



Universidad
de Alcalá

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica e Ingeniería
Química

**Nuevas estrategias electrocinéticas y
nuevas aportaciones a la detección
electroquímica en microchips de
electroforesis capilar basadas en el
empleo de nanotubos de carbono y otras
nanoestructuras**

Tesis doctoral

Agustín González Crevillén

Alcalá de Henares, julio de 2009

**Jesús Alberto Escarpa Miguel, Profesor Titular de Química Analítica de la
Universidad de Alcalá,**

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado **“NUEVAS ESTRATEGIAS ELECTROKINÉTICAS Y NUEVAS APORTACIONES A LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN MICROCHIPS DE ELECTROFORESIS CAPILAR BASADAS EN EL EMPLEO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y OTRAS NANOESTRUCTURAS”**, ha sido realizado bajo su dirección por D. Agustín González Crevillén, en el Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la Facultad de Química de la Universidad de Alcalá. Asimismo, autorizo su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Alcalá de Henares a 3 de Julio de 2009.

**María Luisa Marina Alegre, Catedrática de Universidad de Química Analítica
y Directora del Departamento de Química Analítica e Ingeniería Química de la
Universidad de Alcalá,**

CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado **“NUEVAS ESTRATEGIAS ELECTROKINÉTICAS Y NUEVAS APORTACIONES A LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN MICROCHIPS DE ELECTROFORESIS CAPILAR BASADAS EN EL EMPLEO DE NANOTUBOS DE CARBONO Y OTRAS NANOESTRUCTURAS”**, ha sido realizado en este Departamento por D. Agustín González Crevillén bajo la dirección del Dr. Jesús Alberto Escarpa Miguel, Profesor Titular de dicho Departamento. Asimismo, autorizo su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente en Alcalá de Henares a 3 de Julio de 2009.

Resulta difícil empezar a escribir estos agradecimientos cuando ha habido tanta gente que me ha apoyado a lo largo de este camino. De cualquier modo, no sería justo si a la primera persona que mencionara no fuera a Alberto, mi director de Tesis y, con el paso del tiempo, un gran amigo. Él fue quién, en momentos de dudas personales y tras un encuentro casual, me ilusionó de nuevo por el conocimiento, por la ciencia, por la investigación y, por qué no decirlo, por la vida, porque Alberto es una de esas personas que hacen cambiar las cosas. Muchas gracias por todo.

Este encuentro originó otra serie de ellos siendo uno de los primeros, que nunca olvidaré, el de Cristina. Gracias por todas las discusiones científicas que hemos tenido, por tu ayuda y compañía, especialmente, en esas largas tardes de invierno trabajando en el laboratorio.

Toñín, mi primer compañero del laboratorio, gracias por tus enseñanzas y, sobre todo, por brindarme desde un primer momento tu amistad. Al final, nos quedamos con las ganas de dejar caer al suelo un microchip de vidrio.

Mirian, mi joven padawan, espero que aprendieras o recibieras algo bueno de mí, yo, por mi parte, siempre recibí tu alegría y apoyo en todo momento.

A todos los compañeros y amigos que he ido conociendo a lo largo de mi estancia en el laboratorio, María, Carmen, Inés, Mónica, Virginia (Guadalajara), Ana, Elena, Laura, Cristina, Clara, Virginia (País Vasco), Niky, Miguel... y algún otro que se me haya olvidado muchísimas gracias a todos por compartir y hacer más llevadera la lucha diaria en el laboratorio y por todas las risas y buenos momentos que hemos pasado, sobre todo, en la hora de la comida.

También, quiero aprovechar este espacio y dar las gracias a todos los profesores y personal del departamento de Química Analítica por su esfuerzo en hacer que funcione el departamento y, de este modo, permitir el desarrollo de ésta y otras Tesis doctorales.

Además, a todo el personal del Servicio de Gestión de la Investigación de la Universidad de Alcalá y, de manera especial, a Lola Morillo y Rafa, decirles que no cambien ya que son los más eficientes, entregados y comprometidos con su trabajo de todo el personal administrativo de la Universidad de Alcalá, además de un gran apoyo para todos los becarios de investigación.

I will never forget the nice people I met in the Bioelectronics and Biosensors Center (Tempe, Arizona, USA). Firstly, Andrea Bulbarello, he was like my brother, I will ever remember your help and good moments we enjoyed together, specially, the pet graveyard and Brice canyon. Sirilak, my boss, Kare and Siriwan, we enjoyed a lot in Las Vegas, and Jared, an excellent poker player and good friend, thank all of you, guys. I am also very thankful to Dr. Wang for the opportunity to work in his lab doing really novel research.

Y como en esta profesión uno se mueve tanto, agradecer a mis nuevos compañeros de trabajo del CSIC, Marita, Raúl, Cristina, Sara y Ángel por aguantar mis últimas correcciones de Tesis que

tanto les comentaba, y a José Carlos y Mercedes por permitirme continuar en el mundo de la investigación.

Quiero terminar estos agradecimientos mencionando a las personas más importantes en mi vida y que siempre han estado conmigo, me han animado y querido, mi familia. Y, por último, a mi mujer, Raquel, por hacer que cada día sea más feliz y haber llenado mi soledad con su presencia. Te quiero mi niña.

"Sin ciencia se congelan las aplicaciones. Sin ciencia se habrían hecho mejores carros de caballos pero nunca los automóviles"

"El punto de partida no es la objetividad sino la creencia apasionada en algo que puede que no exista, pero que merece la pena buscar"

Gerald Holton

Summary

The miniaturization of laboratories (lab-on-a-chip) is, without any doubt, one of the most promising, dynamic and multidisciplinary fields of research in the present scientific scene being the Analytical Chemistry pioneer in this revolution with the introduction of the *micro total analysis system* (μ -TAS) concept in the early 1990s. Indeed, the decrease of the scale could potentially provide some unique benefits for the analysis such as low analysis time, high throughput, low sample and reactive consumption, low waste generation and portability (possibility to perform the analysis *in situ*). Nowadays, after two decades, some of these potential benefits have been managed and they form part of the scientific actuality. Nevertheless, there are still some aspects that have to be solved despite the large volume of research.

On the other hand, the capillary electrophoresis, in connection with lab-on-a-chip world, has been the main protagonist (CE- microchips) due to its easiness of miniaturization without losing analytical performance (analysis time can be reduced to seconds and high separation efficiencies can be achieved using extremely low volume samples). Likewise, the electrokinetic flow in multiple channels on a CE-microchip can be obtained and controlled easily using a few electrodes, avoiding the microfabrication and integration of complex components (micropumps, microvalves, etc.) necessary for hydrodynamic flow.

In addition, the discovery of novel materials, process and phenomena at the nanoscale and the development of new experimental and theoretical techniques for research provide fresh opportunities for the development of innovative nanosystems and nanostructured materials. The application of the nanomaterials and, in general, of the nanotechnology in the field of microfluidics is also revolutionizing the analytical microsystems.

Taking into account that one of most important problem of microfluidic systems, in general, and CE- microchip, in particular, is the low sensitivity due to the extremely small volume of sample introduced (nL-pL), the main objective of this Thesis Doctoral has been to evaluate the possibilities offered by nanomaterials, specially, carbon nanotubes to increase the sensibility in μ CE-ED

looking for synergies between both lab-on-a-chip technology and analytical nanotechnology.

The results showed in this Thesis cover not only the developing of new methods for the determination of the couple arbutin-hydroquinone, vitamins (pyridoxine, ascorbic and folic acids) and polyphenols (arbutin, phloridzin, catechin, rutin and isoflavones) in pharmaceutical and food samples but, also, the improvement of the analytical performance of μ CE-ED by introducing of new methodologies or strategies *on-chip*.

Firstly, the technical possibility of working indiscriminately and/or sequentially with both simple cross-injectors in glass CE microchip was demonstrated. In this way, strategies were designed to carry out a methodological innovation integrating both calibration and analysis on the chip in only one run. The strategy consisted in sequentially using both reservoirs (named calibration and analysis reservoirs) as well as a calibration factor (defined as signal/concentration of standard). The analytical route required 350s in the overall protocol (employing 130 s in calibration plus 130 s in analysis) for water-soluble vitamin determination (B and C vitamin groups) and an improvement over the times used in both conventional and microchip protocols was obtained.

On the other hand, the synergy of CE microchips with carbon nanotube detectors in food analytical science has been explored. Two different carbon electrodes (glassy carbon electrode (GCE) and screen printed electrode (SPE)) were modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and their electrochemical behaviour was evaluated as detectors in CE microchip using water-soluble vitamins (pyridoxine, ascorbic acid and folic acid) in different pharmaceutical formulations. SPE modified with CNTs have become the best approach because of their improvement of sensitivity and lowered LODs with the advantages of easy surface modification, inherent miniaturization and disposability.

Moreover, it was demonstrated that carbon nanotubes (CNTs) possess preferential "electrocatalytic" properties over the oxidation of enediol groups,

establishing a relationship between electrocatalysis and chemical structure, being MWCNT the only material that perfectly joined both a decrease in overpotentials and an enhanced analytical signal selectively over enediol groups. This fact could open up new perspectives in application domains since their inherent behaviour permits direct electrochemical sensing, simplifying the overall detection processes.

Finally, in this research work, fabrication strategies have also been developed for metallic nanowires and their preliminary characterization and potential applications for barcoding and electroanalysis have also been explored.

Taking into account the whole of results obtained in this research work we can conclude (i) carbon nanotubes coupled to the advantages of microchips capillary electrophoresis mentioned above are opening new frontiers in the field of food and pharmaceutical analysis developing new applications due to the synergic effect of analytical miniaturization and nanotechnology and (ii) the fabrication and design of multichannel microchip combined with new methodologies as showed in this work will permit the creation of high throughput miniaturized analytical systems able to carry out simultaneously a great number of analysis for food and pharmaceutical control.

Índice

I. Objetivo y plan de trabajo.....	1
II. Nuevas estrategias electrocinéticas en microchips de electroforesis capilar con detección electroquímica.....	5
II.1.Introducción.....	7
II.1.1. Concepto de “ <i>lab-on-a-chip</i> ”: microchips de electroforesis capilar.....	9
II.1.2. Diseños y principios de los microsistemas de electroforesis capilar con detección electroquímica.....	12
II.1.2.1. <i>Materiales y técnicas de microfabricación.....</i>	<i>13</i>
II.1.2.2. <i>Protocolos electrocinéticos de inyección.....</i>	<i>19</i>
II.1.2.3. <i>Implementación de la detección electroquímica.....</i>	<i>22</i>
II.1.2.4. <i>Materiales electródicos.....</i>	<i>28</i>
II.1.2.5. <i>Modos de detección.....</i>	<i>31</i>
II.1.3. Aplicaciones analíticas.....	37
II.1.3.1. <i>Posibilidades analíticas de los microchips de electroforesis capilar en el ámbito alimentario.....</i>	<i>38</i>
II.1.3.2. <i>Microchips de electroforesis capilar en el ámbito del análisis de alimentos.....</i>	<i>39</i>
II.1.4. Analitos estudiados.....	59
II.1.4.1. Vitaminas.....	59
II.1.4.1.a. <i>Definición, clasificación y características generales de las vitaminas.....</i>	<i>59</i>
II.1.4.1.b. <i>Fuentes de vitaminas.....</i>	<i>62</i>
II.1.4.1.c. <i>Estructura química y propiedades de las vitaminas hidrosolubles estudiadas.....</i>	<i>63</i>
II.1.4.2. Compuestos polifenólicos.....	68
II.1.4.2.a. <i>Definición, clasificación y propiedades generales de los compuestos polifenólicos.....</i>	<i>68</i>
II.1.4.2.b. <i>Estructura química y propiedades específicas de las polifenoles estudiados.....</i>	<i>71</i>

II.2. Parte experimental.....	77
II.2.1. Reactivos y muestras.....	79
II.2.2. Instrumentos y electrodos.....	79
II.2.3. Microchip para electroforesis capilar con detección electroquímica: Descripción del sistema utilizado en el presente trabajo.....	80
II.2.4. Procedimientos.....	82
II.2.4.1. Preparación de patrones.....	82
II.2.4.2. Preparación de muestras.....	83
II.2.4.3. Limpieza del electrodo de disco de carbono vitrificado.....	84
II.2.4.4. Protocolo de trabajo.....	84
II.3. Resultados y discusión.....	87
II.3.1. Propuesta y desarrollo de una ruta analítica para el <i>screening</i> rápido de hidroquinona y arbutina en muestras reales. Evaluación del protocolo de inyección electrocinética.....	89
II.3.1.1. Optimización de la separación y detección de los analitos.....	89
II.3.1.2. Comportamiento analítico del método.....	92
II.3.1.3. Aplicación del método para el análisis de muestras reales.....	93
II.3.1.4. Evaluación del protocolo de inyección electrocinética: posibilidad técnica del uso de ambos inyectores en microchip de cruz sencilla.....	96
II.3.2. Determinación de vitaminas hidrosolubles en preparados farmacéuticos usando μ CE-ED. Propuesta y aplicación de una nueva estrategia analítica <i>on-chip</i> : Calibración integrada.....	101
II.3.2.1 Optimización de la detección electroquímica.....	102
II.3.2.2. Optimización de la separación electroforética.....	107
II.3.2.3. Comportamiento analítico del método.....	112
II.4. Conclusiones.....	123
II.5. Bibliografía.....	127

III. Nuevas aportaciones a la detección electroquímica en microchips de electroforesis capilar basados en el empleo de nanotubos de carbono y otros nanoestructuras	143
III.1.Introducción.....	145
III.1.1. Nanomateriales.....	147
III.1.2. Nanotubos de carbono.....	149
<i>III.1.2.1. Propiedades generales, métodos de fabricación y manipulación.....</i>	<i>149</i>
<i>III.1.2.2. Aplicaciones de los CNTs en electroanálisis.....</i>	<i>154</i>
<i>III.1.2.3. Nanotubos de carbono y sistemas microfluídicos de separación.....</i>	<i>157</i>
III.1.3. Nanohilos.....	161
<i>III.1.3.1. Propiedades generales, métodos de fabricación y manipulación.....</i>	<i>161</i>
<i>III.1.3.2. Aplicaciones analíticas de los nanohilos.....</i>	<i>166</i>
<i>III.1.3.3. Nanohilos y sistemas microfluídicos de separación.....</i>	<i>168</i>
III.2.Parte experimental.....	171
III.2.1. Nanotubos de carbono.....	173
<i>III.2.1.1. Reactivos.....</i>	<i>173</i>
<i>III.2.1.2. Instrumentos y electrodos.....</i>	<i>174</i>
<i>III.2.1.3. Procedimientos.....</i>	<i>175</i>
III.2.2. Nanohilos.....	176
<i>III.2.2.1. Reactivos.....</i>	<i>176</i>
<i>III.2.2.2. Instrumentos y electrodos.....</i>	<i>176</i>
<i>III.2.2.3. Procedimientos.....</i>	<i>178</i>
III.3. Resultados y discusión.....	181
III.3.1. Nanotubos de carbono como detectores electroquímicos para microchips de electroforesis capilar.....	183

III.3.1.1. Elección del soporte electródico para la modificación con nanotubos de carbono.....	183
III.3.1.2. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafiados modificados con CNTs para la determinación de vitaminas en preparados farmacéuticos.....	188
III.3.1.3. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafiados modificados con CNTs para la determinación de antioxidantes naturales en alimentos.....	196
III.3.1.4. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafiados modificados con CNTs para la determinación de isoflavonas totales en alimentos.....	205
III.3.1.5. Estudio fundamental sobre el comportamiento electrocatalítico preferente de los nanotubos de carbono sobre compuestos que poseen grupos enodiol.....	211
III.3.2. Diseño y fabricación de nanohilos como nuevas herramientas analíticas.....	225
III.3.2.1. Fabricación de nanohilos multi-segmento de oro y plata para desarrollar sistemas codificados o “códigos de barras”.....	227
III.3.2.2. Fabricación de nanohilos de níquel y su exploración inicial como detectores electroquímicos en microchip de electroforesis capilar.....	232
III.4. Conclusiones.....	241
III.5. Bibliografía.....	247
IV. Conclusiones generales.....	257
V. Anexos.....	261

V.1. Composición del material secundario de referencia suministrado por Exxentia.....	263
V.2. Acrónimos.....	267
V.3. Producción científica fruto de esta memoria.....	271

I. Objetivo y plan de trabajo

Conscientes de que una de las problemáticas más importantes de los sistemas microfluídicos, en general, y de los microchips de electroforesis capilar, en particular, es la baja sensibilidad analítica, debido a los extremadamente pequeños volúmenes de muestra introducidos en los mismos (nL-pL), el objetivo central de este trabajo de investigación reside en explorar las posibilidades que ofrecen los nuevos materiales de la nanotecnología moderna en referencia directa a la mejora de la sensibilidad. En consecuencia, se podría decir que, este objetivo tuvo como vocación avanzar hacia la búsqueda de sinergias entre la tecnología “*lab-on-a-chip*” y la nanotecnología analítica.

En este sentido y en un mayor grado de concreción, el objetivo central de este trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral ha sido estudiar las posibilidades analíticas que ofrecen los nanotubos de carbono, como verdaderos promotores de la nanotecnología moderna, para mejorar la sensibilidad en microchips de electroforesis capilar con detección electroquímica.

De este objetivo central, se ha derivado otro no menos importante que ha sido la caracterización analítica de los nanotubos de carbono como nuevas herramientas analíticas en aras de comprender mejor sus propiedades y poder explotarlas adecuadamente en el ámbito del Electroanálisis, del que podría decirse que ha experimentado un Renacimiento con la incorporación de la nanotecnología a la escena científica contemporánea.

Asimismo y de manera paralela a este objetivo central, se planteó un objetivo común de mejora de los protocolos electrocinéticos básicos de manipulación de fluidos en microchips de electroforesis capilar, tales como el estudio del protocolo de inyección electrocinética, el desarrollo de nuevas separaciones electroforéticas de analitos de interés farmacéutico y alimentario así como la posibilidad de integrar protocolos de calibración en el desarrollo de las metodologías con el fin de hacer más versátil el empleo de estos microsistemas. Este objetivo, finalmente, se ha mantenido de manera transversal a lo largo de todo el trabajo de investigación que se presenta.

Finalmente, un tercer objetivo ha sido la puesta en marcha de una nueva fase de investigación que ha consistido en la fabricación de otras nanoestructuras como nanohilos metálicos y la exploración inicial de su potencial analítico en el ámbito fundamentalmente de los microchips de electroforesis capilar.

Para alcanzar los objetivos anteriormente expuestos, se desarrolló el siguiente plan de trabajo:

- 1- Optimización de metodologías electrocinéticas de inyección, separación y calibración metodológica explorando las posibilidades analíticas que ofrecen los microchips de electroforesis capilar con diseño de cruz sencilla.
- 2- Estudio de las posibilidades de los nanotubos de carbono como nuevos detectores electroquímicos en microchips de electroforesis capilar. Con tal motivo, se han abordado las siguientes etapas:
 - (i) estudio del soporte electródico más adecuado para llevar a cabo la modificación con nanotubos de carbono explorándose electrodos convencionales de disco de carbono vitrificado y electrodos serigrafados de carbono.
 - (ii) estudio del tipo de nanotubo de carbono más adecuado, explorándose los nanotubos de pared simple y multipared de diferentes longitudes.
 - (iii) evaluación del potencial analítico en los dominios cualitativo y cuantitativo del análisis.
 - (iv) aplicación analítica a un conjunto de analitos importante dentro del ámbito del análisis farmacéutico y alimentario.
- 3- Caracterización analítica de los nanotubos de carbono mediante técnicas físicas y electroquímicas.
- 4- Puesta a punto de un método de fabricación de nanohilos metálicos así como la caracterización preliminar de los mismos y el estudio de sus posibilidades en los ámbitos del análisis farmacéutico y/o alimentario.

**II. Nuevas estrategias
electrocinéticas en microchips de
electroforesis capilar con detección
electroquímica**

II.1. Introducción

II.1.1. Concepto de “*lab-on-a-chip*”: microchips de electroforesis capilar.

El concepto μ -TAS fue introducido y desarrollado a partir de la modificación del sistema de análisis total (TAS) mediante la disminución del escalado e integración de sus múltiples etapas (inyección, reacción, separación, detección) en un único dispositivo, dando lugar a un sistema de prestaciones similares a un sensor con tiempo de respuesta rápido, bajo consumo de muestra, funcionamiento *in situ*, y alta estabilidad [1, 2]. Posteriormente, se introdujo el término “*lab-on-a-chip*” para aunar el hecho de que en estos dispositivos no sólo se podían llevar a cabo tareas analíticas sino también otras tales como la síntesis de compuestos y el control de reacciones químicas [3, 4]. Actualmente, cada uno de los términos mencionados anteriormente se utiliza de manera indistinta.

La miniaturización de los sistemas analíticos no es simplemente una reducción de la escala debido a que esta reducción implica cambios en las fuerzas y procesos que intervienen en dichos sistemas. Una de las características más relevantes de los microsistemas analíticos es la omnipresencia del flujo laminar (número de Reynolds extremadamente pequeños), en el cual las fuerzas viscosas dominan sobre las de inercia. Esto implica que no se generan turbulencias y que el mezclado de las moléculas se produce solamente por difusión, lo que influye notablemente en los diseños de estos microsistemas. La otra característica especial es la posibilidad de manipular fluidos en la escala del nanolitro e incluso del picolitro lo cual ha desembocado en la ampliación del término μ -TAS hacia los llamados sistemas microfluídicos. La microfluídica es la ciencia y tecnología de los sistemas que procesan o manipulan volúmenes de fluidos del orden de 10^{-9} a 10^{-18} L usando canales que van desde decenas hasta cientos de micras [5, 6].

La búsqueda y desarrollo de sistemas *lab-on-a-chip* se perfila como una de las grandes líneas de investigación multidisciplinarias y, como prueba de ello, destacar el capítulo especial que dedicó la revista *Nature* en el 2006 (vol.442, issue 7101, *Insight*, pag. 367-412) y la aparición de una nueva revista científica en el año 2000 (*lab-on-a-chip*) dedicada exclusivamente a esta área de investigación.

Centrándonos en el concepto μ -TAS, se ha producido, como era de esperar, un enorme crecimiento en el interés por el desarrollo de sistemas analíticos que utilicen formatos miniaturizados [7, 8]. Las ventajas de un μ -TAS son aquellas derivadas de la

disminución de la escala que pueden ser resumidas así: análisis más rápido, portabilidad (descentralización del análisis químico), reducción del consumo de muestra y reactivos (disminución del coste), así como la reducción de desechos (protección del medio ambiente), automatización del análisis químico, alto rendimiento (posibilidad de procesar muestras en paralelo) y la posibilidad de llevar a cabo el análisis *on line* [7, 8].

Recientes revisiones bibliográficas [5, 6] afirman que tras dos décadas desde la introducción del concepto de μ -TAS, el campo de la microfluídica no ha avanzado todo lo que cabría esperar al no haber sido posible todavía la integración total de todos sus componentes en un sistema funcional y, además, sigue siendo una utopía la posibilidad de ser utilizada por gente inexperta. Asimismo, Haeberle y Zengerle [9] han destacado desde un punto de vista tecnológico que la práctica y esfuerzo de ensamblar componentes discretos, al menos en el campo de las aplicaciones *lab-on-a-chip*, pertenece al pasado y no se puede esperar que continúe en el futuro, afirmando claramente que la comunidad científica necesita validar plataformas microfluídicas fáciles de operar que, además, sean fabricadas de manera estándar y a un coste asequible para que, finalmente, sean comercializadas y utilizadas por la sociedad.

A pesar de las debilidades citadas anteriormente, los microchips de electroforesis capilar, como componente importante del campo de la microfluídica, son el mejor ejemplo de madurez alcanzada en el dominio del *lab-on-a-chip* constituyéndose como uno de los padres de la microfluídica y, actualmente, el ejemplo más representativo de los microsistemas analíticos [6, 10-12].

En el campo del μ -TAS, los microchips de CE han sido indudablemente los que han avanzado más rápidamente y la rama más fructífera hasta el momento. El predominio de las separaciones electroforéticas sobre otras técnicas de separación se debe principalmente a la inherente simplicidad de fabricación y funcionamiento de los microchips de CE combinado con las características únicas de la CE con respecto a la velocidad de separación, inyección de muestra y consumo de reactivos [10, 12].

Los microchips de CE emplean canales grabados en un sustrato plano utilizando técnicas de microfabricación desarrolladas en la industria de los semiconductores. Las primeras aplicaciones de estos microsistemas empleaban obleas de vidrio o cuarzo porque son ópticamente transparentes y presentan un buen flujo electroosmótico [13-

15]. Desde entonces, se han investigado otros materiales incluyendo polímeros y cerámicas. Los microcanales son fabricados en los microchips utilizando fotolitografía o micromoldeado para formar los canales para la inyección de muestra, la separación por electroforesis capilar y la detección de los analitos. Una vez que todas las disoluciones, incluyendo las correspondientes a las muestras, son introducidas en el microcanal (habitualmente son transferidas electrocinéticamente), sus componentes son separados aplicando un alto voltaje y, después, detectados utilizando un sistema de detección adecuado.

Los microchips de CE, como μ -TAS en sí mismos que son, tienen además el potencial de analizar secuencialmente cientos de muestras en cuestión de pocos minutos. La velocidad de análisis combinada con la posibilidad de realizar análisis en paralelo, podría dar lugar a rendimientos de análisis muy altos. Estos microchips normalmente consumen sólo picolitros de muestra y potencialmente podrían ser fabricados incorporando una integración completa para la preparación de muestra, separación y detección. Una ventaja clave para el empleo de estos dispositivos es su facilidad de fabricación y que, además, las técnicas de microfabricación pueden ser adaptadas para la producción en serie. Por lo tanto, todas estas características hacen que los microchips de CE sean una tecnología atractiva para la siguiente generación de instrumentación de electroforesis capilar [13-15].

Por otra parte es importante señalar que en la mayoría de las aplicaciones de microchips de CE se ha utilizado detección por fluorescencia inducida por láser (LIF) [16] porque el láser puede ser fácilmente enfocado sobre el microcanal de separación y también por los bajos límites de detección que se alcanzan con esta técnica. Sin embargo, los microchips de CE con detección LIF tienen algunas desventajas, entre ellas, el hecho de que la mayor parte de compuestos no poseen ningún grupo funcional fluorescente necesitándose, por tanto, el uso de un fluoróforo adecuado. Estos fluoróforos son, a menudo, muy voluminosos y suelen eliminar al menos un grupo cargado. Este hecho puede provocar que los analitos de interés presenten movibilidades electroforéticas similares por lo que para usar la detección LIF con eficacia puede ser necesario un canal de separación más largo o un esquema con derivatización post-columna. Aunque el LIF ofrece una alta sensibilidad, sin embargo, requiere una instrumentación de control muy voluminosa que compromete

enormemente las ventajas de la miniaturización. Es importante subrayar que el éxito de la detección LIF es, en gran parte, debido a su alta sensibilidad, pero también al hecho de que especies bioquímicamente relevantes pueden ser derivatizadas fácilmente con un marcador fluorescente (por ejemplo, ADN y proteínas). Sin embargo, la técnica no se puede llevar a cabo fácilmente para otros compuestos por lo que la detección por fluorescencia directa no puede ser considerada como una técnica universal. Por lo tanto, no es sorprendente que, con el objetivo de ampliar el empleo de dispositivos microfluídicos más allá de las aplicaciones bioquímicas ahora establecidas, se esté prestando mucha atención al desarrollo de otros métodos de detección basados, por ejemplo, en técnicas electroquímicas.

La detección electroquímica ofrece grandes promesas para estos microsistemas, con características que incluyen: una notable sensibilidad (acercándose a la de fluorescencia), la inherente miniaturización tanto del detector como de la instrumentación de control, respuestas no dependientes de la longitud del camino óptico o de la turbidez de la muestra, bajo coste y alta compatibilidad con microinstrumentación y tecnologías de microfabricación [16-22].

La detección electroquímica a menudo ha sido considerada incompatible con CE porque se ha visto como un conflicto la combinación de los altos voltajes aplicados en la separación electroforética con los mucho menores aplicados en los electrodos del detector. Sin embargo, en electroforesis capilar miniaturizada se ha encontrado que, con diseños apropiados de la célula de detección, el voltaje de separación no interfiere con la medida electroquímica.

El protagonismo claro de la detección electroquímica en los sistemas miniaturizados de CE queda reflejado en las excelentes revisiones aparecidas en la literatura sobre microchips de CE con detección electroquímica (ED) [17-22], discutiendo los avances más recientes en las diferentes modalidades de este tipo de detección, así como las ventajas y las debilidades de estas propuestas.

II.1.2. Diseños y principios de los microsistemas de electroforesis capilar con detección electroquímica.

En la **figura 1** se muestra un diseño típico de un microchip de CE ((A) inyector de cruz sencilla y (B) inyector de doble T) mostrando una red de canales con una anchura

que varía entre 10 y 100 μm y con canales de separación entre 3 y 10 cm de longitud. En una configuración típica podemos encontrar depósitos (reservorios) para la introducción de muestra (S), para el tampón de separación (RB) y para el desecho (SW). El volumen de los depósitos normalmente tiene una capacidad comprendida entre 10-250 μL . En los depósitos se colocan electrodos de platino sobre los que se aplican una diferencia de potencial mediante una fuente de alto voltaje (1-5kV) para llevar a cabo la inyección de muestra y la separación electroforética. La detección electroquímica utilizada normalmente es amperométrica, empleando un sistema de tres electrodos. Los electrodos de referencia son, por lo general, de Ag/AgCl y como contraelectrodos se utilizan hilos de platino.

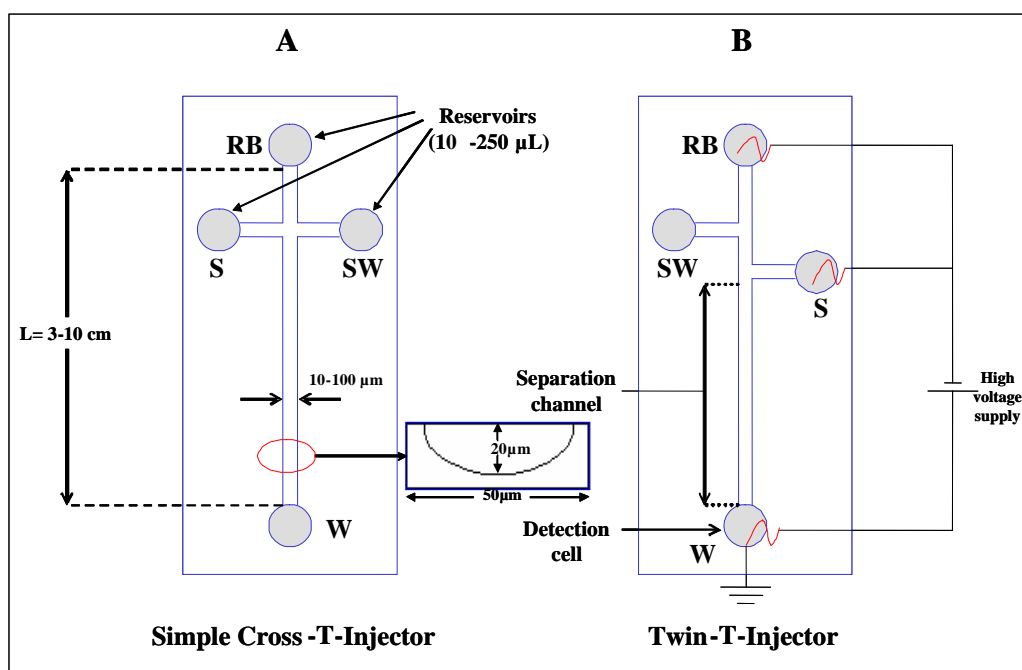


Figura 1. Diseños de microchip de cruz sencilla (A) y doble T (B) indicándose a su vez dimensiones y conexiones. Leyenda: RB, tampón de separación; S, muestra; SW, desecho de muestra y W, desecho principal y célula de detección.

II.1.2.1. Materiales y técnicas de microfabricación.

La descripción exacta y profunda de las técnicas de microfabricación obviamente está fuera del ámbito de este capítulo, pudiéndose encontrar más información en excelentes libros [3, 23]. Sin embargo, ya que uno de las características más atractivas de la detección electroquímica en microchips es su compatibilidad con las tecnologías

de microfabricación, se ha creído conveniente explicar brevemente dichas técnicas de microfabricación.

Para la fabricación de microchips de CE se utilizan diferentes materiales [3, 14], fundamentalmente vidrio y determinados polímeros. Las obleas de vidrio son las más comunes debido a: (i) sus buenas propiedades ópticas (transparencia), (ii) su resistencia a muchas sustancias químicas, (iii) presentan un buen flujo electroosmótico (EOF) (próximo al de la sílice fundida $\approx 9.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ a $\text{pH} > 9$), (iv) poseen propiedades dieléctricas (posibilidad de trabajar con los altos voltajes usados en electroforesis capilar) y (v) existen métodos de microfabricación bien desarrollados (adaptados de la industria de microfabricación de silicio). Otras ventajas del vidrio son su dureza, la alta estabilidad térmica y la biocompatibilidad (amplia gama de aplicaciones: separaciones de ADN, enzima/immunoensayos, células biológicas).

Varios materiales poliméricos han sido también usados para fabricar microchips de CE, siendo los más empleados el PMMA (polimetilmetacrilato) como ejemplo de material termoplástico (disponible a partir de una amplia gama de métodos de microfabricación), y PDMS (polidimetilsiloxano) como ejemplo de un elastómero [3, 24].

Los polímeros también presentan buena resistencia al tratamiento químico y buena biocompatibilidad. Es posible encontrar un polímero que tenga las características ópticas deseadas para una aplicación dada (por ejemplo, el PDMS es transparente en la región UV del espectro electromagnético mientras la mayor parte de polímeros termoplásticos, como PMMA y PC (policarbonato), son transparentes en la región visible). Con respecto a la generación de EOF cabría esperar, sin embargo, una clara desventaja frente al que presentan los microchip de vidrio, debido a que muchos polímeros no contienen grupos funcionales ionizables (algo que sí ocurre en el vidrio), por lo que cabría esperar que se produjeran EOFs mucho más pequeños. Sin embargo, bajo técnicas de microfabricación controladas, es posible generar EOF aceptable para distintos polímeros: $\approx 2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ para PMMA [25], $3.15 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ para PET [26], $2.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ para PC [27], $\approx 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ para poliéster [28] y $3.7 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ para TOPAS [29], siendo todos ellos inferiores al del vidrio.

Para aumentar o modificar el EOF de los polímeros se han desarrollado distintas estrategias que se pueden agrupar en dos tipos. En el primer grupo estarían los

tratamientos físicos con fuentes de alta energía, entre los que nos encontramos el tratamiento de la superficie del PDMS con una descarga de plasma oxidándose los grupos $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2\text{O}$ a $\text{OSi}(\text{OH})_{4-n}$ que son fácilmente ionizables [30] y el tratamiento del PMMA con un láser de radiación UV con lo que se consigue un aumento de un 4% del flujo electroosmótico [31]. En el segundo grupo, nos encontraríamos las modificaciones químicas de la superficie del polímero añadiendo distintos grupos funcionales como grupos amino [32] vía aminólisis o grupos octadecilo [33] utilizando el reactivo n-octadecilisocianato. También se ha conseguido modificar la superficie de un microchip de policarbonato tratándola con trióxido de azufre, aumentándose de este modo la hidrofiliidad por sulfonación de los anillos aromáticos presentes en el polímero [34]. Además, Wang y colaboradores [35] han desarrollado un nuevo método para manipular el EOF en un microchip de PMMA. El proceso consiste en introducir un modificador orgánico en la disolución de monómero antes de la polimerización, es decir, la modificación del EOF se realiza durante el proceso de fabricación del microchip y no después, como ocurre en el resto de métodos, simplificándose el proceso. Con esta estrategia se consiguió un incremento del EOF de $2.12 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ a $4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ añadiendo ácido metilacrílico (6%) a la disolución de monómero y una inversión del flujo ($-5.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V.s}$ a pH 3) añadiendo un 3% de aminoetilmetacrilato.

Por último, indicar que el interés por los microchips de polímeros también ha aumentado debido a que los bajos costes de fabricación hacen que puedan ser desechables. La combinación de los bajos costes de microfabricación de polímeros con el bajo precio de los detectores electroquímicos podría dar lugar al verdadero *lab-on-a-chip* desechable.

A continuación, se van a describir los aspectos más importantes involucrados en las tecnologías de microfabricación tanto de microchips de vidrio como de polímeros.

Fabricación de microchips de vidrio

En la fabricación de los microchips de vidrio, las estructuras se generan normalmente sobre obleas de vidrio utilizando tecnologías fotolitográficas estándar [3, 23, 36-39]. La **figura 2A** presenta un ejemplo del procedimiento de fabricación.

En primer lugar, se deposita sobre la oblea una capa *sacrificial* (Cr/Al) (**fig.2A: deposition**). A continuación, sobre ésta se deposita el material fotosensible, el cual es

un polímero que se hace soluble (desarrollo positivo) o insoluble (desarrollo negativo) en disoluciones reveladoras después de la exposición a la luz (**fig. 2A: exposition light**). En el siguiente paso, el material fotosensible es expuesto a la luz en la región definida por una fotomáscara, normalmente usando un alineador. La fotomáscara es una placa con un molde diseñado que es transparente mientras el fondo es opaco (o viceversa) a la exposición de la luz. Después de que el microchip es tratado para endurecer el material fotosensible no expuesto a la luz, el material fotosensible expuesto es disuelto con una disolución reveladora (**fig. 2A: development**). La capa de máscara *sacrificial* (Cr/Al) de la región expuesta es retirada usando productos apropiados (**fig. 2A: sacrificial layer removing**), permaneciendo intacta la capa *sacrificial* situada debajo del material fotosensible no expuesto a la luz.

Después del desarrollo de los microcircuitos en el material fotosensible, estos se han de transferir al sustrato mediante técnicas de grabado (**fig. 2A: glass etching**). El principal reactivo utilizado para el grabado es HF, el cual puede ser preparado en varias disoluciones que incluyen HF/NH₄F, HF/HNO₃HF/NH₄F, HF/HNO₃, y HF concentrado. La velocidad de grabado del vidrio con HF es fácilmente controlable si se controla la temperatura. Después del grabado de los microcanales, se retira la capa del material fotosensible y de la máscara *sacrificial* (**fig. 2A: stripping**), y se perforan los depósitos de entrada (no mostrado en la figura). Los depósitos de entrada pueden ser perforados sobre el sustrato grabado o sobre otra oblea de vidrio. Cuando los depósitos son perforados sobre obleas grabadas es mucho más fácil alinear los sustratos para enlazarlos. Por último, el sustrato que contiene los microcanales se sella con otra pieza de sustrato para formar el microchip (**fig. 2A: bonding**) [3, 14].

Fabricación de microchips de polímeros

Los dos modos principales de fabricar microchips de polímeros son por replicado de un molde maestro (métodos de moldeado) y por fabricación directa [3, 23]. Los métodos de moldeado implican fundamentalmente dos pasos: (i) fabricación del molde (también conocido como molde maestro), y (ii) transferencia de los canales diseñados desde el molde a los sustratos poliméricos. Por otra parte, los métodos directos de fabricación consisten en la eliminación del polímero en los sitios donde las

microestructuras (microcanales, depósitos) deben estar localizadas. Este tipo de microfabricación se lleva a cabo mediante ablación con láser [14, 41, 42].

Dentro de los métodos por moldeado existen fundamentalmente tres tipos: grabado en caliente [14, 43], moldeado por inyección [14, 44] y por curado [14, 23, 40].

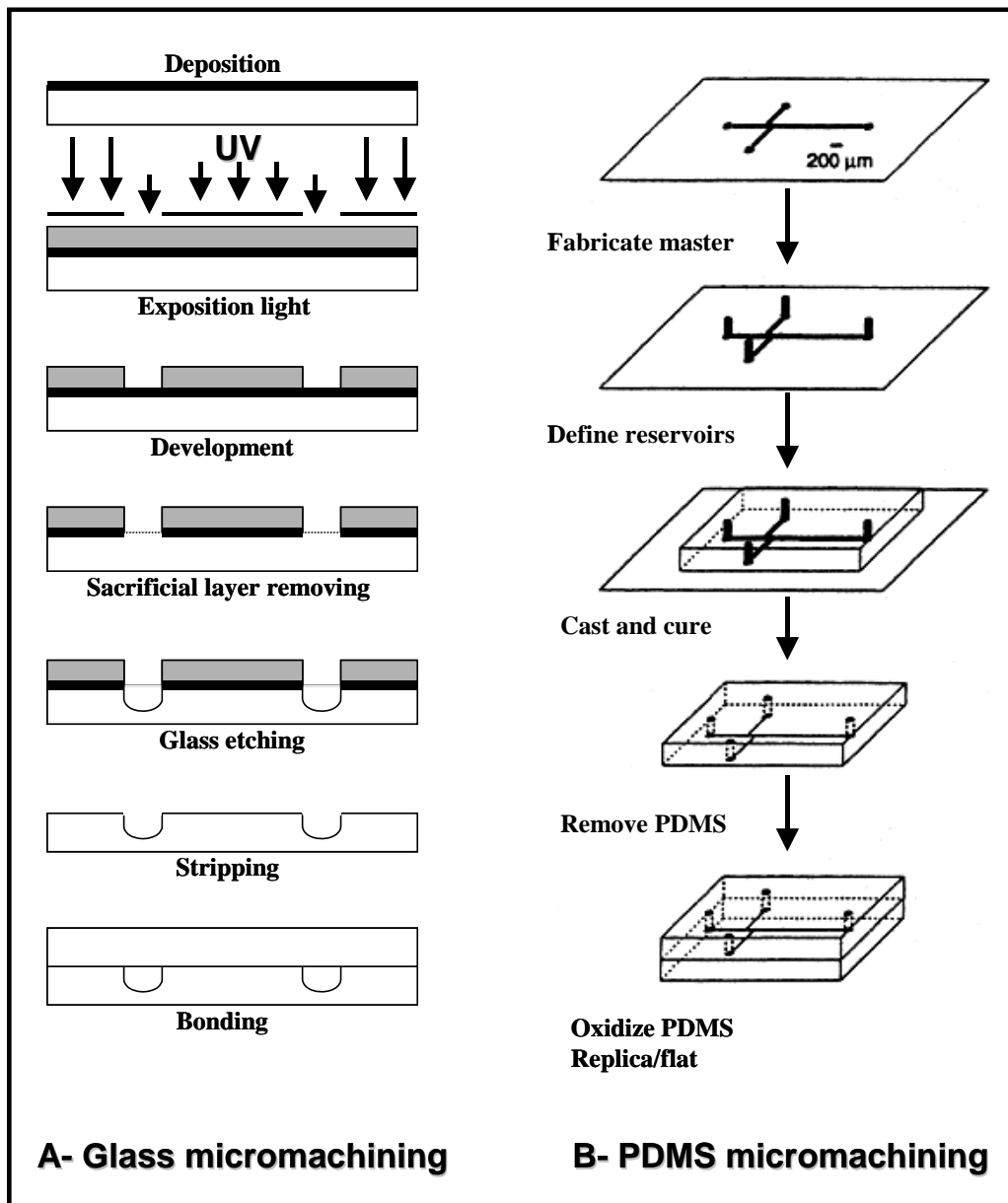


Figura 2. Secuencia esquemática del proceso de fabricación de microcanales en vidrio (A) [3] y PDMS (B) [40].

El grabado en caliente es el proceso en el cual se presiona un molde en un termoplástico que ha sido ablandado al ser calentado y seguidamente se enfría

produciendo una réplica invertida del molde. El primer paso en el grabado en caliente consiste en calentar el molde y el polímero a la temperatura de transición vítrea (T_g). Una vez que el polímero comienza a ablandarse toma la forma del molde. Entonces el molde y el polímero son enfriados por debajo de la temperatura de transición vítrea para endurecer el polímero, y después el polímero se retira del molde. El grabado puede tardar varios minutos por dispositivo y puede ser una herramienta útil para preparar de forma rápida prototipos de dispositivos [43].

En la técnica de moldeado por inyección, en primer lugar, se inyecta el material polimérico fundido sobre el molde, el cual se encuentra a una temperatura alta para prevenir que el material polimérico inyectado se endurezca demasiado pronto [42]. A continuación, el molde se enfría lentamente para que el polímero se endurezca y la microestructura de polímero pueda ser retirada del molde. El moldeado por inyección permite un rendimiento de producción muy alto con bajos costes de producción (un dispositivo cada 5-10 s) [44].

El moldeado por curado emplea, sin embargo, un proceso químico para endurecer el polímero [23]. Dos componentes, una base y un endurecedor o curador, son mezclados justo antes de ser usados. Inmediatamente después de ser mezclados empieza el proceso de curado químico. La mezcla líquida es vertida en el molde y el polímero toma la forma de éste. Después de algún tiempo, este proceso termina con el endurecimiento del polímero (a presión y temperatura controladas) y la estructura de polímero puede entonces ser retirada del molde. Esta técnica es muy popular, especialmente con elastómeros como el PDMS, porque es el más sencillo de los tres procesos de moldeado pero requiere el contacto con el molde durante minutos u horas.

En la **figura 2B** se muestra una representación esquemática del proceso de fabricación de moldeado por curación [40]. Los canales en PDMS se forman fácilmente como réplica del molde maestro, es decir, simplemente se genera una réplica negativa del molde al verter el prepolímero de PDMS sobre dicho molde y la posterior curación a presión atmosférica con temperaturas algo elevadas. En el último paso, la réplica de PDMS que contiene la red de canales es sellada de forma irreversible con una segunda oblea de PDMS. En el ejemplo mostrado, el sellado se debe a la oxidación de ambas superficies con una descarga de plasma de oxígeno. La oxidación proporciona un

sellado más fuerte, resulta más fácil llenar los canales de PDMS oxidado con los fluidos, y como se ha explicado anteriormente, se generan mayores EOFs catódicos, lo que es coherente con el hecho de tener una superficie cargada más negativamente después de la oxidación.

Por otra parte, la microfabricación con láser (fotoablación) es un método de fabricación directo basado en la eliminación controlada de material polimérico usando una radiación intensa UV o infrarroja proporcionada por un láser. El proceso de fotoablación implica la absorción de la radiación de un láser de longitud de onda corta (alta energía) para romper enlaces covalentes en moléculas de polímero de cadena larga con la producción de una onda de choque que elimina de forma controlada fragmentos de polímero descompuestos [3, 14, 23]. Muchos polímeros comercialmente disponibles pueden ser tratados con este método, incluyendo el policarbonato, el polimetilmetacrilato (PMMA), el poliestireno, nitrocelulosa y politetrafluoroetileno [24, 41]. Las estructuras resultantes se caracterizan generalmente por haber sufrido poco daño térmico, por tener paredes verticales rectas y la profundidad bien definida [45]. Sin embargo, este método no se presta para la producción en serie.

II.1.2.2. Protocolos electrocinéticos de inyección.

Un aspecto muy importante dentro de los microsistemas de CE es la introducción con reproducibilidad de volúmenes muy bien definidos y extremadamente pequeños (pL-nL) dentro de los microcanales. La inyección de un volumen bien definido y reproducible en el canal de separación tiene suma importancia en la eficacia de la separación y la sensibilidad de la detección.

Los inyectores integrados son aquellos formados por el cruce ortogonal del canal de separación con un canal que conecta la muestra con el desecho (inyector en T (**fig. 1A**), inyectores de doble T (**fig. 1B**)). Los inyectores de muestra integrados permiten la inyección electrocinética de pequeños volúmenes de muestra con reproducibilidad [15].

Tres metodologías diferentes de inyección han sido empleadas con microchips de CE-ED: *unpinched* [17, 46-48], *pinched* [3, 17, 47, 49] y *gated* [3, 17, 50]. En todas

estas propuestas el depósito de detección se mantiene conectado a tierra. Estas estrategias se ilustran en la **figura 3**.

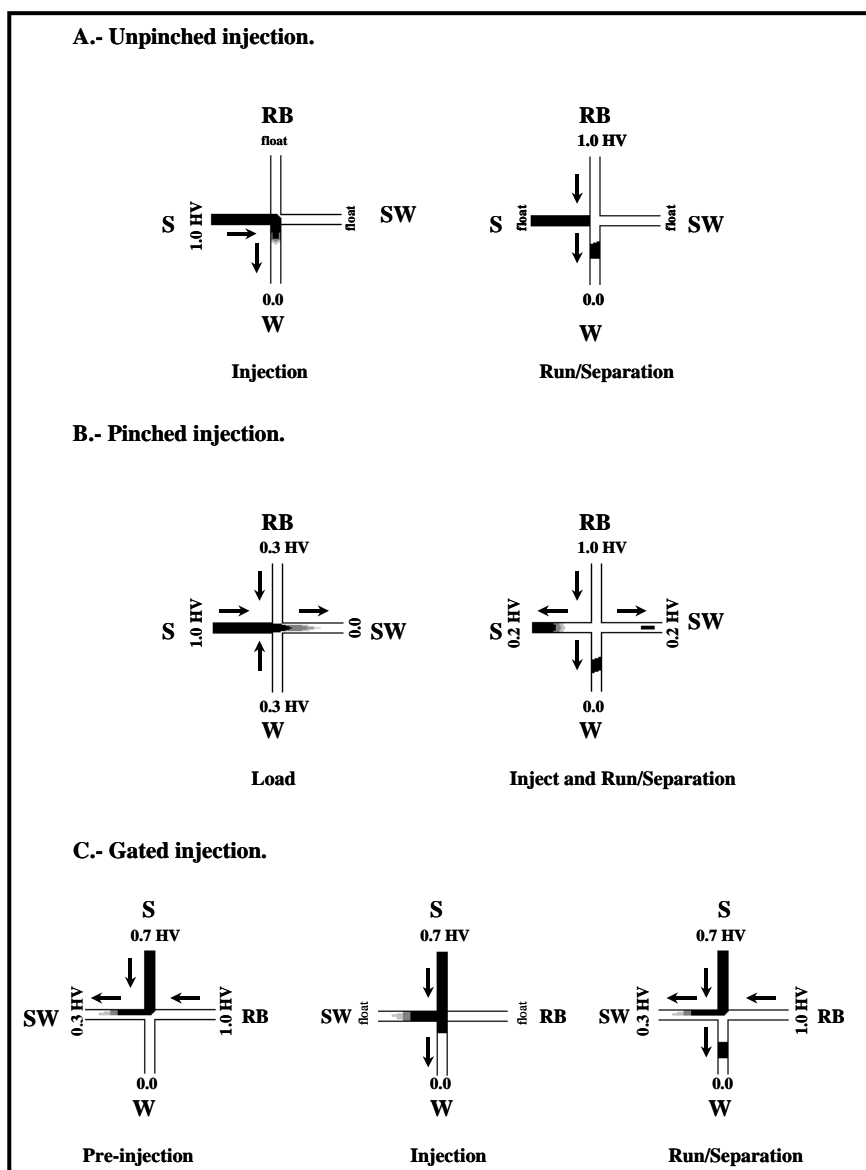


Figura 3. Protocolos de inyección electrocinética: (A) *unpinched*, (B) *pinched* y (C) *gated* [3]. Leyenda: (RB) depósito del medio de separación, (S) depósito de muestra, (SW) depósito de desecho de muestra, (W) depósito de desecho y célula de detección.

El procedimiento de inyección más sencillo es el *unpinched* (fig. 3A) y, en general, es la estrategia usada habitualmente [17, 46-48]. Este método de inyección, se puede llevar a cabo usando una única fuente de voltaje. Se aplica un alto voltaje al reservorio de muestra (S) durante un tiempo corto manteniendo el depósito de detección (W) conectado a tierra (inyección). De esta manera, la muestra se introduce

directamente en el canal de separación mediante inyección electrocinética. Después de que se completa la inyección, se aplica un voltaje al reservorio que contiene el tampón de separación (RB) y se inicia la separación propiamente dicha. Este método no usa voltajes adicionales para mantener la muestra en el canal de separación por lo que puede dar lugar a inyecciones irreproducibles y grandes volúmenes de muestra.

Las inyecciones que utilizan el método *pinched* requieren el control del voltaje de cada reservorio (**fig. 3B**) [3, 17, 47, 49]. En este caso, el reservorio de muestra se coloca al final de uno de los brazos laterales, y antes de la inyección, la muestra es continuamente introducida electrocinéticamente desde el depósito de muestra (S) hasta el depósito de desecho (SW) (*load*). Además, los voltajes se aplican de tal manera que existe un flujo desde el depósito del tampón de separación y desde el depósito del final del canal principal (de detección, W) hacia la intersección y hacia el depósito de desecho (SW). Esto se hace para evitar la entrada prematura de muestra en el canal principal. Ajustando adecuadamente los voltajes se puede “enfocar” (“pinchar”, “pinch”) el flujo de muestra adecuadamente a su paso por la intersección (inyección y separación). Por esta razón, esta técnica es denominada *pinched injection*.

La **figura 3C** muestra el principio de inyección *gated* (por puertas) [3, 17, 50] que también requiere el control del voltaje de cada depósito, pero acorde a otra configuración. Antes de la inyección (pre-inyección), el depósito situado al final del canal de separación (el depósito de detección, W) se conecta a tierra. Así, este depósito funciona como el ánodo al que es dirigido el EOF. Los demás depósitos están conectados a potenciales positivos más altos. El depósito que contiene la muestra y, para asegurar el flujo desde el mismo, se conecta a un voltaje algo mayor. Por la misma razón, el depósito de desecho está conectado a un voltaje relativamente bajo para recibir el flujo de muestra. El depósito correspondiente al medio de separación (RB) está conectado a un voltaje ligeramente más alto que el depósito de muestra. Esto permite un flujo de salida tal que impide a la muestra entrar en el canal principal fluyendo a través de la unión hacia el depósito de desecho. Al mismo tiempo, este depósito también proporciona un flujo de tampón fresco en el canal principal. El modo más simple de facilitar la inyección es dejar de aplicar el voltaje a los depósitos de desecho y de tampón (inyección). El voltaje se mantiene aplicado en los otros depósitos (S y W), permitiendo a la muestra fluir por el canal principal. La inyección

termina cuando se establece de nuevo la distribución de voltaje original; de esta manera, se interrumpe el flujo de muestra hacia el canal principal y se libera el volumen de muestra que fluye al ánodo (separación). Como el volumen inyectado depende principalmente del tiempo de la secuencia de inyección y la muestra puede entrar en el canal principal mientras la válvula electrocinética está abierta, este procedimiento de inyección es denominado *gated injection* (por puertas). En este esquema, la inyección es en la dirección del voltaje aplicado, lo que significa que durante el tiempo de inyección, iones cargados positivamente son inyectados en mayor medida que las especies neutras, que también son inyectadas en mayor medida que iones cargados negativamente.

Las principales diferencias entre los métodos de inyección indicados son que el volumen de la inyección *pinched* es predeterminado y fijo, y que si se da suficiente tiempo al paso de carga (*load*), entonces la composición de la disolución de muestra presente en la intersección (que es la que se inyecta) es la misma que la composición de la muestra original. La inyección *unpinched* presenta el esquema más sencillo pero puede llegar a ser menos reproducible aunque mediante un control adecuado se pueden obtener buenas RSDs (menos del 5 %) [47, 48].

II.1.2.3. Implementación de la detección electroquímica.

Un diseño adecuado de detección electroquímica debería asegurarnos, en primer lugar, un aislamiento eléctrico (desacoplamiento) frente al alto voltaje de separación (normalmente entre 1-5 kV) debido a que la corriente asociada con el alto voltaje de separación es, por lo general, varios órdenes de magnitud superior a la corriente medida en el detector electroquímico. Asimismo, un diseño adecuado debería permitir una alta sensibilidad, selectividad (vía potencial aplicado y material del electrodo), un manejo simple y estabilidad a largo plazo. En la literatura más relevante [17, 18, 20] se han publicado diferentes diseños, de los cuales los más representativos se comentarán a continuación.

Teniendo en cuenta la posición relativa entre el canal de separación y el electrodo de trabajo [20], las configuraciones pueden ser clasificadas como: detección *end-channel*, *in-channel* y *off-channel* (**fig. 4A**). En la detección *end-channel* el electrodo es situado justo en la salida del canal de separación. Para la detección *in-*

channel, el electrodo es situado directamente en el canal de separación, y la detección *off-channel* implica eliminar el voltaje de separación antes de que este alcance el detector mediante un desacoplador.

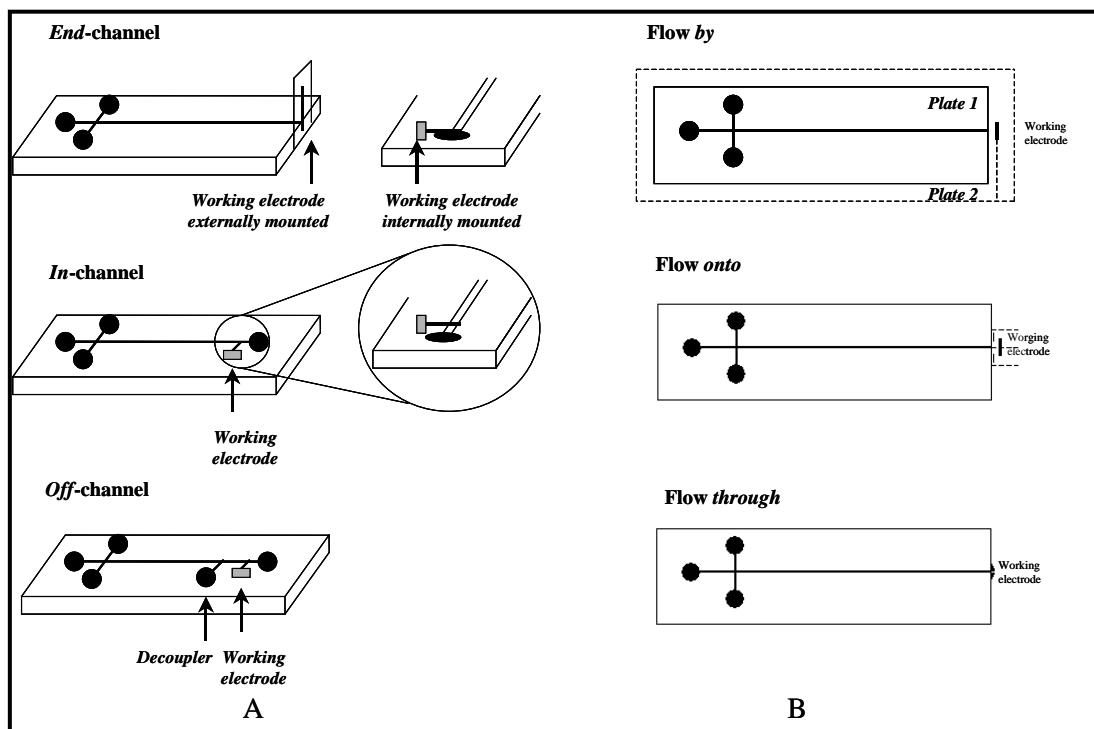


Figura 4. Configuraciones comunes de los detectores electroquímicos para los microchips de CE, (A) en función de la posición relativa entre el capilar y el electrodo de trabajo: *end-channel* (externo o interno), *in-channel*, y *off-channel* [20]; (B) en función de la posición relativa del electrodo con respecto a la dirección del flujo: *flow by* (paralelo); *flow onto* (con la superficie perpendicular a la dirección del flujo); *flow through* (con el detector colocado directamente en la salida del canal) [18].

Por otra parte, teniendo en cuenta la posición relativa entre el electrodo de trabajo y la dirección del flujo [18] (**fig. 4B**), podemos encontrar tres configuraciones: *flow by*, la dirección del flujo es paralela a la superficie del electrodo; *flow onto*, la superficie del electrodo es perpendicular a la dirección del flujo; y *flow through* donde el electrodo es situado directamente a la salida del canal. Como se observa, en todos los casos, la característica común es situar el electrodo de trabajo fuera del canal de separación porque tal disposición produce en buena medida un eficaz aislamiento del alto voltaje de separación, debido a la caída del potencial a través del capilar, por lo que las tres configuraciones mencionadas (*flow by*, *flow onto* y *flow through*) deben ser entendidas como protocolos de detección *end-channel*.

A continuación, se describirán los aspectos más importantes de cada una de las configuraciones mencionadas (*end-channel*, *in-channel* y *off-channel*).

Detección *end-channel*

La detección *end-channel* implica la alineación del electrodo al final del canal de separación (ver **figura 5**). El voltaje de separación tiene una influencia mínima sobre el potencial aplicado en el detector electroquímico porque la mayor parte del voltaje cae a través del canal de separación. Sin embargo, el voltaje de separación puede causar un pequeño pero significativo cambio en el potencial del electrodo de trabajo [18, 20]. Por lo tanto, para determinar el potencial de detección apropiado para un analito dado, es necesario obtener un voltamperograma hidrodinámico para el compuesto de interés en las condiciones de separación exactas que serán empleadas [51]. La principal ventaja de este diseño consiste en que no es necesario ningún desacoplador y que el microsistema es sencillo y robusto. Sin embargo, la mayor desventaja es una pérdida de eficacia en la separación y de sensibilidad, debido a la distancia existente entre el final del canal de separación y el electrodo de trabajo. Esta distancia de separación es también crucial en el desacoplamiento, influyendo en el ruido de la señal analítica obtenida.

La configuración *end-channel* permite la limpieza del electrodo y el empleo de electrodos químicamente modificados; sin embargo, estos diseños generalmente poseen una menor integración de sus componentes en el soporte monolítico y carecen de la capacidad de incorporar electrodos múltiples.

Detección *in-channel*

Las estrategias *in-channel* implican situar al electrodo de trabajo directamente dentro del canal de separación. Los analitos migran sobre el electrodo en el interior del canal de separación, eliminando el ensanchamiento de banda que a menudo se observa con alineaciones *end-channel* [20], sin embargo, se necesita utilizar un potencióstato aislado eléctricamente. En este sentido, Martin et al. [52] publicaron un excelente trabajo, que implica el desarrollo de un potencióstato aislado eléctricamente, que hizo posible colocar el electrodo de trabajo en el canal de separación. El compacto sistema potencióstático miniaturizado (4x9x2 cm) mantiene la

promesa de integración del sistema de detección completo en un microchip. En la **figura 5** se muestra una comparativa entre la configuración *in-channel* frente a la configuración *end-channel* descrita anteriormente. La configuración *in-channel* ayudó a eliminar algunas de las características de la separación negativas encontradas con la configuración *end-channel*, especialmente con respecto al alineamiento del electrodo de trabajo al final del canal de separación así como con respecto a las eficacias de separación y sensibilidad. De hecho, esta configuración aumenta la eficacia de la separación (el número de platos en un factor de 1.3) (**fig. 5B**) y presenta características de eficacia parecidas a las encontradas para LIF en términos de altura de plato y simetría de picos. Sin embargo, mantiene el problema, que ya sucedía con la configuración *end-channel*, del pequeño cambio en el potencial de detección que genera el voltaje de separación el cual obliga a construir el voltamperograma hidrodinámico para hallar el potencial óptimo de detección.

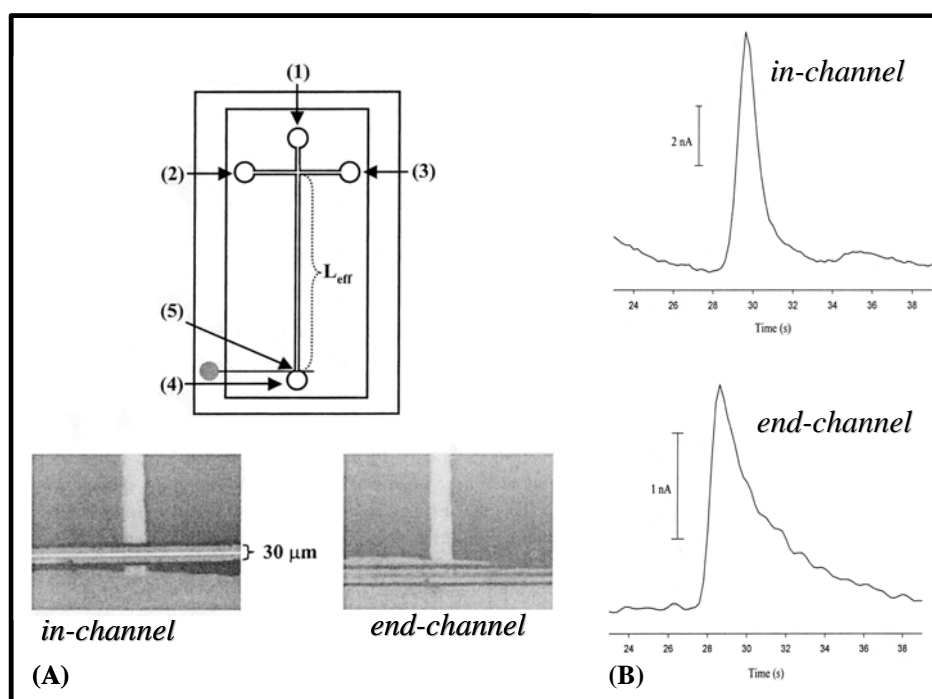


Figura 5. Configuraciones *in-* y *end-channel* de un microchip de CE con una célula de ED integrada propuesta por Martin et al. [52]: (A) diseño del microchip (arriba) y alineamiento del electrodo utilizado en estos estudios (abajo). (B) Electroforegramas de catecol utilizando detección *in-channel* y detección *end-channel*.

Además, existe un trabajo muy interesante en la bibliografía donde se combina, por primera vez, detección *in-* y *end-channel*. Fue desarrollado por el grupo del

profesor Costa [53] y consistió en la fabricación de un detector amperométrico dual de oro formado por un electrodo de película de oro y un hilo de oro en configuración *in-* y *end-channel*, respectivamente. La ventaja de este sistema es que puede utilizar diferentes potenciales de detección para la detección *in* y *end-channel*, presentando mayor selectividad para compuestos que exhiben reacciones redox reversibles, como es el caso del *p*-aminofenol.

Detección Off-channel

Mediante este tipo de detección se superan los problemas generados tanto por la detección *end-* como la *in-channel*. La disposición del electrodo es similar a la de la detección *in-channel* (**fig. 5A**), pero el voltaje de separación es aislado de la corriente amperométrica utilizando un desacoplador. Conceptualmente hablando, el desacoplador desvía de manera efectiva el voltaje de separación a tierra y se crea una región de campo libre después del electrodo donde los analitos son eluidos por el EOF generado antes del desacoplador hacia el detector, de esta manera, se evita las alteraciones que genera el voltaje de separación sobre el potencial de detección [51].

De manera ilustrativa, se muestra en la **figura 6** el diseño propuesta por Wu et al. [54] donde se describió, por primera vez, el empleo de una técnica de microfabricación para integrar simultáneamente un detector electroquímico de tres electrodos y un desacoplador eléctrico de platino con una capa de PDMS tratada con plasma de oxígeno que contiene un canal de CE para completar un microchip de CE-ED. La **figura 6A** muestra claramente todos los componentes de este interesante diseño que combina las ventajas de la microfabricación con el concepto de desacoplamiento. El desacoplador se situó delante del detector de tres electrodos para aislar la interferencia del alto voltaje de separación sobre el potencial de detección. Experimentalmente, los electroforegramas obtenidos de los analitos dopamina y catecol demostraron que el desacoplador sobre el que se habían depositado nanopartículas de platino tiene suficiente capacidad para aislar la interferencia del campo eléctrico de separación (**fig. 6B y 6C**). Además, también se puede apreciar el bajo ruido que se obtiene mediante la configuración *off-channel* registrándose valores inferiores al picoamperio.

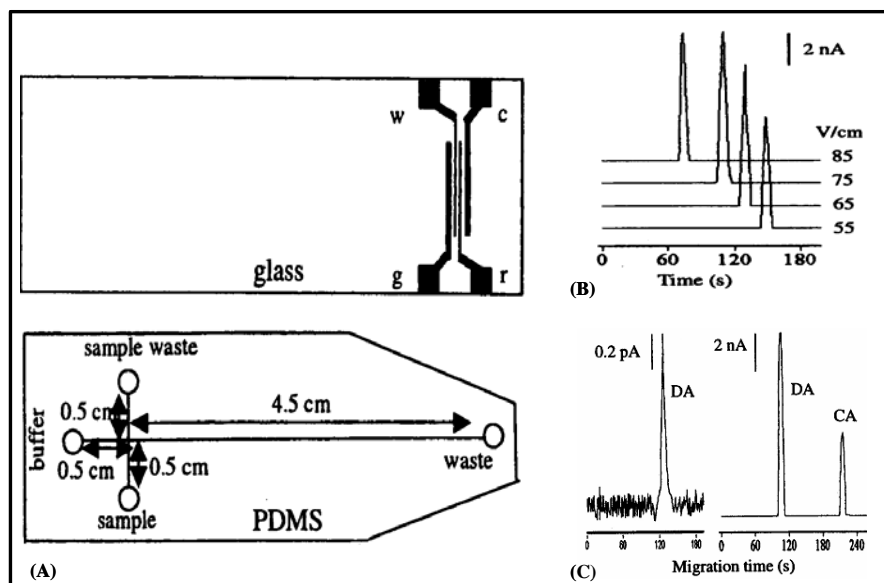


Figura 6. Configuración *off-channel* de un microchip de CE con una célula de ED integrada: (A) célula electroquímica depositada en vidrio (arriba) y microchip de PDMS (abajo). (B) Electroforegramas correspondientes a dopamina 1 mM obtenidos a diferentes campos eléctricos de separación. (C) Electroforegramas de dopamina (DA) 0.125 μ M en el campo eléctrico de 65 V/cm y dopamina 1 mM y catecol 1 mM (CA) en el campo eléctrico de 75 V/cm [54].

En la mayoría de los diseños *in-channel* y *off-channel* publicados se utilizan técnicas de microfabricación para incorporar los distintos electrodos en los chips facilitando la creación de dispositivos totalmente integrados y portátiles; pero tiene el inconveniente de requerir el empleo de instrumentación cara y habitación blanca (*clean room*) junto con el hecho de que la integración de más de un material electródico exige mucho esfuerzo.

Asimismo, indicar que para crear verdaderos sistemas *lab-on-a-chip*, los componentes electrónicos así como el esquema del circuito microfluidico y de la detección necesitan ser miniaturizados en un sistema compacto. Una contribución de varios autores ha presentado una descripción de esta propuesta (miniaturización total) y, particularmente, ha demostrado algunas de las ventajas únicas de los sistemas totalmente microfabricados diseñados para CE-ED [55], ofreciendo una propuesta multidisciplinar para desarrollar un sistema autónomo y transportable de CE-ED que (a) incorpora todos los electrodos necesarios directamente en el microchip, y (b) utiliza soportes electrónicos miniaturizados diseñados especialmente con el fin de soportar los diseños de microchips de CE-ED.

II.1.2.4. Materiales electródicos

El funcionamiento del detector y el éxito del microsistema de CE-ED están fuertemente influenciados por el material del electrodo de trabajo ya que es donde tiene lugar la reacción electroquímica del analito. La selección del electrodo de trabajo depende sobre todo del comportamiento redox de los analitos y de la corriente de fondo en la región del potencial aplicado.

Se han utilizado carbono, platino y oro como materiales de electrodos para microchips de CE-ED [17, 18]. El carbono (incluyendo pasta de carbono, tinta y carbono vitrificado) es el material más ampliamente utilizado debido a su ensuciamiento mínimo y menor sobrepotencial, una ventana de potenciales más grande y baja corriente de fondo [18]. El grupo de Lunte describió el primer sistema de detección dual de carbono (fibra de carbono) para un microchip de electroforesis capilar en el cuál se utilizó una configuración *end-channel* [56]. Este grupo también ha empleado electrodos de pasta de carbono en chips de PDMS para detectar aminoácidos [57]. El grupo de Wang [47], desde la introducción de los electrodos de tinta de carbono serigrafiados (SPE), ha investigado un gran número de posibilidades usando este tipo de electrodos [58-61].

También ha sido investigada una nueva técnica denominada micromoldeamiento de tintas de carbono para usar en microfluidica [62]. Esta propuesta emplea microcanales de PDMS para definir el tamaño de los microelectrodos. Primero se hacen microcanales de PDMS de dimensiones aproximadas a las deseadas para los microelectrodos mediante litografía suave. El PDMS es entonces sellado reversiblemente al sustrato y los microcanales se llenan con tinta de carbono. Después del paso de calentamiento, se retira el molde de PDMS obteniéndose microelectrodos de carbono de tamaño ligeramente inferior que el del microcanal original de PDMS. Los microelectrodos resultantes pueden ser sellados reversiblemente a un canal de flujo de PDMS, configurándose de esta manera un microchip con detección amperométrica completamente integrada.

Gavin y Ewing [63] han descrito un detector electroquímico en serie muy interesante (de 100 electrodos de platino microfabricados) para el análisis simultáneo de neurotransmisores.

El oro ha sido también utilizado como material electródico en microchips de CE-ED. Wang et al. han descrito una configuración *end-channel* utilizando un electrodo *thin-film* de oro [46], electrodos serigrafiados recubiertos de oro [64-70] y un electrodo de disco de oro [71]. Hilmi and Luang [72] también han utilizado electrodos de oro en microchips de CE-ED. Un artículo importante fue la primera descripción de detección electroquímica con múltiples electrodos en un microchip de PDMS empleando electrodos de oro [48]. Además, Chen et al. han desarrollado un microelectrodo de oro el cual estaba integrado en un microchip de policarbonato [73].

Asimismo, se han investigado las posibilidades analíticas que ofrecen los electrodos modificados como detectores en microchips de CE. El grupo de Wang [74] ha estudiado el comportamiento de un electrodo de carbono serigrafiado recubierto de paladio para la detección electrocatalítica de varias hidracinas. La capa de paladio permitió una disminución significativa (>0.3 V) del potencial aplicado y condujo a picos más agudos y grandes. El grupo de Lunte [71] ha empleado un detector de pasta de carbono modificado con cobalto-phthalocyanina (CoPC) para la detección electrocatalítica de tioles. Martín et al. [75] han utilizado el mismo compuesto para modificar un electrodo de tinta de carbono, empleándolo también para la detección de tioles. Wang et al. [76] modificaron también con el mismo compuesto un electrodo serigrafiado y detectaron varias hidracinas con un LOD inferior al orden μM . En otro interesante trabajo, se utilizó con éxito un SPE modificado con DNA unido a celulosa para detectar dopamina y uno de sus interferentes (ácido ascórbico) en un suero biológico [77]. Merkoçi et al. [78] han desarrollado un electrodo rígido compuesto grafito-epoxy y para comprobar su funcionamiento determinaron dopamina y catecol, obteniendo límites de detección menores que los obtenidos con electrodos serigrafiados [47] o pasta de carbono [57], como consecuencia del bajo nivel de ruido obtenido. Shiddiky et al. [79] han desarrollado un electrodo de pasta de carbono modificado con un complejo de cobre-(3-mercaptopropil) trimetoxisilano para realizar el análisis simultáneo de nitrito y nitrato. El método está basado en la reducción electrocatalítica de ambos analitos y ha sido utilizado para su determinación en agua y orina.

Por otra parte, la literatura más relevante y actual revela cómo los nuevos materiales electródicos van siendo incorporados en la tecnología de los microchips de

CE-ED. Por ejemplo, se han observado mejoras significativas en el funcionamiento de un microchip de electroforesis capilar con detección electroquímica al usar un electrodo de trabajo modificado con nanotubos de carbono [80], así como electrodos de diamante dopados con boro [81]. Respecto al uso de nanomateriales como los nanotubos de carbono en los microchip de electroforesis capilar no se comentará nada en este bloque ya que se describirán con mayor detenimiento en el sección III de esta memoria.

El grupo de Wang [81] utilizó como electrodo una banda de película de diamante dopado con boro (0.3 x 6.0 mm) depositado químicamente para detección amperométrica *end-channel*. Este material ofreció un aumento de la sensibilidad, menores niveles de ruido y picos más agudos para varios grupos de analitos importantes tales como fenoles (a), agentes nerviosos organofosforados (b) y explosivos nitroaromáticos (c). Se obtuvieron límites de detección de 70 y 110 ppb para dichos explosivos usando este material electródico.

Asimismo, se ha descrito el funcionamiento de películas de carbono pirolizado fotorresistente como electrodo de trabajo para ED en microchips de CE [82]. La característica más atractiva de este material es su superficie excepcionalmente lisa (similar a la del carbono vitrificado pulido), junto con una baja proporción oxígeno/carbono, lo que permite niveles bajos de la corriente de fondo. Las películas de carbono pirolizado fotorresistente se han introducido como electrodos de carbono planos en dispositivos híbridos de microchip de PDMS-cuarzo y se ha demostrado su utilidad para la separación y la detección de varios neurotransmisores. Posteriormente, Lunte et al. [83] desarrollaron con este material electródico un sistema de detección dual completamente integrado en un microchip de PDMS/vidrio mediante su deposición sobre el vidrio con técnicas litográficas. Este sistema de detección dual presenta una mayor selectividad con respecto a los compuestos que exhiben reacciones redox reversibles.

II.1.2.5. Modos de detección

De los tres modos generales de detección electroquímica (amperometría, potenciometría y conductimetría), la amperometría es el más usado en microchips de CE. Más recientemente, ha sido investigada la conductimetría, siendo utilizada en

menor medida aunque actualmente ocupa un papel muy importante, mientras que la potenciometría prácticamente no se ha utilizado.

Amperometría/voltamperometría

En amperometría se mide la corriente que resulta al aplicar un potencial constante al electrodo de trabajo. Es la técnica electroquímica más extensamente utilizada para CE convencional y su implementación como sistema de detección en microchips ha sido llevada a cabo por distintos grupos de investigación. A continuación, sólo se describirán los avances más importantes de detección amperométrica en microchips de CE-ED, omitiéndose obviamente todos aquellos que emplean amperometría convencional como modo de detección.

H.Y. Chen et al. [84, 85], utilizando una configuración *in-channel*, desarrollaron una estrategia de detección que permitió determinar especies no electroactivas mediante una amperometría indirecta, ampliándose así el abanico de analitos potencialmente detectables mediante este modo de detección. Esta estrategia consistió en aprovechar los cambios del potencial efectivo del electrodo de trabajo, provocados por el acoplamiento entre el campo eléctrico de separación y el potencial de dicho electrodo. El acoplamiento se altera al variar la conductividad del medio lo que ocurre al paso de los analitos no electroactivos a través del electrodo (más concretamente, entre el electrodo de trabajo y el cátodo del campo eléctrico electroforético). Dicha alteración genera un aumento o un descenso del potencial efectivo del electrodo. La diferencia entre los dos trabajos mencionados anteriormente [84, 85] radica en la manera de aprovechar la alteración del potencial efectivo. En el primer trabajo [84], detectan cationes por electroforesis de polaridad directa utilizando un potencial de trabajo reductor para monitorizar la reducción del oxígeno disuelto en el tampón de separación. Al pasar los cationes por el electrodo provocan un aumento o descenso del potencial efectivo que genera un pico (positivo o negativo) al variar la cantidad de oxígeno que se reduce. Con esta estrategia detectaron también cuatro aminoácidos no electroactivos [86]. De manera análoga, en el segundo trabajo [85] se detectaron aniones por polaridad invertida utilizando un potencial de oxidación alto dentro de la barrera de oxidación del sistema.

Se ha investigado la aplicación de detección amperométrica de pulsos (PAD) en un microchip híbrido PDMS/vidrio con un electrodo de trabajo de platino para la detección electroquímica de glucosa, maltosa y xilosa [87]. La amperometría de pulsos mantiene la actividad del electrodo mediante una secuencia triple de pulsos que incluye los potenciales de detección, de limpieza del electrodo y de reactivación del mismo. La limpieza de la superficie del electrodo por oxidación de los productos de la reacción, fijados por adsorción, tiene lugar a un potencial suficientemente positivo mientras que la regeneración de la superficie del electrodo tiene lugar a un potencial negativo. La detección amperométrica de pulsos también ha permitido la separación y la detección en microchip de CE de carbohidratos no derivatizados, aminoácidos y antibióticos que contienen azufre [88, 89]. También ha sido utilizada para seguir la degradación de ácidos fenólicos de plantas acuáticas [90], así como para determinar contaminantes fenólicos en agua [91].

Por otra parte, Herbert et al. [92] han aportado una interesante contribución utilizando voltamperometría sinusoidal (SV) en microchips. Asimismo, han llevado a cabo una comparación entre la amperometría a potencial constante y la SV usando plataformas de microchips encontrando que la SV era más sensible (nM) que la amperometría a potencial constante (μ M) para los neurotransmisores estudiados (dopamina, isoproterenol, y L-dopa) [93]. También ha sido descrito la aplicación de la SV utilizando un electrodo de película de carbono pirolizado fotorresistente [82].

Aunque la utilidad de la detección amperométrica en microchips de CE ha sido ampliamente demostrada, los microchips también se pueden entender como plataformas ideales para realizar análisis voltamperométricos a nivel de la microescala [94]. Se trata de la introducción de protocolos voltamperométricos para la detección/caracterización electroquímica después de transportar el analito, usando los microchips de EC como “sistema de inyección/preparación de la muestra/manipulación de líquidos”. Esta propuesta es ventajosa con respecto a la voltamperometría en nanoviales, la cual carece de preparación de muestra y manipulación de fluidos. Pero la característica más atractiva es que este acoplamiento realza el poder de los dispositivos de microchips al añadir una nueva dimensión de la información analítica y establece esquemas de detección altamente sensibles.

Conductimetría

El acoplamiento de la detección conductimétrica en microchips de EC fue descrito después que el de la amperométrica [19, 95-105]. La detección conductimétrica es menos sensible que la amperométrica pero es una técnica de detección universal que se ha aplicado en microchips de CE tanto en el modo galvánico (un par de electrodos se coloca en el canal de separación para medir la impedancia del líquido) [95, 96] como en el modo sin contacto (*contactless*, no hay ningún contacto entre el par de electrodos y la disolución del canal de separación) [97-105]. La detección sin contacto presenta tres ventajas sobre la galvánica: (i) el circuito electrónico se desacopla del alto voltaje aplicado para la separación (no hay ningún acoplamiento directo entre los componentes electrónicos y el líquido en el canal), (ii) se previene la formación de burbujas en los electrodos metálicos, y (iii) se previene la modificación electroquímica o degradación de la superficie del electrodo. Ambos modos de detección (sin contacto y galvánico) integrados en un microcanal requieren una conexión física con los componentes electrónicos situados dentro o incluso fuera del microdispositivo.

Las **figuras 7 y 8** muestran diseños seleccionados como representativos de ambos modos de detección, galvánico y sin contacto, respectivamente. En ambas estrategias, la microfabricación desempeña un papel importante en la integración de los detectores de conductividad.

Dentro del modo galvánico, Van der Berg y colaboradores [95] han desarrollado chips de vidrio para electroforesis capilar en zona libre y han demostrado la posibilidad de detectar iones inorgánicos y ácidos fumárico, málico y cítrico (**fig. 7**). Soper y colaboradores [96] han diseñado un dispositivo de PMMA con electrodos de hilo de platino integrados y han mostrado la separación y detección sensible de aminoácidos, proteínas y fragmentos de ADN con un detector convencional de conductividad utilizando electroforesis capilar en zona libre (CZE) y cromatografía electrocinética micelar (MEKC), respectivamente.

Por otra parte, Guijt et al. [97] llevaron a cabo una de las primeras y más interesantes aportaciones que utilizan detectores de conductividad sin contacto. En este trabajo, se presentó y evaluó un detector conductimétrico sin contacto integrado dentro de un microcanal de CE. Se realizó la medida de la conductividad con un

sistema de cuatro electrodos usando dos electrodos externos y dos internos. Se obtuvo el acoplamiento capacitivo con el líquido dentro del canal cubriendo los electrodos con una capa fina de un dieléctrico, carburo de silicio. Pumera et al. [100] han propuesto un nuevo diseño sin contacto colocando los electrodos sobre la superficie externa del microchip en lugar de incrustarlos en el microdispositivo. Esta propuesta permite una simplificación significativa del proceso de fabricación y supone una de las más importantes alternativas de la conductividad sin contacto en microchips (**fig. 8**). El nuevo detector conductimétrico se basa en la colocación de dos electrodos de película de aluminio en el lado externo de un microchip de PMMA y en medir la impedancia de la disolución en el canal de separación.

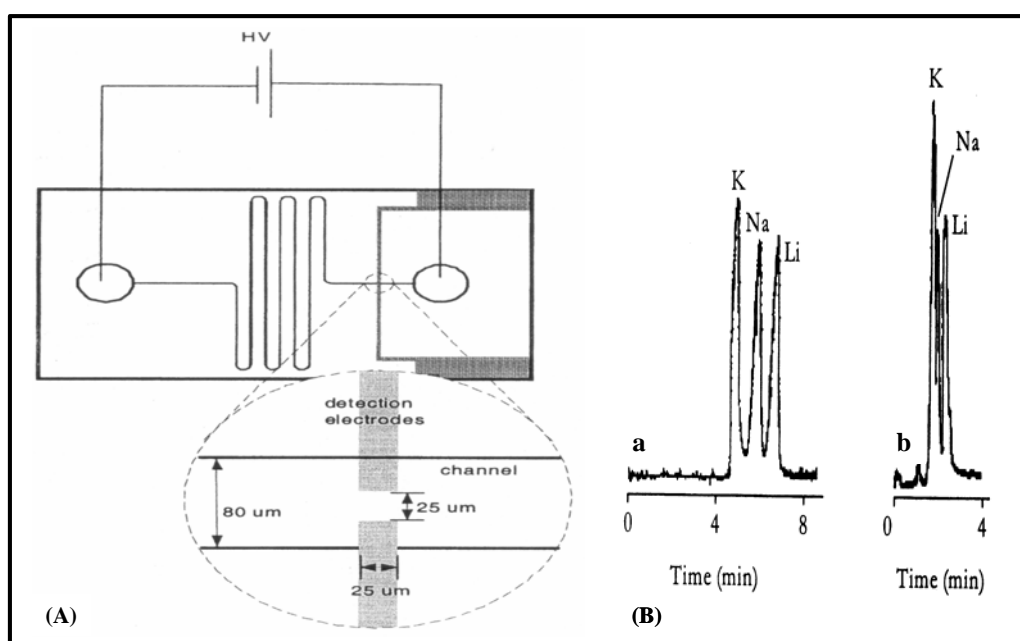


Figura 7. Configuración de un microchip de electroforesis con detección conductimétrica galvánica integrada. (A) Descripción esquemática de la disposición experimental. (B) Electroforegramas de la separación de iones metálicos alcalinos en un canal de 6 cm (a), y en un canal de 3 cm (b) [95].

Más recientemente, el mismo grupo ha investigado la extensión del concepto a una detección dual conductimétrica/amperométrica usando un microchip de vidrio para la detección de compuestos nitroaromáticos y explosivos [101]. El microsistema implicó la combinación de un detector conductimétrico sin contacto con un detector amperométrico *end-channel*. Este acoplamiento se hizo usando un único canal de separación y permitió mejorar la caracterización de iones (cationes pequeños) y

especies electroactivas (explosivos nitroaromáticos), así como la confirmación de la identidad de los picos. El mismo grupo ha descrito la detección conductimétrica sin contacto para monitorizar aminas alifáticas en disolventes que absorbían en el UV (dimetilformamida, dimetilacetamida, dimetil sulfóxido, carbonato de propileno), revelando la conveniencia de este detector en medios no acuosos [102].

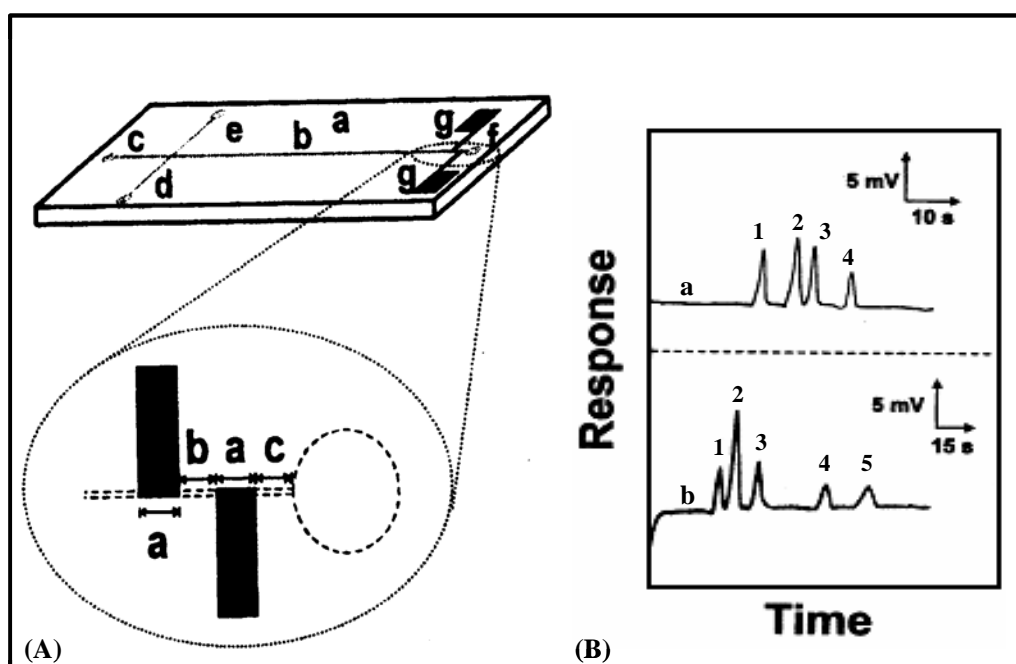


Figura 8. Configuración de un microchip de electroforesis con detección conductimétrica sin contacto (*contactless*) integrada. (A) Microchip (parte superior). Vista ampliada del detector (parte inferior). (B) Electroforegramas que muestran la separación de cationes (a) y aniones (b). (a) Mezcla que contiene 450 μM de potasio (1), 800 μM de bario (2), 650 μM de sodio (3) y 550 μM de litio (4). (b) Mezcla de cloruro (1), sulfato (2), fluoruro (3), acetato (4) y fosfato (5), 800 μM (1-3) y 1600 μM (4,5) [100].

El grupo de Wang [103] también ha desarrollado un nuevo e ingenioso detector móvil de conductividad sin contacto. Este sistema permite posicionar el detector en diferentes puntos a lo largo del canal de separación mediante el deslizamiento del soporte del electrodo. Este ingenioso diseño permite la conmutación rápida entre la determinación de analitos totales (solutos no resueltos) y determinación de cada uno de ellos (analitos separados), en base a situar el detector en el principio o en el final del canal de separación, respectivamente. Una construcción similar con pequeñas diferencias con respecto a la longitud del electrodo fue diseñada por Chen et al. [106].

Tanyaniwa y Hauser [104] han aportado un excelente trabajo que trata sobre el acoplamiento entre el alto voltaje y la detección conductimétrica sin contacto en microdispositivos electroforéticos planos. Estos autores demostraron que la mejor

sensibilidad se obtenía situando los electrodos en depresiones de tal manera que se puedan acoplar al canal de separación (límites de detección para iones pequeños K^+ , Na^+ y Mg^{2+} , 0.49, 0.41 y 0.35 μM , respectivamente). En este trabajo se describió también la detección de metales pesados como Mn^{2+} , Zn^{2+} y Cr^{3+} . La naturaleza universal del nuevo diseño fue ilustrada mediante la detección de ácidos láctico y cítrico, los cuales son de interés en el campo alimentario, y con la detección de tres antiinflamatorios. Con este mismo sistema se exploró la determinación de distintas especies bioquímicas (aminoácidos, péptidos, proteínas, inmunoglobulina y DNA) y los resultados fueron satisfactorios (LOD del orden μM) [107].

También se ha propuesto un sofisticado diseño de detección conductimétrica sin contacto para microdispositivos de CE utilizando cuatro electrodos [105]. Esta nueva configuración mejoró el funcionamiento analítico del sistema de detección clásico de dos electrodos. La nueva configuración fue ilustrada con iones inorgánicos (K^+ , Na^+ y Li^+) y con seis ácidos orgánicos.

Bai et al. [108] han propuesto detección conductimétrica pasiva aplicada a microchips de CE. El voltaje de separación se utilizó para generar una diferencia de potencial entre dos electrodos situados a lo largo del canal. Para electroforesis de corriente constante, la señal generada es proporcional a la resistencia de la disolución pasando entre los electrodos. Este principio directamente toma la ventaja del campo de separación y la señal se mide usando un voltímetro de alta impedancia. El concepto ha sido demostrado mediante la separación de tres iones alcalinos en un microchip polimérico.

Finalmente, Fu et al. [109] han propuesto un diseño de un microchip de CE-ED en el cual utilizan un detector conductimétrico sin contacto con electrodos semicirculares de oro y lo han aplicado para la detección de cationes metálicos en aguas minerales, bebidas energéticas y vino tinto.

II.1.3. Aplicaciones analíticas.

En primer lugar, es preciso indicar que existe en la bibliografía un conjunto enorme de investigación relacionada con las aplicaciones de los microchips de CE-ED en el ámbito principalmente clínico y en menor medida, en el medioambiental, los

cuales han sido a su vez objeto de excelentes revisiones bibliográficas [16-22, 110, 111].

El desarrollo de aplicaciones mediante una nueva tecnología es indicativo del grado de madurez de la misma. La capacidad de procesar de manera efectiva muestras reales y ejecutar las operaciones analíticas necesarias *on-chip* son la llave para lograr el éxito y la comercialización de los microchips de CE. A pesar de la gran cantidad de trabajos publicados usando estos microsistemas, las aplicaciones con muestras reales no son tan abundantes y todavía se encuentra en su infancia constituyéndose como uno de los grandes retos tanto de la microfluídica, en general, como de los microchips CE, en particular [112]. En este sentido, se ha publicado recientemente una revisión bibliográfica muy interesante que trata sobre las limitaciones más comunes y las estrategias para superarlas en el análisis cuantitativo utilizando microchips de CE resaltando la importancia de estos microsistemas analíticos en el ámbito de las muestras reales [113].

Una revisión de todas las aplicaciones analíticas de los microchips de CE está lógicamente fuera de los límites razonables de esta memoria así como del objetivo de la investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral. En consecuencia, en este apartado se mostrará sólo el estado actual en referencia directa a la investigación desarrollada que emplea este tipo de microsistemas analíticos en el ámbito del análisis de alimentos. No obstante, es preciso indicar también que en los inicios de este trabajo de investigación, el volumen de artículos científicos que trataban de la aplicación de microchips de CE en el campo alimentario era muy escaso comparado con el campo clínico y medioambiental pero, en los últimos cuatro años, se ha incrementado cualitativamente el número de trabajos siendo recogidos en dos artículos de revisión realizados por nuestro grupo de investigación [114, 115].

II.1.3.1. Posibilidades analíticas de los microchips de electroforesis capilar en el ámbito del análisis de alimentos.

Para entender el papel actual de los microchips de CE en la ámbito del análisis de alimentos y, de esta manera, poder contextualizar adecuadamente la investigación que se presenta en este capítulo, se debería tener presente la siguiente idea general. Aunque con la transferencia desde el escalado convencional al miniaturizado, tanto la

selectividad como la sensibilidad pueden ser reducidas, estos microsistemas son potencialmente muy atractivos en la ciencia de los alimentos debido a las ventajas inherentes que comporta una disminución del escalado, tales como la reducción drástica del tiempo de análisis, el bajísimo consumo de muestra, la posibilidad de integración de múltiples análisis en la misma plataforma microfluídica con el consiguiente abaratamiento final, y la existencia de sistemas integrados completamente automatizados que pueden ser utilizados *in-situ* por cualquier persona. Estas características, al igual que en otros campos de aplicación, podrían constituir claras ventajas de estos microsistemas dentro del ámbito del análisis de alimentos.

Por otra parte, los principales inconvenientes que presentan los microchips de CE en el análisis de alimentos, debido a la complejidad de sus matrices, son en un sentido general principalmente dos: la posible disminución de la selectividad (disminución de la capacidad de separación de picos) y la sensibilidad (debido, como se ha indicado precedentemente, a los bajos volúmenes de muestra que se introducen en estos microsistemas (nL-pL)). En consecuencia, tanto la selectividad como la sensibilidad del análisis deben ser resueltas bien durante el tratamiento de muestra o bien durante la etapa de detección, mediante el empleo de detectores de alta sensibilidad.

Sin embargo, los requisitos para mejorar la selectividad y sensibilidad a menudo implican protocolos complejos de preparación de muestra y separación de analitos con esquemas de detección avanzados que utilizan protocolos tediosos. En este sentido, es preciso indicar que la integración del tratamiento de muestra en microchip está menos desarrollada debido a su complejidad inherente constituyendo este hecho en sí mismo uno de los retos actuales de la miniaturización en su sentido más general [116]. Sin embargo, de dicha integración, cabría esperar un futuro muy prometedor dentro del ámbito del análisis de alimentos debido a (i) las posibilidades inherentes ofrecidas por la tecnología de la microfabricación para crear diseños sofisticados (por ejemplo, células electroquímicas) y microestructuras (filtros) con respecto a los requisitos de preparación de muestra; (ii) las posibilidades inherentes ofrecidas por la omnipresencia de flujo laminar (bajísimos números de Reynolds) y por la importancia que cobra el transporte por difusión en microfluídica (por ejemplo, filtro H); y (iii) la

facilidad para utilizar fenómenos electrocinéticos para mover fluidos con exactitud dentro de una red compleja de microcircuitos.

Por otra parte, debido a que un grupo muy importante de analitos de importancia alimentaria se puede analizar mediante CE convencional (aminoácidos, proteínas y péptidos, compuestos polifenólicos, vitaminas, carbohidratos, pequeños iones orgánicos e inorgánico, pesticidas y residuos) y los microchips de CE se basan en el mismo principio que la CE convencional, se podría esperar un resultado prometedor en el futuro cercano usando estrategias analíticas bien diseñadas que impliquen sistemas de detección bien implantados en otros ámbitos tales como LIF y principalmente ED (dado que muchos de estos analitos exhiben una marcada electroactividad).

Por lo tanto, en el futuro se prevé un papel muy importante de los microchips de CE en aplicaciones alimenticias y, desde ese futuro, se espera un desarrollo en el grado de madurez del concepto *food lab-on-a-chip*. Los objetivos previamente establecidos en otras áreas deberían ser redefinidos convenientemente en el área de los alimentos hacia la monitorización de compuestos de interés alimentario y el control y manipulación de la calidad de los alimentos, sin olvidarse del gran reto de la determinación de alimentos transgénicos.

II.1.3.2. Microchips de electroforesis capilar en el ámbito del análisis de alimentos.

La **figura 9** muestra los diseños más habituales y representativos de microchip de CE que han sido utilizados en el análisis de alimentos hasta el día de hoy. Como puede observarse, todos ellos corresponden a diseños y geometrías sencillas (microchip de cruz sencilla y doble T) que emplean como sustratos tanto vidrio como polímeros (PDMS, PMMA) estando acoplados, principalmente, a la detección electroquímica tanto en su modo amperométrico como conductimétrico.

Por otra parte, la lista de analitos estudiados hasta el momento es bastante amplia esperándose una continua expansión en los próximos años. Los compuestos analizados hasta ahora han sido ácidos fenólicos, flavanoles, aminoácidos, conservantes, isoflavonas, colorantes, toxinas, ADN, proteínas, aminos biogénicas y saborizantes. A continuación se comentarán los aspectos más reveladores de las

contribuciones científicas aparecidas hasta el momento ordenando los trabajos según el tipo de detección utilizada (amperométrica, conductimétrica, LIF y UV).

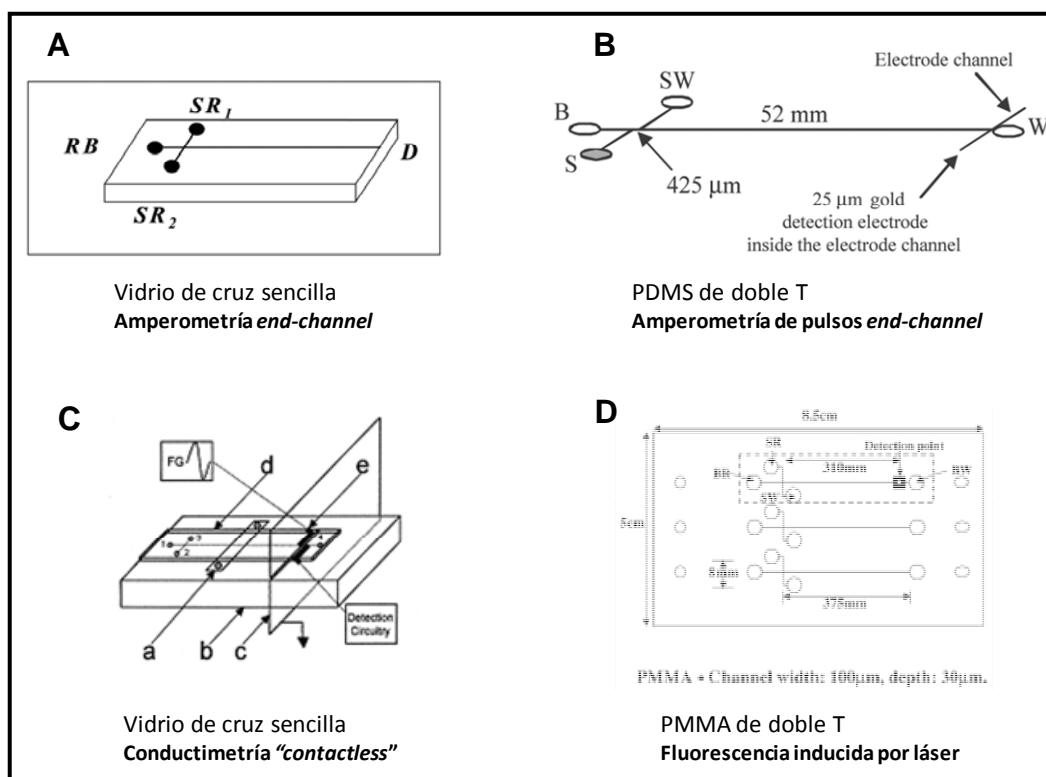


Figura 9. Diseños de los microchips y rutas de detección más empleadas en el análisis alimentario. (A) Microchip de vidrio de cruz sencilla usando ambos inyectores. RB: depósito de tampón de separación, SR1 y SR2: Depósitos de muestra [117]. (B) Microchip de PDMS de doble T con PAD [118]. (C) Microchip de vidrio de cruz sencilla con detección conductimétrica sin contacto [119]. (D) Microchip de PMMA de doble T con LIF [120].

Los detectores electroquímicos miniaturizados tales como los electrodos serigrafiados (SPEs) acoplados a sistemas de microchip han permitido la detección rápida de ácidos fenólicos relacionados con los alimentos incluyendo los ácidos clorogénico, gentísico, ferúlico y vainílico [121]. Los analitos fueron separados por CZE debido al diferente grado de ionización de los compuestos fenólicos empleando un tampón borato (pH 9.5). El protocolo utilizó menos de 300 s en la separación de los ácidos fenólicos y se aplicó a vinos comerciales sin preparación de muestra con resultados prometedores. A pesar de que la recuperación de los ácidos fenólicos analizados fue muy buena demostrándose la idoneidad del método, solamente dos de ellos (vainílico y clorogénico) fueron realmente detectados en las muestras de vino tal y como se refleja en la **figura 10A**. Además, se mejoró la selectividad utilizando diferentes potenciales de oxidación con el fin de obtener electroforegramas más

sencillos. Asimismo, la dilución realizada también evitó la interferencia de otros compuestos fenólicos tales como flavonoides ya que las muestras de vino son muy complejas y la detección directa de todos los polifenoles requiere el empleo de rutas analíticas más sofisticadas.

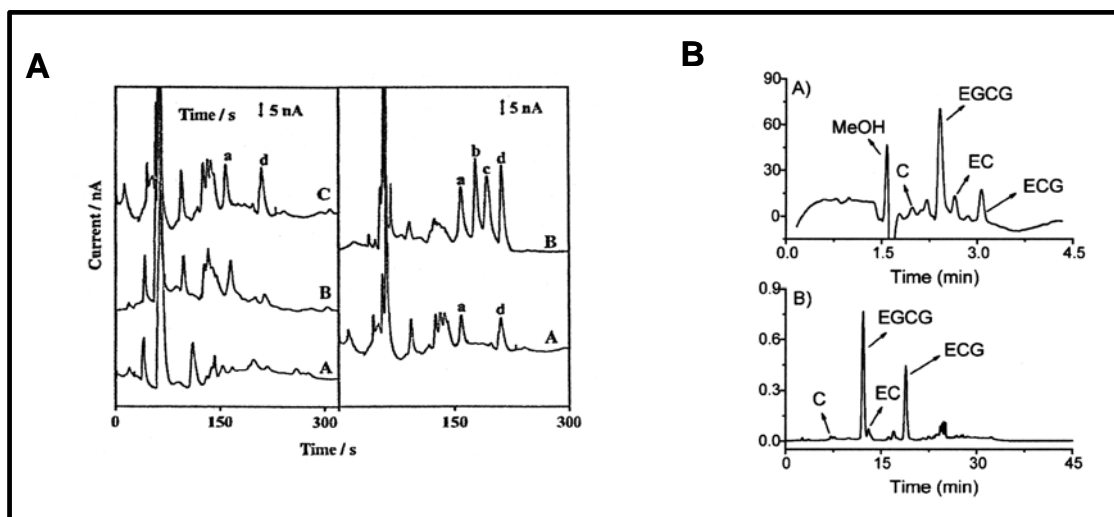


Figura 10. Análisis de antioxidantes naturales. **(A)** Electroforegramas de vino tinto de California a varios potenciales de detección (*izquierda*): (A) 0.8 V (B) 0.9 V (C) 1.0 V. Análisis de los mismos vinos antes (A) y después (B) de la adición de 200 μ M de ácidos fenólicos (*derecha*): (a) ácido clorogénico; (b) ácido gálgico; (c) ácido ferúlico; (d) ácido vainillíco. [121]. **(B)** (A) Electroforegrama de extracto de té mostrando la presencia de (+)-catequina (C), galato de epigalocatequina (EGCC), (-)-epicatequina (EC) y galato de epicatequina (ECG). (B) Cromatograma (HPLC-UV) de extracto de té verde [118].

El grupo de investigación del profesor Henry ha propuesto el análisis de catequinas y derivados en extracto de té verde usando un microchip de PDMS y MEKC como modo electroforético con detección amperométrica de pulsos (PAD) [118]. La detección de (+)-catequina, galato de epigalocatequina, (-)-epicatequina y sus derivados galato se llevó a cabo en menos de 3 minutos, mejorando notablemente el tiempo empleado con un sistema de HPLC (25 minutos) (**fig. 10B**). En este trabajo, se demostraron tres aspectos importantes en el empleo de los microchips de CE-ED en alimentos: (i) el uso de PAD para evitar problemas asociados con el ensuciamiento del electrodo debido a la adsorción de los productos de la oxidación, (ii) el uso adecuado de microchips de PDMS, y (iii) la utilización de MEKC para separar las catequinas involucradas. Además, una contribución importante de este artículo fue la buena concordancia encontrada entre los datos cuantitativos obtenidos empleando el método propuesto frente a los declarados por el fabricante y los obtenidos con un método de HPLC donde las muestras se estudiaron alternativamente con fines

comparativos. Sin embargo, la preparación de la muestra seguía siendo compleja y *off-chip* (metanol-agua, extracción con agitación y filtración) y la matriz de la muestra seguía siendo “sencilla” puesto que se analizó un suplemento alimenticio.

En el primer trabajo desarrollado por nuestro grupo, coetáneo a los trabajos anteriormente comentados, se utilizó un microchip CE-ED de vidrio con diseño de cruz sencilla para la detección rápida y simultánea de cinco antioxidantes naturales (ácido ascórbico y flavonoides) en distintas muestras de pera en tan sólo 200 s [117]. La determinación de polifenoles es muy difícil ya que existen multitud de estructuras o compuestos dentro de este grupo que podrían contribuir a la obtención de electroforegramas demasiado complejos. Para ayudar en la interpretación de estos electroforegramas, se propuso una estrategia analítica que consistió en la separación electroforética de parejas de analitos con un propósito identificativo, es decir, se buscó la presencia (identificación positiva) o ausencia (identificación negativa) de estas parejas en la muestra real analizada. La selección de estas parejas se llevó a cabo estratégicamente para responder distintas demandas analíticas. Las separaciones realizadas fueron la de dos de los más importantes antioxidantes naturales para poder diferenciar entre los de origen polifenólico ((+)-catequina) y los de origen no polifenólico (ácido ascórbico); la de dos abundantes flavonoides confinados en distintas partes de la fruta, (+)-catequina y rutina que solamente se encuentra en la piel; y la separación de dos “huellas digitales” fenólicas, arbutina (típico de peras) y florizina (típico de manzanas). El método se aplicó a muestras reales mostrándose datos cuantitativos pero el proceso de extracción sólido-líquido y la filtración posterior se realizó fuera del sistema miniaturizado. La complejidad de las muestras (pera y derivados) dificultó la determinación de estos compuestos siendo solamente detectado y cuantificado los más abundantes.

El grupo de investigación del profesor Wang, ha aportado un interesante protocolo empleando microchip de CE-ED para el análisis de aminoácidos relacionados con alimentos incluyendo la Se-metionina, Se-etionina y Se-metilcisteína [122]. Los aminoácidos fueron derivatizados *off-chip* y fueron separados en un tampón borato en 300 s. El trabajo realizado fue confinado solamente a los patrones; sin embargo, abrió la posibilidad de utilizar los microchips de EC en el análisis de dichas biomoléculas en

muestras reales. La **figura 11** muestra la excelente separación de una mezcla de patrones de aminoácidos usando detectores electroquímicos miniaturizados.

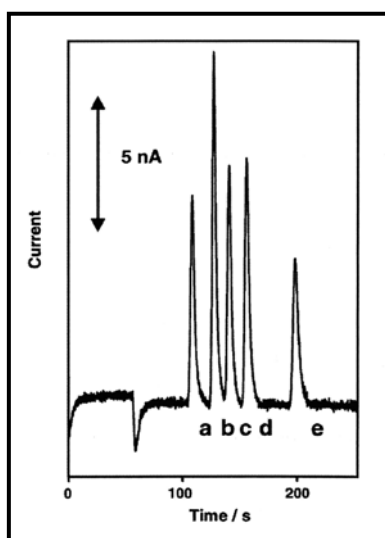


Figura 11. Electroforegrama correspondiente a una mezcla de seleno aminoácidos: 200 μ M de Met (b); Se-Met (c); Se-Eth (d) y Se-Cys (e) [122].

Otra aplicación interesante de los microchip de CE ha sido la detección rápida y fiable de posibles fraudes ocasionados por la adición de potenciadores del sabor en alimentos. El aroma de vainilla, que se obtiene de extractos de *Vanilla planifolia*, es un aroma y uno de los saborizantes más populares de la industria alimentaria. La vainillina es el componente principal del aroma de la vainilla mientras que la etilvainillina es compuesto análogo pero de origen sintético. El uso de este último es habitual pero es una prueba inequívoca del uso de compuestos artificiales y, por tanto, debe ser indicado en la etiqueta. En base a esto, se desarrolló un método donde se separaron mediante un microchip de CE-ED alcohol vainillínico, etilmaltol, maltol, etilvainillina y vainillina en menos de 200 s con un excelente control del EOF (RSD en los tiempos de migración menores al 3%) (ver **fig. 12**) [123]. La vainillina fue detectada en vainas de vainilla siendo el componente mayoritario en los extractos de vainilla. Pero, en contraposición, se detectó etilvainillina en azúcares aromatizados, demostrándose el origen no natural del aroma de vainilla añadido. La extracción de los compuestos derivados de la vainilla es muy compleja y se realizó *off-chip*. Sin embargo, se demostró el buen comportamiento analítico del microsistema utilizado tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.

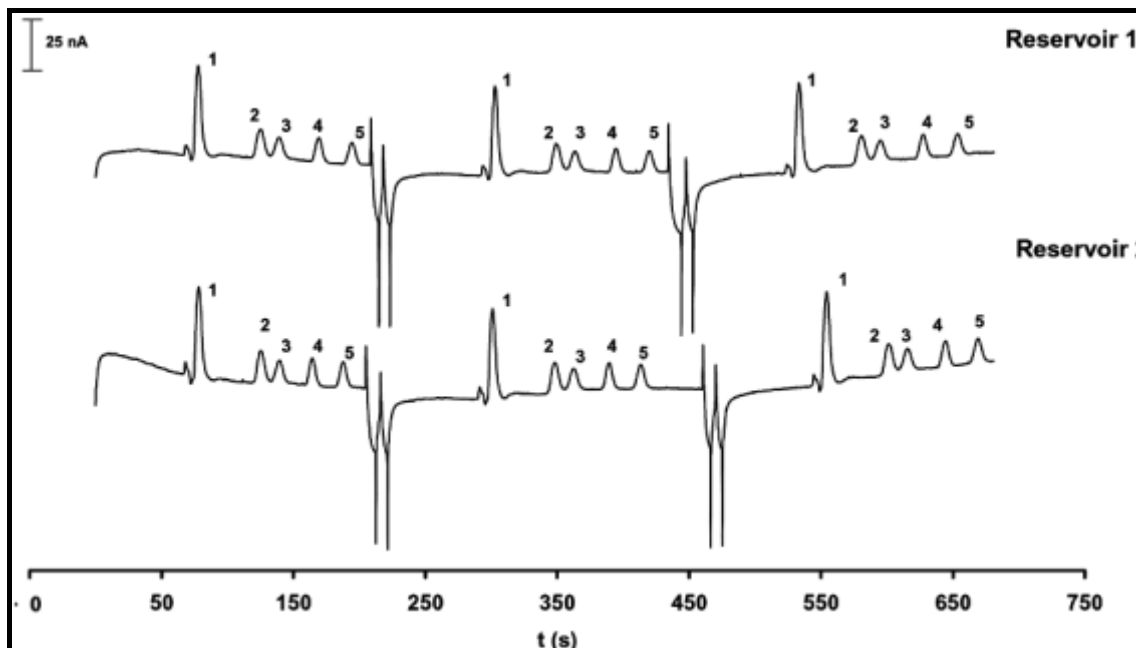


Figura 12. Electroforegramas secuenciales obtenidos por inyecciones repetitivas de cinco patrones de aromatizantes presentes en la vainilla usando microchip de CE-ED. Picos: Alcohol vainillínico (1), etilmaltol (2), maltol (3), etilvainillina (4), vainillina (5) [123].

Un tipo de compuestos con importancia alimentaria que han sido recientemente foco de atención para su determinación mediante microchips son los colorantes. Los colorantes artificiales se añaden de manera habitual a los alimentos con el propósito de mejorar su presencia física para el consumidor. Como la mayoría de estos aditivos son sintetizados químicamente y pueden tener efectos adversos contra la salud, existe una gran desconfianza entre los consumidores y, además, su contenido máximo en los alimentos está regulado por ley. Dossi et al. han publicado un excelente trabajo donde se realizó la separación de cinco colorantes (amarillo AB, rojo 2g, amarillo ocaso, new coccine y amaranto) en menos de 300 s usando un microchip de CE-ED [124]. La idoneidad de este método se evaluó analizando muestras reales tales como refrescos y caramelos detectándose solamente el amarillo ocaso. El tratamiento de muestra fue mínimo pero también se llevó a cabo *off-chip*. Una de las características más importantes de este trabajo fue la selectividad mostrada para estos compuestos por el detector electroquímico en comparación con uno UV/visible obteniéndose un electroforegrama limpio y claro. Además, Dossi ha publicado otro trabajo donde se desarrolló una nueva configuración *in-channel* para un microchip CE-ED y se aplicó a la detección de dos colorantes sintéticos (azul patentado V y verde S) [125]. Las ventajas

ya explicadas de esta configuración respecto a la *end-channel* (mejor resolución entre picos y mayor sensibilidad debido a la prevención de la dispersión de la banda del analito) se observaron claramente en esta publicación. El comportamiento analítico de este diseño se evaluó determinando los dos colorantes en muestras reales (refrescos, sirope y caramelos). La separación se llevó a cabo en 200 s y ambos compuestos se detectaron en las muestras analizadas (ver **fig. 13**).

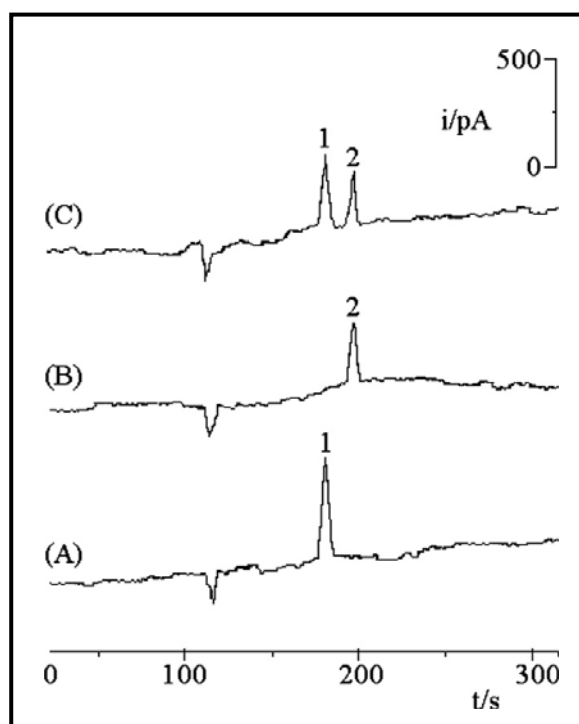


Figura 13. Determinación de colorantes en un refresco (A), sirope de menta (B) y un caramelo (C) usando un microchip de CE-ED con un nuevo diseño de configuración *end-channel*. Picos: (1) Azul patentado V, (2) Verde S [125].

La adaptación de los microchips de CE a las demandas o necesidades analíticas es una estrategia inteligente para mejorar el potencial de estos microdispositivos y acercarlos más a su aplicación fuera de los laboratorios de investigación. Por tanto, el uso de microchips de CE como sistemas de análisis por inyección electrocinética es una alternativa atractiva para responder a demandas analíticas donde solamente se necesite determinar un analito o un grupo de analitos (una señal). Dentro de esta problemática estaría la determinación de isoflavonas totales, compuestos polifenólicos para los que la diferenciación de sus posibles formas químicas parece ser irrelevante ya que solamente la forma aglicona es absorbida en el tracto intestinal humano y todas

las formas de isoflavonas son transformadas a agliconas a lo largo del proceso digestivo. Por tanto, la cantidad total de isoflavonas podría dar suficiente información de cara al etiquetado y control de calidad alimentario. En este sentido, nuestro grupo empleando una plataforma electroforética microfluídica llevó a cabo la calibración metodológica y la determinación del contenido total de isoflavonas en muestras de soja [126]. La exactitud (error sistemático inferior al 6%) de estos microsistemas se demostró por primera vez usando un patrón secundario (Drug Master File SW/1211/03) como material de referencia. La ultra-rápida calibración y análisis de isoflavonas totales en muestras de soja se llevó a cabo exitosamente y de manera integrada en tan sólo 60 segundos cada etapa. La integración de ambos procesos, mejoró el comportamiento analítico de estos microsistemas reduciendo el tiempo de análisis total (120 s) y aumentándose la exactitud en un factor de 3 respecto a una cuantificación mediante el uso de una curva de calibración externa.

Hauser y colaboradores [119, 127] han publicado los trabajos más relevantes en el análisis de alimentos empleando detección por conductividad sin contacto (*contactless*). En efecto, este grupo ha estudiado la separación de vitamina C y de conservantes tales como benzoato y sorbato utilizando un microchip de PMMA [127]. La transferencia del tampón utilizado en CE convencional al formato de microchip no mantuvo los valores óptimos de resolución obtenidos en escalado convencional debido principalmente a la corta longitud útil del microchip comparado con la del capilar convencional. Con tal motivo, se necesitó optimizar de nuevo el medio de separación empleando para ello una ciclodextrina (HP- β -CD) y el tensioactivo CTAB como parte de la composición del tampón para alcanzar la separación adecuada. Estos estudios demuestran que la transferencia del escalado convencional al formato del microchip no puede establecerse de manera inmediata sino que requiere de una investigación adicional. Asimismo, esta contribución demuestra también las fuerzas y las debilidades en el análisis de vitamina C, benzoato y sorbato utilizando un sistema convencional de CE y un formato de microchip. En efecto, se pusieron de manifiesto las ventajas y las desventajas inherentes del formato de microchip con respecto al escalado convencional (se obtuvieron tiempos de análisis muy cortos pero la sensibilidad, la capacidad de picos, y la resolución entre picos fue levemente reducida). Además, el mismo grupo ha aportado otra aplicación muy importante donde se analizan hasta 12

aniones (inorgánicos y orgánicos) en menos de 100 s usando la misma ruta de detección y empleando diferentes disoluciones electrolíticas. Se determinaron amonio, potasio, calcio, sodio y magnesio así como cloruro, sulfato, oxalato, tartrato, malato, citrato, succinato, acetato, lactato, fosfatos inorgánicos y varios orgánicos en diferentes bebidas incluyendo agua, vino tinto, cerveza y leche [119]. Este excelente trabajo revela claramente el papel relevante de la detección conductimétrica en el análisis de rutina de alimentos tal y como se ilustra en la **figura 14**.

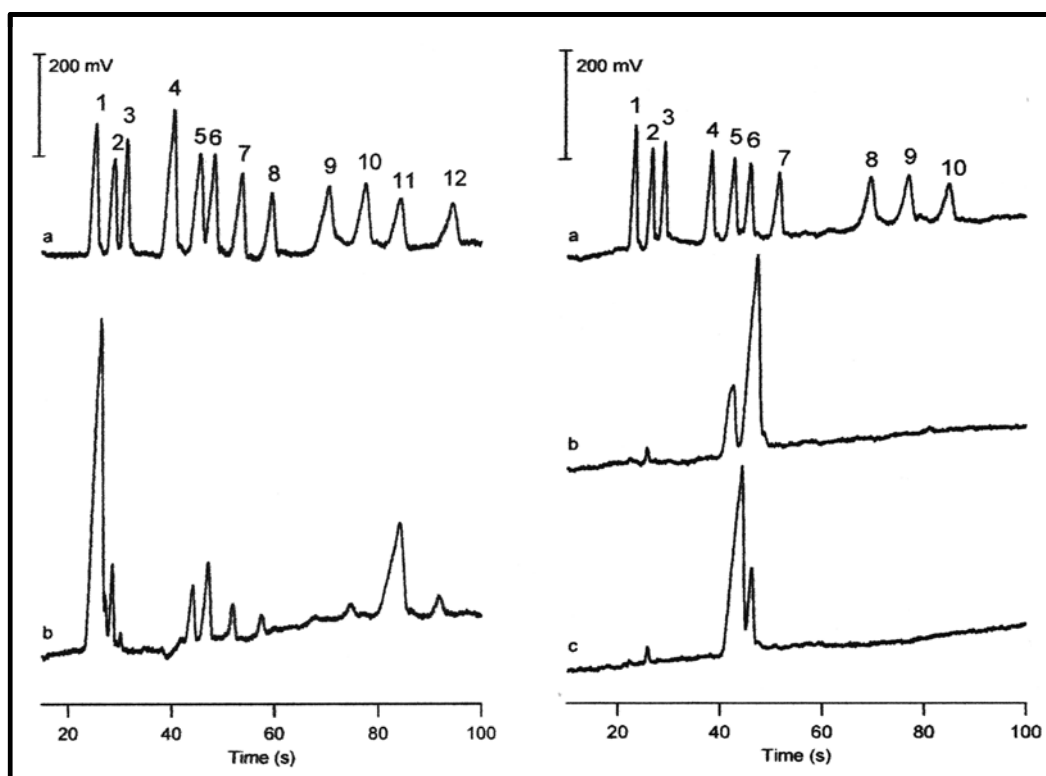


Figura 14. Separaciones electroforéticas empleando detección conductimétrica sin contacto. Izquierda: Determinación de aniones inorgánicos y orgánicos en cerveza. (a) Disolución de patrones, picos: 1, Cl^- ; 2, SO_4^{2-} ; 3, oxalato; 4, formiato; 5, malato; 6, citrato; 7, succinato; 8, piruvato; 9, acetato; 10, lactato; 11, fosfato; 12, piroglutamato. (b) Cerveza, dilución 1:5. Derecha: Determinación de aniones inorgánicos y orgánicos en zumos de frutas. (a) Disolución de patrones, picos: 1, Cl^- ; 2, SO_4^{2-} ; 3, oxalato; 4, tartrato; 5, malato; 6, citrato; 7, succinato; 8, acetato; 9, lactato; 10, fosfato. (b) Zumo de naranja, (c) zumo de manzana; dilución 1:50 [119].

Aparte de los trabajos de Hauser existe otra publicación donde usan un detector de conductividad sin contacto acoplado a un microchip de vidrio para determinar monofluoroacetato (MFA) en muestras de zumos y agua [128]. El MFA es un compuesto tóxico y, al tener carga, adecuado para ser detectado por conductividad. La principal característica de este trabajo fue la determinación directa (realizando

solamente una simple preparación de muestra) de MFA en una matriz compleja de zumo de frutas que contiene muchas interferencias tales como ácidos orgánicos, pequeños iones inorgánicos y alta concentración de azúcar. La inyección directa del zumo sin diluir no fue posible porque las paredes del microcanal se cubrían con moléculas de azúcar después de varios análisis causando resultados irreproducibles. Este inconveniente se resolvió diluyendo la muestra ya que la buena sensibilidad del método permitía seguir detectando el analito. La interferencia de los otros iones presentes en la muestra se evitó porque ofrecían distinta conductividad de acuerdo con su masa y carga. Trabajando directamente con muestras de zumo diluidas se pudo detectar y cuantificar el MFA en sólo 5 minutos.

A continuación, se van a comentar los trabajos donde se utilizó LIF como sistema de detección que, como se comentó anteriormente, ha tenido un papel menos protagonista que la detección electroquímica en el ámbito del análisis de alimentos.

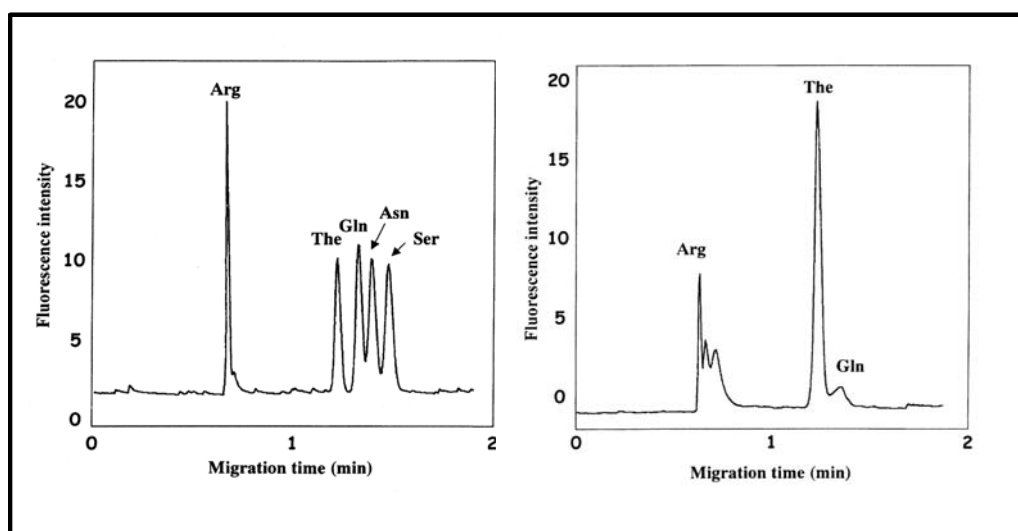


Figura 15. Electroforegramas obtenidos para una mezcla de aminoácidos (izquierda) y un extracto de té verde japonés (derecha) empleando LIF [120].

El primer trabajo realizado empleando detección LIF consistió en el desarrollo de una metodología ultrarrápida (menos de 120 s) para el análisis de cinco aminoácidos en té usando un microchip de PMMA [120]. Los aminoácidos fueron previamente derivatizados *off-chip* y posteriormente separados en el mismo en menos de 2 minutos con un tampón fosfato que contenía SDS para evitar la absorción de los aminoácidos en las paredes de los capilares. Los datos cuantitativos obtenidos para los tres

aminoácidos principales del té verde (tianina, arginina y glicina) fueron concordantes con los obtenidos usando HPLC. En este caso, se consiguió la selectividad mediante la derivatización de los aminoácidos objeto de análisis y eliminación de los polifenoles presentes. La **figura 15** muestra la separación de dichos aminoácidos en una mezcla de patrones y en una muestra de té, revelando el poder analítico de los microchips con detección LIF (separación de cinco patrones de aminoácidos con buena resolución y la detección de tres de ellos en una muestra compleja de té con resolución aceptable).

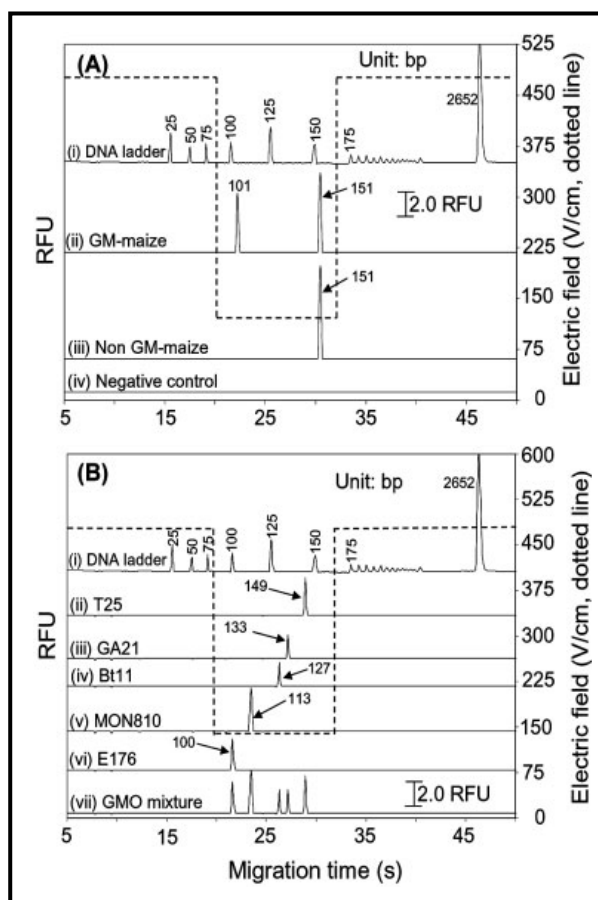


Figura 16. Análisis de maíz transgénico mediante microchip de electroforesis en gel con detección LIF. (A) Electroforegramas correspondientes a una muestra de maíz modificado y no modificado genéticamente. (B) Electroforegramas correspondientes a cinco muestras distintas de maíz transgénico [129].

Aunque el análisis de DNA está fuera de los objetivos de esta Tesis, se va a comentar un trabajo debido al impacto directo que tiene en el análisis de alimentos transgénicos. Este trabajo consistió en el análisis ultra-rápido de maíz transgénico utilizando un microchip de vidrio de doble T con detección LIF aplicando un programa

de campos eléctricos en gradiente [129]. Se investigó la eficiencia en la separación y la sensibilidad de varios geles de cribado. Los productos generados por PCR se analizaron en tan sólo 30 s reduciéndose 60 veces el tiempo de análisis de los métodos convencionales y permitiendo la discriminación entre maíz modificado y no modificado genéticamente. En la **figura 16** se muestran los electroforegramas correspondientes a distintas muestras de maíz transgénico y no transgénico.

También se han desarrollado métodos *on-chip* para el análisis de proteínas en alimentos. Usando el equipo comercial Agilent 2100 Bioanalyzer, que lleva un detector LIF, se ha conseguido hallar diferencias bioquímicas en músculos de peces debido al efecto de la acuicultura, sumamente importante para la calidad alimentaria, mediante el registro de los perfiles electroforéticos proteicos obtenidos con detección LIF [130]. La separación y cuantificación de 13 proteínas distintas se llevó a cabo en 60 s registrándose alteraciones claras en el perfil proteico (ver **figura 17**).

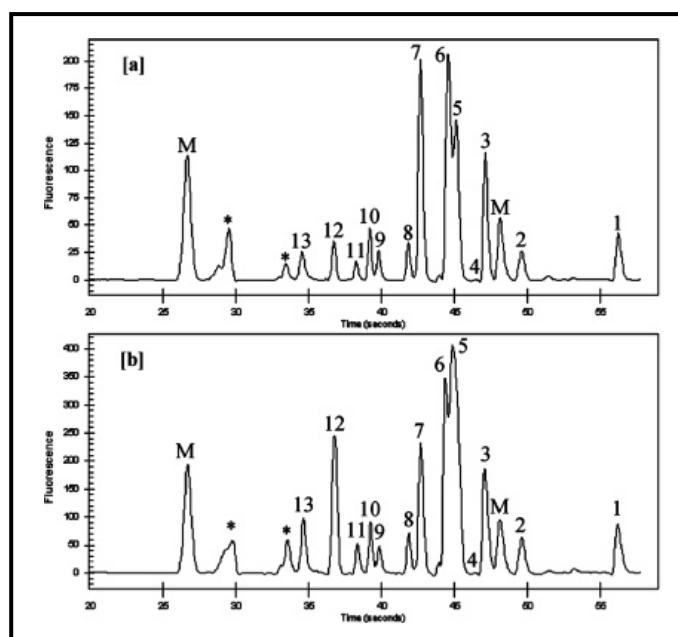


Figura 17. Electroforegramas correspondientes al análisis de extractos de músculo de peces mediante el uso del equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. Perfil proteico de una muestra de pez de piscifactoría (a) y procedente del mar (b). Los picos del 3 al 13 se usaron para la cuantificación relativa y el pico M como patrón interno [130].

Asimismo, el equipo Agilent 2100 Bioanalyzer también se utilizó con éxito para la identificación de variedades de trigo y la predicción de su calidad [131]. El análisis de 10 muestras, incluyendo la extracción de polipéptidos, centrifugación y separación

electroforética, se realizó en menos de una hora pudiéndose distinguir las distintas variedades de trigo estudiadas.

En otro trabajo, Schulze y colaboradores determinaron tres proteínas (lisozima, conalbúmina, ovoalbúmina), sin usar marcadores, en muestras diluidas de huevos de gallina en menos de 2 minutos (ver **figura 18**) mediante el uso de un microchip de vidrio con capilar recubierto con PVA (polialcohol vinílico) y detección LIF (UV profundo) [132]. Los límites de detección obtenidos fueron inferiores al orden micromolar.

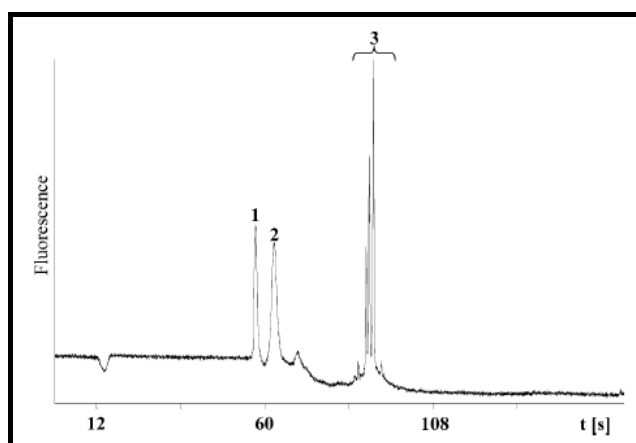


Figura 18. Electroforegramas correspondientes a la determinación de tres proteínas en una muestra de huevo de gallina mediante un chip recubierto con PVA y detección LIF. (1) Lisozima, (2) conalbúmina, (3) ovoalbúmina [132].

Otra aplicación interesante usando sistemas miniaturizados de electroforesis capilar ha sido la determinación de aminas biogénicas. Estos compuestos son abundantes en los seres vivos ya que intervienen en el metabolismo y se generan por descarboxilación de los aminoácidos, por lo tanto, también aparecen en una gran variedad de alimentos. Por ejemplo, tiramina e histamina, generadas por descarboxilación de tiroxina e histidina, están entre las aminas biogénicas más beneficiosas para la salud que se encuentran en bebidas fermentadas. El grupo de Mathies publicó un excelente trabajo donde se determinaron estas aminas neuroactivas en bebidas fermentadas usando un sistema portátil microfabricado de CE-LIF (Mars Organic Analyzer) que había sido utilizado anteriormente para la identificación de biomarcadores tales como aminoácidos, aminas, amino azúcares y bases nucleótidas en otros campos analíticos [133]. Las aminas biogénicas fueron marcadas previamente en su grupo amino primario con fluorescamina durante 10

minutos de reacción. Las muestras fueron posteriormente analizadas obteniéndose un complejo electroforegrama en tan sólo 120 s. Adicionalmente, el análisis de muestras de vino reveló que la histamina y tiramina se generaron durante la fermentación alcohólica y maloláctica, respectivamente. Debido a la singularidad del equipo utilizado, en la **figura 19** se muestra tanto un esquema de la instrumentación y del diseño del microchip que integra (**fig. 19 A y B**) como de los electroforegramas obtenidos para las muestras de vino analizadas (**fig. 19 C**). Además de éste, existe otro trabajo donde se determinaron tres aminas bioactivas (triptamina, triptófano y tiramina) usando un equipo miniaturizado casero de CE-ED [134]. El equipo se construyó cortando un capilar de vidrio de CE convencional y pegándolo sobre un soporte de plexiglás al cual se le acopló un electrodo de cobre como detector. El método propuesto permitió la separación de las tres aminas bioactivas en un tiempo de 6 min y se aplicó con éxito a muestras de vino y cerveza.

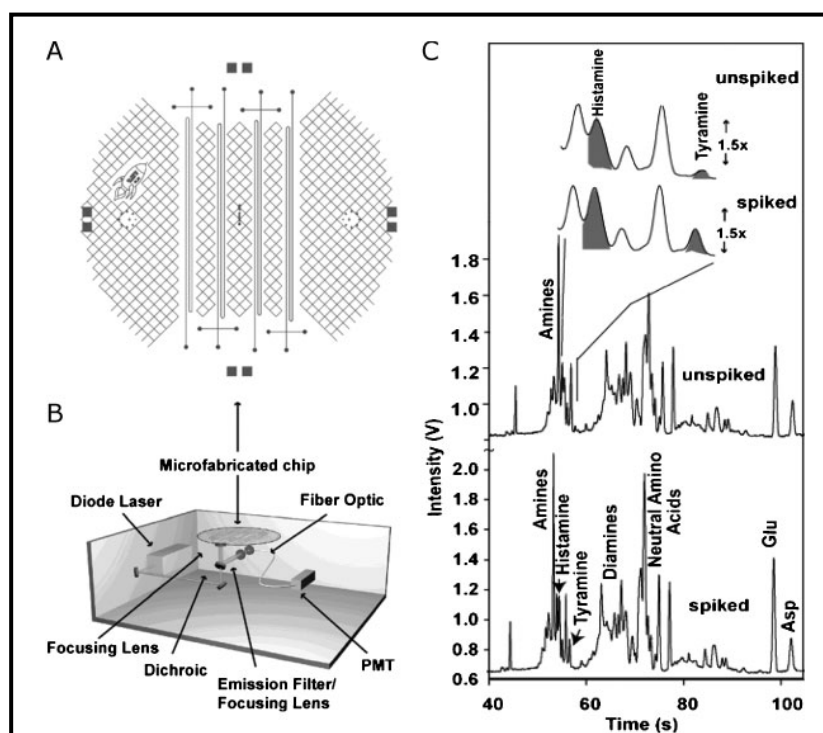


Figura 19. Determinación de aminas neuroactivas mediante el uso del equipo *Mars Organic Analyzer*. (A) Diseño del microchip. (B) Componentes del equipo portátil. (C) Electroforegramas obtenidos para muestras de vinos [133].

Por otra parte, un nuevo dispositivo microfluídico con detección UV, poco habitual en microchips de CE, se utilizó para determinar cuatro alcaloides tóxicos

(colchicina, aconitina, estricnina y nicotina) en muestras alimentarias (agua, leche y zumo de manzana) [135]. Se usó un microchip de cuarzo de cruz sencilla para la separación electroforética (menos de 200s) al cual se le acopló un espectrofotómetro miniaturizado de fibra óptica como detector. Para mejorar la sensibilidad de este tipo de detección se utilizó una técnica de preconcentración *on-line* y, además, se diseñó una célula de detección de burbuja para ampliar el camino óptico. En la **figura 20** se muestra los resultados obtenidos para los análisis realizados a las muestras reales estudiadas que previamente fueron fortificadas con patrones de los alcaloides para su detección y estudios de recuperación.

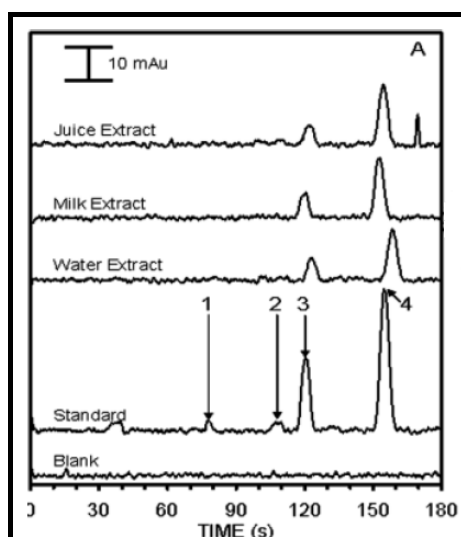


Figura 20. Electroforegramas correspondientes a la determinación de alcaloides en muestras alimentarias mediante microchip-MECK con detección UV. Picos: (1) nicotina, (2) aconitina, (3) estricnina, (4) colchicina [135].

Para finalizar esta revisión sobre microchips de CE en el análisis de alimentos es preciso destacar un trabajo que propone una integración de un gran número de etapas analíticas (preconcentración, separación y detección electroquímica) usando un sofisticado diseño de microchip con el objetivo de conseguir un verdadero *food lab-on-a-chip* [136]. El microchip estaba formado por tres canales paralelos donde dos de ellos se utilizaron para llevar a cabo un preconcentración y, a continuación, la inyección de muestra y el tercero se usó para llevar a cabo la separación mediante MEKC. El microsistema se evaluó analizando colorantes en distintas muestras alimentarias (zumo, bebida alcohólica tradicional coreana, pescado, fideos y pimienta roja en

polvo). En la **figura 21** se muestran el diseño del microchip, los pasos realizados para la preconcentración y el electroforegrama obtenido para una de las muestras. Las recuperaciones obtenidas fueron aceptables aunque se produjo una amplia variación en las corrientes de respuesta y tiempos de migración junto con una línea base inestable posiblemente debido a la alta concentración de sales y de ácidos orgánicos e inorgánicos en las muestras analizadas. De cualquier modo, destacar que gracias al proceso de preconcentración los límites de detección fueron excelentes (1 - 5nM).

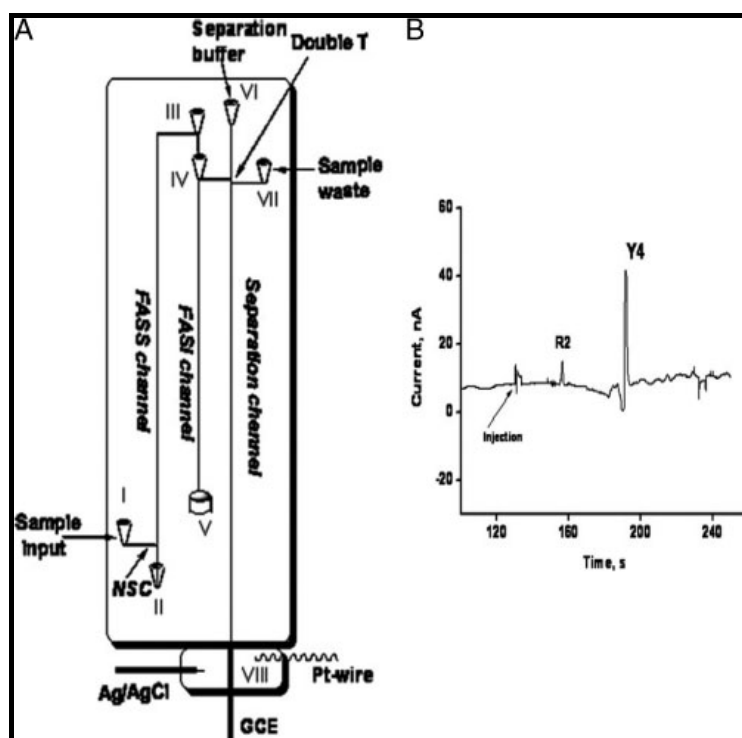


Figura 21. Análisis de colorantes en alimentos mediante un microchip de CE-ED con la etapa de preconcentración integrada. (A) Diseño del microchip. (B) Electroforegrama correspondiente a una bebida alcohólica tradicional coreana. Picos: (R2) Amaranto, (Y4) tartrazina [136].

Finalmente, se ha creído conveniente reunir en la **Tabla 1** la información analítica más relevante de las contribuciones comentadas anteriormente. Como puede deducirse de una lectura detenida de la misma, como consecuencia de la complejidad de las muestras de alimentos y la problemática del tratamiento de muestra en escalado miniaturizado comentada con anterioridad, en las primeras aplicaciones aparecidas en este ámbito el tratamiento de muestra se lleva a cabo siempre fuera del microchip y éstos son utilizados únicamente como sistemas ultrarrápidos de

separación (desde segundos a pocos minutos) salvo alguna excepción [136]. Con respecto al comportamiento analítico de los métodos desarrollados en formato miniaturizado se puede establecer que la precisión fue estudiada en todos los casos con profundidad; sin embargo, en los primeros trabajos raramente se aportaron datos sobre exactitud siendo, en todo caso, los experimentos de recuperación la estrategia más utilizada para evaluarla pero, en los últimos años, se ha realizado un enorme esfuerzo para demostrar la buena exactitud de estos microsistemas comparando los resultados obtenidos con el valor dado por el fabricante o con otros métodos analíticos. En este sentido, destacar la importancia del trabajo realizado por Blasco et al. ya que fue el primero en validar un método *on-chip* para el análisis de alimentos mediante un material secundario de referencia. De manera general, los LODs obtenidos en todos los casos fueron del orden micromolar y casi siempre adecuados para detectar los analitos en las muestras estudiadas.

Considerando la evolución de los trabajos que han ido apareciendo durante estos años constatar que mientras al principio se desarrollaban métodos de análisis pero rara vez se aplicaban a muestras reales, en las últimas publicaciones se ha mostrado un gran interés en demostrar la capacidad analítica de los microchips de CE para el análisis de muestras reales y, por tanto, su capacidad para ser usados en un futuro próximo en análisis de rutina.

Por último y teniendo en cuenta los trabajos científicos aportados hasta el momento y la aparición de los primeros equipos comerciales cabría concluir que los microchips de CE ya están presentes en el análisis alimentario y que, actualmente, la comunidad científica debería centrarse en desarrollar y validar métodos para su aplicación en muestras reales y, de este modo, demostrar la utilidad y fiabilidad de los futuros *food lab-on-a-chip*.

Tabla 1. Microchips de CE en el análisis alimentario

Muestra	Analitos	Tipo de microchip y modo de separación	Modo de detección	Características analíticas	Hechos destacados	Ref
Vino	<i>Ácidos fenólicos:</i> Clorogénico Gentísico Ferúlico Vanílico	Vidrio con diseño cruz sencilla CZE	Amperometría (<i>End-channel</i>) SPE HNO ₃ 0.1M como medio de detección	Tiempo de separación (<300s) Buena precisión (RSD < 7% en área de pico) LOD=10µM	Filtración del vino <i>off-chip</i> y separación/detección directa. Detección real de clorogénico/vanílico. Sin datos cuantitativos.	121
Extracto de té verde (suplemento dietético)	<i>Catequinas:</i> Catequina Galato de epigallocatequina Epicatequina Galato de epicatequina	PDMS con diseño de doble T. El canal de detección perpendicular la de separación. MEKC	Amperometría de pulsos (<i>End-in-channel</i>) Electrodo de oro (diámetro 25 µm)	Tiempo de separación (<300s) Buena precisión (RSD < 7% en área de pico) LODs 8-10µM	Extracción sólido-líquido y filtración <i>off-chip</i> Detección real de las cuatro catequinas. Validación del método usando HPLC.	118
Pera y zumos	<i>Antioxidantes naturales:</i> Arbutina (+)-Catequina Ácido ascórbico Flordizina Rutina	Vidrio con diseño cruz sencilla CZE	Amperometría (<i>End-channel</i>) GCE	Tiempo de separación (<200s) Buena precisión (RSD < 7% en área de pico)	Filtración para zumo Extracción sólido-líquido y filtración para pera (<i>off-chip</i>) Detección real de arbutina y ácido ascórbico. Aproximación a la cuantificación.	117
Ninguna	<i>Seleno aminoácidos:</i> Se-metionina Se-etionina Se-metilcisteina	Vidrio con diseño cruz sencilla MEKC	Amperometría (<i>End-channel</i>) SPE	Tiempo de separación (<250s) Buena precisión (RSD =5% en área de pico) LOD=10µM	Derivatización de aminoácidos <i>off-chip</i> No se analizó muestra real	122
Pastillas de vitamina C Refrescos	Vitamina C <i>Conservantes:</i> Benzoato Sorbato	PMMA con diseño cruz sencilla CTAB para suprimir EOF. Se usó ciclodextrinas (HP-β-CD).	Conductividad sin contacto "contactless"	Tiempo de separación (<50s) Buena precisión (RSD menor al 4%) LODs 3-10 mg/L Comparación con CE convencional	Filtración <i>off-chip</i> Datos cuantitativos Validación del método usando CE convencional	127

Tabla 1. Microchips de CE en el análisis alimentario (Continuación).

Muestra	Analitos	Tipo de microchip y modo de separación	Modo de detección	Características analíticas	Hechos destacados	Ref
Té verde	<i>Aminoácidos:</i> Arg, The, Gln, Asn, Ser	PMMA con diseño de doble T MEKC	LIF	Tiempo de separación (120s) Precisión <i>inter</i> -chip 3%	Extracción & filtración & derivatización de aminoácidos <i>off</i> -chip Datos cuantitativos Validación del método usando HPLC	120
Maíz modificado genéticamente	DNA	Vidrio con diseño de doble T Electroforesis en gel	LIF	Tiempo de separación (30s)	Diferenciación entre maíz modificado y no modificado genéticamente	129
Huevo de gallina	Lisozima Conalbúmina Ovoalbúmina	Vidrio con diseño de cruz sencilla recubierto con PVA	LIF (UV lejano)	Tiempo de separación (100s) LODs 0.5-0.9 μ M	Detección sin uso de marcadores	132
Bebidas fermentadas	<i>Aminas biogénicas:</i> (tiramina y histamina)	Borofloat® (vidrio borosilicatado) con un diseño sofisticado CZE	LIF	Tiempo de separación (100s)	Detección de ambos analitos en muestra real. Instrumentación portátil totalmente integrada (analizador orgánico portátil <i>Mars Organic Analyzer</i>)	133
Vino y cerveza	Triptamina, triptófano y tiramina	Capilar de vidrio CZE	Amperometría (<i>end-channel</i>) electrodo de Cu	Tiempo de separación (360 s) LOD (10^{-7} M)	Sistema electroforético miniaturizado casero	134
Vainilla y edulcorantes	Vainillina y etilvainillina	Vidrio con diseño cruz sencilla CZE	Amperometría (<i>end-channel</i>) GCE	Tiempo de separación (200 s) LOD 0.1–0.3 mM	Detección rápida de fraudes entre vainillina (natural) y etilvainillina (artificial) en muestras reales	123

Tabla 1. Microchips de CE en el análisis alimentario (Continuación II).

Muestra	Analitos	Tipo de microchip y modo de separación	Modo de detección	Características analíticas	Hechos destacados	Ref
Refrescos, sirope y caramelos	<i>Colorantes artificiales:</i> (Amarillo AB, rojo 2G, amarillo ocaso, new coccine, amaranto)	Vidrio con diseño cruz sencilla CZE	Amperometría (<i>end-channel</i>) GCE	Tiempo de separación (300 s) LOD 3–15 μM	Alta selectividad debido al empleo de detección electroquímica (electroforegramas limpios comparados con los obtenidos por UV/Vis). Solamente el amarillo ocaso se detectó en muestra real.	124
Refrescos, sirope y caramelos	<i>Colorantes artificiales:</i> (Azul patentado V y verde S)	PDMS con diseño cruz sencilla CZE	Amperometría (<i>in-channel</i>) Fibra de carbono	Tiempo de separación (250 s) LODs 10–17 μM	Nuevo diseño electroquímico (<i>in-channel</i>) en el análisis alimentario. Ambos colorantes fueron detectados en muestras reales.	125
Agua, leche, zumo de manzana (fortificados)	<i>Alcaloides:</i> (colchicina, aconitina, estricnina, nicotina)	Cuarzo con diseño cruz sencilla MECK	Absorción UV Fibra óptica miniaturizada	Tiempo de separación (200 s) LOQs 20–100 μM	Detección UV para alcaloides. Se detectó sólo en muestras fortificadas.	135
Leche y suplemento alimenticio de soja	Isoflavonas totales	Vidrio con diseño cruz sencilla Sin separación de analitos (FIA)	Amperometría (<i>end-channel</i>) GCE	Tiempo de análisis (60 s) LODs 5–8 μM	Calibración integrada. Alta exactitud (error inferior al 7% respecto material certificado de referencia). Detección real del contenido total en isoflavonas en muestras derivadas de soja.	126
Zumos	MFA (mono fluoroacetato)	Vidrio con diseño cruz sencilla CZE	Conductividad sin contacto “ <i>contactless</i> ”	Tiempo de separación (120 s) LODs 138–173 $\mu\text{g/L}$	Detección real en muestras de zumo diluidas.	128
Bebidas (zumo y alcohol), pescado, fideos y pimiento rojo en polvo	Colorantes	Diseño sofisticado con tres canales en vidrio MECK	Amperometría (<i>end-channel</i>) GCE	Tiempo de separación (240 s) LODs 1–5 nM	Integración total de las etapas analíticas. Preconcentración <i>on-chip</i> . Se detectaron dos colorantes en muestra real.	136

II.1.4. Analitos estudiados

II.1.4.1. Vitaminas

II.1.4.1.a. Definición, clasificación y características generales de las vitaminas.

Las vitaminas son compuestos orgánicos presentes en los alimentos que no pueden ser sintetizadas por el organismo humano en las cantidades adecuadas requeridas para el mantenimiento de las funciones metabólicas de la mayoría de las células animales. La mayor parte de las vitaminas son sintetizadas por las plantas y microorganismos; otras sólo por microorganismos.

Muchas enzimas necesitan un cofactor orgánico (coenzima) o inorgánico (iones metálicos) para llevar a cabo su función catalítica en el metabolismo humano. Muchas de estas coenzimas derivan de las vitaminas, de ahí el que estos compuestos sean indispensables. Su carencia se traduce en la falta de actividades enzimáticas trascendentales, con alteraciones metabólicas graves que dan lugar a patologías diversas.

Las vitaminas se dividen en dos grandes grupos: hidrosolubles y liposolubles. Entre las hidrosolubles están la tiamina (B₁), la riboflavina (B₂), la niacina (PP o B₃), el ácido pantoténico (B₅), el ácido fólico (B₉), el ácido ascórbico (C), la piridoxina (B₆), la cobalamina (B₁₂) y la biotina (H) y entre las vitaminas liposolubles se encuentran el retinol (A), el calciferol (D), el tocoferol (E) y la fitoquinona (K). Las funciones bioquímicas de cada uno de los grupos de vitaminas se muestran en la **tabla 2**. Como se puede observar en dicha tabla, las formas coenzimáticas de las vitaminas hidrosolubles participan catalíticamente en multitud de procesos metabólicos y la carencia o deficiencia de alguna de ellas puede afectar de forma considerable al metabolismo, deteniendo procesos de reproducción y crecimiento o aumentando la susceptibilidad a las infecciones (enfermedades carenciales o *avitaminosis*). Con respecto a las funciones bioquímicas de las vitaminas liposolubles solamente indicar que presentan una enorme disparidad entre ellas.

Tabla 2. Funciones bioquímicas de las vitaminas.**A) Vitaminas hidrosolubles.**

Vitamina	Coenzima	Función bioquímica
Ac. Pantoténico (B ₅)	CoA	Transferencia de grupos acilo (β -oxidación de ác. Grasos, degradación de acetil CoA en el ciclo de Krebs, etc.)
Biotina (H ó B ₈)	Biotina	Transferencia de grupos carboxilos (piruvato carboxilasa, acetil CoA carboxilasa, etc.)
Tiamina (B ₁)	Pirofosfato de tiamina (TPP)	Transferencia de grupos aldehído por descarboxilación oxidativa
Piridoxina (B ₆)	Fosfato de piridoxal	Transferencia de grupos amino, descarboxilación (metabolismo de aminoácidos)
Cobalamina (B ₁₂)	5'-adenosil cobalamina Metilcobalamina	Transmetilación, síntesis de ác. timidílico y DNA, degradación de aminoácidos
Ac. Fólico (B ₉)	Ac. tetrahidrofólico	Transmetilación, degradación de aminoácidos
Niacina (B ₃ ó PP)	NAD ⁺ y NADP ⁺	Transferencia de hidrógenos (electrones)
Riboflavina (B ₂)	FMN y FAD	Transferencia de hidrógenos (electrones)
Ac. ascórbico (C)	Ac. ascórbico	Transferencia de hidrógenos, síntesis del colágeno.

B) Vitaminas liposolubles.

Vitaminas	Función bioquímica
Vitamina A (retinol)	Biosíntesis de cartílagos y hormonas sexuales. Fisiología de las mucosas y de la retina.
Vitamina D (calciferol)	Regulación de la calcemia (nivel de calcio en sangre). Formación de los huesos.
Vitamina E (tocoferol)	Captador de peróxidos (antioxidante)
Vitamina K (fitoquinona)	Formación de protrombina. Coagulación de la sangre.

El abuso de vitaminas o *hipervitaminosis* puede producir, sobre todo en el caso de las liposolubles, trastornos importantes. Por otra parte, y en contra de la creencia generalizada, altas dosis de vitaminas hidrosolubles pueden también resultar perjudiciales por toxicidad directa, establecimiento de estados de dependencia, enmascaramiento de enfermedades concurrentes, interacción con fármacos u otras vitaminas y asociación con altas dosis de vitaminas liposolubles. El conocimiento de la dosis diaria recomendada (RDA) es difícil y los organismos oficiales relacionados con la salud, basándose en los datos que los investigadores van obteniendo, las fijan periódicamente. Durante el embarazo y la lactancia se aumenta la dosis y los alcohólicos y las mujeres que toman anticonceptivos necesitan también un suplemento de vitaminas del grupo B [137-139]. Actualmente existe una directiva europea 90/496/EEC que fija la RDA y que ha sido recogida en la legislación española mediante el real decreto RD 1275/2003, pero hay dos informes del comité científico para la alimentación (“Nutrient and energy intakes for the European Community”, opinion expressed on 11 December 1992, Ed. Directorate-General industry 1993 y “The revision of reference values for nutrition labelling”, expressed on 5 March 2003, Ed.SCF/CS/NUT/GEN/18 Final) que recomiendan variar estos valores tal y como se refleja en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Cantidades diarias recomendadas para vitaminas.

Vitaminas	RDA (90/496/EEC)	RDA (año 2003)
Vitamina B ₁ (mg)	1.4	1.1
Vitamina B ₂ (mg)	1.6	1.4
Niacina (mg)	18	16
Ac. pantoténico (mg)	6	6
Vitamina B ₆ (mg)	2	1.4
Biotina (µg)	150	50
Ac. Fólico (µg)	200	400
Vitamina B ₁₂ (µg)	1.0	2.5
Vitamina C (mg)	60	80
Vitamina A (µg RE) ^a	800	800
Vitamina D (µg)	5	5
Vitamina E (mg)	10	12
Vitamina K (µg)	-	75

^a equivalente de retinol mg/g PUFA (ácidos grasos poliinsaturados)

II.1.4.1.b. Fuentes de vitaminas.

El descubrimiento de las vitaminas proviene de estudios dietéticos donde se sometían a distintos animales a dietas deficitarias en algún tipo de alimento puesto que por aquel entonces la única fuente de vitaminas eran los alimentos. Actualmente, se pueden sintetizar todos estos nutrientes esenciales y existen distintas fuentes artificiales tales como los complejos vitamínicos o los conocidos hoy en día como *alimentos funcionales*.

Según la directiva europea 2002/46/CE se consideran “*complementos alimenticios*” a “los productos alimenticios cuyo fin sea complementar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada; es decir, en cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras y otras formas similares, bolsitas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras formas similares de líquidos y polvos que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias” y se entiende como “*nutrientes*” a las vitaminas y los minerales.

Por tanto, los complejos multivitamínicos se pueden considerar como complementos alimenticios y no como medicamentos (regulados según directiva 2001/83/CE).

Los “*alimentos funcionales*” se pueden definir como “aquellos alimentos que además de proporcionar nutrientes básicos y calorías también proporcionan un beneficio fisiológico” [140]. Aceites, zumos, margarinas, etc. enriquecidas en vitaminas, en compuestos que bajan el nivel de colesterol o que proporcionan algún beneficio sobre nuestra salud son habituales en nuestros mercados. Debido a la gran cantidad de alimentos “milagrosos” que están proliferando, la UE tuvo que crear una directiva y un reglamento nuevos (directiva 2000/13/CE, reglamento 2003/0165) que ampliaban la ya existente directiva (90/496/CEE) para regular que sustancias contenidas en los alimentos tienen propiedades beneficiosas para el organismo y cómo se debe etiquetar dichos alimentos. Las vitaminas se encuentran también dentro de las sustancias beneficiosas que se añaden o contienen estos *alimentos funcionales*.

De manera orientativa, en la **tabla 4** se muestran los alimentos que constituyen la fuente principal para cada una de las vitaminas.

Tabla 4. Vitaminas y fuente de obtención.

Vitaminas	Alimentos ricos en vitaminas
Vitamina B ₁	Cereales enteros, legumbres, nueces, hígado, carnes, leche, huevos
Vitamina B ₂	Cereales enteros, legumbres, verduras, hígado, carnes, leche, huevos
Niacina	Pescados, frutos secos, cereales enteros, legumbres, hígado, carnes, leche, huevos, levadura
Ac. Pantoténico	Abundante en muchos alimentos
Vitamina B ₆	Pescados, cereales enteros, legumbres, hígado, carnes, leche, huevos, algunas verduras
Biotina	Levadura, hígado y huevos
Ac. Fólico	Hojas vegetales frescas, naranjas, nueces, hígado, carnes, cereales enteros y levadura
Vitamina B ₁₂	Mariscos, hígado, carnes, leche, huevos y levadura
Vitamina C	Cítricos, coles, fresas, acerolas, grosellas, presente en hortalizas y frutas
Vitamina A	Vegetales (carotenoides), yema de huevo, productos lácteos, carnes, pescados grasos y aceites de hígado de pescados
Vitamina D	Aceites de pescado, mantequilla, leche y yema de huevo
Vitamina E	Aceites vegetales, fracción lipídica de hortalizas verdes.
Vitamina K	Verduras, legumbres, carnes, hígado, huevo, quesos fermentados y alfalfa

II.1.4.1.c. Estructura química y propiedades de las vitaminas hidrosolubles estudiadas.

Ácido ascórbico (vitamina C).

La estructura del ácido ascórbico (**figura 22**) está relacionada con las L-hexosas y se caracteriza por tener un grupo enodiol en el que reside su propiedad redox y por el grupo carboxilo el cual está, normalmente, en forma de lactona. El ácido ascórbico tiene propiedades reductoras debido a su grupo enodiol que al oxidarse se convierte en ácido deshidroascórbico. Este último compuesto también es una forma activa de la vitamina C ya que participa en equilibrios redox de las células.

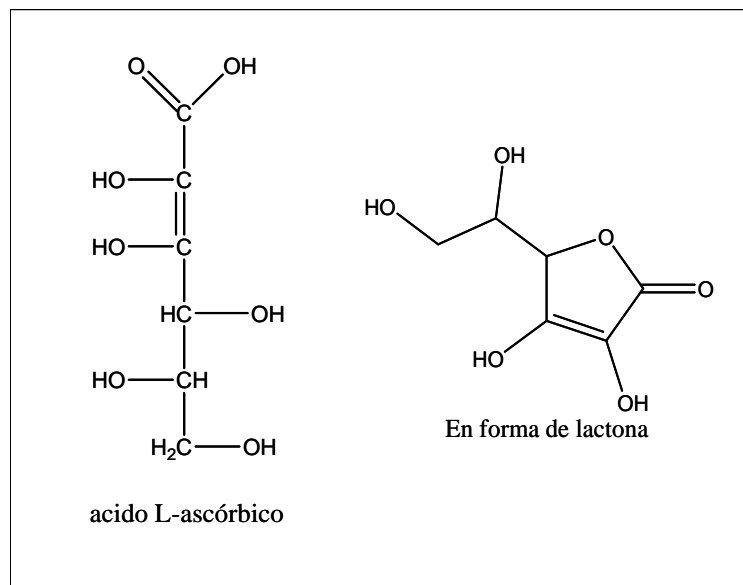


Figura 22. Estructuras del ácido L-ascórbico

La hipovitaminosis C se manifiesta por los síntomas de cansancio, debilidad, inflamación en las piernas, neurosis, inflamación de las encías y pérdidas de dientes, hemorragias por debilidad de los capilares, dermatosis, dificultad para la cicatrización de las heridas y otros. La carencia grave produce el escorbuto y la muerte.

La función metabólica del ácido ascórbico está relacionada con la integridad del tejido conjuntivo participando en las reacciones de oxidación de los aminoácidos prolina y lisina a hidroxiprolina e hidroxilisina, ambos fundamentales en la cadena del colágeno, lo que explica los síntomas hemorrágicos y de fragilidad capilar que provoca su deficiencia. También participa en otras oxidaciones: transformación de esteroides en ácidos biliares, de tirosina en noradrenalina, oxidación de medicamentos y toxinas para su eliminación por la orina. Además, se le atribuye el papel de captador de radicales libres peróxido en las células, lo cual es importante porque estos radicales degradan las membranas y contribuyen al envejecimiento celular.

Piridoxina (vitamina B₆).

La vitamina B₆ presenta tres formas activas: piridoxina, piridoxal y piridoxamina. De las tres la forma química más abundante en alimentos es la piridoxina siendo, además, punto de origen de la síntesis de las otras dos.

Las estructuras de los vitámeros de la vitamina B₆ se muestran en la **figura 23**.

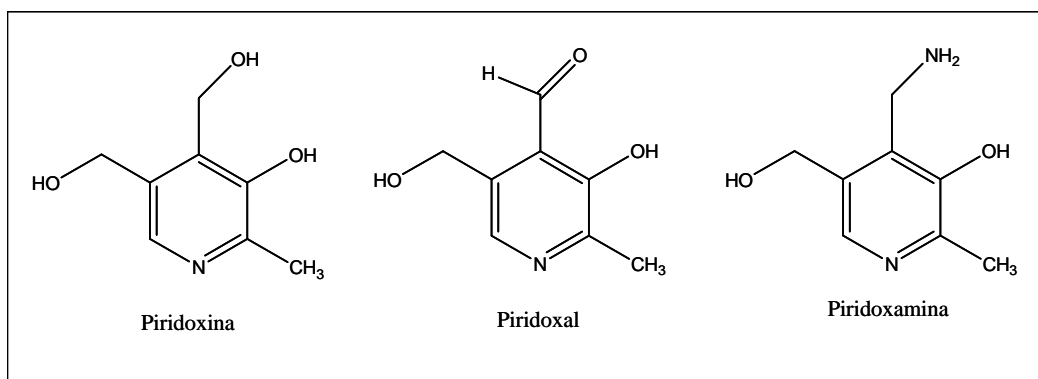


Figura 23. Estructura de las formas activas de la vitamina B₆.

En las células, la piridoxina es oxidada y fosforilada y el fosfato de piridoxal es la coenzima de muchas enzimas indispensables para el metabolismo de los aminoácidos (aminotransferasas, carboxilasas, desaminasas, etc.) y participa en la biosíntesis de porfirinas (grupo hemo), noradrenalina y serotonina, en la transformación de triptófano en ácido nicotínico, etc. Uno de los síntomas típicos de deficiencia de B₆ es la excreción urinaria de aminoácidos.

Los síntomas de hipovitaminosis son trastornos nerviosos, insomnio, debilidad, cansancio, dermatosis y anemias microcíticas (eritrocitos pequeños y con poca hemoglobina).

Cobalamina (vitamina B₁₂).

La estructura de la vitamina B₁₂ o cobalamina es la más compleja de todas las vitaminas (**figura 24**). Básicamente es una estructura fuertemente resonante con un núcleo de cobalto y debido a esta resonancia posee color rojo. También es de reseñar que en lugar de un grupo cianuro unido al catión metálico también es habitual encontrar un grupo hidroxilo.

Su síntesis fue publicada por Woodward y Eschenmosser en 1973, tras doce años de trabajo, y se consiguió en 90 pasos. Evidentemente, esta síntesis no se utiliza para su producción industrial sino que se obtiene por fermentación ya que se conocen varios microorganismos que la producen.

La vitamina B₁₂, para ser absorbida, tiene que unirse a una glicoproteína estomacal (factor intrínseco) y, posteriormente, liga una molécula de desoxiadenosina que sustituye al grupo -OH en el cobalto, siendo la d-adenosilcobalamina la forma

coenzimática. Es indispensable para varias reacciones de transmetilación como la transformación de cisteína a metionina, en el metabolismo de ácidos grasos y, sobre todo, para la formación de ácido d-timidílico necesario para la biosíntesis de DNA. Su deficiencia inhibe la duplicación celular. En esta formación de timidina, la vitamina B₁₂ actúa en conexión con el ácido fólico.

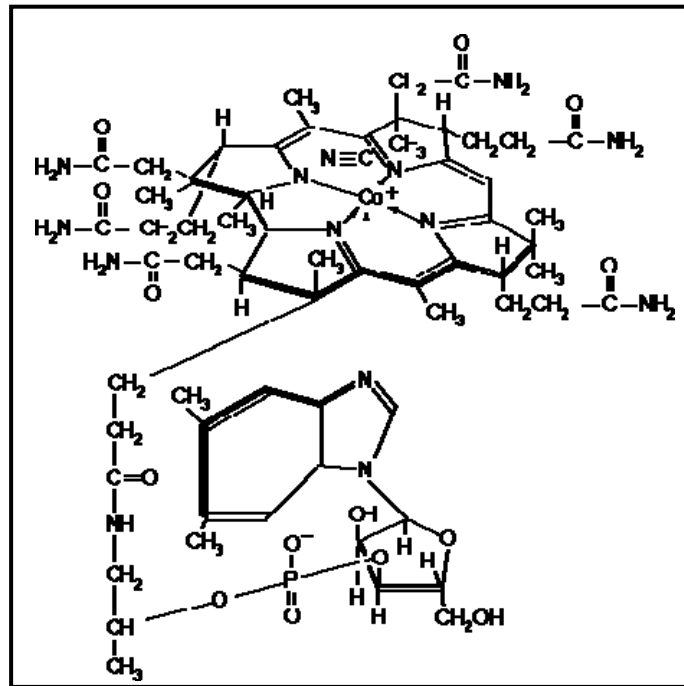


Figura 24. Estructura de la cianocobalamina.

La deficiencia de B₁₂ produce anemia megaloblástica caracterizada porque aparecen eritrocitos de gran tamaño en la médula ósea, lo que va acompañado de graves trastornos generales. Además, algunas personas no absorben la cobalamina lo que provoca que desarrollen un tipo de anemia megaloblástica denominada perniciosa. La razón de la falta de absorción de esta vitamina es que no sintetizan, en la pared estomacal, el factor intrínseco, bien por causas genéticas, por vejez, por gastronomía, etc.

Ácido fólico (vitamina B₉).

El ácido fólico es una vitamina del complejo B que presenta distintas especies derivadas de éste por sucesivas reducciones del anillo de pirazina. En la **figura 25** se muestra la estructura del ácido fólico y su forma coenzimática el ácido tetrahidrofólico.

El ácido fólico tiene un núcleo de pteridina (anillo de pirimidina acoplado a otro de pirazina) el cual se une al ácido p-amino benzoico y este, a su vez, a través de un enlace amida al ácido glutámico.

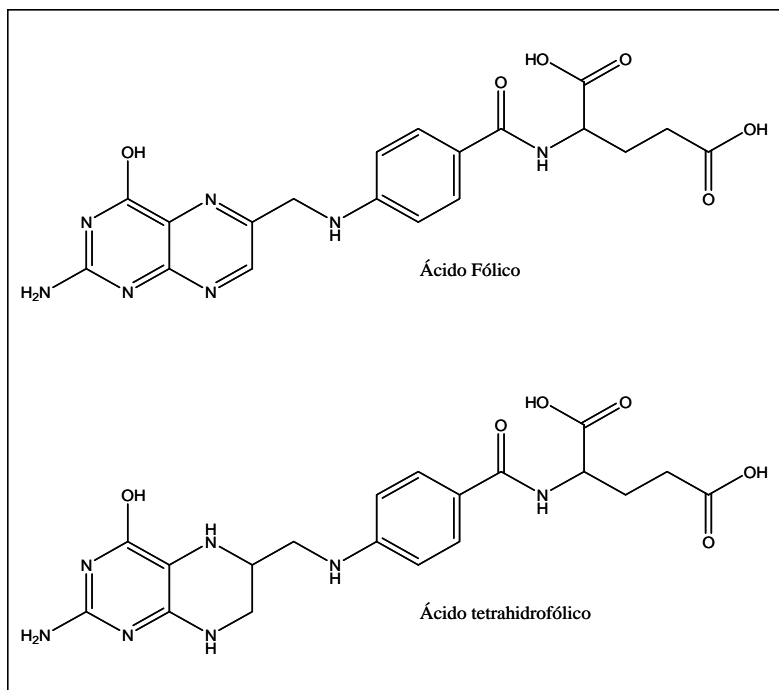


Figura 25. Estructuras del ácido fólico y tetrahidrofólico.

Esta vitamina interviene en las reacciones metabólicas de transferencia de grupos C-1 (metilo y formilo principalmente) y en la biosíntesis de ácido timidílico, necesario para el DNA, y de bases púricas. Cuando es absorbido se reduce por el NADPH a tetrahidrofólico y éste actúa como transportador de metilos en procesos donde interviene también la vitamina B₁₂ y la metionina.

Además, el ácido fólico ayuda a prevenir defectos de nacimiento en el cerebro y en la médula espinal denominados defectos del tubo neural como, por ejemplo, la espina bífida. Por eso, se recomienda una ingesta extra de ácido fólico para las mujeres embarazadas.

La deficiencia de ácido fólico produce una anemia parecida a la de la vitamina B₁₂, es decir, un tipo de anemia megaloblástica donde se producen eritrocitos de gran tamaño que genera trastornos generales en el organismo.

II.1.4.2. Compuestos polifenólicos

II.1.4.2.a. Definición, clasificación y propiedades generales de los compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos constituyen un vasto y heterogéneo conjunto de metabolitos secundarios de las plantas que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y que, por lo tanto, constituyen parte integral de nuestra dieta mediante el consumo de alimentos de origen vegetal tales como cereales, legumbres, frutas y verduras. Asimismo, bebidas populares como zumos de fruta, té, café, cacao, cerveza y vino son otra fuente habitual de polifenoles en nuestra ingesta diaria.

Desde un punto de vista químico, los compuestos polifenólicos o polifenoles son aquellos que contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, pudiendo presentar, además, otros grupos funcionales como sustituyentes. Para dar una idea ilustrativa de la variedad estructural de los compuestos polifenólicos, es preciso indicar que, en la actualidad son conocidas más de 6500 estructuras de este tipo de compuestos. Dada esta complejidad estructural, uno de los aspectos importantes en el ámbito de los compuestos polifenólicos ha sido establecer una clasificación sencilla en base a las estructuras predominantes en los mismos. En este sentido, puede establecerse que las principales clases estructurales que forman parte de los compuestos polifenólicos son los ácidos fenólicos y los flavonoides.

Adicionalmente, los flavonoides se clasifican en diferentes familias, diferenciándose dentro de éstas en el número y posición de los grupos hidroxilo así como en las alquilaciones y/o glicosilaciones de los mismos. De tal manera, surgen las siguientes familias; flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanoles, antocianidinas, isoflavonas y chalconas.

Por otra parte, las propiedades físico-químicas y fisiológicas que poseen los compuestos polifenólicos tienen un elevado interés cuyo estudio involucra a una heterogénea comunidad científica. Algunas de estas propiedades están bien establecidas desde hace tiempo como, por ejemplo, su empleo como marcadores en estudios taxonómicos de clasificación debido a la amplia distribución estructural de estos compuestos en la naturaleza. Sin embargo, otras propiedades tales como su actividad antioxidante, están todavía bajo estudio y puede decirse que es una propiedad emergente de los mismos. Dada la importancia de los antioxidantes

naturales como eficaces atrapadores de los radicales libres y sus consecuencias en la prevención del cáncer, no es de extrañar que esta propiedad sea una de las más importantes por la que los compuestos polifenólicos son objeto de una intensa investigación científica. No en vano, los compuestos polifenólicos son los denominados antioxidantes naturales y/o dietéticos. Con tal motivo, en primer lugar se describirán brevemente las propiedades más establecidas de los compuestos polifenólicos y, seguidamente, de manera más detallada, se comentarán razonadamente todos los aspectos más relevantes relacionados con sus propiedades antioxidantes.

En términos generales, los compuestos polifenólicos, tienen importancia biológica como metabolitos secundarios de las plantas, poseen efectos fisiológicos, se emplean como marcadores en estudios taxonómicos y juegan un papel importante en propiedades relacionadas con la calidad de los alimentos; existiendo numerosas monografías y revisiones bibliográficas en las cuales todas estas propiedades son objeto de estudio indicando por otra parte el interés de estos compuestos en la escena científica [141-148].

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de las plantas, siendo los responsables del crecimiento de las mismas y presentan determinadas interacciones con otros organismos vivos (hongos, bacterias y virus), y evitan así la infección de la planta por lo que se ha atribuido a estos compuestos un carácter protector. Asimismo, los compuestos polifenólicos presentan un carácter protector frente a la radiación UV, encontrándose un aumento de los niveles de los mismos en organismos expuestos a elevadas radiaciones [149-153].

Con respecto a las propiedades fisiológicas de los compuestos polifenólicos y, aunque obviamente, una descripción detallada se encuentra fuera de los límites lógicos de esta memoria, es preciso señalar que, la presencia de los grupos hidroxilo permite su interacción con proteínas y carbohidratos, disminuyendo así la disponibilidad de los macronutrientes. Indicar también que, la solubilidad de los compuestos polifenólicos va a determinar, de manera decisiva, los efectos fisiológicos de los mismos. Los polifenoles solubles son absorbidos en el tracto gastrointestinal y metabolizados; por el contrario, los insolubles no son absorbidos y son expulsados en las heces [154, 155].

Con respecto a las propiedades taxonómicas, indicar que constituyen uno de los aspectos más importantes de los compuestos polifenólicos, debido a la gran variedad estructural que presentan estos compuestos en el reino vegetal; pudiéndose establecer determinadas relaciones entre las partes de la planta y/o cultivo y la composición polifenólica encontrada [156-160]. Así, por ejemplo, el numeroso conjunto de cultivos de *Vitis vinifera* (uva) se clasifica en dos grandes grupos en función de la presencia y/o ausencia de anticionadinas metiladas [161]. Otro ejemplo representativo, es el de los cítricos, en los cuales se han establecido diferencias con respecto a su composición en flavanonas [162]. Esta valiosa propiedad de los polifenoles, como marcadores de determinadas matrices o frutos, ha permitido que se puedan emplear como sensores de la calidad de un determinado producto. En este sentido, la composición de flavanonas ha permitido distinguir entre zumos de naranja puros de aquellos adulterados con pomelo.

Con respecto a las propiedades relacionadas con la calidad de los alimentos, los compuestos polifenólicos juegan un papel importante en las propiedades organolépticas de los mismos [163-166]. Contribuyen a la acidez y astringencia de frutas y zumos debido a su interacción (fundamentalmente de procianidinas) con las glicoproteínas de la saliva. Los colores amarillos y marrones que aparecen en los zumos y en las frutas al ser cortadas o almacenadas, se producen como consecuencia de la reacción de oxidación entre los polifenoles y oxígeno en presencia de la enzima polifenol oxidasa, ya que las quinonas formadas polimerizan produciendo esta coloración. Los polifenoles se consideran los compuestos más importantes que determinan el sabor, así como las diferencias de color en vinos blancos, rosados y tintos. Son los ingredientes naturales del vino que reaccionan con el oxígeno, siendo cruciales en la conservación, maduración y envejecimiento del mismo. Sin embargo, la presencia de polifenoles también puede causar algunos efectos indeseables durante el almacenamiento de frutas y zumos. Por ejemplo, las interacciones con proteínas y polisacáridos son la causa más frecuente de turbidez en cervezas, vinos y zumos clarificados.

Estudios relevantes clínicos y epidemiológicos han establecido que existe una correlación inversa entre la ingesta de frutas y vegetales y la existencia de

determinadas enfermedades de naturaleza cardiovascular e inflamatoria, así como del cáncer y otros desórdenes [167].

Esta acción beneficiosa de la ingesta de estos alimentos se está atribuyendo a la presencia de unos compuestos abundantes en los mismos que son los denominados antioxidantes dietéticos o naturales. Estos antioxidantes incluyen a los compuestos polifenólicos, vitaminas C y E y carotenoides [168]. Por consiguiente, existe un elevado interés para la sociedad en general, para los médicos y expertos en nutrición así como para investigadores en las ciencias de la salud y de los alimentos, en poder conocer la capacidad antioxidante y los constituyentes asociados a dicha capacidad antioxidante en los alimentos que forman parte integral de nuestra dieta.

En definitiva, los polifenoles son potentes antioxidantes, denominados también antioxidantes naturales y/o dietéticos, presentando propiedades relacionadas con la prevención de la oxidación, tales como antiinflamatorias, antialérgicas y anticancerígenas [169-172].

II.1.4.2.b. Estructura química y propiedades específicas de las polifenoles estudiados.

Tras esta introducción general a los compuestos polifenólicos donde se han comentado, de manera general, sus estructuras, sus propiedades bioquímicas y sus aplicaciones, se procederá a describir brevemente y de manera individual la estructura y propiedades específicas de cada uno de los compuestos polifenólicos seleccionados para el desarrollo de esta Tesis.

Arbutina e hidroquinona

Arbutina e hidroquinona presentan una gran similitud estructural y funcional, por esta razón, se ha decidido comentarlas de manera conjunta. La estructura de la hidroquinona (1,4-hidroxibenceno) consiste en un benceno con dos grupos hidroxilo en posición *para* que son los causantes de sus propiedades fuertemente reductoras. La estructura de la arbutina (hidroquinona-1-O- α -d-glucósido) es igual a la de la hidroquinona salvo que uno de los grupos hidroxilo está glicosilado (ver **figura 26**). Mientras que la arbutina, a pesar de ser un compuesto fenólico de difícil clasificación, se encuadra dentro del grupo de los polifenoles, la hidroquinona no pertenece a dicho

grupo. Estos compuestos se puede encontrar en pequeñas cantidades en multitud de vegetales (brócoli, café, trigo, vino tinto...) pero la arbutina se encuentra en concentraciones muy elevadas en ciertas plantas como, por ejemplo, la Gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.)) siendo habitual su uso como hierba medicinal (HMP) debido a la presencia de dicho compuesto. Las aplicaciones farmacológicas descritas para arbutina están referidas a su uso como desinfectante del tracto urinario y como blanqueador de la piel. Por otra parte, cuando se ingiere Gayuba (HMP) que contiene arbutina, el organismo metaboliza este principio activo en forma de conjugados de hidroquinona (glucurónido y sulfato) que se excretan renalmente. Estos metabolitos parecen ser los precursores de la hidroquinona en forma libre que se libera en el tracto urinario y que, finalmente, es la responsable de la actividad desinfectante [173, 174]. Además, la hidroquinona se utiliza en cosmética como agente blanqueante pero su uso prolongado puede causar picor, dermatitis y eritema, por este motivo, la cantidad máxima permitida en productos cosméticos está regulada por normativa (Real Decreto 1599/1997 modificado por Orden SCO/2592/2004 y Orden SCO/322/2009).

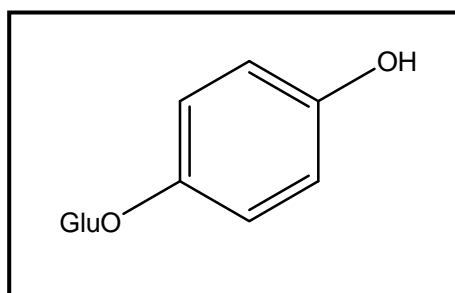


Figura 26. Estructura química de la arbutina.

(+)-Catequina

Este polifenol se clasifica dentro del subgrupo de los flavanoles. Su estructura está formada por un esqueleto difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$) con cuatro sustituyentes hidroxilo (3, 5, 7, 3', 4') (ver **fig. 27**). Los flavanoles constituyen una de las familias más ampliamente distribuidas encontrándose abundantemente en té, vino tinto y chocolate. No sólo se presentan como unidades monoméricas, sino que también aparecen como estructuras oligoméricas conocidas como procianidinas. Las procianidinas están constituidas por dos o más monómeros unidos químicamente,

siendo (+)-catequina y (-)-epicatequina sus monómeros constituyentes. Al grupo de los flavanoles también se les conoce, por extensión, como “catequinas”.

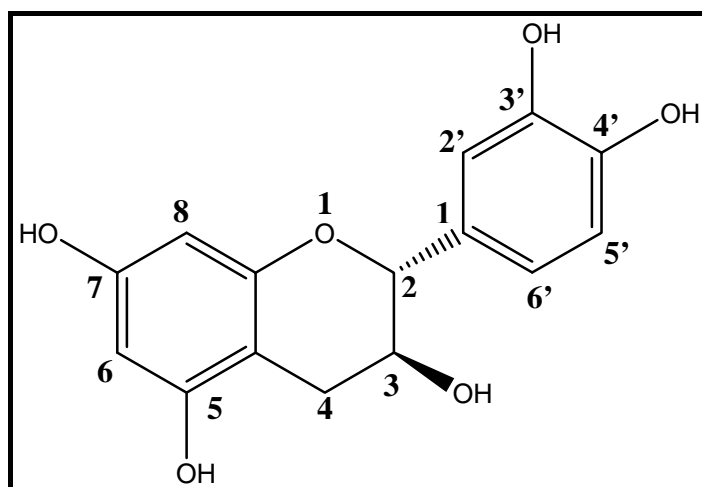


Figura 27. Estructura química de la (+)-catequina.

Rutina

La rutina se clasifica dentro de los flavonoles y tiene una estructura parecida a la catequina. Las diferencias respecto a la catequina son que presenta un sustituyente ceto en la posición 4, un doble enlace entre el C₂ y el C₃ y está glicosilado en la posición 3 (el monosacárido es ramnosa) (ver **fig. 28**). Este compuesto sólo se encuentra en la piel de frutas y verduras, por tanto, su identificación durante el análisis de una muestra es prueba inequívoca de que contiene piel de alguna fruta o verdura.

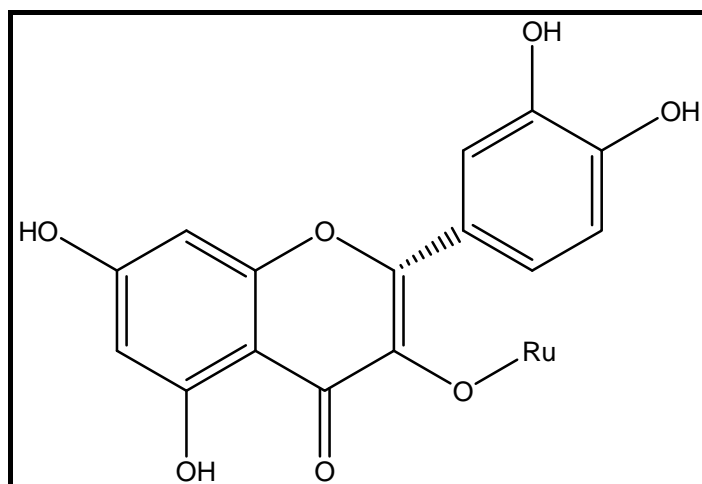


Figura 28. Estructura química de la rutina.

Florizina

Este compuesto pertenece al grupo de las chalconas que se caracterizan en que son los únicos flavonoides que no poseen un heterociclo. La estructura se muestra en la **figura 29** y se puede observar como también está glicosilada (anillo de glucosa unido al oxígeno en posición 2') al igual que la rutina. Este compuesto es característico de las manzanas y se puede utilizar para identificar la presencia de manzana en cualquier tipo de muestra.

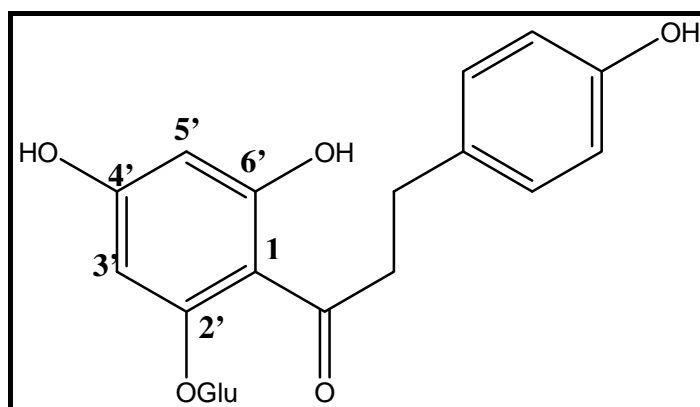


Figura 29. Estructura química de la florizina.

Isoflavonas

Las isoflavonas forman un subgrupo importante dentro de los polifenoles ya que presentan unas propiedades singulares que las diferencian claramente del resto de polifenoles y que han suscitado un enorme interés en el campo clínico, farmacéutico y alimentario.

Las isoflavonas, se pueden encontrar en leguminosas siendo especialmente abundantes en la soja. Las isoflavonas de la soja están incluidas en el grupo de los fitoestrógenos debido a su suave actividad estrógena [175], además, inhiben la actividad de ciertas enzimas y poseen propiedades antioxidantes [176, 177]. Todo ello hace que posean una capacidad potencial de protección contra ciertas enfermedades de tipo cardiovascular, osteoporosis y algunos tipos de cáncer [176, 178].

La estructura básica de la isoflavona aglicona es una 3-fenil-benzopirán-4-ona que está hidroxilada en las posiciones 4' y 7 y dependiendo de los sustituyentes R_1 y R_2 en los carbonos 5 y 6, respectivamente, nos encontramos con los tres tipos principales de agliconas presentes en la soja, daidzeína, genisteína y gliciteína. También existen los

correspondientes 7-O-glucósidos denominados daidzina, genistina y glicitina que pueden ser esterificados a través del oxígeno de la posición 6'' del anillo de glucosa con grupos acetilo o malonilo (R_3) para dar otros seis compuestos (ver **fig. 30**).

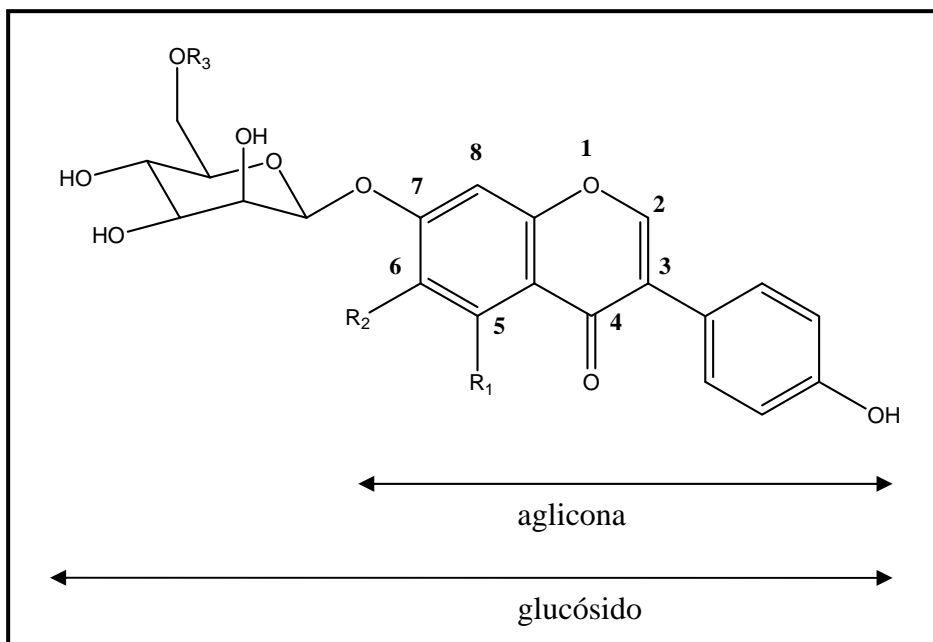


Figura 30. Estructura de las isoflavonas de soja.

Después del consumo de productos derivados de la soja, los glucósidos de isoflavona sufren una hidrólisis enzimática, principalmente, en el intestino delgado, que libera la aglicona que es la forma biodisponible para nuestro organismo [179, 180]. La hidrólisis es necesaria para la absorción de los glucósidos ya que solamente las agliconas pueden ser absorbidas en el intestino delgado [181]. Por todo lo anteriormente dicho, la diferenciación entre las distintas formas de las isoflavonas de soja puede ser irrelevante ya que el efecto fisiológico es debido a las agliconas y todas las formas posibles son hidrolizadas en el organismo a su correspondiente aglicona. Por tanto, una medida exacta del contenido total de isoflavonas en los productos de soja es un parámetro importante para medir su actividad fisiológica y, por tanto, para el control de calidad del producto [182]. De hecho, en el etiquetado de multitud de suplementos alimenticios preparados a partir de soja sólo aparece el contenido total en isoflavonas y no el tipo y ni la cantidad de cada tipo de isoflavona que contiene.

II.2. Parte experimental

II.2.1. Reactivos y muestras.

Los compuestos hidroquinona, arbutina, ácido fólico, hidrocloreto de piridoxina y cianocobalamina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y el compuesto ácido ascórbico en Fluka Chemie (Buchs, UK). El metanol empleado fue de grado HPLC y suministrado por Panreac (Barcelona, España). El bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) y el ácido bórico (H_3BO_3) se compraron en Sigma-Aldrich. El dihidrogenofosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y el monohidrogenofosfato sódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). Para la preparación de todas las disoluciones se utilizó agua ultra pura obtenida a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, USA).

El suplemento dietético de hojas de Gayuba (*Arctotaphylos. uva-ursi* L.), la crema cosmética (Pigmentasa[®], 5% de hidroquinona), el vino y los distintos complejos vitamínicos (Vitafardi[®], Aspol[®], Supradyn[®], Dayamineral[®], Hidrosil[®]) fueron adquiridos en distribuidores locales (Alcala de Henares, España). Las muestras de orina fueron recolectadas de nuestro grupo de investigación.

La composición por comprimido de los complejos vitamínicos estudiados fue la siguiente:

Vitafardi[®]; 500 µg de cloruro de hidroxocobalamina y 1 g de ácido ascórbico

Aspol[®]; 10 mg de ácido fólico.

Supradyn[®]; 2 mg de piridoxina, 60 mg de ácido ascórbico y 200 µg de ácido fólico.

Dayamineral[®]; 1.5 mg de piridoxina, 150 mg de ácido ascórbico y 250 µg de ácido fólico.

Hidrosil[®]; 500 µg de cloruro de hidroxocobalamina, 1 g de cloruro de piridoxina y 250 mg de cloruro de tiamina.

II.2.2. Instrumentos y electrodos.

La fuente de alto voltaje utilizada correspondió a un modelo Glassman High Voltaje Inc. con un intervalo de voltaje ajustable comprendido entre 0 y 5000V.

La detección amperométrica se llevó a cabo con un Potenciostato Autolab PGSTAT12 de Eco Chemie (Holanda).

Se utilizó un sistema convencional de tres electrodos, empleando como electrodo de referencia un electrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{Cl}^-$ (3,0 M) y como electrodo auxiliar

un electrodo de platino. El electrodo de trabajo fue un electrodo de disco de carbono vitrificado de 2 mm de diámetro.

Los microchips de vidrio con diseño de cruz sencilla fueron adquiridos comercialmente de la compañía Micralyne (Model MC-BF4-001, Edmond, Canadá).

II.2.3. Microchip para electroforesis capilar con detección electroquímica: Descripción del sistema utilizado en el presente trabajo.

El diseño completo del microsistema empleado en este trabajo de investigación se muestra en el esquema de la **figura 31** y la fotografía que aparece en **figura 32**. El microsistema consta de dos partes fundamentales: el microchip de vidrio propiamente dicho y el cuerpo del microchip que contiene la célula de detección y los reservorios para las disoluciones.

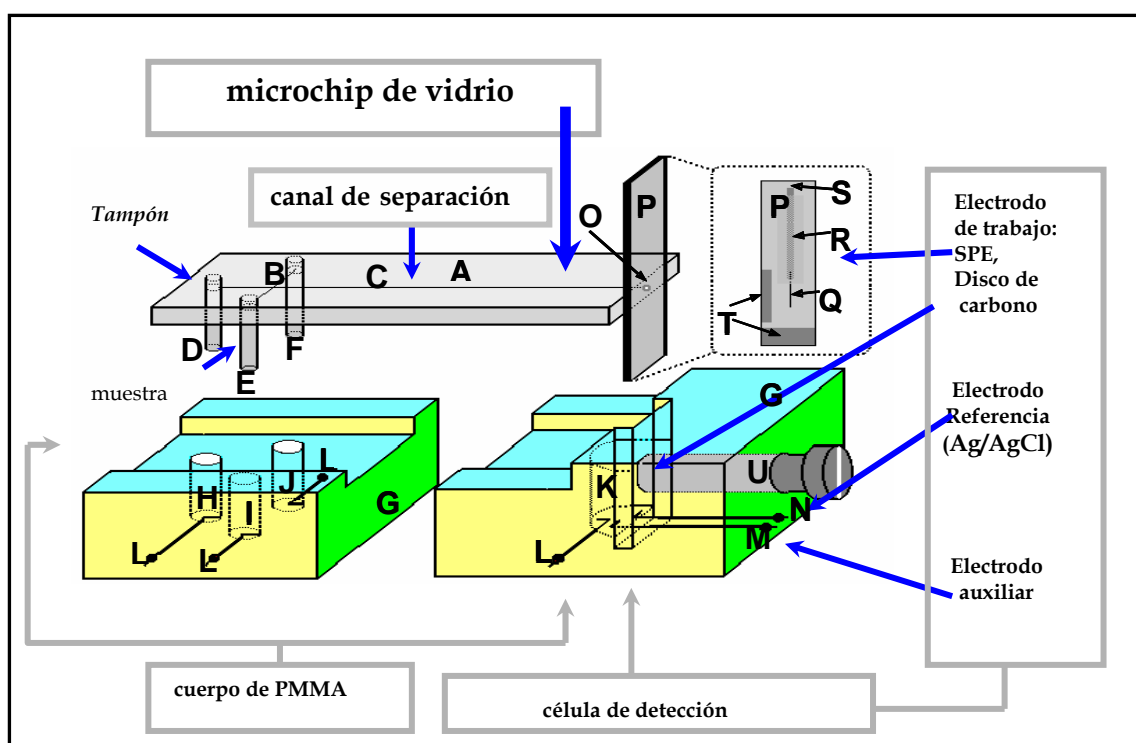


Figura 31. Diseño de un sistema de microchip para electroforesis capilar con detección electroquímica. (A) microchip de vidrio, (B) canal de inyección, (C) canal de separación, (D) comunicación electrolítica entre el canal de separación y el reservorio correspondiente al medio de separación, (E) comunicación electrolítica entre el canal de inyección y el reservorio correspondiente a la muestra, (F) comunicación electrolítica entre el canal auxiliar y el reservorio destinado a otros usos, (G) cuerpo de metacrilato, (H) reservorio para el medio de separación, (I) reservorio para la inyección de la muestra, (J) reservorio para otros usos, (K) célula de detección, (L) electrodos de conexión con la fuente de alto voltaje, (M) electrodo auxiliar de Pt, (N) electrodo de referencia de Ag/AgCl, (O) salida del canal de separación, (P) placa de porcelana donde se imprime el electrodo de trabajo, (Q) electrodo de trabajo de película impresa por estarcido, SPE, (R) aislante, (S) contacto eléctrico de plata (T) espaciador, (U) tornillo de plástico (acoplamiento para electrodos de trabajo de disco).

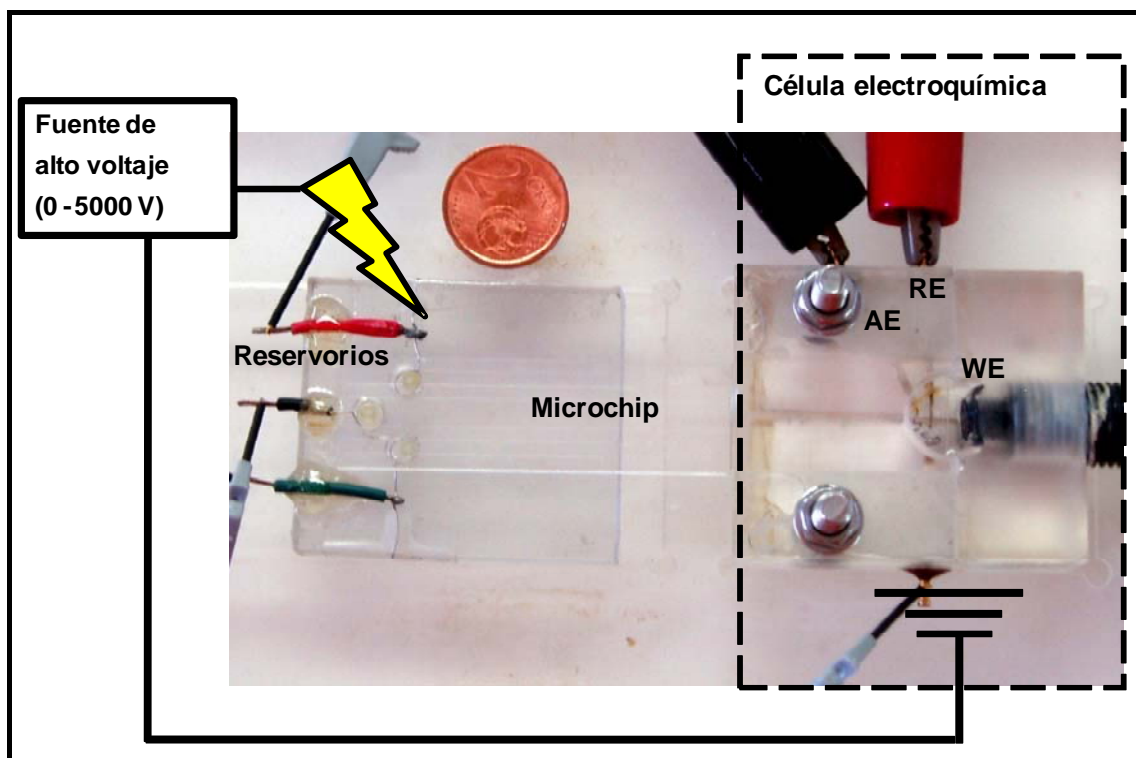


Figura 32. Fotografía y esquema del microsistema analítico utilizado. AE: electrodo auxiliar de platino, RE: electrodo de referencia Ag/AgCl, WE: electrodo de trabajo de disco de carbono vitrificado.

El microchip de vidrio que se muestra en la figura corresponde a un diseño de cruz sencilla (15x87 mm) con un canal de separación de longitud efectiva de 77 mm y un canal de inyección de 10 mm el cual es dividido en dos partes iguales por el canal de separación, dejando por consiguiente, una longitud de 5 mm desde el reservorio de la muestra hasta el canal de separación. Los microcanales obtenidos por técnicas de litografía y grabado presentan una geometría semicircular de 50 μm de ancho y 20 μm de profundidad.

El cuerpo y la base del microchip están constituidos de metacrilato. La base contiene los reservorios con capacidades comprendidas entre 20 y 100 μL para albergar la muestra, el medio de separación y el desecho. Hilos de Pt son introducidos en cada uno de los reservorios con el fin de proporcionar un contacto eléctrico para aplicar el futuro alto voltaje y conducir los fluidos electrocinéticamente. El microchip y los reservorios se comunican electrolíticamente a través de puntas de pipeta.

La célula de detección está constituida por un sistema de tres electrodos: el electrodo de trabajo (de disco o serigrafiado, *screen printed electrode* (SPE)) montado perpendicularmente al canal de separación (el flujo a través del capilar es perpendicular a la superficie del electrodo), un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un

electrodo auxiliar de platino. Adicionalmente, la célula de detección contiene otro hilo de Pt con el fin de conectar a tierra y provocar el fenómeno electrocinético hasta el final del canal de separación.

Cuando se desea utilizar como electrodo de trabajo un electrodo serigrafiado, éste se introduce de manera perpendicular a salida del microcanal, como muestra la **figura 31**. Cuando se desea trabajar con un electrodo de disco, éste se introduce de manera paralela al microcanal de salida a través de un tornillo previamente perforado, tal y como se muestra en la **figura 31** y más detalladamente en la **figura 33**.

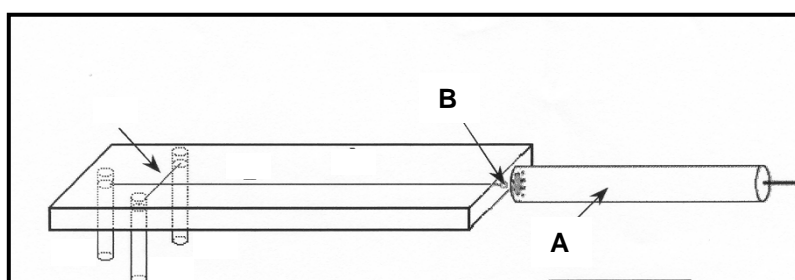


Figura 33. Diseño de un sistema de microchip para electroforesis capilar con detección electroquímica empleando un electrodo de disco (A) situado justo a la salida del canal microfluídico (B).

II.2.4. Procedimientos.

II.2.4.1. Preparación de patrones.

Las disoluciones madre de hidroquinona (5 g/L), arbutina (5 g/L), ácido ascórbico (0.1M) y de piridoxina (0.05M) se prepararon en metanol, la de ácido fólico (0.1M) en sosa 1M y la de cianocobalamina 0.05M en el tampón de trabajo, manteniéndolas siempre protegidas de la luz. Las disoluciones de hidroquinona, arbutina y ácido ascórbico se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las disoluciones se utilizaron dentro de las primeras 24 horas después de su preparación. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente a partir de las anteriores mediante dilución adecuada en el medio de separación.

Como medios de separación se utilizaron una disolución borato (60 mM, pH=9) para hidroquinona y arbutina y un tampón fosfato (10 mM, pH 6) para las vitaminas.

Todas las disoluciones de trabajo se filtraron antes de ser utilizadas (filtro de nylon de $0.22\text{ }\mu\text{m}$).

II.2.4.2. Preparación de muestras.

Para el suplemento dietético de Gayuba, se tomaron 25 cápsulas y se vaciaron y mezclaron en un recipiente. Unos 5 mg de este polvo se mezclaron con 25 ml de tampón borato (60mM, pH 9) y se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 10 min. A continuación, se centrifugó la muestra a 3700 rpm durante 10 min recogiendo el sobrenadante. Sobre el residuo se volvió a añadir otros 5 ml de tampón repitiéndose el proceso otras dos veces ($V_{\text{total}} \approx 35$ mL). Para la crema Pigmentasa[®], se pesó 0.1 g de crema sobre un recipiente al cual se le añadió 10 mL de tampón borato y se sonicó durante 10 min recogiendo el sobrenadante. Las muestras de orina y vino fueron filtrada (filtro de nylon de 0.22 μm) y diluidas en tampón borato (6:1 para la orina y 7:3 para el vino).

Para los suplementos vitamínicos, el procedimiento de extracción fue similar para el caso de Vitafardi[®], Supradyn[®] y Hidrosil[®] mientras que para los complejos vitamínicos Dayamineral[®] y Aspol[®] se realizó de manera distinta.

En los tres primeros suplementos se tomaron 10 comprimidos, se pulverizaron y se disolvieron en 25 ml de tampón fosfato (10mM, pH=6), previamente burbujeado con nitrógeno durante 30 min. La mezcla se introdujo en un baño de ultrasonidos a temperatura ambiente hasta su completa disolución. Finalmente, se realizó la dilución adecuada, utilizando como disolvente un tampón de trabajo, para llevar a cabo el análisis.

Para el complejo multivitamínico Dayamineral[®] se tomaron 10 comprimidos, se pulverizaron y se disolvieron en 25 de tampón de trabajo, previamente burbujeado con nitrógeno durante 30 min. La mezcla se ultrasonicó a temperatura ambiente durante 30 min. Después se centrifugó a 3500 r.p.m durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se realizó la dilución adecuada con tampón de trabajo para su determinación.

Para el suplemento de ácido fólico Aspol[®] el proceso fue similar al anterior, a excepción de la extracción que se llevó a cabo en un baño de ultrasonidos termostatzado a 40°C.

II.2.4.3. Limpieza del electrodo de disco de carbono vitrificado.

La limpieza se realizó diariamente utilizando tratamientos de diferente tipo: físico, químico y electroquímico.

(i) Tratamiento Físico: mediante pulido manual durante 3 minutos con una dispersión preparada de alúmina de 1 micra de diámetro y durante 3 minutos con una de 0,05 micras de diámetro.

(ii) Tratamiento Químico: el electrodo se ultrasonicó durante 15 s con una disolución de etanol y otros 15 s con agua destilada, aclarando con agua destilada entre ambos procedimientos.

(iii) Tratamiento Electroquímico: el electrodo se sometió a una voltamperometría cíclica a 10 V/s durante 2000 ciclos, entre -0.5 V y 1.5 V.

El estado del electrodo se comprobó mediante el cálculo de los valores de los criterios de reversibilidad deducidos a partir del voltamperograma cíclico obtenido para una disolución de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ de concentración 0.1 M.

II.2.4.4. Protocolo de trabajo.

(i) Acondicionamiento de los microcanales.

El acondicionamiento del microchip se realizó al inicio de la sesión de trabajo y entre cada experimento. Se llevó a cabo introduciendo mecánicamente agua ultrapura, después una disolución de NaOH 0,1 M y de nuevo agua ultrapura en el interior de los microcanales durante 15 minutos para cada proceso. Es muy importante llevar a cabo el control de estos tiempos con el fin de obtener resultados reproducibles.

(ii) Montaje del sistema.

En los reservorios adecuados, se depositaron 90 μl de muestra y 90 μl del medio de separación. Se llenaron cuidadosamente las puntas de las pipetas que se colocaron en el chip, para permitir el contacto electrolítico entre los microcanales del chip y los reservorios que contienen las disoluciones previamente depositadas.

Adicionalmente se acondicionó el microcanal de separación haciendo circular por el mismo el medio de separación durante 5 minutos.

(iii) Preparación de los inyectores electrocinéticos.

Con el fin de asegurar inyecciones reproducibles de pequeño volumen (del orden de nanolitros) en el análisis, previamente fue necesario llevar a cabo una inyección

larga (15 s) por cada brazo con el fin de llenar adecuadamente los inyectores. Después se hizo pasar durante 5 min el medio de separación para asegurarse de arrastrar toda la muestra introducida en la inyección larga.

II.3. Resultados y discusión

II.3.1. Propuesta y desarrollo de una ruta analítica para el *screening* rápido de hidroquinona y arbutina en muestras reales. Evaluación del protocolo de inyección electrocinética.

En el campo de los microchips de CE, además de introducir nuevos conceptos y mejoras tecnológicas, es necesario llevar a cabo el desarrollo de protocolos y rutas analíticas que demuestren el poder real de estos microsistemas, especialmente, aquellos que están comercialmente disponibles. El éxito de una metodología analítica está íntimamente ligado a la calidad del microsistema analítico en conjunto por lo que debería considerarse tanto el montaje y diseño del microchip de CE como el funcionamiento del mismo.

La estrategia propuesta para evaluar el comportamiento analítico y técnico del microsistema utilizado en este trabajo de investigación (microchip de cruz sencilla de CE-ED en configuración *end-channel*) ha sido: (i) optimizar la separación y determinación de analitos de interés (hidroquinona y arbutina) que pueden estar presentes en un conjunto muy variado de muestras reales (hierba medicinal, orina, cosmético y vino) y que involucran a campos muy heterogéneos (análisis clínico, seguridad pública y control alimentario) y (ii) evaluar el protocolo de inyección usando los dos inyectores del microchip de cruz sencilla, a fin de comprobar la eficiencia del fenómeno electrocinético, las conexiones y la reproducibilidad del volumen de muestra inyectado. Los resultados obtenidos en cada uno de estos apartados se presentan a continuación.

II.3.1.1. Optimización de la separación y detección de los analitos.

El desarrollo de un método para la determinación de analitos en un microsistema analítico para electroforesis capilar con detección electroquímica exige un estudio profundo de todas las variables involucradas en el mismo. Existen variables relacionadas propiamente con el diseño, tales como la distancia y el alineamiento del electrodo con respecto a la salida de canal de separación, variables de naturaleza electroforética tales como el voltaje de separación y el tiempo y voltaje de inyección (protocolo de inyección *unpinched*), y otras variables relacionadas propiamente con la detección electroquímica como son el tipo de electrodo y el potencial de detección.

El acoplamiento del microchip para EC con el electrodo de trabajo requiere la optimización de la distancia existente entre el canal de separación y el electrodo así como de un perfecto alineamiento entre ambos. Esta distancia debe de adquirir un valor tal que evite, por una parte, el acoplamiento entre la corriente electroforética y la corriente amperométrica de detección y, por otra, una pérdida de eficacia y por consiguiente una pérdida de sensibilidad. En efecto, al disminuir la distancia de separación aumenta la eficacia pero también el ruido de la detección dado que el acoplamiento es mayor.

En primer lugar, se optimizaron las variables químicas, es decir, el pH y la fuerza iónica del medio electroforético. El tampón elegido fue borato ya que forma complejos cargados negativamente con los grupos hidroxilo presentes en los flavonoides y otras estructuras fenólicas favoreciendo las separaciones por electroforesis capilar en zona (CZE) [183]. La influencia del pH se evaluó entre 8.5 y 9.5 siendo 9.0 el valor de pH más adecuado (electroforegramas no mostrados).

La **figura 34 A** muestra la influencia de la fuerza iónica sobre la separación electroforética cuando la concentración del tampón borato pH=9 varía entre 30 mM y 60 mM en incrementos de 10 mM. Como era de esperar, cuando la fuerza iónica se incrementó, los tiempos de migración también lo hicieron y la resolución entre picos mejoró. Se obtuvo una resolución aceptable ($R_s=1.2$) cuando la concentración del tampón borato fue 60 mM por lo que fue elegida como valor óptimo. La influencia del voltaje de separación también fue estudiada. En la **figura 34 B** se pueden observar los electroforegramas obtenidos cuando el voltaje de separación se incrementó desde 1.0 a 2.5 kV en incrementos de 0.5 kV. Al aumentarse el voltaje de separación, los tiempos de migración disminuyeron produciéndose una pérdida de resolución. Finalmente, se eligió 1.5 kV como voltaje óptimo de separación ya que se conseguía una completa y rápida separación (180 s) con una adecuada resolución ($R_s=1.2$).

Por otra parte, la máxima sensibilidad sin pérdida de resolución entre picos se obtuvo realizando la inyección de muestra a 2 kV durante 10 s (resultados no mostrados) por lo que se escogieron estos valores como los óptimos.

Como se ha expuesto anteriormente, la distancia entre la salida del canal electroforético y la superficie del electrodo de trabajo es crucial en la configuración *end-channel* porque afecta notablemente a la eficiencia y sensibilidad del análisis. La

figura 34 C muestra la influencia de la distancia entre la salida del canal y el electrodo sobre la sensibilidad, la eficiencia y la resolución en la separación. El control de la distancia canal/electrodo se realizó situando una, dos o tres láminas de celofán entre ambos actuando como separadores lo que permitió obtener distancias de separación de 60, 120 y 180 μm , respectivamente.

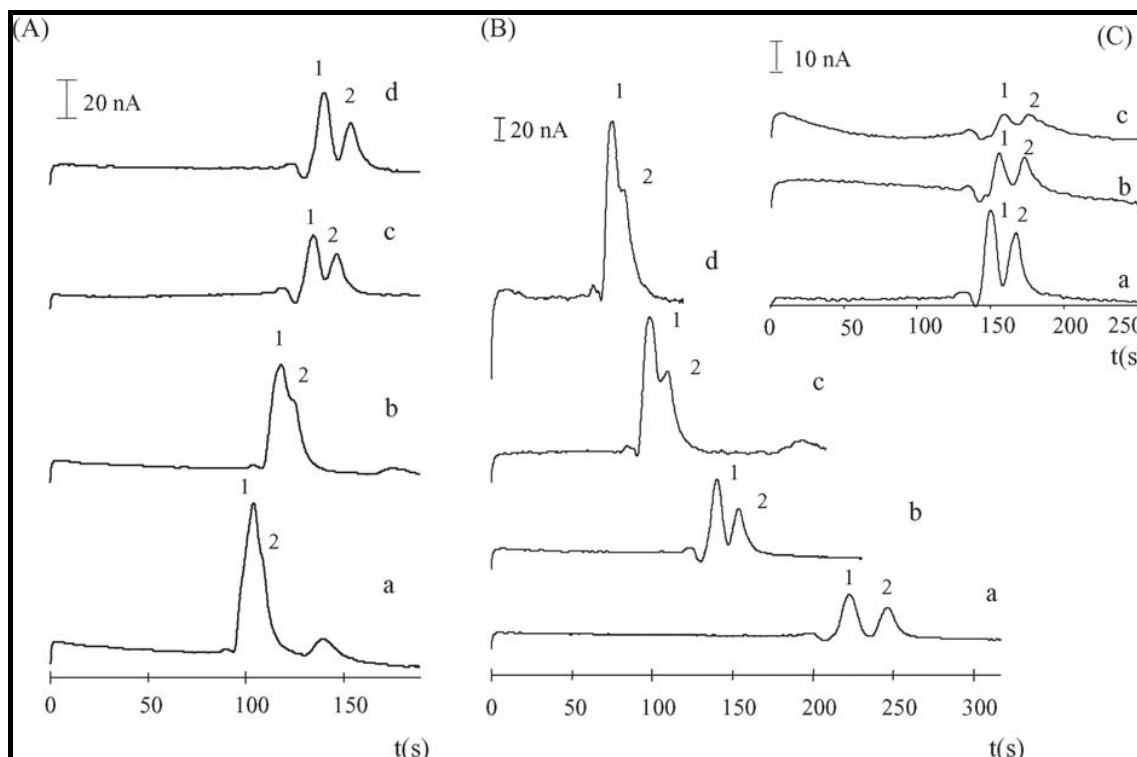


Figura 34. (A) Influencia de la fuerza iónica sobre la separación electroforética: (a) 30 mM, (b) 40 mM, (c) 50 mM, and (d) 60 mM. Condiciones: tampón borato pH 9, voltaje de separación 1.5 kV, inyección a 2 kV durante 10 s, potencial de detección +1.0V. (B) Influencia del voltaje de separación sobre la separación: (a) 1 kV, (b) 1.5 kV, (c) 2 kV, (d) 2.5 kV. Condiciones: tampón borato 60mM pH 9, inyección a 2 kV durante 10 s, potencial de detección +1.0V. (C) Influencia de la distancia de separación entre el detector y la salida del canal electroforético: (a) 60 μm , (b) 120 μm , and (c) 180 μm . Condiciones: tampón borato 60mM pH 9, voltaje de separación 1.5 kV, inyección a 2 kV durante 10 s, potencial de detección +1.0V. Picos: (1) hidroquinona 200 ppm y (2) arbutina 200 ppm.

Como se observa en la **figura 34 C** (a-c), cuando la distancia se incrementa, la eficiencia de la separación y la señal analítica disminuyen. De hecho, el número de platos se reduce de 1804 a 679 para hidroquinona y de 1834 a 520 para arbutina cuando la distancia canal/electrodo pasa de 60 a 180 μm , respectivamente. En contraposición, al reducir la distancia se aumenta el ruido de fondo (comparar **fig.34 C** a y c) hasta tal punto que cuando no se coloca ningún separador se genera un enorme

ruido que impide ver las señales (electroforegrama no mostrado). El origen de este ruido es el acoplamiento entre el campo eléctrico de separación y el potencial de detección. Además, el uso del espaciador no es sólo para evitar este efecto sino para tener un perfecto control de la distancia entre la salida del canal y el electrodo y, de este modo, obtener resultados reproducibles. En consecuencia, se eligió como distancia óptima 60 μm ya que se obtuvo la mejor eficacia y sensibilidad.

Aunque la influencia del voltaje de separación es mínima sobre el potencial aplicado sobre el detector electroquímico ya que la mayoría del voltaje se pierde a lo largo del canal de separación, este voltaje puede causar un pequeño pero significativo cambio en el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo. Por tanto, es necesario obtener el voltamperograma hidrodinámico (HDV) para los compuestos de interés bajo las condiciones electroforéticas escogidas (ver **figura 35**). Se seleccionó +1.0 V como el mejor potencial de detección porque presentaba la mejor relación señal/ruido para la detección simultánea de ambos analitos (hidroquinona y arbutina).

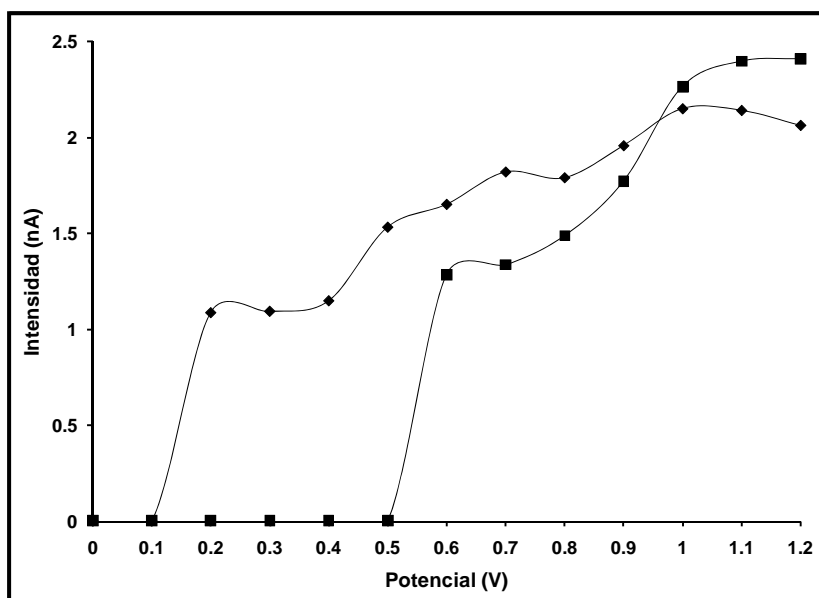


Figura 35. Voltamperograma hidrodinámico correspondiente a hidroquinona (◆) y arbutina (■). Condiciones: como en figura 34C.

II.3.1.2. Comportamiento analítico del método.

La fiabilidad del método desarrollado se estudió tanto en términos de precisión como de exactitud. En primer lugar, se evaluó la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad. La **tabla 5** recoge los datos obtenidos de repetibilidad y

reproducibilidad para los tiempos de migración, altura y área de pico de hidroquinona y arbutina. Como era de esperar los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos para la repetibilidad (análisis realizados en el mismo día) fueron menores que para la reproducibilidad en todos los casos examinados. La repetibilidad obtenida fue excelente para los dos analitos comportándose de manera similar con RSD inferiores al 0.8% para el área de pico. La reproducibilidad (calculada para análisis de días distintos) fue también muy buena obteniéndose valores de RSD comprendidos entre 7 y 9% para los tiempos de migración, 6 y 9% para alturas y 7 y 9% para las áreas de pico.

A continuación, se llevó a cabo en las condiciones optimizadas la calibración metodológica para cada uno de los analitos empleando el método de calibración externa. Se obtuvo distinta sensibilidad en términos de pendiente de calibración para hidroquinona ($7.4 \text{ nC}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}$) y arbutina ($5.2 \text{ nC}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{L}$) siendo los coeficientes de correlación excelentes para ambos (0.990 para hidroquinona y 0.999 para arbutina). Los límites de detección y cuantificación se calcularon utilizando el criterio 3 S/R y 10 S/R, respectivamente. Estos valores fueron de 3.0 y 10.2 ppm para hidroquinona y 4.3 y 13.5 ppm para arbutina resultando adecuados para la determinación de estos analitos en las muestras reales escogidas.

Tabla 5. Repetibilidad y reproducibilidad del método para la determinación de hidroquinona y arbutina.

Hidroquinona						Arbutina					
$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Altura $\pm s$ (nA)	RSD (%)	Área $\pm s$ ($\times 10^7 \text{C}$)	RSD (%)	$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Altura $\pm s$ (nA)	RSD (%)	Área $\pm s$ ($\times 10^7 \text{C}$)	RSD (%)
Repetibilidad ¹											
130 \pm 1	0.8	33 \pm 1	3	2.7 \pm 0.1	5	142 \pm 1	0.7	22 \pm 1	4	1.7 \pm 0.1	8
Reproducibilidad ²											
137 \pm 10	7	32 \pm 2	6	2.4 \pm 0.2	7	150 \pm 13	9	21 \pm 2	9	1.8 \pm 0.2	9

¹ Precisión evaluada como repetibilidad (n=3 mismo día).

² Precisión evaluada como reproducibilidad (n=3 días diferentes).

II.3.1.3. Aplicación del método para el análisis de muestras reales.

Una vez desarrollado el método para la determinación de hidroquinona y arbutina, se seleccionó una muestra real representativa de cada campo analítico

estudiado (farmacéutico, clínico, cosmético y alimentario) y se aplicó sobre éstas dicho método. La **figura 36** muestra los electroforegramas obtenidos para una hierba medicinal (HMP) (A), orina (B), una muestra cosmética (C) y vino tinto (D).

La arbutina fue completamente extraída de la hierba medicinal (Gayuba) y detectada en presencia de hidroquinona añadida al extracto en menos de 180 s con buena resolución (**fig.36A**). La misma separación de analitos se llevó a cabo usando una muestra de orina donde ambos analitos fueron añadidos siendo detectados de nuevo en menos de 180 s y con buena resolución (**fig.36B**).

Por otra parte, la hidroquinona fue extraída y detectada en un cosmético en ausencia y presencia de su glicósido (arbutina) (**fig.36C**). Por lo que el método podría permitir una cuantificación de este principio activo incluso en presencia de su glicósido en aras de la seguridad pública ya que la concentración de este compuesto en cosméticos está limitada por normativa.

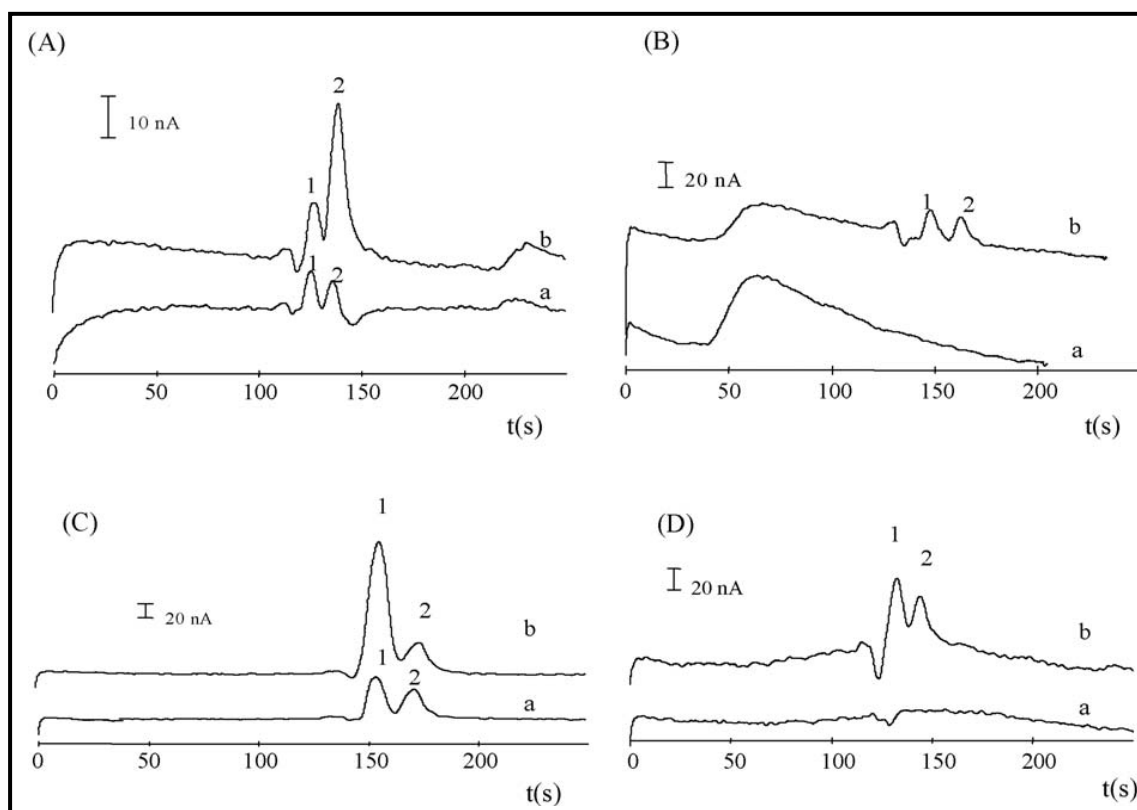


Figura 36. Análisis de muestras reales. Electroforegramas correspondientes a una muestra de hierba medicinal *Gayuba* (A), orina (B), cosmético (C) y vino tinto (D). Picos: (1) hidroquinona y (2) arbutina. (a) Fortificado con 150 ppm del analito no detectado: hidroquinona para (A) y arbutina para (C); (b) fortificado con 150 ppm de hidroquinona y 125 ppm de arbutina. Condiciones: ver fig. 34C.

Tabla 6. Datos relevantes obtenidos del análisis de muestras reales.

Muestra	Hidroquinona					Arbutina					Rs ⁴
	t _m ±s	RSD (%) ¹ (tiempo de migración)	RSD ² (%) (altura)	RSD ³ (%) (área)	Recuperación (%)	t _m ±s	RSD (%) ¹ (tiempo de migración)	RSD ² (%) (altura)	RSD ³ (%) (área)	Recuperación (%)	
HMP	127.9±0.7	0.5	2	5	110	138.8±0.7	0.5	6	5	100	1.12
Orina	148.1±0.4	0.3	5	10	85	162.9±0.5	0.3	7	10	71	1.55
Cosmético	154.8±0.3	0.2	2	3	70	172.5±0.1	0.1	1	2	97	1.12
Vino tinto	132.9±0.6	0.5	2	5	103	144.3±0.6	0.4	3	8	95	1.03

¹ Desviación estándar relativa (n=3) obtenida para los tiempos de migración, altura² y área de pico³.⁴ Resolución obtenida para cada muestra.

Finalmente, una muestra de vino fue fortificada con hidroquinona y arbutina, donde potencialmente pueden aparecer los dos compuestos, y se llevó a cabo el análisis de dicha muestra consiguiéndose la detección de ambos analitos con una aceptable resolución (**fig.36D**).

En todos los casos examinados, además del análisis de las muestras, se añadieron los dos analitos a dichas muestras para confirmar la identidad de los picos presentes y, además, evaluar las recuperaciones y estimar la exactitud del método (para los analitos no detectados en la muestra) (electroforegramas b de la **figura 36**).

Por otra parte, la **tabla 6** recoge la información más significativa correspondiente al análisis de cada muestra: precisión en los tiempos de migración, en las alturas y áreas de pico, recuperaciones de los analitos añadidos y resolución entre picos. Como puede observarse, se obtuvo una excelente precisión para ambos analitos en las muestras analizadas con valores de RSD comprendidos entre 0.2 y 10%. Las recuperaciones también fueron aceptables con valores comprendidos entre el 70 y el 110%, siendo la más baja para la muestra de orina. De cualquier modo, se obtuvieron análisis muy rápidos con tiempos de análisis inferiores a 180 s y sin pérdida de resolución ($R_s \geq 1$) para todos los casos.

Los resultados obtenidos indican que uno de los mayores inconvenientes del método optimizado para ser utilizado en el control de calidad farmacéutico o alimentario es su falta de sensibilidad siendo detectados solamente los analitos en aquellas muestras donde su concentración era alta.

II.3.1.4. Evaluación del protocolo de inyección electrocinética: posibilidad técnica del uso de ambos inyectoros en microchip de cruz sencilla.

En la mayoría de los artículos encontrados en la literatura sobre microchips de CE de cruz sencilla, uno de los reservorios no se utiliza y se denomina reservorio de desecho de muestra (SW) (ver figura 1 de la sección II.1.2). Sin embargo, dado que la introducción de la muestra dentro del microsistema se hace, en la mayoría de los casos, de manera manual, el potencial uso de ambos reservorios inyectoros sería muy útil viéndose multiplicado el rendimiento analítico de estos microchips en un factor de 2.

Para explorar la eficiencia en la inyección de los inyectores presentes en un microchip comercial de cruz sencilla (inyectores en T) y demostrar sus posibilidades de trabajar indiscriminada y/o secuencialmente con ambos, se escogió como modelo la determinación de arbutina extraído de la planta medicinal (Gayuba).

El procedimiento de inyección más sencillo es la aproximación *unpinched* porque se puede llevar a cabo con una fuente de alto voltaje con una sola salida, siendo la utilizada para este estudio. En la **figura 37** se puede observar un esquema del diseño del microchip junto con el protocolo de inyección propuesto que implica el uso de ambos inyectores o reservorios (SR1 y SR2). Después de las inyecciones largas para rellenar los brazos inyectores (**fig.37 A+B**), se aplica un voltaje por un corto espacio de tiempo sobre cada reservorio de muestra (SR1 y SR2) manteniendo el reservorio de detección conectado a tierra (inyección). La muestra es introducida dentro del capilar de separación mediante una inyección electrocinética. A continuación, se aplica el voltaje sobre el reservorio del tampón electroforético (RB) para llevar a cabo la separación electroforética (**fig.37 C+D**).

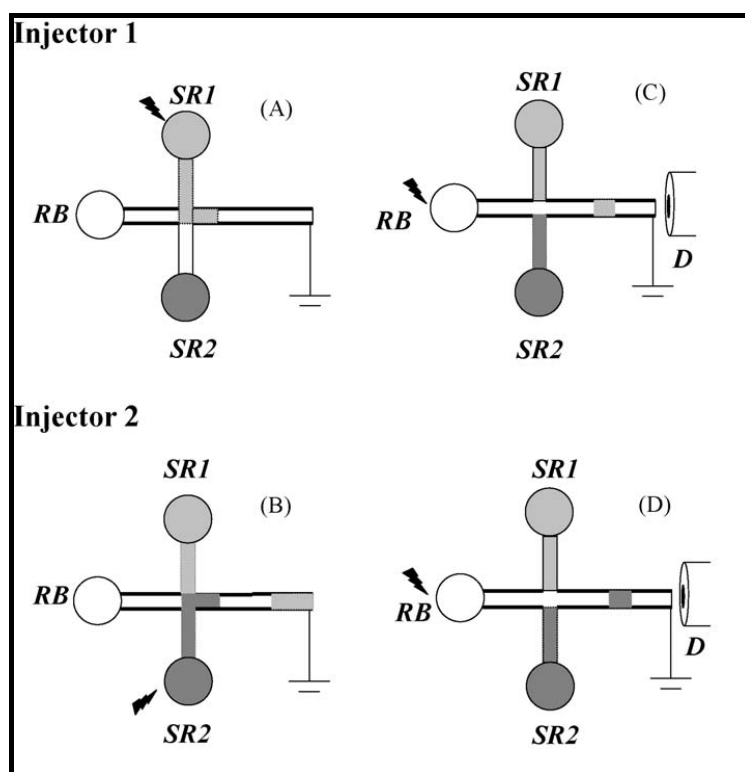


Figura 37. Diseño del microchip y protocolo electrocinético de inyección secuencial usando ambos inyectores. Pre-inyección (2 kV, 20 s) (A+B), inyección de muestra (2 kV, 10 s) y separación (1.5 kV) (C+D). RB: tampón electroforético, SR1 y SR2: reservorios de muestra.

La novedad metodológica de esta estrategia fue extender el protocolo de inyección *unpinched* al uso de ambos inyectores y estudiar en profundidad su eficacia y reproducibilidad. La **tabla 7** recoge los valores de parámetros tales como tiempo de migración, altura y área de pico obtenidos para la determinación de arbutina en extractos de hierbas medicinales (gayuba). Asimismo, en esta tabla se incluyen los valores de precisión correspondientes a estos parámetros según se emplee un solo inyector o los dos inyectores de manera secuencial. La precisión *intra*-inyector se definió como la desviación estándar relativa (RSD) obtenida en análisis repetitivos de arbutina llevados a cabo con el mismo inyector y la precisión *inter*-inyector como la desviación estándar relativa (RSD) obtenida en el análisis repetitivo de arbutina llevado a cabo con ambos inyectores. Se obtuvieron unos resultados excelentes con respecto a los tiempos de migración altura y área de pico con unos valores de RSD menores al 4% para un solo inyector (*intra*-inyector) y menores al 7% para ambos inyectores (*inter*-inyector). Estos experimentos se realizaron usando dos extractos distintos (distinta concentración de analito) para demostrar que se pueden usar indiscriminadamente ambos inyectores con independencia de la concentración.

Por tanto, estos resultados indican una buena reproducibilidad entre inyectores y abren la posibilidad de trabajar indiscriminadamente y/o secuencialmente con ambos, al menos cuando la muestra que se deposite en cada reservorio sea la misma. Además, destacar que el protocolo desarrollado en microchip de CE permitió la monitorización del proceso de optimización de la extracción de arbutina en la muestra de Gayuba ya que fue posible detectar hasta que se alcanzó un electroforegrama en blanco lo que permitió registrar la eficacia extractiva en cada paso de la extracción (ver **figura 38**). Como se indica en la **figura 38**, la eficiencia en la extracción fue cercana al 70% para el primer extracto y cercana al 30% para el segundo con independencia del inyector empleado. Para confirmar estos resultados, los mismos extractos fueron analizados *off-chip* usando voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) obteniéndose rendimientos similares y confirmándose, además, la ausencia de analito en el tercer extracto obtenido (ver **figura 39**).

Tabla 7. Precisión *intra-* e *inter-*inyector obtenida en la determinación de arbutina en extractos de Gayuba usando ambos inyectores (1 y 2).

¹ Extracto 1			² Extracto 2		
³ Inyector 1			³ Inyector 1		
Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)	Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)
170.1	29.5	2.37	162.8	11.8	0.92
171.4	28.8	2.34	163.4	12.6	0.99
171.6	28.4	2.47	163.2	12.5	0.99
171.3±0.4 (RSD = 0.2%)	28.9±0.5 (RSD = 2%)	2.39±0.07 (RSD = 3%)	163.1±0.3 (RSD = 0.2%)	12.3±0.4 (RSD = 3%)	0.96±0.04 (RSD = 4%)
⁴ Inyector 2			⁴ Inyector 2		
Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)	Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)
171.8	27.6	2.12	164.0	13.0	1.06
171.8	28.3	2.34	164.0	13.3	1.13
171.2	28.2	2.30	162.6	13.7	1.07
171.4±0.4 (RSD = 0.2%)	28.0±0.4 (RSD = 1%)	2.2±0.1 (RSD = 5%)	163.5±0.8 (RSD = 0.5%)	13.3±0.3 (RSD = 2%)	1.09±0.04 (RSD = 4%)
Precisión total para ambos inyectores ⁵			Precisión total para ambos inyectores		
Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)	Tiempo de migración (s)	Altura de pico (nA)	Área de pico (C) (x10 ⁷)
171.4±0.4 (RSD=0.2%)	28.5±0.6 (RSD=2%)	2.3±0.1 (RSD=5%)	163.3±0.6 (RSD=0.4%)	12.8±0.7 (RSD=5%)	1.03±0.07 (RSD=7%)

¹ Primer extracto obtenido de la Gayuba en 25 mL.

² Segundo extracto obtenido en 5mL.

³ Valores del tiempo de migración, altura y área de pico obtenidos para el inyector 1.

⁴ Valores del tiempo de migración, altura y área de pico obtenidos para el inyector 2.

⁵ Valores del tiempo de migración, altura y área de pico obtenidos para ambos inyectores.

Los valores están expresados como el valor medio ± desviación estándar (SD). (RSD= desviación estándar relativa).

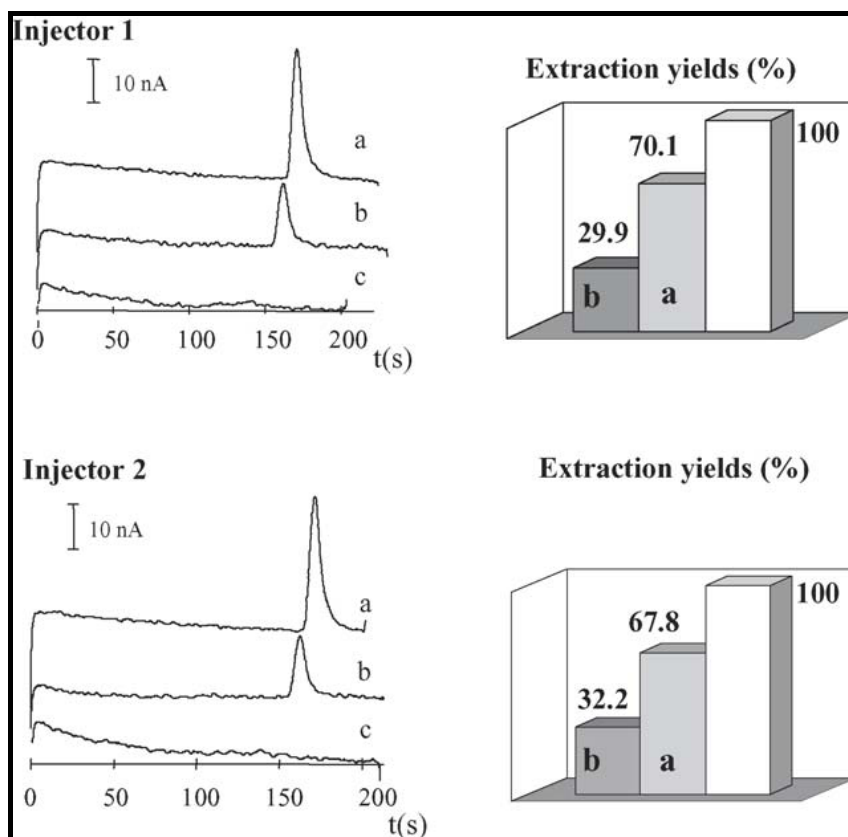


Figura 38. Eficiencia de la extracción de arbutina en una hierba medicinal (Gayuba) usando ambos inyectores (1 y 2): electroforegramas y diagramas obtenidos para (a) primer, (b) segundo y (c) tercer extracto. Condiciones: tampón borato 60 mM pH=9, voltaje de separación 1.5 kV, inyección a 2 kV durante 10 s, potencial de detección +1.0 V.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, quedó demostrada la posibilidad de usar indistinta y/o secuencialmente ambos inyectores lo que nos abrió un abanico de posibilidades a la hora de diseñar métodos analíticos mediante microchip CE-ED. Un ejemplo interesante sobre el uso de ambos inyectores con objetivos distintos, se detallará en el siguiente apartado de esta Tesis.

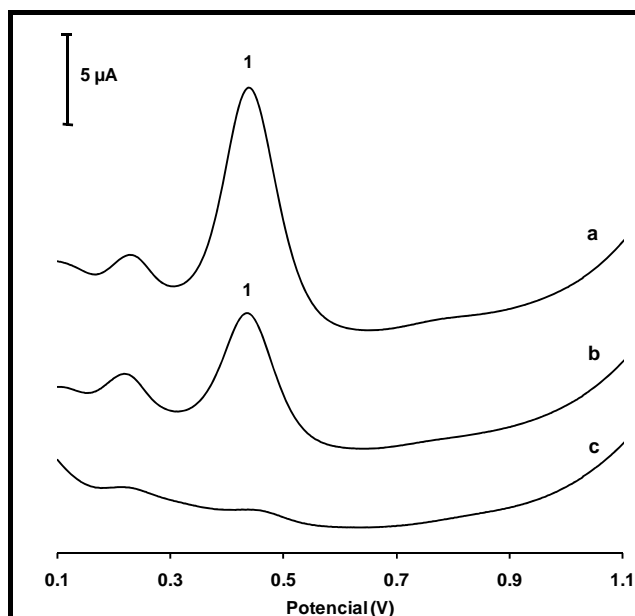


Figura 39. Voltamperogramas correspondientes a la extracción de arbutina en una hierba medicinal (Gayuba) obtenidos por DPV (*off-chip*). (a) Primer, (b) segundo y (c) tercer extracto. Picos: (1) Arbutina. Condiciones: tampón borato 60 mM pH=9, velocidad de barrido 20mV/s, pulso 50 mV.

II.3.2. Determinación de vitaminas hidrosolubles en preparados farmacéuticos usando μ CE-ED. Propuesta y aplicación de una nueva estrategia analítica *on-chip*: Calibración integrada.

En este apartado, se presentan los resultados obtenidos en todo el proceso de determinación de vitaminas hidrosolubles (piridoxina, cianocobalamina, ácido ascórbico y ácido fólico) utilizando microchips de electroforesis capilar con detección electroquímica. En primer lugar, se presentan los resultados referentes a la mejora metodológica de la detección, dado que algunos de los analitos estudiados presentan una electroactividad moderada lo que ha obligado a buscar estrategias para mejorar la sensibilidad en la detección de los mismos. A continuación, se presentan los resultados relacionados con la optimización de las variables electroforéticas involucradas en la separación y con el estudio de las características analíticas del método desarrollado. Seguidamente, se presentan los resultados correspondientes al análisis de preparados farmacéuticos donde la determinación de vitaminas hidrosolubles se ha llevado a cabo por primera vez utilizando μ CE-ED. Finalmente, se incluyen los resultados correspondientes a la propuesta de determinación de vitaminas utilizando una

estrategia analítica denominada *calibración integrada*, descrita por primera vez, que implica el uso de ambos inyectores con finalidades distintas.

II.3.2.1 Optimización de la detección electroquímica.

Estrategia para la mejora de la sensibilidad

En el ámbito de la CE convencional con detección electroquímica, el empleo de un pH diferente entre el medio de separación y el de detección fue propuesto por primera vez por el grupo de M. R. Smyth para la detección de ácidos fenólicos [184]. Más tarde, esta estrategia fue trasladada a los microchip por el grupo de Henry para la determinación de glucosa [89] y después por el profesor J. Wang para la detección de ácidos fenólicos [121]. Partiendo de esta idea, se introdujo en el medio de detección HNO_3 1M lo que provocó una mejora cualitativa de la sensibilidad en la detección del ácido fólico (se triplicó la señal) sin afectar ostensiblemente a la del resto de vitaminas (ver **figura 40**) además de reducirse el ruido de fondo. La explicación a este hecho radica en que la superficie de un electrodo activado electroquímicamente contiene especies aniónicas [185, 186] por lo que al llegar un analito cargado negativamente, como es el caso del ácido fólico, sufre una fuerte repulsión que dificulta la llegada del analito a la superficie del electrodo traduciéndose en una pérdida de sensibilidad. El medio fuertemente ácido del reservorio de detección neutraliza los dos grupos carboxílicos del ácido fólico lo que evita la repulsión por estas especies aniónicas y desemboca en un aumento de la corriente farádica.

Este hecho fue confirmado realizando experimentos fuera del chip mediante voltamperometría cíclica para el ácido fólico en los dos medios, HNO_3 1M y tampón fosfato 10 mM pH=6. En la **figura 41** se puede apreciar claramente un aumento en la intensidad de las dos bandas de oxidación del ácido fólico (picos 1 y 2) al cambiar de medio, además, este descenso de pH, provoca un desplazamiento de las bandas hacia potenciales mayores ya que la oxidación está más impedida termodinámicamente. Los otros dos picos anódicos no numerados que aparecen en la **figura 41 B**, probablemente sean productos de degradación del ácido fólico debido al medio fuertemente ácido donde está disuelto.

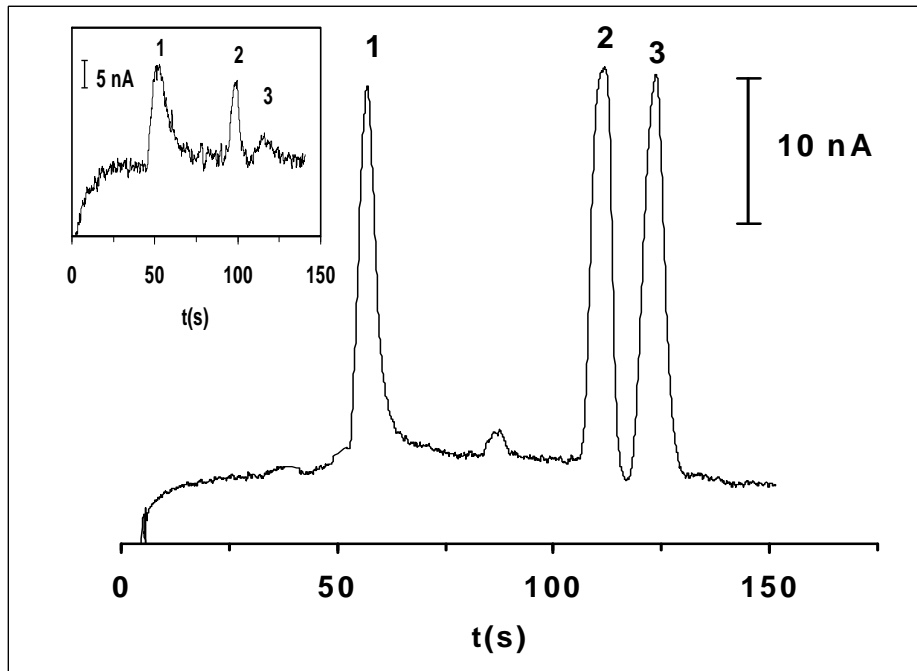


Figura 40. Separación por CZE de vitaminas hidrosolubles. Picos: (1) Piridoxina 1×10^{-4} M, (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} M, (3) ac. fólico 2×10^{-4} M. Condiciones: Tampón fosfato 10 mM pH=6, voltaje de separación 2 kV, voltaje de inyección 2 kV durante 3 s, potencial de detección 1.2 V con HNO_3 1M como medio de detección. Inset: con el medio de separación igual al de detección.

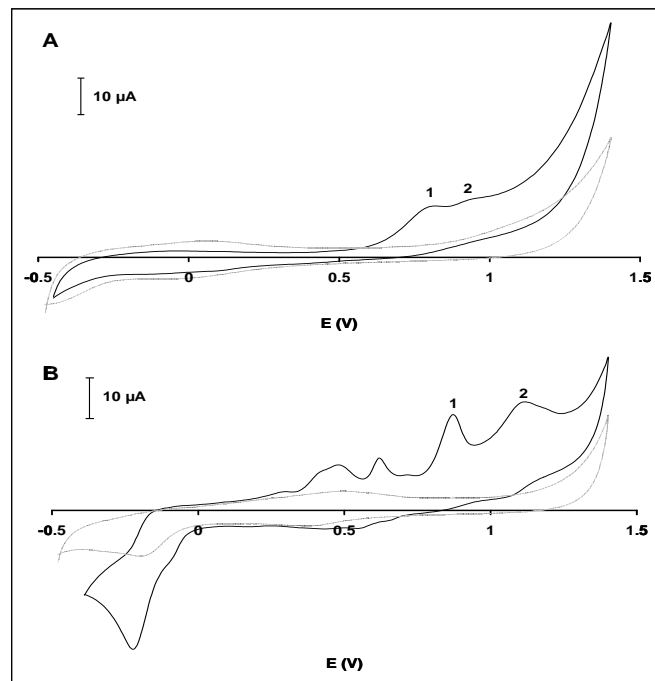


Figura 41. Voltamperometría cíclica de ácido fólico 1 mM. (A) Tampón fosfato 10 mM pH=6 como electrolito. (B) HNO_3 1 M como electrolito. Condiciones: $v_{\text{barrido}}=10$ V/s

Asimismo, estos resultados ponen de manifiesto el papel de la configuración *end-channel* respecto a las demás ya que no sólo es más fácil modificar y reemplazar los electrodos sino que permite la posibilidad de utilizar medios de detección distintos al de separación, estrategia que puede mejorar la sensibilidad del método ampliando notablemente su versatilidad.

Tras utilizar un medio de detección distinto al de separación y obtener un incremento en la señal amperométrica, se procedió a establecer el mejor potencial de detección para estos analitos en términos de relación señal/ruido.

Selección del potencial de detección óptimo. Construcción del voltamperograma hidrodinámico (HDV).

El potencial de oxidación óptimo para estos analitos fue elegido trazando el correspondiente voltamperograma hidrodinámico (HDV). El aumento de potencial se estableció en intervalos de 0.1V, para poder definir perfectamente la curva sigmoidal de estos analitos. El perfil hidrodinámico se muestra en la **figura 42**.

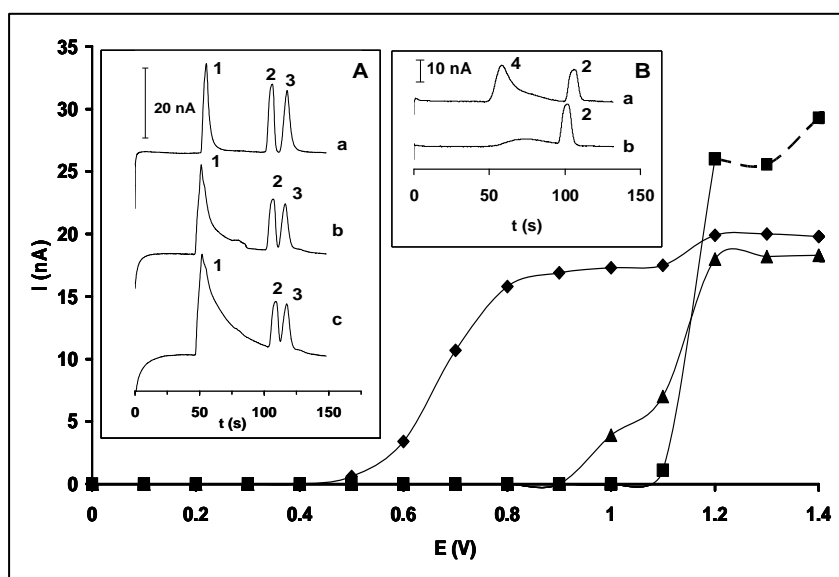


Figura 42. Voltamperogramas hidrodinámicos de las vitaminas hidrosolubles estudiadas. ■—Piridoxina; ◆—ac.ascórbico; ▲—ac.fólico. Inset A: Ensanchamiento del pico de piridoxina con el potencial de oxidación. (a) +1.2 V, (b) +1.3 V, (c) +1.4V. Picos: (1) Piridoxina 3×10^{-4} M, (2) ac. ascórbico 2.5×10^{-4} M, (3) ac.fólico 2×10^{-4} M. Inset B: Comportamiento electroquímico de la cianocobalamina con el potencial de detección. (a) +1.2 V, (b) +1.4 V. Picos: (4) Cianocobalamina 1×10^{-3} M, (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} M. Condiciones: las mismas de la fig.40.

Como se observa y es bien conocido, la vitamina C tiene un potencial redox moderado; sin embargo, las vitaminas del grupo B requieren potenciales mayores para ser oxidadas. Mientras que la intensidad de corriente de la vitamina C crece rápidamente a partir de +0.5 V, para el ácido fólico y la piridoxina la corriente anódica no aparece hasta +0.9V y +1.1V, respectivamente.

Además el potencial de detección tiene una influencia especialmente importante en la oxidación de la vitamina B₆. Así, para valores superiores a +1.2 V, la forma del pico electroforético cambia y empieza a tener cola perjudicándose, de esta manera, la detección de las otros dos vitaminas (ver **figura 42 Inset A**).

El conjunto de todos estos resultados pueden ser comprendidos mediante comparación con la bibliografía existente. Mientras que la oxidación electroquímica de la vitamina C es bien conocida (ver **figura 43 A**), presentando un pico anódico irreversible alrededor de +0.4 V [186], la oxidación electroquímica de la vitamina B₆ es muy compleja, presentando dos picos anódicos irreversibles a +0.75 V y a +1.3 V [187]. Además el proceso electroquímico en este caso es fuertemente dependiente del pH, produciéndose además fenómenos de hidratación y tautomerismo ácido-base (formación de hemiacetales). La oxidación de la vitamina B₆ tiene dos pasos principales, primero se forma el piridoxal y después el ácido piridóxico, es decir, el proceso global sería el paso de un grupo -CH₂OH inicial a un -COOH (ver **figura 43 B**).

En base a lo anteriormente expuesto, la aparición de cola en el pico de la vitamina B₆ al aumentar el potencial de detección puede deberse a una modificación en el mecanismo de oxidación que provocaría un cambio en la cinética del proceso, es decir, en lugar de estar controlado por la transferencia de materia estaría controlada por la reacción electroquímica. Otra de las posibles razones podría ser que el disolvente se estuviera oxidando, dado que el potencial de detección elegido es muy elevado. Estos hechos no han sido comprobados pero sí se han tenido en cuenta a la de hora de elegir el potencial de oxidación óptimo ya que permite trabajar como máximo hasta 1.2V.

Con respecto a la detección electroquímica de ácido fólico, conviene señalar que, mientras que el proceso de reducción ha sido perfectamente definido, su oxidación ha sido poco estudiada. Existe un trabajo en la bibliografía donde a pH=1 (ácido perclórico 0.1M) el ácido fólico muestra dos bandas de oxidación a +0.8V y a +1.03V y otra de

reducción a -0.25V mediante voltamperometría cíclica [185]. Nuestros resultados están en perfecta concordancia con este trabajo siendo también necesario un pH muy ácido para poder ver la reacción electroquímica del ácido fólico. Además en otro trabajo se propone que el grupo oxidable del ácido fólico es el $-\text{OH}$ unido al núcleo de pteridina (anillo de pirimidina acoplado a otro de pirazina) que se oxida a un radical estabilizado por el doble anillo [188] (ver **figura 43 C**).

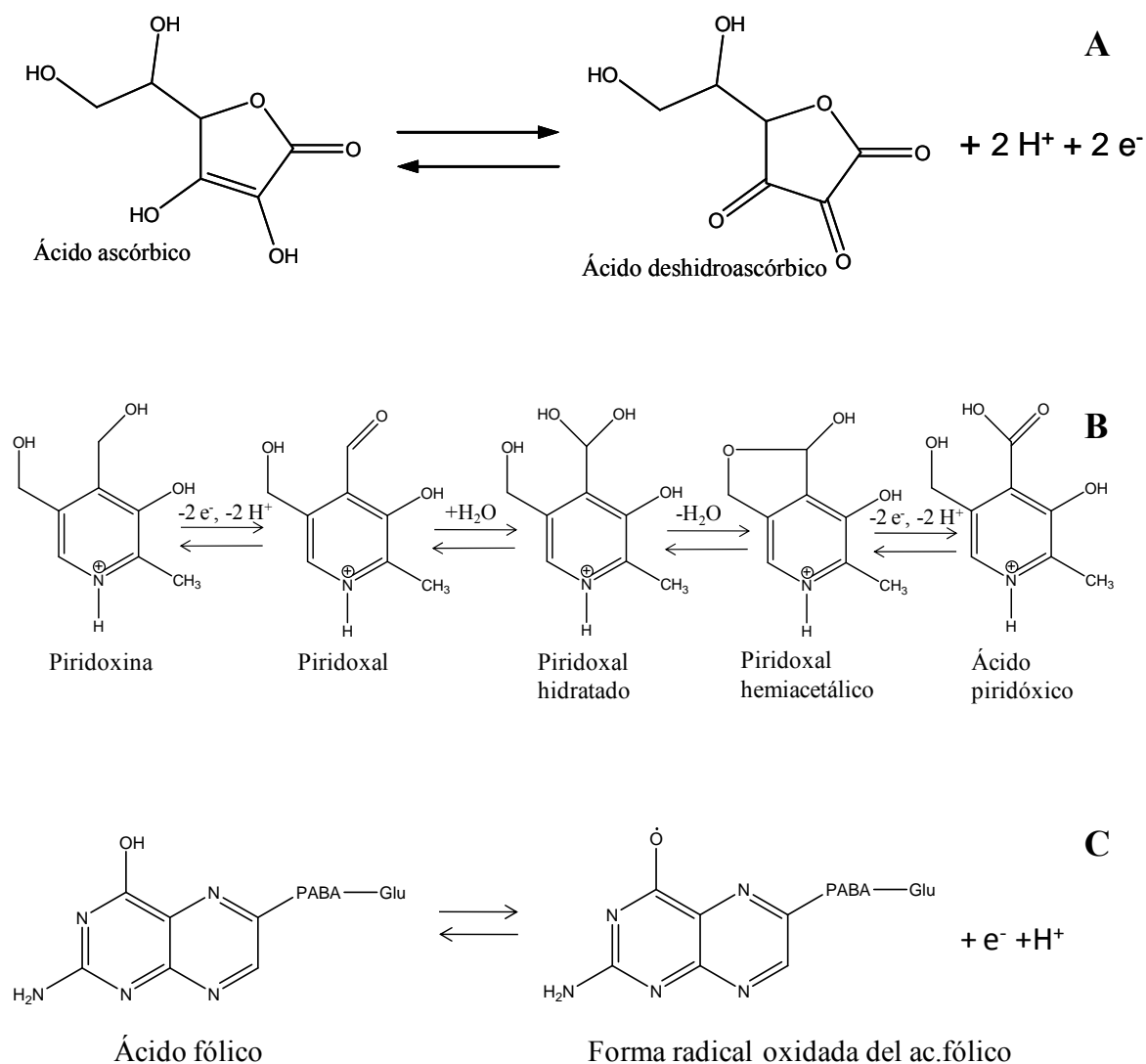


Figura 43. Mecanismos de oxidación de las vitaminas estudiadas. (A) Ac.ascórbico, (B) Piridoxina, (C) Ac.fólico. PABA: ácido p-aminobenzoico, Glu: ácido glutámico.

También se procedió a la optimización de la detección de la cianocobalamina (B_{12}) pero sólo se conseguía una buena señal a partir de $+1.4\text{V}$ (ver **figura 42 Inset B**). El hecho de no poder aumentar el potencial por encima de $+1.2\text{V}$ por la deformación

del pico de piridoxina, obligó a sacrificar la detección de B₁₂ en favor de la B₆, quedando claramente demostrada la importancia del potencial de oxidación para la determinación de este conjunto de vitaminas.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el potencial de detección elegido para la determinación de la vitaminas hidrosolubles, objeto de nuestro trabajo de investigación, fue +1.2 V ya que mostraba la mejor relación señal/ruido.

II.3.2.2. Optimización de la separación electroforética.

Estudio de las variables químicas.

Las variables químicas que afectan a la separación de manera crítica son dos, el pH y la fuerza iónica. El primer paso es elegir el tampón de trabajo más adecuado por lo que se procedió al estudio de dos tampones; borato y fosfato.

Los resultados obtenidos mostraron que el tampón fosfato (pH=6) era más adecuado ya que permitía la separación de las vitaminas por CZE en menor tiempo y con mayores eficacias que el tampón borato (pH=9). La principal razón del aumento de los tiempos en tampón borato es que estos analitos interaccionaban con el borato (formación de complejos), lo que les confería mayor carga negativa retrasándose su salida. Esta interacción se apreciaba claramente con la piridoxina (pKa=4.5) ya que en medio fosfato salía con el flujo electroosmótico, es decir, estaba en forma neutra, y en medio borato salía después de éste. Por consiguiente, el único origen posible de la carga negativa para este analito era la que le aportaba el complejo con borato (electroforegramas no mostrados).

(i) Estudio del pH.

Como es bien conocido, el pH es un parámetro de separación muy importante en analitos con propiedades ácido-base. Las movilidades electroforéticas de los analitos dependen tanto del tamaño de los iones como de su carga efectiva, ya que son proporcionales al grado de disociación que experimentan los analitos en el medio de separación. Además, los analitos están sometidos a la acción del flujo electroosmótico (EOF) (generado por la superficie cargada del canal) que es directamente proporcional al voltaje de separación aplicado y al pH del tampón ya que se genera mayor ionización de la superficie del canal y, por tanto, mayor potencial zeta. Por tanto, la movilidad

aparente del analito será la suma de su movilidad electroforética más la movilidad causada por el flujo electroosmótico ($\mu_{\text{aparente}} = \mu_{\text{electroforética}} + \mu_{\text{EOF}}$).

Se estudiaron cuatro valores de pH utilizando un tampón fosfato 10 mM pH= 5, 6, 7 y 8. Los electroforegramas correspondientes a estudios de la influencia del pH en la separación de los analitos se muestran en la **figura 44**. Como se observa en dicha figura, para todos los valores de pH estudiados se obtuvieron resoluciones a línea base. Sin embargo, cuando el pH aumentaba los tiempos de análisis eran más largos y la sensibilidad de los picos disminuía, con la excepción del paso de pH=5 a pH=6. A estos valores de pH, se obtuvieron tiempos de análisis similares pero se eligió pH=6 como pH de trabajo ya que las señales obtenidas para este valor eran mayores.

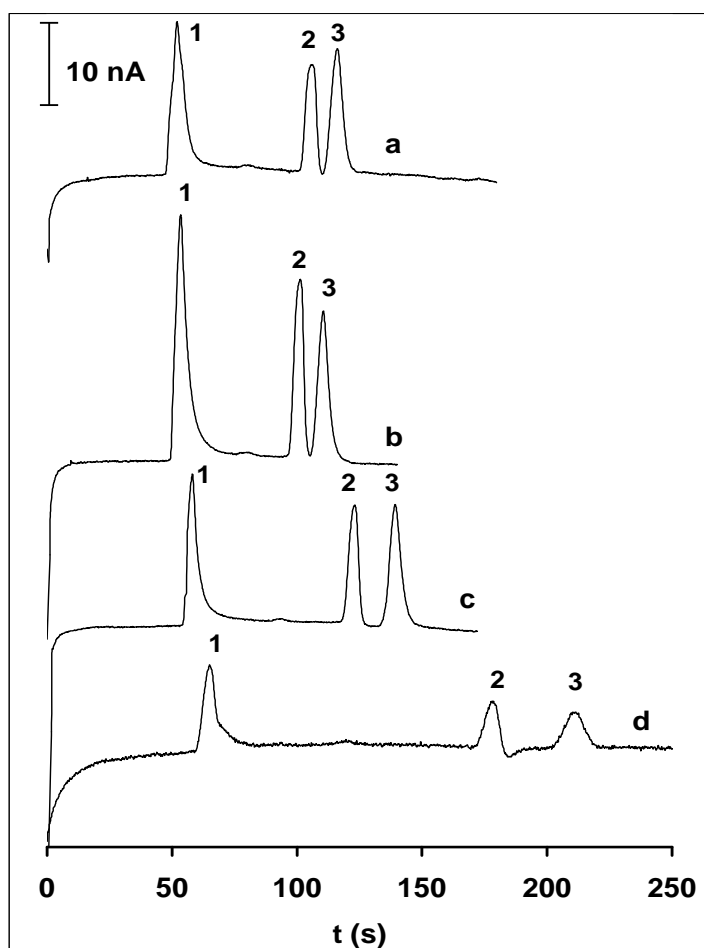


Figura 44. Influencia del pH en la separación electroforética. (a) pH=5, (b) pH=6, (c) pH=7, (d) pH=8. Picos: (1) Piridoxina 1×10^{-4} M, (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} M, (3) ac.fólico 2×10^{-4} M. Condiciones: el resto de condiciones igual que fig.40.

La separación por CZE se logró porque tanto el ácido ascórbico ($pK_a = 4.04$) como el fólico ($pK_{a1}=1.5$, $pK_{a2}=4.5$) a estos valores de pH están cargados. La vitamina C posee una carga negativa y el ácido fólico está doblemente cargado, mientras que la piridoxina permanece neutra. Al estar a un pH por encima de los valores de pK_a correspondientes tanto al ácido ascórbico como al ácido fólico, a medida que aumentemos el pH, los analitos estarán más cargados (más ionizados) y sus tiempos de migración aumentarán, justificándose el menor tiempo de análisis obtenido para $pH=6$. Por otra parte, este aumento de pH también provoca un aumento del flujo electroosmótico, justificándose que a $pH=6$ se obtuvieran tiempos de análisis similares a $pH=5$.

(ii) Estudio de la fuerza iónica.

El estudio de la fuerza iónica se realizó en un intervalo comprendido entre 10 y 30 mM de concentración de tampón borato variándose en unidades de 10 mM entre cada experimento.

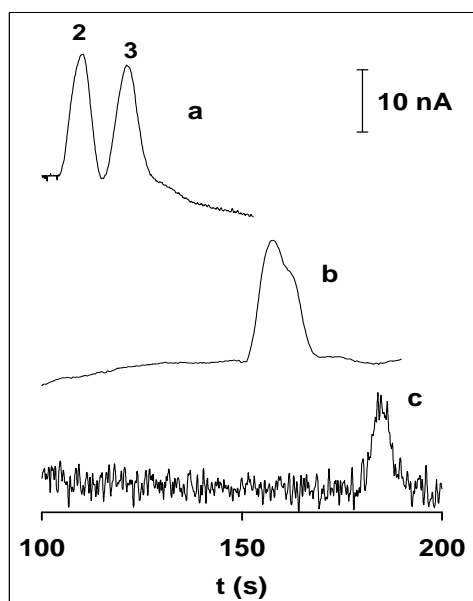


Figura 45. Influencia de la fuerza iónica en la separación de ácido ascórbico y fólico. (a) 10 mM, (b) 20 mM, (c) 30 mM. Condiciones: el resto de condiciones como en fig.46. Picos: (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} , (3) ac. fólico 2×10^{-4} M.

La **figura 45** muestra la influencia de la fuerza iónica sobre la separación de los analitos al pH optimizado. En esta figura no se ha mostrado el electroforegrama

completo para poder apreciar con mayor claridad su influencia en la separación de los ácidos ascórbico y fólico. En este caso, un aumento de la fuerza iónica resultó ser crítico para la separación ya que, aparte de aumentar los tiempos de migración, se pasó de una resolución a línea base a 10 mM (**fig. 45 a**) a una pérdida total de resolución a 30 mM detectándose una única señal (**fig. 45 c**). También es de destacar como a 30 mM la corriente eléctrica a través del capilar (electroforética) es tan grande que se acopla con la corriente eléctrica de detección dando lugar a un aumento notable del ruido. Por tanto, la fuerza iónica elegida para el resto del estudio fue 10 mM con la cual se obtenía una resolución de 1.2.

Estudio de los protocolos electrocinéticos de inyección y separación.

Una vez optimizadas las variables químicas, se realizó la optimización de las condiciones electrocinéticas de inyección y el estudio de la influencia del voltaje de separación sobre la separación de los analitos.

(i) Optimización de las condiciones electrocinéticas de inyección.

En la inyección electrocinética la cantidad de muestra inyectada depende de dos factores, del tiempo de la inyección y del voltaje aplicado durante la misma. Se llevaron a cabo diferentes experimentos utilizando tiempos de inyección de 3, 5 y 10 segundos y voltajes de inyección comprendidos entre 1.0 y 2.0 kV.

La señal más adecuada (en términos de la sensibilidad obtenida y de la forma adoptada por los picos) se obtuvo cuando se emplearon valores de 2.0 kV como potencial de inyección y tiempos de inyección de 3 s.

(ii) Estudio del voltaje de separación.

En las condiciones previamente optimizadas de pH (pH=6.0), fuerza iónica (10 mM) y condiciones de inyección (2.0 kV, 3 s), se estudió la influencia del voltaje de separación en un intervalo comprendido entre 2 y 3 kV, en incrementos de 0.5 kV.

Los electroforegramas obtenidos para la influencia del voltaje de separación sobre la separación de los analitos se muestran en la **figura 46**. Como se observa y era de esperar, un aumento en el voltaje de separación se tradujo en menor tiempo de análisis, peor resolución y un mayor ruido.

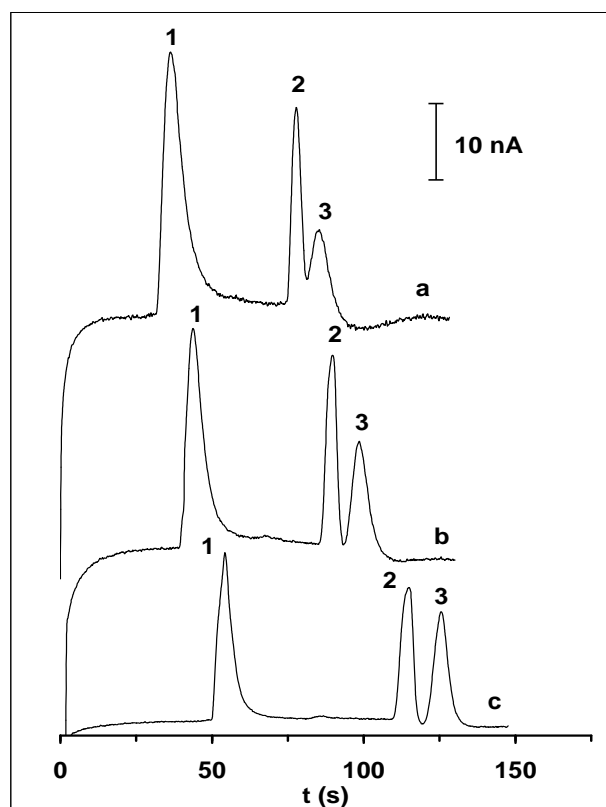


Figura 46. Influencia del voltaje de separación en la separación electroforética. (a) 3 kV, (b) 2.5 kV, (c) 2 kV. Picos: (1) Piridoxina 1×10^{-4} M, (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} M, (3) ac.fólico 2×10^{-4} M. Condiciones: el resto de condiciones igual que fig. 40.

Asimismo, con el fin de obtener una visión cuantitativa de la influencia que ejerce el voltaje de separación sobre los analitos, se han calculado los valores de resolución entre el pico de ácido ascórbico y el de ácido fólico para cada voltaje agrupándose estos valores en la **tabla 8**. Las condiciones óptimas de separación se dieron cuando se tomó una situación de compromiso entre el menor tiempo de análisis posible y una resolución aceptable. Estas condiciones experimentales se alcanzaron cuando el voltaje de separación utilizado fue de 2 kV.

Tabla 8. Resoluciones correspondientes a ácido ascórbico y ácido fólico para cada voltaje de separación ensayado.

V (kV)	3	2.5	2
Rs	0.8	1.1	1.3

II.3.2.3. Comportamiento analítico del método.

Las características analíticas del método se establecieron en dos partes perfectamente diferenciadas. En primer lugar, se estudió la precisión del método teniendo en cuenta tiempo de migración, alturas y áreas de pico para cada analito y, a continuación, se estableció la calibración metodológica empleando para tal fin el protocolo de calibración externa.

Estudios de precisión.

La precisión se estudió en términos tanto de repetibilidad como de reproducibilidad. Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo realizando inyecciones repetidas en un periodo corto de tiempo (el mismo día), bajo las mismas condiciones de operación, utilizando la misma muestra y el mismo equipo. Para estudiar la precisión en términos de reproducibilidad las inyecciones se llevaron a cabo en días distintos empleando diferentes muestras.

En la **tabla 9** se pueden ver los resultados obtenidos en términos de repetibilidad y reproducibilidad para las vitaminas estudiadas.

Tabla 9. Precisión del método para la determinación de vitaminas hidrosolubles.

Repetibilidad¹						
Analito	Tiempo de migración (s)		Altura de pico (nA)		Área de pico ($\times 10^8$) (C)	
	$t_m \pm s$	RSD (%)	$h_m \pm s$	RSD (%)	$a_m \pm s$	RSD (%)
Piridoxina	54.3 \pm 0.3	0.5	19 \pm 1	6	8.7 \pm 0.4	5
Vitamina C	108.8 \pm 0.6	0.5	30.2 \pm 0.4	2	16.0 \pm 0.2	2
Ac.Fólico	120.0 \pm 0.7	0.6	39 \pm 1	3	21.9 \pm 0.4	2
Reproducibilidad²						
Analito	Tiempo de migración (s)		Altura de pico (nA)		Área de pico ($\times 10^8$) (C)	
	$t_m \pm s$	RSD (%)	$h_m \pm s$	RSD (%)	$a_m \pm s$	RSD (%)
Piridoxina	54 \pm 1	2	24 \pm 2	8	12 \pm 1	7
Vitamina C	105 \pm 3	3	19 \pm 1	5	9 \pm 1	9
Ac.Fólico	115 \pm 3	3	17 \pm 2	10	9 \pm 1	12

¹usando una mezcla de 300 μ M de B6, 400 μ M de vitamina C y 400 μ M de ac.fólico.

²usando una mezcla de 275 μ M de B6, 250 μ M de vitamina C y 200 μ M de ac.fólico.

Como era de esperar, los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos para la repetibilidad fueron menores que los obtenidos para la reproducibilidad en todos los casos estudiados. Se obtuvo una excelente repetibilidad siempre con valores

de RSDs inferiores al 0.7% para los tiempos de migración y menores al 6% para alturas y áreas de pico. La reproducibilidad también fue aceptable, con valores de RSDs próximos al 3 % para los tiempos de migración de todas las vitaminas y RSDs para alturas de pico que van del 5 al 10% y en áreas del 7 al 12%.

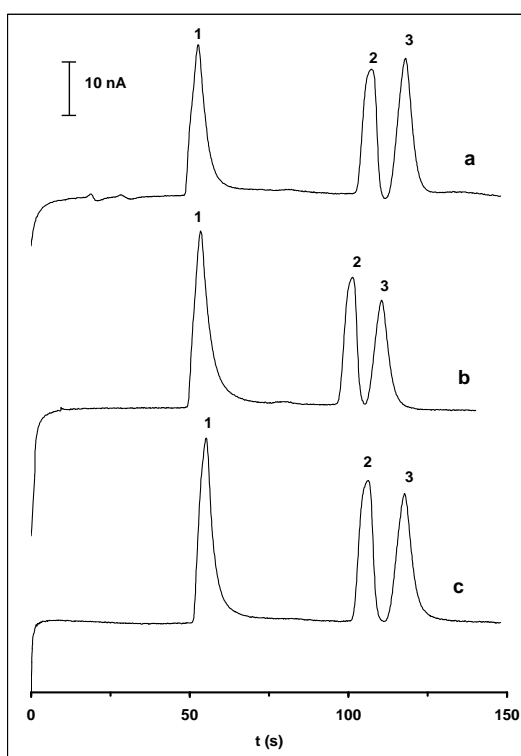


Figura 47. Electroforegramas correspondientes a la separación de vitaminas hidrosolubles obtenidos en días distintos. Picos: (1) Piridoxina 1×10^{-4} M, (2) ac. ascórbico 2×10^{-4} , (3) ac.fólico 2×10^{-4} M. Condiciones: igual que fig.40.

Para ilustrar mejor la buena reproducibilidad del método y, de manera concreta, el buen comportamiento del inyector, dada la dificultad intrínseca de estos microsistemas a la hora de obtener resultados robustos (tiempos de análisis cortos, falta de automatización, etc.), se muestran en la **figura 47** tres electroforegramas obtenidos en días distintos.

Calibración metodológica

Con el fin de obtener información de otras características analíticas y para poder proponer al método optimizado como método cuantitativo, se llevó a cabo la

calibración externa para cada uno de los analitos, en las condiciones previamente optimizadas (medio de separación tampón fosfato 10 mM a pH=6, voltaje de inyección de 2 kV durante 3 s, voltaje de separación de 2 kV, y potencial de 1.2 V en la detección).

En la **figura 48** se muestran los electroforegramas obtenidos a partir de disoluciones patrón que contienen las tres vitaminas estudiadas.

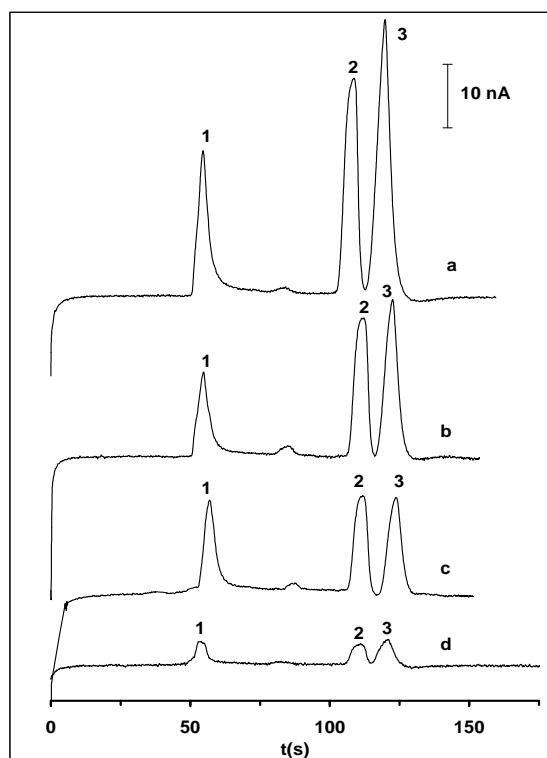


Figura 48. Electroforegramas correspondientes a estudios de calibración para las vitaminas estudiadas. Picos: (1) Piridoxina, (2) ac. ascórbico, (3) ac.fólico. (a) Piridoxina 3×10^{-4} M, ac. ascórbico 4×10^{-4} M, ac.fólico 4×10^{-4} M, (b) piridoxina 1.5×10^{-4} M, ac. ascórbico 2.5×10^{-4} M, ac.fólico 2.5×10^{-4} M, (c) piridoxina 1×10^{-4} M, ac. ascórbico 2×10^{-4} M, ac.fólico 2×10^{-4} M, (d) piridoxina 2.5×10^{-5} M, ac. ascórbico 5×10^{-5} M, ac.fólico 5×10^{-5} M. Condiciones: igual que en fig.40.

Como se observa en la **figura 48** existe una buena respuesta del detector al aumentar la concentración de los analitos. Los parámetros analíticos correspondientes a la rectas de calibrado (ordenada en el origen, pendiente, r , límites de detección y de cuantificación) se muestran en la **tabla 10**.

Tabla 10. Parámetros obtenidos para el protocolo de calibración externa ($y=a+bx$).

Analito	$a^1 \pm ts_a^2 (x10^8)$ (C)	$b^1 \pm ts_b^2 (x10^8)$ (C. μM^{-1})	r	LOD (μM) ³	LOQ(μM) ⁴
Piridoxina	0.5 \pm 0.6	0.040 \pm 0.003	0.996	15	25
Ac.Ascorbico	-0.9 \pm 0.9	0.043 \pm 0.003	0.992	21	50
Ac.Folico	-1.4 \pm 1.6	0.054 \pm 0.006	0.993	28	50

¹Recta de regresión: $y=a+bx$ donde "y" es el área de pico en culombios y "x" la concentración en μM .

²intervalo de confianza $\alpha=0.05$

³calculado mediante $3s_a/b$

⁴experimental

En esta tabla se puede observar que la sensibilidad (en términos de pendiente de calibración) del ácido fólico fue levemente superior a la del ácido ascórbico lo que significa que la estrategia de mejora de la detección funcionó equiparándose el comportamiento redox del ácido fólico (banda de oxidación poco sensible) al del ácido ascórbico (banda de oxidación modelo). Asimismo, las pendientes y ordenadas en el origen fueron similares para las tres vitaminas estudiadas obteniéndose, en consecuencia, límites de detección (LOD) parecidos. Otra observación a tener en cuenta es que, estadísticamente hablando, el valor de la ordenada en el origen, en todos los casos estudiados, fue cero, lo que nos permitiría llevar a cabo la cuantificación usando sólo la pendiente. Este hecho es muy importante porque nos podría permitir realizar rápidas calibraciones usando simplemente un factor de calibración (un sólo punto) tal y como se expondrá posteriormente.

Aplicación del método desarrollado a la determinación de vitaminas en complejos vitamínicos.

Para demostrar la capacidad del método desarrollado se aplicó el mismo al análisis cuantitativo de vitaminas en distintas formulaciones que contenían una o más de las vitaminas estudiadas y que se encontraban en distintas concentraciones.

En la **tabla 11** se recogen los valores obtenidos experimentalmente para cada vitamina en las formulaciones estudiadas, el valor nominal en el complejo vitamínico así como la precisión y la exactitud obtenidas en dicho análisis.

Como se refleja en la **tabla 11**, las cantidades obtenidas por comprimido para las vitaminas estudiadas utilizando el sistema de microchip CE-ED resultaron ser muy próximas a las declaradas por el fabricante (errores relativos comprendidos entre el 2 y

el 9%), con independencia de la diferente concentración de vitaminas que había en cada formulación. Además las precisiones obtenidas fueron aceptables (inferiores al 10%) lo que demuestra las grandes posibilidades de estos microsistemas para el análisis cuantitativo de vitaminas en este tipo de muestras.

Tabla 11. Determinación de vitaminas estudiadas en preparados farmacéuticos.

Formulación	Analito	Precisión (%) ¹	Valor nominal (por comprimido)	Valor obtenido (por comprimido)	Error (%) ²
Hidrosil®	Piridoxina	10	250 mg	267 mg	7
Vitafardi®	Ac.Ascorbico	3	1 g	1.1 g	9
Aspol®	Ac.Folico	8	10 mg	9.8 mg	2

¹expresado como la desviación estándar relativa obtenida en tres análisis independientes (n=3).

²expresado como error relativo.

En la **figura 49** se muestran los electroforegramas correspondientes a las determinaciones de vitaminas en los distintos complejos vitamínicos estudiados. La capacidad del método propuesto para determinar las tres vitaminas simultáneamente en una muestra real se comprobó, asimismo, mediante estudios de recuperación. Para ello, se procedió a la fortificación del fármaco Aspol®, que contiene ácido fólico, en las otras dos vitaminas (piridoxina y ácido ascórbico). Los resultados fueron satisfactorios ya que se separaron las tres vitaminas (**figura 49 d**) y se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre 85-115%.

Después de aplicar con éxito el método de análisis a los diferentes complejos vitamínicos, se procedió a la determinación cuantitativa de vitaminas en muestras más complejas. En este caso, se intentó cuantificar las tres vitaminas estudiadas en complementos alimenticios donde existe una alta concentración de sales minerales.

La principal dificultad que se encontró es que se tenían que hacer diluciones muy altas para evitar modificaciones de la fuerza iónica causadas por las sales minerales. Un cambio en la fuerza iónica provocaría cambios en los tiempos de migración y, lo que es más dramático, afectaría a la inyección de muestra, siendo ésta una de las debilidades de los fenómenos electrocinéticos. La dilución realizada para evitar estos efectos provocó que la única vitamina que se pudo determinar fuera el ácido ascórbico que es la que está en mayor concentración en este tipo de suplementos. En la **figura 50** se

muestran, a modo de ejemplo, electroforegramas correspondientes a dos suplementos alimenticios, Supradyn® y Dayamineral®.

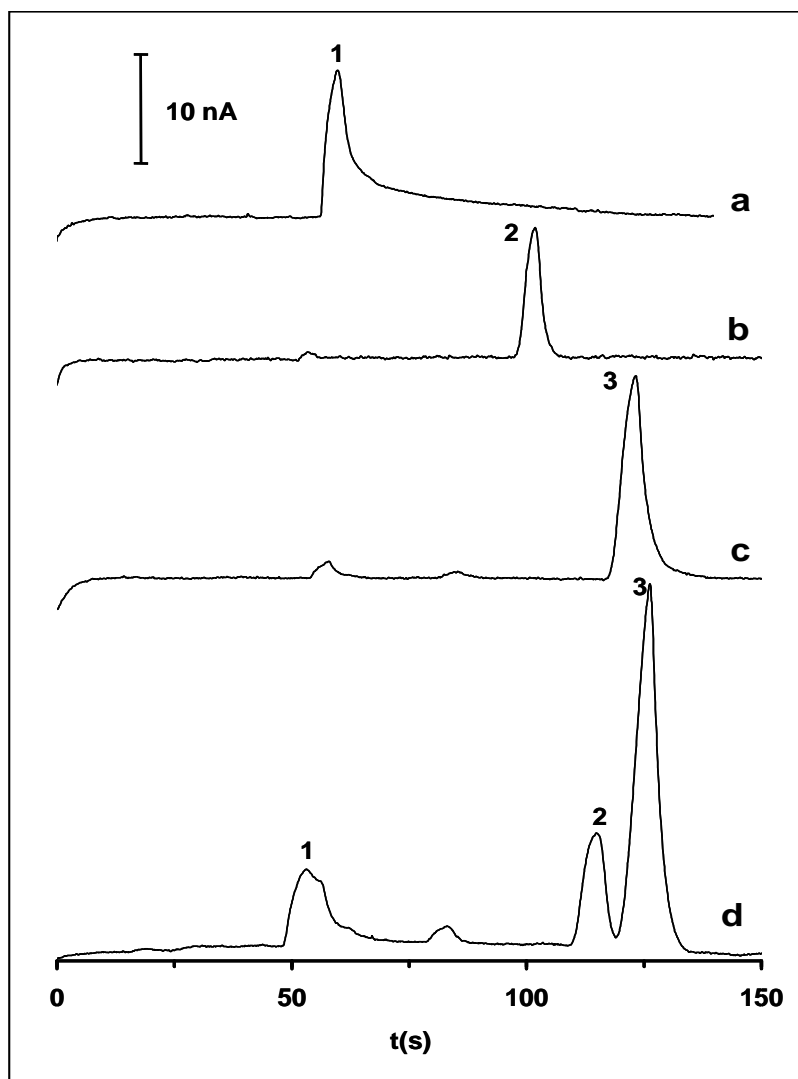


Figura 49. Electroforegramas correspondientes a las vitaminas estudiadas en preparados farmacéuticos. (a) Hidrosil®, (b) Vitafardi®, (c) Aspol®, (d) Aspol® reforzado con piridoxina 1×10^{-4} M, ac. ascórbico 2×10^{-4} M. Picos: (1) Piridoxina, (2) ac. ascórbico, (3) ac.fólico. Condiciones: igual que en fig.40.

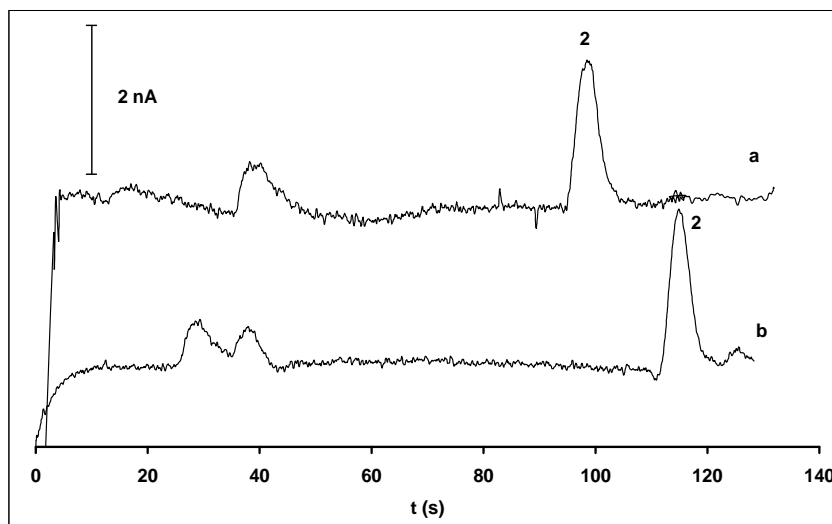


Figura 50. Análisis de dos preparados multivitamínicos. (a) Dayamineral®, (b) Supradyn®. Picos: (2) Ac. ascórbico. Condiciones: como en la fig.40.

Propuesta de integración secuencial de los protocolos de calibración metodológica y determinación de vitaminas hidrosolubles.

En el apartado anterior (II.3.1) quedó claramente demostrada la posibilidad del uso indiscriminado y/o secuencial de ambos inyectores del microchip debido a la buena reproducibilidad obtenida entre los mismos. Partiendo de esta idea y teniendo en cuenta que, según los estudios de calibración realizados, la ordenada en el origen es estadísticamente cero, se propuso una estrategia para realizar de forma secuencial la calibración y determinación de vitaminas en un sólo montaje experimental utilizando el sistema miniaturizado. Esta estrategia se denominó “*calibración integrada*” y se muestra en la **figura 51**.

Como puede observarse en la figura, de los cuatro reservorios del microchip de cruz sencilla, uno de ellos denominado reservorio de calibración (RC) se utilizó para la calibración y contenía una concentración conocida de los patrones de las vitaminas a determinar, otro denominado reservorio de análisis (RA) contenía la muestra y se empleó para la determinación de las vitaminas en la muestra, otro denominado reservorio del tampón (RT) contenía el tampón de separación y el último se utilizó como reservorio de detección (RD) (**figura 51 A**). La estrategia consistió en realizar una inyección desde el reservorio de calibración (RC) obteniéndose una señal correspondiente a una cantidad conocida de patrones de las vitaminas a determinar y, a continuación, realizar otra inyección pero esta vez desde el reservorio de muestra

(RA) para obtener la señal correspondiente a la muestra problema que contiene las vitaminas. A partir de la señal del patrón podemos obtener el factor de calibración para ese análisis definido como $f_{\text{calibración}} = \text{Señal}_{\text{patrón}} / [\text{patrón}]$ (ya que el valor de la ordenada en el origen es estadísticamente cero (ver **Tabla 10**)). A continuación y debido a que el factor es una constante del análisis, la concentración de la vitamina estudiada en la muestra problema se calcula mediante la expresión $[\text{Vitamina}] = \text{Señal}_{\text{Muestra}} / f_{\text{calibración}}$.

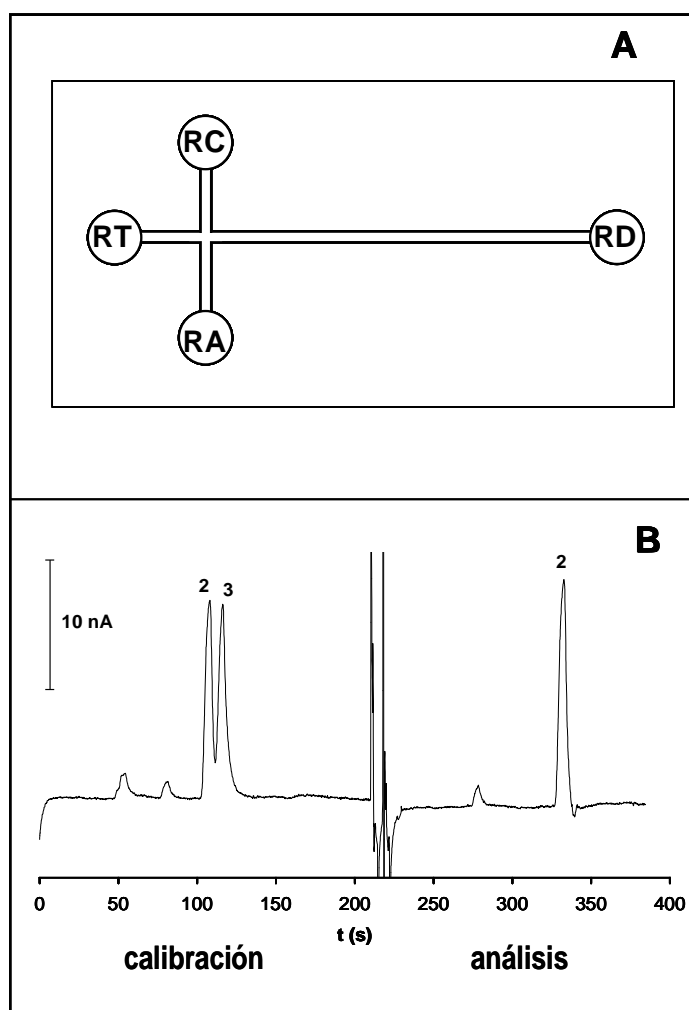


Figura 51. Integración de las etapas analíticas correspondientes a la calibración metodológica y la determinación analítica de las vitaminas en un preparado farmacéutico. (A) Esquema del microchip con los reservorios etiquetados como RC (reservorio de calibración), RA (reservorio de análisis), RT (reservorio con el tampón de separación) y RD (reservorio de detección). (B) Electroforegrama correspondiente a la calibración y cuantificación de ac. ascórbico en el complejo vitamínico Vitafardi® en un sólo experimento. **Picos:** (2) ac. ascórbico, (3) ac. fólico. Condiciones: igual que en fig.40.

En aras de demostrar la viabilidad de la estrategia, la determinación de vitamina C con calibración integrada se llevó a cabo analizando Vitafardi® como muestra. Los resultados obtenidos fueron excelentes ya que se consiguió realizar la calibración y el análisis de una muestra de manera secuencial en tan sólo 350 s (electroforegramas **figura 51 B**) siguiendo el programa de voltajes mostrado en la **tabla 12**.

Tabla 12. Programa de voltajes utilizado.

Orden	Etapa analítica	Etapa electrocinética	Reservorio calibración (RC)	Reservorio de análisis (RA)	Reservorio separación (RT)	Reservorio detección (RD)
1º	Calibración	Inyección	2 kV	abierto	abierto	tierra
		Separación	abierto	abierto	2 kV	tierra
2º	Análisis	Inyección	abierto	2 kV	abierto	tierra
		Separación	abierto	abierto	2 kV	tierra

Asimismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la pendiente obtenida para la vitamina C mediante la *calibración integrada* ($0.39 \text{ nC} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) y la de la recta de calibración externa, obtenida con varias disoluciones patrón y descrita anteriormente ($0.43 \text{ nC} \cdot \mu\text{M}^{-1}$), por lo que los resultados obtenidos en términos de exactitud fueron similares entre ambos modos de calibración (error relativo del 12% con la calibración integrada y del 9% con la calibración externa) demostrándose claramente la idoneidad de la estrategia (**figura 51 B**).

Las ventajas del método propuesto que integra la calibración y el análisis en el diseño de microchip de cruz sencilla son las siguientes: (i) la calibración puede diseñarse estratégicamente eligiendo tantos patrones como analitos se van a determinar y en concentraciones iguales a la de la muestra y, de este modo, minimizar el error al interpolar, (ii) el análisis completo se puede realizar en condiciones de repetibilidad mejorándose la precisión del análisis y (iii) la calibración y el análisis se pueden realizar en el mismo montaje experimental del sistema miniaturizado con lo que se reducen ostensiblemente los tiempos de análisis y la exactitud mejora ya que, en caso de una pérdida de eficacia del sistema, ésta afectaría por igual a la calibración y al análisis.

Además, es importante destacar que la posibilidad comentada en el párrafo anterior de diseñar la mezcla de patrones de tal manera que la concentración de dicha mezcla sea igual a la esperada para la muestra es muy importante de cara al control de calidad farmacéutico ya que, en este tipo de análisis, se conoce el contenido aproximado de los principios activos a analizar y, además, suelen encontrarse en distintos niveles de concentración debido a que la actividad biológica o las necesidades de nuestro organismo de dichos principios activos son también diferentes.

II.4. Conclusiones

Por una parte, se ha desarrollado un método para la determinación de hidroquinona y arbutina empleando un microchip de electroforesis capilar de cruz sencilla con detección electroquímica. El análisis se llevó a cabo en tan sólo 180 s disminuyendo notablemente los tiempos de análisis obtenidos en técnicas en escalado convencional. El método fue aplicado al análisis de muestras reales que abarcaron el campo clínico, alimentario y farmacéutico obteniéndose buenos resultados tanto en términos de precisión como de exactitud, todo ello, teniendo en cuenta la variedad y complejidad de las matrices estudiadas y las dificultades intrínsecas de los microchips de electroforesis capilar. Asimismo, se ha propuesto el empleo indistinto de los dos inyectores que configuran el diseño del microchip de cruz sencilla debido a la excelente reproducibilidad obtenida entre ambos con una precisión inferior al 7%.

Por otra parte, se ha desarrollado por primera vez un método rápido y fiable para llevar a cabo la determinación de vitaminas hidrosolubles, empleando también un microchip de electroforesis capilar de cruz sencilla con detección electroquímica. La introducción de HNO₃ 1M en el medio de detección y un control riguroso del potencial de oxidación resultaron claves para la determinación de estos analitos. La separación se realizó en 130 s con una buena resolución, mejorándose notablemente los tiempos invertidos en escalado convencional. Además se ha demostrado su aplicabilidad para la determinación de vitaminas en complejos vitamínicos y los resultados en términos de precisión y exactitud fueron aceptables, con errores relativos inferiores al 9%. Debido a la buena reproducibilidad obtenida al utilizar ambos inyectores de manera indiscriminada y como continuación natural de este hallazgo, se ha desarrollado una estrategia *on-chip* denominada calibración integrada que ha consistido en la integración de la calibración metodológica y el análisis de la muestra utilizando de manera secuencial los dos inyectores lo que ha permitido llevar a cabo la determinación analítica completa en tan sólo 350 s reduciéndose el tiempo total y simplificando el procedimiento de forma importante, no sólo con respecto al escalado convencional sino también con respecto al escalado miniaturizado.

En consecuencia y teniendo en cuenta las conclusiones anteriormente comentadas, la posibilidad del uso indiscriminado y/o secuencial de los dos inyectores de un microchip de cruz sencilla ha abierto interesantes oportunidades a la hora de diseñar métodos analíticos con estos microsistemas.

II.5. Bibliografía

-
- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing", *Sens. Actuators B*, 1990, 1, 244-248.
- [2] A. Manz, J.C.T. Eijkel, "Miniaturization and chip technology. What can we expect?", *Pure Appl. Chem.*, 2001, 73, 1555-1561.
- [3] O. Geschke, H. Klank, P. Tellesmann (Eds.), *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, WILEY-VCH Verlag & Co. KgaA, Weinheim, 2004.
- [4] A.J. de Mello, "Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems", *Nature*, 2006, 442, 394-402.
- [5] G.M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, 2006, 442, 368-373.
- [6] D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, "Scaling and the design of miniaturized chemical-analysis systems", *Nature*, 2006, 442, 374-380.
- [7] S.C. Jakeway, A.J. de Mello, E.L. Russell, "Miniaturized total analysis systems for biological analysis", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2000, 366, 525-539.
- [8] A.J. de Mello, "Miniaturization", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 372, 12-13.
- [9] S. Haeberle, R. Zengerle, "Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications", *Lab Chip*, 2007, 7, 1094-1110.
- [10] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fettingner, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems : Capillary electrophoresis on a chip", *J. Chromatogr.*, 1992, 593, 253-258.
- [11] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H.M. Widmer, "Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip", *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1926-1932.
- [12] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, "High-speed separations on a microchip", *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1114-1118.
- [13] C.L. Colyer, T. Tang, N. Chiem, D.J. Harrison, "Clinical potential of microchip capillary electrophoresis systems", *Electrophoresis*, 1997, 18, 1733-1741.
- [14] V. Dolník, S. Liu, S. Jovanovich, "Capillary electrophoresis on microchip", *Electrophoresis*, 2000, 21, 41-54.
- [15] G.J.M. Bruin, "Recent developments in electrokinetically driven analysis on microfabricated devices", *Electrophoresis*, 2000, 21, 3931-3951.
- [16] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, "Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices", *Lab-on-a-chip*, 2001, 1, 1-6.

- [17] N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martín, S.M. Lunte, "Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry", *Electrophoresis*, 2001, 22, 2526-2536.
- [18] W.R. Vandaveer IV, S.A. Pasas, R.S. Martín, S.M. Lunte, "Recent developments in amperometric detection for microchip capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3667-3677.
- [19] J. Tanyanyiwa, S. Leuthardt, P.C. Hauser, "Conductimetric and potentiometric detection in conventional and microchip capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3659-3666.
- [20] F.M. Matysik, "Advances in amperometric and conductometric detection in capillary and chip-based electrophoresis", *Microchim. Acta*, 2008, 160, 1-14.
- [21] J. Wang, "Electrochemical Detection for Capillary Electrophoresis Microchips: A Review", *Electroanalysis*, 2005, 17, 1133-1140.
- [22] L. Nuholm, "Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications", *Analyst*, 2005, 130, 599-605.
- [23] M.J. Madou (Ed.), *Fundamentals of Microfabrication (The Science of Miniaturization)*, CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 2000.
- [24] S.A. Soper, S.M. Ford, S. Qi, R.L. McCarley, K. Kelly, M.C. Murphy, "Peer Reviewed: Polymeric Microelectromechanical Systems", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 642A-651A.
- [25] A. Muck Jr, J. Wang, M. Jacobs, G. Chen, M.P. Chatathi, V. Jurka, Z. Vborn, S.D. Spillman, G. Sridharan, M.J. Schöning, "Fabrication of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips by atmospheric molding", *Anal Chem*, 2004, 76, 2290-2297.
- [26] X. Bai, C. Roussel, H. Jensen, H.H. Girault, "Polyelectrolyte-modified short microchannel for cation separation", *Electrophoresis*, 2004, 25, 931-935.
- [27] Y. Liu, D. Ganser, A. Scheider, R. Liu, P. Gradzinski, N. Kroutchinina, "Microfabricated polycarbonate CE devices for DNA analysis", *Anal Chem*, 2001, 73, 4196-4201.
- [28] W.K. Tomazzelli, J.A. Fracassi da Silva, H.D. Torres da Silva, E.M. Richter, R. Burlan, L. Angnes, C.L. do Lago, L.H. Mazo, E. Carrillo, "Electrophoresis microchip fabricated by a direct-printing process with end-channel amperometric detection", *Electrophoresis*, 2004, 25, 3832-3839.
- [29] M. Castaño-Alvárez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, "Poly(methylmethacrylate) and Topas capillary electrophoresis microchip performance with electrochemical detection", *Electrophoresis*, 2005, 26, 3160-3168.
- [30] Duffy, McDonald, Schueller, Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984.

- [31] T.J. Johnson, D. Ross, M. Gaitan, L.E. Locascio, "Laser modification of preformed polymer microchannels: Application to reduce band broadening around turns subject to electrokinetic flow", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 3656-3661.
- [32] A.C. Henry, T.J. Tutt, M. Galloway, Y.Y. Davidson, C.S. McWhorter, S.A. Soper, R.L. McCarley, "Surface modification of poly(methyl methacrylate) used in the fabrication of microanalytical devices", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5331-5337.
- [33] S.A. Soper, A.C. Henry, B. Vaidya, M. Galloway, M. Wabuye, R.L. McCarley, "Surface modification of polymer-based microfluidic devices", *Anal. Chim. Acta*, 2002, 470, 87-99.
- [34] B. Vaidya, S.A. Soper, R.L. McCarley, "Surface modification and characterization of microfabricated poly(carbonate) devices: manipulation of electroosmotic flow", *Analyst*, 2002, 127, 1289-1292.
- [35] J. Wang, A. Muck Jr, M.P. Chatathi, G. Chen, N. Mittal, S.D. Spillman, S. Obeidat, "Bulk modification of polymeric microfluidic devices", *Lab Chip*, 2005, 5, 226-230.
- [36] Z.H. Fan, D.J. Harrison, "Micromachining of capillary electrophoresis injectors and separators on glass chips and evaluation of flow at capillary intersections", *Anal. Chem.*, 1994, 66, 177-184.
- [37] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, A.W. Moore, J.M. Ramsey, "Precolumn reactions with electrophoretic analysis integrated on a microchip", *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4127-4132.
- [38] L.B. Koutny, D. Schmalzing, T.A. Taylor, M. Fuchs, "Microchip electrophoretic immunoassay for serum cortisol", *Anal. Chem.*, 1996, 68, 18-22.
- [39] S.C. Jacobson, A.W. Moore, J.M. Ramsey, "Fused Quartz Substrates for Microchip Electrophoresis", *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2059-2063.
- [40] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, "Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Anal. Chem.*, 1998, 70, 4974-4984.
- [41] M.A. Roberts, J.S. Rossier, P. Bercier, H. Girault, "UV Laser machined polymer substrates for the development of microdiagnostic systems", *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2035-2042.
- [42] O. Rötting, W. Röpke, H. Becker, C. Gärtner, "Polymer microfabrication technologies", *Microsystem Technologies*, 2002, 8, 32-36.
- [43] L. Martynova, L.E. Locascio, M. Gaitan, G.W. Kramer, R.G. Christensen, W.A. MacCrehan, "Fabrication of plastic microfluid channels by imprinting methods", *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4783-4789.
- [44] R.M. McCormick, R.J. Nelson, M.G. Alonso-Amigo, J. Benvegna, H.H. Hoopwer, "Microchannel electrophoretic separations of DNA in injection-molded plastic substrates", *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2626-2630.

- [45] L.G. Reyna, J.R. Sobehart, "Laser ablation of multilayer polymer films", *J. Appl. Phys.*, 1994, **76**, 4367-4371.
- [46] J. Wang, B. Tian, E. Sahlin, "Integrated electrophoresis chips/amperometric detection with sputtered gold working electrodes", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 3901-3904.
- [47] J. Wang, B. Tian, E. Sahlin, "Micromachined electrophoresis chips with thick-film electrochemical detectors", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5436-5440.
- [48] R.S. Martin, A.J. Gawron, S. M. Lunte, C.S. Henry, "Dual-electrode electrochemical detection for poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips", *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 3196-3202.
- [49] A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, "Capillary electrophoresis chips with integrated electrochemical detection", *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 684-688.
- [50] Y. Liu, J.C. Fanguy, J.M. Bedsoe, C.S. Henry, "Dynamic coating using polyelectrolyte multilayers for chemical control of electroosmotic flow in capillary electrophoresis microchips", *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5939-5944.
- [51] S.R. Wallenborg, L. Nyholm, C.E. Lunte, "End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: Influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol", *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 544-549.
- [52] R.S. Martin, K.L. Ratzlaff, B.H. Huynh, S.M. Lunte, "In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat", *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1136-1143.
- [53] M. Castaño-Álvarez, M.T. Fernández-Abedul, A. Costa-García, "Amperometric detector designs for capillary electrophoresis microchips", *J. Chromatogr. A*, 2006, **1109**, 291-299.
- [54] C.C. Wu, R.G. Wu, J.G. Huang, Y.C. Lin, H.C. Chang, "Three-electrode electrochemical detector and platinum film decoupler integrated with a capillary electrophoresis microchip for amperometric detection", *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 947-952.
- [55] R.S. Keynion, T.J. Roussel, Jr., M.M. Crain, D.J. Jackson, D.B. Franco, J.F. Naber, K.M. Walsh, R.P. Baldwin, "Design and development of microfabricated capillary electrophoresis devices with electrochemical detection", *Anal. Chim. Acta*, 2004, **507**, 95-105.
- [56] A.J. Gawron, R.S. Martin, S.M. Lunte, "Fabrication and evaluation of a carbon-based dual-electrode detector for poly(dimethylsiloxane) electrophoresis chips", *Electrophoresis*, 2001, **22**, 242-248.
- [57] R.S. Martin, A.J. Gawron, B.A. Fogarty, F.B. Regan, E. Dempsey, S.M. Lunte, "Carbon paste-based electrochemical detectors for microchip capillary electrophoresis / electrochemistry", *Analyst*, 2001, **126**, 277-280.

- [58] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, "Capillary electrophoresis microchips with thick-film amperometric detectors: separation and detection of phenolic compounds", *Anal. Chim. Acta*, 2000, 416, 9-14.
- [59] J. Wang, M.P. Chatrathi, A. Mulchandani, W. Chen, "Capillary electrophoresis microchips for separation and detection of organophosphate nerve agents", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1804-1808.
- [60] J. Wang, A. Ibáñez, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, "Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5323-5327.
- [61] J. Wang, M. Pumera, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, M. Musameh, "Single-channel microchip for fast screening and detailed identification of nitroaromatic explosives or organophosphate nerve agents", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1187-1191.
- [62] M.L. Kovarik, N.J. Torrence, D.M. Spence, R.S. Martin, "Fabrication of carbon microelectrodes with a micromolding technique and their use in microchip-based flow analyses", *Analyst*, 2004, 129, 400-405.
- [63] P. Gavin, A.G. Ewing, "Continuous separations with microfabricated electrophoresis-electrochemical array detection", *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 8932-8936.
- [64] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, "Micromachined separation chips with a precolumn reactor and end-column electrochemical detector", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5774-5778.
- [65] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, "Microseparation chips for performing multienzymatic dehydrogenase/oxidase assays: simultaneous electrochemical measurement of ethanol and glucose", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1296-1300.
- [66] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, R. Polsky, "Microfabricated electrophoresis chips for simultaneous bioassays of glucose, uric acid, ascorbic acid and acetaminophen", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 2514-2518.
- [67] J. Wang, M.P. Chatrathi, A. Ibáñez, A. Escarpa, "Micromachined separation chips with post-column enzymatic reactions of "class" enzymes and end-column electrochemical detection: assays of amino acids", *Electroanalysis*, 2002, 14, 400-404.
- [68] J. Wang, A. Ibáñez, M.P. Chatrathi, "Microchip-based amperometric immunoassays using redox tracers", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3744-3749.
- [69] M. Pumera, J. Wang, E. Grushka, R. Polsky, "Gold nanoparticle-enhanced microchip capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5625-5628.
- [70] J. Wang, M.P. Chatrathi, "Microfabricated electrophoresis chip for bioassay of renal markers", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 525-529.

- [71] J. Wang, A. Escarpa, M. Pumera, J. Feldman, "Capillary electrophoresis–electrochemistry microfluidic system for the determination of organic peroxides", *J. Chromatogr. A*, 2002, 952, 249-254.
- [72] A. Hilmi, J.H.T. Luong, "Electrochemical detectors prepared by electroless deposition for microfabricated electrophoresis chips", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 4677-4682.
- [73] Y. Kong, H. Chen, Y. Wang, S.A. Soper, "Fabrication of a gold microelectrode for amperometric detection on a polycarbonate electrophoresis chip by photodirected electroless plating", *Electrophoresis*, 2006, 27, 2940-2950.
- [74] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, R. Polsky, "Capillary electrophoresis chips with thick-film amperometric detectors: Separation and detection of hydrazine compounds", *Electroanalysis*, 2000, 12, 691-694.
- [75] C.D. Kuhnline, M.G. Gangel, M.K. Hulvey, R.S. Martin, "Detecting thiols in a microchip device using micromolded carbon ink electrodes modified with cobalt phthalocyanine", *Analyst*, 2006, 131, 202-207.
- [76] W. Siangproh, O. Chailapakul, R. Laocharoensuk, J. Wang, "Microchip capillary electrophoresis/electrochemical detection of hydrazine compounds at a cobalt phthalocyanine modified electrochemical detector", *Talanta*, 2005, 67, 903-907.
- [77] M. Johirul, A. Shiddiky, R. Kim, Y. Shim, "Microchip capillary electrophoresis with a cellulose-DNA-modified screen-printed electrode for the analysis of neurotransmitters", *Electrophoresis*, 2005, 26, 3043-3052.
- [78] M. Pumera, A. Merkoçi, S. Alegret, "Microchip capillary electrophoresis-electrochemistry with rigid graphite-epoxy composite detector", *Electroanalysis*, 2006, 18, 207-210.
- [79] M.J.A. Shiddiky, M-S. Won, Y-B. Shim, "Simultaneous analysis of nitrate and nitrite in a microfluidic device with a Cu-complex-modified electrode", *Electrophoresis*, 2006, 27, 4545-4554.
- [80] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, "Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector", *Anal. Chem.*, 2004, 76, 298-302.
- [81] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, A. Fujishima, D.A. Tryk, D. Shin, "Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 935-939.
- [82] N.E. Hebert, B. Snyder, R.L. McCreery, W.G. Kuhr, S.A. Brazill, "Performance of pyrolyzed photoresist carbon films in a microchip capillary electrophoresis device with sinusoidal voltammetric detection", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4265-4271.

- [83] D.J. Fischer, W.R. Vandaveer, R.J. Grigsby, S.M. Lunte, "Pyrolyzed photoresist carbon electrodes for microchip electrophoresis with dual-electrode amperometric detection", *Electroanalysis*, 2005, 17, 1153-1159.
- [84] J.J. Xu, N. Bao, X.H. Xia, Y. Peng, H.Y. Chen, "Electrochemical detection method for nonelectroactive and electroactive analytes in microchip electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2004, 76, 6902-6907.
- [85] J.J. Xu, Y. Peng, N. Bao, X.H. Xia, H.Y. Chen, "In-channel indirect amperometric detection of nonelectroactive anions for electrophoresis on a poly(dimethylsiloxane) microchip", *Electrophoresis*, 2005, 26, 3615-3621.
- [86] J.J. Xu, Y. Peng, N. Bao, X.H. Xia, H.Y. Chen, "Simple method for the separation and detection of native amino acids and the identification of electroactive and non-electroactive analytes", *J. Chromatogr. A*, 2005, 1095, 193-196.
- [87] J.C. Fanguy, C.S. Henry, "Pulsed amperometric detection of carbohydrates on an electrophoretic microchip", *Analyst*, 2002, 127, 1021-1023.
- [88] C.D. García, C.S. Henry, "Direct determination of carbohydrates, amino acids and antibiotics by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4778-4783.
- [89] C.D. García, C.S. Henry, "Enhanced determination of glucose by microchip electrophoresis with pulsed amperometric detection", *Anal. Chim. Acta*, 2004, 508, 1-9.
- [90] Y. Ding, C.D. Garcia, "Application of microchip-CE electrophoresis to follow the degradation of phenolic acids by aquatic plants", *Electrophoresis*, 2006, 27, 5119-5127.
- [91] Y. Ding, C.D. Garcia, "Pulsed amperometric detection with poly(dimethylsiloxane)-fabricated capillary electrophoresis microchips for the determination of EPA priority pollutants", *Analyst*, 2006, 131, 208-214.
- [92] N.E. Hebert, W.G. Kuhr, S.A. Brazill, "Microchip capillary electrophoresis coupled to sinusoidal voltammetry for the detection of native carbohydrates", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3750-3759.
- [93] N.E. Hebert, W.G. Kuhr, S.A. Brazill, "A microchip electrophoresis device with integrated electrochemical detection: A direct comparison of constant potential amperometry and sinusoidal voltammetry", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3301-3307.
- [94] J. Wang, R. Polsky, B. Tian, M.P. Chatrathi, "Voltammetry on microfluidic chip platforms", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5285-5289.
- [95] R.M. Guijt, E. Baltussen, G. van der Steen, R. B.M. Schasfoort, S. Schlautmann, H.A.H. Billiet, J. Frank, G.W.K. van Dedem, A. van den Berg, *Electrophoresis*, 2001, 22, 235.

- [96] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S.M. Ford, S. Llopis, R.L. McCarley, S.A. Soper, "Contact conductivity detection in poly(methyl methacrylate)-based microfluidic devices for analysis of mono- and polyanionic molecules", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2407-2415.
- [97] R.M. Guijt, E. Baltussen, G. van der Steen, H. Frank, H. Billiet, T. Schalkhammer, F. Laugere, M. Vellekoop, A. Berthold, L. Sarro, G.W.K. van Demen, *Electrophoresis*, 2001, 22, 2537.
- [98] A. Berthold, F. Laugere, H. Schellevis, C.R. de Boer, M. Laros, R.M. Guijt, P.M. Sarro, M.J. Vellekoop, "Fabrication of a glass-implemented microcapillary electrophoresis device with integrated contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3511-3519.
- [99] J. Lichtenberg, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, "A microchip electrophoresis system with integrated in-plane electrodes for contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, 2002, 23, 3769-3780.
- [100] M. Pumera, J. Wang, F. Opekar, I. Jelínek, J. Feldman, H. Löwe, S. Hardt, "Contactless conductivity detector for microchip capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1968-1971.
- [101] J. Wang, M. Pumera, "Dual conductivity/amperometric detection system for microchip capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5919-5923.
- [102] J. Wang, M. Pumera, "Nonaqueous electrophoresis microchip separations: Conductivity detection in UV-absorbing solvents", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 341-345.
- [103] J. Wang, G. Chen, A. Muck, Jr., "Movable contactless-conductivity detector for microchip capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 4475-4479.
- [104] J. Tanyanyiwa, P.C. Hauser, "High-voltage capacitively coupled contactless conductivity detection for microchip capillary electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 6378-6382.
- [105] F. Laugere, R.M. Guijt, J. Bastemeijer, G. van der Steen, A. Berthold, E. Baltussen, P. Sarro, G.W.K. van Dedem, M. Vellekoop, A. Bossche, "On-Chip contactless four-electrode conductivity detection for capillary electrophoresis devices", *Anal. Chem.*, 2003, 75, 306-312.
- [106] Y. Chen, P.Y. Yang, J.H. Li, D. Chen, G. Chen, "Electrophoresis microchips with sharp inlet tips, for contactless conductivity detection, fabricated by in-situ surface polymerization", *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384, 683-691.
- [107] E.M. Abad-Villar, P. Kubáň, P.C. Hauser, "Determination of biochemical species on electrophoresis chips with an external contactless conductivity detector", *Electrophoresis*, 2005, 26, 3609-3614.

- [108] X. Bai, Z. Wu, J. Josserand, H. Jensen, H. Schafer, H.H. Girault, "Passive conductivity detection for capillary electrophoresis", *Anal. Chem*, 2004, 76, 3126-3131.
- [109] C.Y Lee, C.M. Chen, G.L Chang, C.H Lin, L.M Fu, "Fabrication and characterization of semicircular detection electrodes for contactless conductivity detector - CE microchips", *Electrophoresis*, 2006, 27, 5043-5050.
- [110] J. Rossier, F. Reymond, P.E. Michel, "Polymer microfluidic chips for electrochemical and biochemical analyses", *Electrophoresis*, 2002, 23, 858-867.
- [111] Y.Y Peng, A. Pallandre, N.T. Tran, M. Taverna, "Recent innovations in protein separation on microchips by electrophoretic methods", *Electrophoresis*, 2008, 29, 157-178.
- [112] A.G. Crevillén, M. Hervás, M.A. López, M.C. González, A. Escarpa, "Real sample analysis on microfluidic devices", *Talanta*, 2007, 74, 342-357.
- [113] T. Reverman, S. Götz, J. Künneneyer, U. Karst, "Quantitative analysis by microchip capillary electrophoresis – current limitations and problem-solving strategies", *Analyst*, 2008, 133, 167-174.
- [114] A. Escarpa, M.C. González, A.G Crevillén, A.J. Blasco, "CE microchips: An opened gate to food analysis", *Electrophoresis*, 2007, 28, 1002-1011.
- [115] A. Escarpa, M.C. González, M.A. López, A.G Crevillén, M. Hervás, M. García, "Microchips for CE: Breakthroughs in real-world food analysis", *Electrophoresis*, 2008, 29, 4852-4861.
- [116] A. Ríos, A. Escarpa, M.C. González, A.G. Crevillén, "Challenges of analytical microsystems", *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, 467-479.
- [117] A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, "Fast and simultaneous detection of prominent natural antioxidants using analytical microsystems for capillary electrophoresis with a glassy carbon electrode: A new gateway to food environments", *Electrophoresis*, 2005, 26, 4664-4673.
- [118] R.W. Hompesch, C.D. García, D.J. Weiss, J.M. Vivanco, C.S. Henry, "Analysis of natural flavonoids by microchip-micellar electrokinetic chromatography with pulsed amperometric detection", *Analyst*, 2005, 130, 694-700.
- [119] P. Kuban, P.C. Hauser, "Application of an external contactless conductivity detector for the analysis of beverages by microchip capillary electrophoresis", *Electrophoresis*, 2005, 26, 3169-3178.
- [120] M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, "Rapid analysis of amino acids in Japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection", *J. Chromatogr. A*, 2003, 1013, 183-189.

- [121] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, "Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of phenolic acids", *J. Chromatogr. A*, 2004, *1049*, 189-194.
- [122] J. Wang, S. Manino, C. Cámara, M.P. Chatrathi, M. Scampicchio, J. Zima, "Microchip capillary electrophoresis with amperometric detection for rapid separation and detection of seleno amino acids", *J. Chromatogr. A*, 2005, *1091*, 177-182.
- [123] M. Ávila, M.C. González, M. Zougagh, A. Escarpa, A. Ríos, "Rapid sample screening method for authenticity controlling vanilla flavors using a CE microchip approach with electrochemical detection", *Electrophoresis*, 2007, *28*, 4233-4239.
- [124] N. Dossi, E. Piccin, G. Bontempelli, E. Carrilho, J. Wang, "Rapid analysis of azo-dyes in food by microchip electrophoresis with electrochemical detection", *Electrophoresis*, 2007, *28*, 4240-4246.
- [125] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, S. Susmel, F. Perennes, G. Bontempelli, "A capillary electrophoresis microsystem for the rapid in-channel amperometric detection of synthetic dyes in food", *J. Electroanal. Chem.*, 2007, *601*, 1-7.
- [126] A.J. Blasco, A.G. Crevillén, P. de la Fuente, M.C. González, A. Escarpa, "Electrochemical valveless flow microsystems for ultra fast and accurate analysis of total isoflavones with integrated calibration", *Analyst*, 2007, *132*, 323-329.
- [127] W.S. Law, P. Kubán, J.H. Zhao, F.Y. Li, P.C. Hauser, "Determination of vitamin C and preservatives in beverages by conventional capillary electrophoresis and microchip electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection", *Electrophoresis*, 2005, *26*, 4648-4655.
- [128] Q. Lu, P. Wu, G.E. Collins, "Contactless conductivity detection of sodium monofluoroacetate in fruit juices on a CE microchip", *Electrophoresis*, 2007, *28*, 3485-3491.
- [129] K.S. Kumar, S.H. Kang, "Ultra-fast simultaneous analysis of genetically modified organisms in maize by microchip electrophoresis with LIF detector", *Electrophoresis*, 2007, *28*, 4247-4254.
- [130] G. Monti, L. de Napoli, P. Mainolfi, R. Barone, M. Guida, G. Marino, A. Amoresano, "Monitoring Food Quality by Microfluidic Electrophoresis, Gas Chromatography, and Mass Spectrometry Techniques: Effects of Aquaculture on the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*)", *Anal. Chem.*, 2005, *77*, 2587-2594.
- [131] S. Uthayakumaran, I.L. Batey, C.W. Wrigley, "On-the-spot identification of grain variety and wheat-quality type by Lab-on-a-chip capillary electrophoresis", *J. Cereal Sci.*, 2005, *41*, 371-374.

- [132] P. Schulze, M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder, "Deep UV Laser-Induced Fluorescence Detection of Unlabeled Drugs and Proteins in Microchip Electrophoresis", *Anal. Chem.*, 2005, 77, 1325-1329.
- [133] C.N. Jayarajah, A.M. Skelley, A.D. Fortner, R.A. Mathies, "Analysis of neuroactive amines in fermented beverages using a portable microchip capillary electrophoresis system", *Anal. Chem.*, 2007, 79, 8162-8169.
- [134] Q. Chu, Y. Guan, C. Geng, J. Ye, "Miniaturized Capillary Electrophoresis with Amperometric Detection: Fast Separation and Detection of Bioactive Amines", *Anal. Lett.*, 2006, 39, 729-740.
- [135] C.I.D. Newman, B.C. Giordano, C.L. Copper, G.E. Collins, "Microchip micellar electrokinetic chromatography separation of alkaloids with UV-absorbance spectral detection", *Electrophoresis*, 2008, 29, 803-810.
- [136] K.S. Lee, M.J.A. Shiddiky, S.H. Park, D.S. Park, Y.B. Shim, "Electrophoretic analysis of food dyes using a miniaturized microfluidic system", *Electrophoresis*, 2008, 29, 1910-1917.
- [137] E. Herrera, "Bioquímica, aspectos estructurales y vías metabólicas", 2ª edición, ed. McGraw-Hill Interamericana, 1996.
- [138] C.K. Mathews, K.E. Van Holde, "Bioquímica", 3ª edición, ed. McGraw-Hill Interamericana, 2002.
- [139] E. Primo Yúfera, "Química de los alimentos", ed. Síntesis, 1997.
- [140] M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, "Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods", *J.Sep.Sci.*, 2005, 28, 883-897.
- [141] J.J. Macheix, A. Fleuriet, Billot, "J. Fruit Phenolics.", CRC Press, boca Ratón, USA, 1990.
- [142] "The Flavonoids: Advances in Research", ed. J.B. Harborne y T.J. Mabry, Chapman & Hall, Londres, 1982.
- [143] J.B. Harborne, C.A. Williams, "Anthocyanins and other flavonoids", *Nat. Prod. Rep.*, 1995, 12, 639-658.
- [144] "Flavonoids: Advances in Research since 1986", ed. J.B. Harborne, Chapman & Hall, Londres, 1994.
- [145] "Methods in Plant Biochemistry, Vol 1. Plant Phenolics", ed. J.B. Harborne, Academic Press, Londres, 1989.
- [146] J.B. Harborne, "Do natural plant phenols play a role in ecology?", *Acta Hort.*, 1994, 381, 36.
- [147] U. Matern, B. Grimming, "Natural phenols as stress metabolites", *Acta Hort.*, 1994, 381, 448.

- [148] B.H. Havsteen, "The biochemistry and medical significance of the flavonoids", *Pharmacology & Therapeutics*, 2002, 96, 67-202.
- [149] J. Kuc, "Relevance of phytoalexins - a critical review", *Acta Hort.*, 1994, 381, 526.
- [150] K. Takeda, Y. Tochica, R. Fukazawa, T. Mori, "Flavonoids as UV-protectant", *Acta Hort.*, 1994, 381, 348.
- [151] M. Monici, P. Baglioni, N. Mulinacci, A. Baldi, F.F. Vincieri, "A research model on flavonoids as photoprotectors: studies on the photochemistry of kaempferol and pelargonidin", *Acta Hort.*, 1994, 381, 340.
- [152] J. Chappell, K. Hahlbrock, "Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor", *Nature*, 1984, 311, 76-78.
- [153] K. Hahlbrock, J. Ebel, R. Ortman, A. Sutter, E. Wellmann, H.J. Griseback, "Regulation of enzyme activities related to the biosynthesis of flavone glycosides in cell suspension culture of parsley (*Petroselinum hortense*)", *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 244, 7-15.
- [154] L. Bravo, R. Abia, F. Saura-Calixto, "Polyphenols as dietary fiber associated compounds. Comparative study on in vivo and in vitro properties", *J. Agric. Food. Chem.*, 1994, 42, 1481-1487.
- [155] T. Walle, "Absorption and metabolism of flavonoids", *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, 36, 829-837.
- [156] M. Krauze-Buranowska, W. Cisowski, "High-performance liquid chromatographic determination of flavone C-glycosides in some species of the Cucurbitaceae family", *J. Chromatogr. A*, 1994, 675, 240-243.
- [157] O. Tzakou, E. Verykokidou, C. Harval, "Comparative HPLC analysis of polyphenolic compounds in 4 species of galium L" *J. Liq. Chromatogr.*, 1994, 17, 4463-4467.
- [158] R.J. Mailer, J. Daun, R. Scarth, "Cultivar identification in *Brassica napus* L. by reversed-phase high-performance liquid chromatography of ethanol extracts", *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1993, 70, 863-866.
- [159] D.L. Jennings, E. Carmichael, "Anthocyanin variation in the genus rubus", *New Phytol.*, 1980, 84, 505-513.
- [160] O.M. Andersen, "Anthocyanins in fruits of *Vaccinium Japonicum*", *Phytochemistry*, 1987, 26, 1220-1221.
- [161] P. Ribereau- Gayon, "In Anthocyanins as Food Colours", Ed. P. Markakis, Academic Press., New York, 1982, 209.

- [162] E.M. Gaydou, J.P. Biachini, R.P. Randriamiharisoa, "Orange and mandarin peel oils differentiation using polymethoxylated flavone composition", *J. Agric. Food. Chem.*, 1987, 35, 525-529.
- [163] F. Konishi, S. Kamiya, S. Esaki, "Synthesis and taste of naringenin 7-O-(2-O- α -L-lyxopyranosyl- β -D-galactopyranoside) and its dihydrochalcone derivative", *Agric. Biol. Chem.*, 1983, 47, 1633-1635.
- [164] H.D. Belitz, H. Wieser, *Food Rev. Int.*, 1985, 1, 271.
- [165] S. Hasegawa, M.A. Berhow, C.H. Fong, *Mod. Methods Plant Anal.*, 1995, 18, 55.
- [166] I.J. Colquhoun, B.J. Goodfellow, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1994, 2, 1803.
- [167] W.C. Willet, "Eat, Drink, and be Healthys - The Harvard Medical School Guide to Healthy Eating", ed. Simon and Schuster, New York, 2001.
- [168] C. Kaur, H.C. Kapoor, "Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health", *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2001, 36, 703-725.
- [169] M.A. Read, "Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents", *Am. J. Pathol.*, 1995, 147, 235-237.
- [170] R. Ficarra, P. Ficarra, S. Tommasini, M.L. Calabro, S. Ragusa, R. Barbera, A. Rapisarda, "Leaf extracts of some cordia species - analgesic and antiinflammatory activities as well as their chromatographic analysis", *Farmaco*, 1995, 50, 245-256.
- [171] H. Tapiero, K.D. Tew, G. Nguyen Ba, G. Mathé, "Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies?", *Biomed. Farmacother.*, 2002, 56, 200-207.
- [172] J.A. Ross, C.M. Kasum, "Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety", *Annu. Rev. Nutr.*, 2002, 22, 19-34.
- [173] J. Wittig, S. Wittemer, M. Veit, "Validated method for the determination of hydroquinone in human urine by high-performance liquid chromatography–coulometric-array detection", *J. Chromatogr. B*, 2001, 761, 125–132.
- [174] I. Glöckl, G. Blaschke, M. Veit, "Validated methods for direct determination of hydroquinone glucuronide and sulfate in human urine after oral intake of bearberry leaf extract by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. B*, 2001, 761, 261–266.
- [175] M. S. Kurzer, "Hormonal effects of soy isoflavones: Studies in premenopausal and postmenopausal women", *J. Nutr.*, 2000, 130, 660S-661S.
- [176] T. Valachovicova, V. Slivova, D. Sliva, "Cellular and physiological effects of soy flavonoids", *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2004, 4, 881-887.
- [177] S. Kapiotis, M. Hermann, I. Held, C. Seelos, H. Ehringer, B.M.K Gmeiner, "Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial

- cells from damage by atherogenic LDL”, *Arterioscler. Thromb. Vascular Biol.*, 1997, 17, 2868-2884.
- [178] C. Herman, H. Adlercreutz, B.R. Goldin, S.L. Gorbach, K.A.V. Hockerstedt, S. Watanabe, E.K. Hamalainen, M.H. Markkanen, T.H. Makela, K.T. Wahala, T.A. Hase, T. Fotsis, “Soybean phytoestrogen intake and cancer risk”, *J. Nutr.*, 1995, 125, 757S-770S.
- [179] E. Bowey, H. Adlercreutz, I. Rowland, “Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats”, *Food Chem. Tox.*, 2003, 41, 631-636.
- [180] T. Izumi, M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, M. Kikuchi, “Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans”, *J. Nutr.*, 2000, 130, 1695–1699.
- [181] D.R.K. Setchell, N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirschner, J.E. Heubi, “Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability”, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2002, 76, 447–453.
- [182] J.L. Peñalvo, T. Nurmi, H. Adlercreutz, “A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products”, *Food Chem.*, 2004, 87, 297-305.
- [183] S.F. Wang, J.Y. Zhang, X.G. Chen, Z.D. Hu, “Study of the electrophoretic behaviour of flavonoides”, *Chromatographia*, 2004, 59, 507-511.
- [184] S. Moane, S. Park, C. E. Lunte, M. R. Smyth, “Detection of phenolic acids in beverages by capillary electrophoresis with electrochemical detection”, *Analyst*, 1998, 123, 1931-1936.
- [185] T.J. O’Shea, A. Costa-Garcia, P. Tuñon-Blanco, M. R. Smyth, “Electrochemical pretreatment of carbon fibre microelectrodes for the determination of folic acid”, *J. Electroanal. Chem*, 1991, 307, 63-71.
- [186] H.Y. Gu, A.M. Yu, H.Y. Chen, “Electrochemical behavior and simultaneous determination of vitamin B₂, B₆ and C at electrochemically pretreated glassy carbon electrode”, *Anal. Lett*, 2001, 34, 2361-2374.
- [187] S.R. Hernández, G.G. Ribero, H.C. Goicoechea, “Enhanced application of square wave voltammetry with glassy carbon electrode coupled to multivariate calibration tools for the determination of B₆ and B₁₂ vitamins in pharmaceutical preparations”, *Talanta*, 2003, 61, 743-753.
- [188] R. Joshi, S. Adhikari, S. Patro, S. Chattopadhyay, T. Mukherjee, “Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity”, *Free Rad. Biology Med.*, 2001, 30, 1390–1399.

III. Nuevas aportaciones a la detección electroquímica en microchips de electroforesis capilar basados en el empleo de nanotubos de carbono y otros nanoestructuras

III.1.Introducción

III.1.1. Nanomateriales.

La palabra nanotecnología significa literalmente cualquier tecnología hecha o basada en la nanoescala que tiene aplicaciones en el mundo real. Por tanto, abarca la fabricación y aplicación de sistemas físicos, químicos y biológicos que estén comprendidos en una escala que va desde átomos individuales o moléculas hasta dimensiones por debajo de la micra, incluyéndose aquellos sistemas más grandes que resulten de la integración de dichas nanoestructuras [1]. La nanotecnología es un campo multidisciplinar en el cual la Química Analítica está fuertemente implicada y que se ha convertido en una de las áreas de investigación más importantes e innovadoras para el desarrollo de nuevos sistemas analíticos [2]. Estas estructuras de tamaños inferiores a la micra son denominadas habitualmente como nanomateriales y pueden ser de tipo metálico, polimérico o cristalino. Actualmente, son objeto de un exhaustivo estudio en múltiples áreas del conocimiento debido a sus únicas propiedades y a su potencial aplicación para la fabricación de nuevos materiales compósitos, células de conversión y almacenamiento de energía, catalizadores y nano- y micro- dispositivos como, por ejemplo, sensores y componentes electrónicos y fotoelectrónicos [3-9].

Un ejemplo ilustrativo de estas novedosas propiedades lo podemos observar en el oro. Como es bien sabido, el oro es un metal noble, brillante, de color dorado, conductor, no magnético, con una estructura cúbica centrada en las caras y que funde a 1336 °K. Sin embargo, cuando nos encontramos con partículas de oro del tamaño de 10 nm, éstas absorben en el verde tomando una tonalidad rojiza en suspensión acuosa, además, si son de un tamaño comprendido entre 2-3 nm muestran propiedades magnéticas y, si continuamos reduciendo el tamaño, el oro se convierte en un aislante eléctrico. Todo ello acompañado de un cambio en la estructura espacial a una simetría icosaédrica y, también, con un descenso del punto de fusión. El origen de dichos cambios se debe a dos fenómenos; uno, a la enorme fracción de átomos superficiales respecto a los interiores que hay en los nanomateriales y, otro, debido a un efecto cuántico, agudizándose ambos efectos a medida que se reduce el tamaño del material [10].

Como es sabido, los átomos de la superficie tienen menor número de coordinación o de átomos que les rodean y, por tanto, son más inestables. Este aspecto junto con el hecho del aumento de la relación superficie/volumen al disminuir el tamaño del material genera que el punto de fusión disminuya y, también, que se manifiestan unas notables propiedades catalíticas.

Respecto al efecto cuántico y aunque se escape fuera del alcance de esta memoria, es preciso indicar que a medida que se reduce el tamaño de un material (hasta el tamaño de clusters) su distribución de orbitales moleculares se parece más a la de un átomo o molécula que a la del material en su conjunto, de ahí que las nanopartículas sean denominadas frecuentemente como *quantum dots* o *pseudo-átomos*, es decir, en lugar de ser una distribución continua de orbitales moleculares deslocalizados o banda (como en un metal) estos se desdoblan en dos niveles energéticos a medida que se reduce el tamaño (como en un semiconductor) apareciendo un salto energético entre ambos niveles denominado “*gap*”. Esto explica que materiales que eran conductores se hagan aislantes al llegar a la escala del nanómetro, aparezcan propiedades magnéticas y cambie la energía de ionización, la afinidad electrónica y la longitud de onda de absorción para estos materiales.

Todo ello desemboca en nuevas propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas, mecánicas y catalíticas pero la característica más importante de estos materiales es la capacidad de poder controlar y moldear su tamaño y estructura y, por tanto, las propiedades de dichos materiales abriendo grandes posibilidades a la hora de diseñar nuevos sensores y ensayos bioanalíticos [11].

Los nanomateriales se pueden clasificar en base a su forma geométrica en:

- Nanopartículas; esferas de un tamaño comprendido entre 1-50 nm.
- Nanohilos; cilindros de diámetros en la escala del nanómetro y longitudes de hasta varias micras.
- Nanotubos; cilindros huecos con tamaños similares a los nanohilos, siendo los nanotubos de carbonos las estructuras más representativas.
- Nanobelts o nanorods; troncos de cono con formas similares a un bastón o una campana.

Una de las dificultades del uso de los nanomateriales es su manipulación debido a su pequeño tamaño. La integración de nanomateriales dentro de microdispositivos, el recubrimiento homogéneo de superficies electrónicas y la orientación y alineamiento de estos nanomateriales (para el caso de las estructuras unidimensionales) es objeto de un exhaustivo estudio debido a su enorme importancia. Hasta la fecha, se han desarrollado distintas estrategias para la manipulación de dichas nanoestructuras con resultados prometedores [6] que serán comentados en los siguientes apartados de esta memoria.

Por otra parte, la aplicación de todos estos nanomateriales y, en general, de la nanotecnología, en el campo de la microfluídica va a revolucionar los microsistemas analíticos. Tanto la mejora de la eficacia en la separación como de la detección ya han sido demostradas mediante el uso de nanomateriales [12-15]. Nuevos diseños de equipos de análisis con microcanales modificados con nanoestructuras y con sistemas de detección, tanto electroquímicos como ópticos, integrando dichos nanomateriales serán cada vez más habituales en la bibliografía elevándose como una de las grandes tendencias para el futuro de los microsistemas analíticos.

A continuación, se hablará de las propiedades, métodos de fabricación y aplicaciones analíticas más destacadas de los nanomateriales unidimensionales (nanotubos de carbono y nanohilos), que han sido los utilizados y estudiados durante el desarrollo de esta Tesis, y, de manera más exhaustiva, sobre las aplicaciones de estos nanomateriales como detectores electroquímicos para sistemas miniaturizados de separación. Se tratarán de manera individual los aspectos más reveladores de los nanotubos de carbono y de los nanohilos debido a las características y propiedades singulares de los mismos, especialmente, de los nanotubos de carbono.

III.1.2. Nanotubos de carbono

III.1.2.1. Propiedades generales, métodos de fabricación y manipulación.

Los nanotubos de carbono (CNT) fueron redescubiertos por Iijima [16] en el año 1991. Estos se pueden clasificar en dos grandes grupos en base a su estructura: nanotubos de pared sencilla (SWCNTs) que consisten en una lámina simple de grafito enrollada sobre sí misma formando un cilindro hueco y nanotubos de pared múltiple

(MWCNTs) que consisten en una serie de nanotubos que están concéntricamente agrupados como si fuera el tronco de un árbol [17, 18]. Mientras los MWCNTs se comportan como conductores metálicos, el comportamiento electrónico de los SWCNT depende de su diámetro y quiralidad pudiéndose comportar como metálico o semiconductor. La quiralidad de los SWCNT está relacionada con el ángulo según el cual se enrollan las láminas de grafito y, por tanto, con el alineamiento de los orbitales π . El ángulo de enrollamiento de la lámina de grafito puede ser descrito como un vector de red con dos parámetros (n, m). Entonces, los nanotubos de carácter metálico son aquirales y poseen índices $n=m$ (configuración *armchair*) mientras los de carácter semiconductor tienen índices $n \neq m$ (configuración *quiral*) o $m=0$ (configuración *zig-zag*) siendo este último también aquiral (ver **figura 1**). En cualquier caso, cuando el diámetro de los nanotubos se incrementa el hueco entre la banda de conducción y la de valencia tiende a cero y estos semiconductores se vuelven conductores [8, 9, 19].

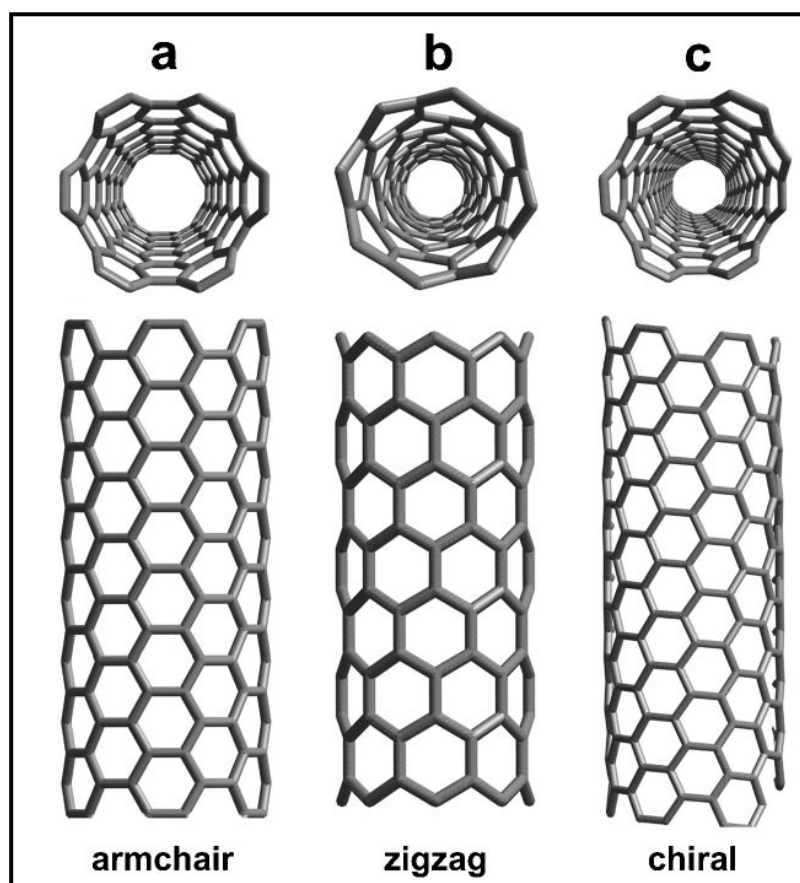


Figura 1. Modelos moleculares de SWCNT exhibiendo distinta quiralidad. (a) *Armchair*, (b) *zig-zag* y (c) *quiral* [19].

Debido a las únicas y extraordinarias propiedades catalíticas, geométricas, mecánicas, electrónicas y químicas de los nanotubos de carbono [8, 20], estas estructuras son objeto de un exhaustivo estudio en multitud de áreas científicas y, aprovechando dichas propiedades, se han desarrollado nuevos dispositivos fotoelectrónicos, materiales compuestos de alta resistencia, dispositivos de almacenamiento y conversión de energía, células de hidrógeno, biosensores y detectores electroquímicos. Los CNTs han sido exhaustivamente utilizados en electroanálisis debido a sus excelentes propiedades catalíticas siendo su aplicación más habitual en el desarrollo de biosensores a través de la modificación de la superficie de electrodos convencionales con dicho material, ya sea formando una película sobre la superficie o embebidos en algún tipo de matriz para formar un electrodo compuesto. Las propiedades que convierten a los CNTs en un material electrodo tan interesante son: su gran superficie activa (electrodos de pequeño tamaño), la mejora de la transferencia electrónica (propiedades electrocatalíticas) y su enorme capacidad de absorción. De hecho, se pueden encontrar un gran número de aplicaciones en la literatura sobre el uso de los CNTs en Química Analítica que han sido resumidos en numerosas revisiones [21-23].

Una de las propiedades más interesantes de los CNTs es su capacidad para reducir los sobrepotenciales de las reacciones redox, denominado “efecto electrocatalítico”, aspecto que ha generado una gran volumen de artículos de investigación.

Aunque todavía existen pequeñas controversias sobre el origen de este efecto electrocatalítico, las bases para entender este fenómeno han sido claramente descritas. El comportamiento electrocatalítico de los CNTs depende enormemente de la pureza y de los defectos del material, de la ruta de síntesis y del proceso de funcionalización para generar especies de oxígeno sobre la superficie de estos [24-26]. El papel crucial de las especies de oxígeno sobre el comportamiento electroquímico observado en los CNTs es bien conocido. Respecto a este aspecto, se ha demostrado que el comportamiento de los CNTs como material electrodo era igual al de otros electrodos de grafito [27]. Asimismo, existe una amplia aceptación de que los defectos y las especies de oxígeno que se encuentra en dichos defectos son similares a las que

se producen en el grafito pirolítico con los bordes perpendiculares a la superficie electródica (EPPG) y están implicados en la electrocatálisis de los CNTs [28]. Por otra parte, hay algunos artículos que han propuesto que las reacciones redox de algunos compuestos (hidracina, H_2O_2) tienen lugar sobre la superficie de nanopartículas catalíticas residuales (se utilizan durante el proceso de fabricación de los CNTs) que permanecen incluso después del proceso de purificación y no directamente sobre los CNTs [29-31].

Para entender mejor la trascendencia del efecto electrocatalítico en el campo del electroanálisis tan sólo decir que se han publicado descensos del sobrepotencial redox debido al uso de CNTs para compuestos fenólicos, tioles, NADH, neurotransmisores, ácido ascórbico, aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, pesticidas, insulina, paracetamol y diversos biomarcadores quedando recogidas en multitud de revisiones bibliográficas [21-23, 32, 33] y, de hecho, se espera que esta lista de compuestos continúe expandiéndose en los próximos años.

A continuación vamos a comentar brevemente los métodos de fabricación de nanotubos de carbono más habituales. Estos son el arco eléctrico de descarga, la ablación o vaporización por láser y la deposición de vapor de carbono (CVD) [8, 19].

El arco eléctrico es el método más fácil y más utilizado para la fabricación de nanotubos de carbono. Esta técnica se basa en la formación de un arco eléctrico (80-100 A) mediante corriente continua entre dos electrodos de grafito muy puros separados entre 1 y 2 mm bajo atmósfera inerte. Durante el proceso se produce la evaporación del carbono del ánodo, que se va consumiendo, y la deposición y crecimiento de CNTs sobre el cátodo. Es preciso tener en cuenta que en realidad sobre el cátodo se deposita una mezcla de estructuras de carbono (polvo de grafito, fullerenos y CNTs) de la cual hay que extraer los CNTs mediante técnicas de purificación. Mediante esta técnica se pueden producir MWCNTs y, si se introducen catalizadores metálicos, SWCNTs.

La primera vez que se sintetizaron CNTs por el método de ablación o vaporización por laser fue en 1995 por Guo et al. [34] y, en este trabajo, solamente se obtuvieron MWCNTs y no SWCNTs. Actualmente, este método se utiliza para la síntesis de SWCNT gracias a la introducción de partículas catalíticas metálicas y no para

MWCNTs. Este método consiste en vaporizar grafito mediante un laser en una cámara en atmósfera inerte en presencia de metales de transición que actúan como catalizadores. Los vapores de carbono se depositan sobre las partículas metálicas en una cámara que se encuentra a temperatura más baja y los SWCNTs crecen sobre dichas partículas.

El método de la deposición de vapor de carbono o químico es el método con mayores posibilidades de futuro ya que puede ser potencialmente escalado para la producción industrial [19]. Este método consiste en descomponer un hidrocarburo (acetileno o etileno) en presencia de un catalizador metálico (Ni, Fe, Co, Mo) a altas temperaturas en atmósfera inerte. A medida que el hidrocarburo descompone, se van depositando y creciendo los CNTs sobre el catalizador. Mediante este método se pueden fabricar MWCNTs y SWCNTs en función de las condiciones del reactor y del catalizador utilizado. Además, se pueden utilizar otras fuentes de carbono como, por ejemplo, monóxido de carbono en presencia de H_2 .

Para poder utilizar estos CNTs dentro de dispositivos es necesario utilizar técnicas eficientes de ensamblaje o colocación. La mayoría de ellas se basan en el ensamblaje u orientación durante el proceso de fabricación gracias a la creación de moldes de crecimiento de CNTs diseñados a conveniencia mediante el uso de técnicas nanolitográficas [35]. Además, existen otras técnicas que permiten la orientación de los CNTs fuera del proceso de fabricación. Entre las más importantes cabe citar las que utilizan monocapas autoensambladas (SAM) donde una biomolécula actúa de mediador entre el soporte y el CNT modificado adecuadamente y las que utilizan un campo magnético tras previa magnetización de los CNT gracias a la deposición de níquel sobre uno de los extremos del CNT [6].

Una vez descritas las propiedades, métodos de fabricación y manipulación de los nanotubos de carbono se va a proceder a describir las aplicaciones más importantes en electroanálisis y, en mayor profundidad, las aplicaciones de los CNTs como detectores electroquímicos en sistemas miniaturizados de separación.

III.1.2.2. Aplicaciones de los nanotubos de carbono en electroanálisis.

Las propiedades de los CNTs tales como su gran conductividad electrónica y resistencia mecánica y su capacidad para catalizar reacciones redox de ciertos compuestos (especialmente, H_2O_2 y NADH) han revolucionado la química electroanalítica generando, en los últimos años, un enorme número de publicaciones basadas en este nanomaterial. De manera concreta, su capacidad de electrocatalizar las reacciones redox de H_2O_2 y NADH ha dado lugar al desarrollo de biosensores electroquímicos basados en enzimas oxidasa o deshidrogenasa. Además, su gran superficie activa, que genera un incremento de la señal electroquímica, y sus propiedades anti-ensuciamiento, que mejora la estabilidad del electrodo, son otras características que convierten a los CNT en un material electródico muy atractivo [23].

Uno de los grandes retos en el desarrollo de biosensores enzimáticos amperométricos es el establecimiento de una comunicación eléctrica satisfactoria entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo [11]. El centro activo de la mayoría de oxidoreductasas está aislado eléctricamente por un escudo proteico. Por culpa de este escudo, la enzima no puede ser oxidada o reducida sobre el electrodo. La posibilidad de una transferencia electrónica directa entre la enzima y el electrodo podría allanar el camino para el desarrollo de biosensores sin la utilización de reactivos adicionales, es decir, sin añadir mediadores o co-sustratos, y permitiría una transducción eficiente del suceso de bioreconocimiento. Un nanobosque de CNT alineados y perpendiculares a la superficie del electrodo, preparados por auto-ensamblaje, puede actuar como un cable molecular que permitiera una comunicación eléctrica entre el electrodo soporte y la proteína redox (unida covalentemente al CNT). Un ejemplo interesante fue desarrollado por el grupo de Willner [36] quienes demostraron el alineamiento estructural de la enzima glucosa oxidasa (GOx) sobre el electrodo mediante el uso de SWCNTs como conexión eléctrica entre el centro redox de la enzima y el electrodo (ver **figura 2**). El ensamblaje de la enzima sobre un extremo de los SWCNTs representa un modo eficiente para conectar la GOx con el electrodo donde los electrones son transportados a través del SWCNT (longitudes estudiadas entre 25-150 nm) siendo la longitud de estos el parámetro que controla la velocidad de transferencia electrónica del proceso.

Los CNTs también pueden conducir a la detección bioelectrónica ultra-sensible de proteínas y DNA. Por ejemplo, los CNTs pueden ser usados para llevar a cabo una amplificación doble de la señal. Wang et al. prepararon CNTs que transportaban multitud de marcadores enzimáticos junto con el elemento de reconocimiento adecuado (interacción anticuerpo-antígeno para proteínas e hibridación para DNA) y, además, modificaron el detector (electrodo de carbono vitrificado) con CNTs [37]. La **figura 3** muestra el doble proceso de amplificación de señal mediante el uso de CNTs (reconocimiento y transducción) que permitió la detección de DNA por debajo de 1.3 zmol. La estrategia de amplificación de la señal usando CNTs puede ser una gran promesa para el análisis de DNA libre de PCR.

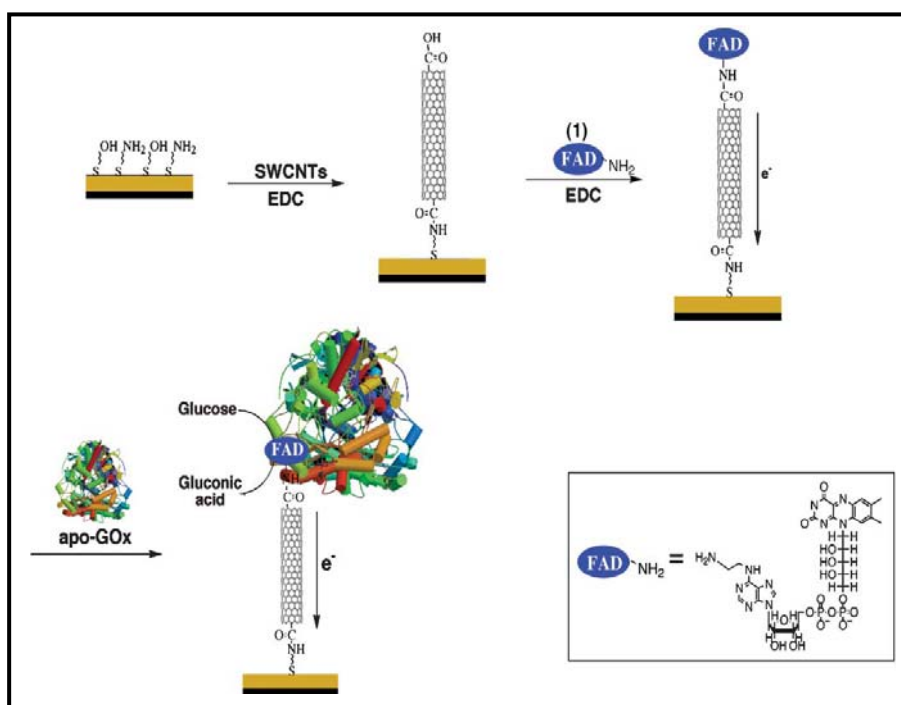


Figura 2. Fabricación de un biosensor donde la enzima (GOx) está conectada eléctricamente al electrodo mediante SWCNT modificados con FAD sin necesidad del uso de mediadores o co-factores [36].

Por otra parte, los CNTs también han sido utilizados como detectores en sistemas de separación. A continuación, se comentarán los trabajos más relevantes desarrollados en electroforesis capilar convencional por su íntima relación con el formato miniaturizado, en el que se encuadra el tema desarrollado en esta Tesis.

No existen muchos trabajos basados en el uso de electrodos modificados con CNTs como detectores en CE convencional. Chicharro et al. desarrollaron un electrodo de pasta de carbono con CNTs (CNTPE) para CE [38]. Este electrodo se fabricó empaquetando firmemente una pasta que contenía una mezcla de polvo de CNTs y aceite mineral en un tubo de teflón. Este nuevo electrodo se comparó con uno de pasta de carbono clásico (preparado de la misma manera pero con polvo de grafito) obteniéndose un gran incremento de la señal (ver **figura 4**) que provocó una mejora en los límites de detección para dopamina, epinefrina, norepinefrina, ácido ascórbico y ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) llegándose a reducir este parámetro para DOPAC en un orden de magnitud. En los voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a cada analito se pudo observar como los potenciales de oxidación se movieron hacia potenciales más bajos (efecto electrocatalítico) y como las corrientes amperométricas se incrementaron al introducir los CNTs en el electrodo. La reproducibilidad de las señales obtenida para CNTPE se evaluó a partir de una serie de 10 análisis consecutivos. En todos los casos, los valores de RSD fueron inferiores al 5% indicando la gran reproducibilidad y estabilidad de estos electrodos.

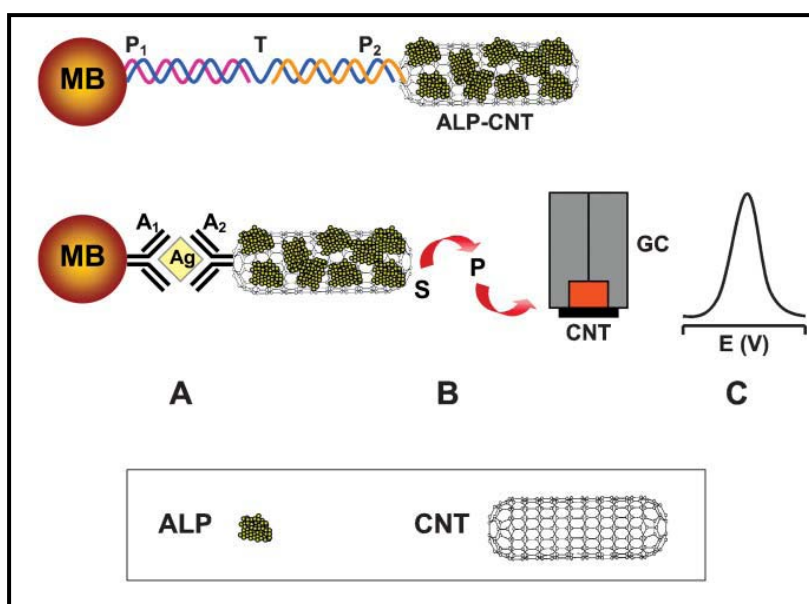


Figura 3. Bioensayo ultra-sensible de proteínas y ácidos nucleicos con procesos de amplificación basados en el uso de CNTs como transportadores y modificadores del electrodo. MB: partícula magnética, ALP: fosfatasa alcalina [37].

Por otra parte, Yao y colaboradores realizaron otro trabajo importante que consistió en la fabricación de un electrodo compuesto de CNT/PMMA para usarlo como detector amperométrico en un sistema de CE [39]. El comportamiento analítico de este sistema fue excelente permitiendo la detección de honokiol y magnolol en una muestra de una hierba medicinal china (*Cortex Magnoliae Officinalis*). El uso de este electrodo mejoró la S/N en comparación a un electrodo grafito/PMMA y, además, mostró una excelente reproducibilidad (RSD < 5%, para n=9) y estabilidad.

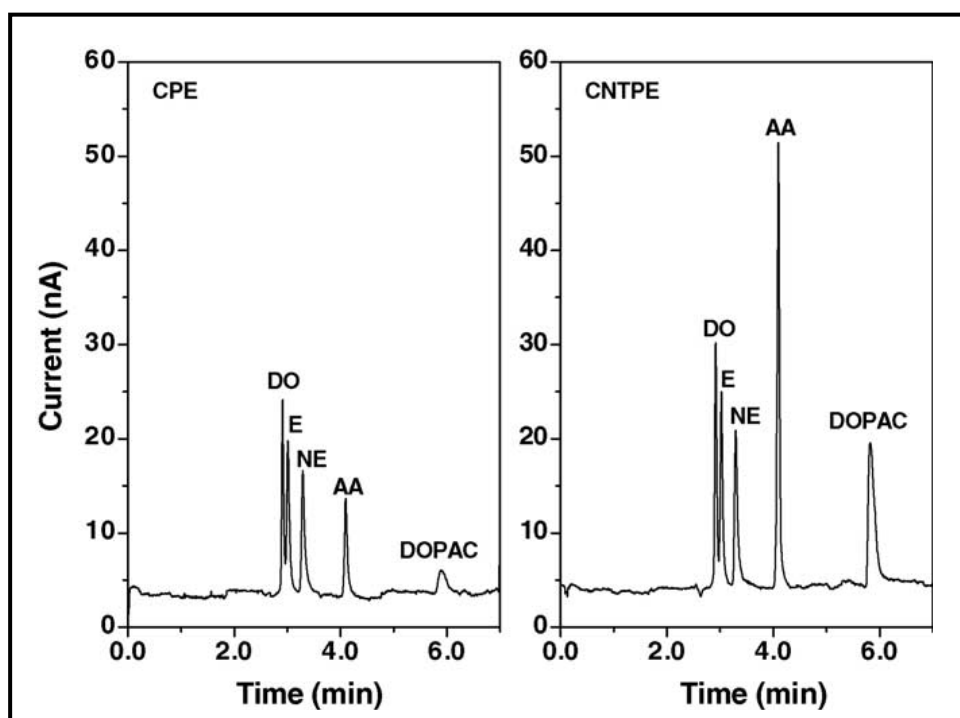


Figura 4. Electroforegramas correspondientes a dopamina (DO), epinefrina (E), norepinefrina (NE), ácido ascórbico (AA) y DOPAC usando CPE (izquierda) y CNTPE (derecha). Potencial de trabajo: +0.4 V [38].

II.1.2.3. Nanotubos de carbono y sistemas microfluídicos de separación.

Aunque los CNTs han sido ampliamente utilizados para el desarrollo de nuevos sensores y biosensores y como detectores en sistemas de separación, estos materiales no han sido apenas explorados como detectores en microchip de electroforesis capilar y su aplicación en muestras reales es muy escasa [40, 41]. Aparte de las ventajas ya descritas previamente como son el incremento de la sensibilidad, la disminución de los límites de detección, la mejora de la resistencia a la pasivación del electrodo y la

reducción de los sobrepotenciales redox (efecto electrocatalítico), adicionalmente, se ha demostrado que las propiedades de los CNTs pueden afectar de manera ventajosa a la separación propiamente dicha usando microchips de CE-ED. En efecto, esta mejora en la separación se manifiesta a través del incremento del número de platos y de la resolución entre picos cuando el modo de detección amperométrica empleado es el *wall-jet*. Los CNTs mejoran la velocidad de transferencia electrónica heterogénea entre el analito y la superficie del electrodo lo que da lugar a picos más estrechos (mayor eficacia) y con menos cola mejorándose en consecuencia la resolución [41]. En efecto, el comportamiento de un detector *wall-jet* en un microchip de electroforesis capilar se puede considerar no como un detector amperométrico sino como uno coulombimétrico debido al gran volumen muerto que genera dicha configuración [42]. Por tanto, toda la banda inyectada de analito es electroquímicamente transformada. Si la transferencia electrónica entre las especies redox y el electrodo es lenta, la corriente amperométrica generada tras la llegada de la banda de analito al detector es necesariamente menor que en un sistema donde la transferencia electrónica es más rápida [43]. En consecuencia, la lenta transferencia electrónica da lugar a la aparición de cola en los picos ya que el detector *wall-jet* trabaja prácticamente en un modo coulombimétrico y $i \approx t^{-1/2}$. Por otra parte, una rápida transferencia electrónica genera picos más estrechos y con menor cola, lo que conlleva mayor poder resolutivo y mayor capacidad de pico para el sistema microchip CE-ED en su conjunto.

Tras haberse comentado las peculiaridades existentes en el uso de los CNTs en sistemas miniaturizados se comentarán los trabajos publicados relacionados con este tema. El primer trabajo combinando CNTs con microchip de electroforesis capilar (μ -EC) fue desarrollado por el grupo del Dr. Wang [44] y exploraron las posibilidades de dicha combinación en la detección de diferentes grupos de analitos (hidracina, fenol, purina, aminoácidos, tioles [45]). Los resultados fueron excelentes ya que se disminuyeron los potenciales de detección, se mejoró la relación señal/ruido y se redujo el ensuciamiento del electrodo. En la **figura 5** se puede apreciar el gran aumento de la señal electroquímica para los compuestos mencionados anteriormente utilizando un electrodo serigrafiado de carbono (SPE) modificado con MWCNTs. Posteriormente, el mismo grupo fabricó un electrodo compuesto de cobre/MWCNTs

para la determinación de carbohidratos [46]. La combinación de ambos materiales produjo un efecto sinérgico mostrando mayor sensibilidad y resistencia al ensuciamiento que los dos materiales electródicos por separado.

Pumera y colaboradores exploraron el uso de electrodos de oro modificados con SWCNTs como detectores electroquímicos en un sistema microfluídico para la detección de aminofenoles y neurotransmisores [47] y, posteriormente, realizaron un estudio fundamental sobre el comportamiento analítico de distintas superficies electródicas (carbono vitrificado, oro y platino) modificadas con CNTs usando neurotransmisores como analitos modelo [48]. En ambos trabajos, se demostró una mejora de la resolución entre picos, sin embargo, la mejora de la sensibilidad no fue muy acusada y dependía fuertemente del soporte electródico elegido.

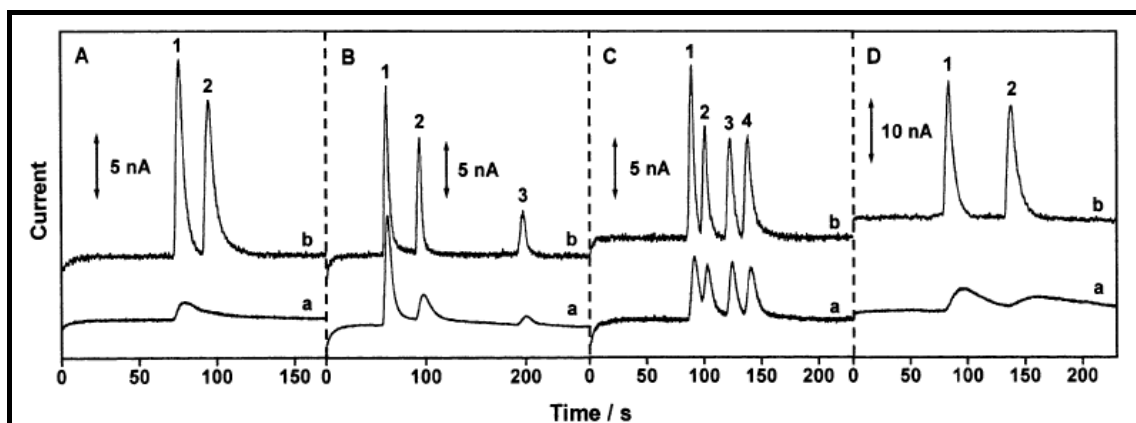


Figura 5. Electroforegramas correspondientes a hidracinas (A), dopamina, catecol y ácido ascórbico (B), fenoles (C) y purinas (D) usando un microchip de CE-ED con un electrodo SPE sin modificar (a) y modificado con CNTs (b). Muestra (A): (1) hidracina y (2) dimetilhidracina. Muestra (B): (1) dopamina, (2) catecol y (3) ácido ascórbico. Muestra (C): (1) Fenol, (2) 2-clorofenol, (3) 2,4-diclorofenol y (4) 2,3-diclorofenol. Muestra (D): (1) Guanina y (2) Xantina [45].

El grupo de Chen utilizó electrodos compósitos de polímero / MWCNTs como detectores en microchip de electroforesis capilar. Estos investigadores desarrollaron dos métodos, uno para la detección de contaminantes fenólicos y purinas en agua utilizando como polímero polimetacrilato de metilo (PMMA) [49] y otro para la determinación de quercetina y rutina en una hierba medicinal china utilizando poliestireno [50]. En ambos trabajos se obtuvieron idénticas mejoras analíticas que las descritas en trabajos anteriores, como ejemplo de ello, en la **figura 6** se pueden

observar los notables aumentos de la señal amperométrica para una serie de compuestos fenólicos usando CNTs.

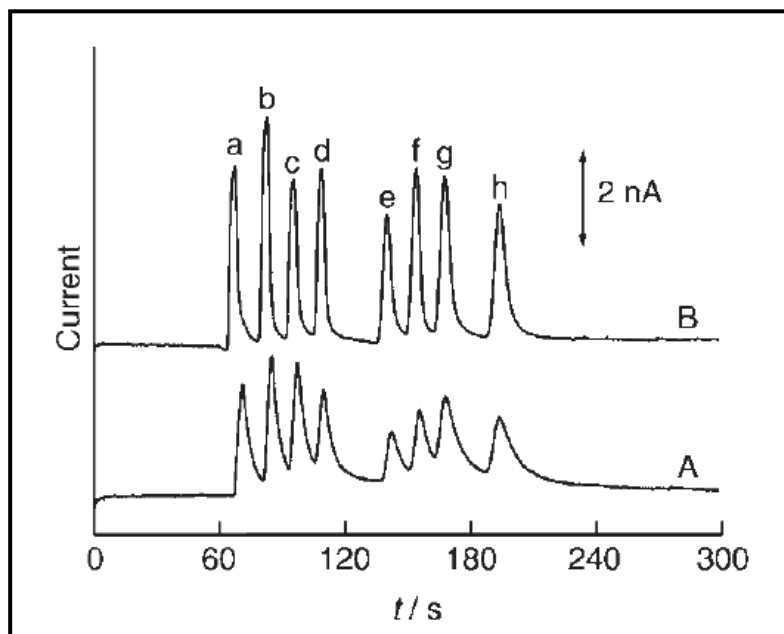


Figura 6. Electroforegramas correspondientes a (a) 2,6-dimetilfenol, (b) fenol, (c) 2-naftol, (d) 4-clorofenol, (e) pentaclorofenol, (f) 2,4-clorofenol, (g) 3-nitrofenol, (h) 4-nitrofenol usando un electrodo compuesto de (A) grafito/PMMA y (B) CNT/PMMA [49].

Finalmente, Vlcková and Schwartz desarrollaron un método para determinar neurotransmisores y sus derivados en muestras biológicas y lo aplicaron con éxito en una muestra de cerebro de ratón y en orina humana [51]. Para ello, utilizaron electrodos modificados con MWCNTs acoplados a un microchip de electroforesis capilar (μ -CE) y necesitaron utilizar un medio de separación complejo (tensoactivos y dendrímeros) para conseguir la separación de los analitos. Es preciso indicar que este es uno de los trabajos desarrollados más interesantes dado que determinaron con éxito analitos de alto interés clínico en muestras reales en tan solo 150 s (ver **fig.7**).

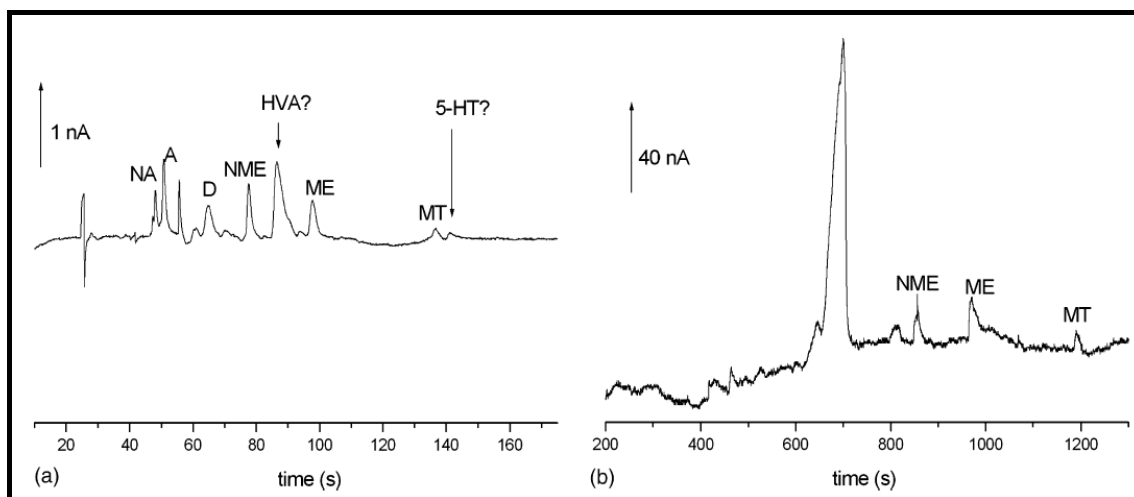


Figura 7. Análisis de muestras reales biológicas utilizando un microchip de electroforesis capilar con un electrodo modificado con CNT como detector (a) Muestra cerebral homogeneizada. (b) Orina [32]. Picos: (D) dopamina, (A) adrenalina, (NA) noradrenalina, (MT) metoxitiramina, (NME) normetanefrina, (ME) metanefrina, (HVA) ácido homovanílico, (5-HT) serotonina [51].

III.1.3. Nanohilos.

III.1.3.1. Propiedades generales, métodos de fabricación y manipulación.

Los nanohilos (nanowires, NW) son estructuras cuasi-unidimensionales (1-D) que tienen forma cilíndrica y poseen diámetros del orden del nanómetro. Estas estructuras son las más pequeñas posibles para un eficiente transporte electrónico, por tanto, se convierten en un componente esencial para el desarrollo de dispositivos en la escala del nanómetro. Además, debido a su pequeño tamaño, a la gran relación superficie/volumen y a sus propiedades controlables de transporte electrónico (causadas por el efecto cuántico explicado anteriormente), su comportamiento electrónico está fuertemente influenciado por la más mínima perturbación.

Un buen método de fabricación de estructuras unidimensionales debería ser capaz de controlar simultáneamente las dimensiones, las propiedades y la morfología. De manera general, estas estructuras son sintetizadas mediante la promoción de la cristalización o deposición de un sólido a lo largo de una sola dirección a través de varios mecanismos:

- El uso de moldes con morfologías unidimensionales para formar directamente dichas estructuras.

- La utilización de estructuras cristalográficas intrínsecamente anisotrópicas de un sólido para provocar el crecimiento unidimensional.
- El uso de interfases sólido/líquido para reducir la simetría de un núcleo de crecimiento.
- La utilización de agentes bloqueantes para controlar cinéticamente las velocidades de crecimiento de las caras de un núcleo de crecimiento.

En base a estas estrategias se han desarrollado una serie de técnicas que, además, varían según de qué material se desee construir el nanohilo [6, 52-54].

Con respecto a la fabricación de nanohilos semiconductores (silicio y germanio), los métodos de fabricación más habituales son los siguientes:

-Técnicas vapor-líquido-sólido (VLS): Se utilizan partículas catalíticas metálicas para crecer nanohilos monocristalinos a partir de fuentes gaseosas de dicho material como, por ejemplo, SiCl_4 y SiH_4 . Las partículas metálicas se depositan sobre la superficie de un sustrato de silicio reaccionando entre sí para formar una aleación metal-Si que al alcanzar cierta temperatura funde para formar gotas. El punto de fusión de esta aleación en su punto eutéctico es más bajo que los dos materiales por separado. Por tanto, al introducir el vapor de SiCl_4 o SiH_4 junto con H_2 , la gota de metal-Si cataliza la reacción formándose silicio sobre dicha gota donde se absorbe. Al continuar la reacción y sobresaturarse la gota, el silicio en exceso precipita pasando de la fase líquida (gota) a la fase sólida (sustrato). Este silicio sólido se sitúa entre la gota catalítica y el sustrato creciendo longitudinal y perpendicularmente a la superficie del sustrato y elevando la gota catalítica. El diámetro de estos nanohilos va a depender del tamaño de la partícula catalítica. También, se han fabricado nanohilos de óxidos y nitruros metálicos utilizando esta técnica.

-Fabricación asistida por láser: Se vaporiza en un compartimento una muestra sólida del semiconductor u óxido metálico utilizando un haz de alta energía y, a continuación, se enfría en otra cámara depositándose en forma de nanohilos gracias a la utilización de las condiciones adecuadas de temperatura y presión y a la presencia de óxidos del propio material o de nanopartículas metálicas catalíticas.

-*Vaporización térmica*: El fundamento es el mismo que la fabricación asistida por láser pero la vaporización de la muestra se realiza mediante un horno a altas temperaturas.

Debido a las características originales de los polímeros, claramente distintas a las de los metales y semiconductores, se han desarrollado técnicas de fabricación de nanohilos exclusivas para este tipo de materiales tales como la nanolitografía *Dip-pen*, técnicas de estiramiento mecánico y *electrospinning*.

-*Nanolitografía Dip-pen*: Es una técnica de grabado por barrido en la cual se utiliza la punta de un microscopio de fuerza atómica (AFM) para liberar o depositar moléculas sobre una superficie a través del menisco de disolvente que se forma sobre dicha punta. Esta técnica ha permitido grabar líneas de polianilina y polipirrol utilizando polímeros iónicos como si fuera la tinta de un bolígrafo sobre sustratos que poseían la carga opuesta, de esta manera, las interacciones electrostáticas entre la tinta y el sustrato provocan una fuerza suficiente para arrancar el polímero de la punta del microscopio y generar diseños sobre obleas de silicio.

-*Técnicas de estiramiento mecánico o stretching*: Estas técnicas sirven para fabricar nanohilos de polímeros conductores. En primer lugar, se sitúa la punta de un microscopio de efecto túnel (STM) a una pequeña distancia (20-100 nm) respecto un electrodo, después, se introduce el monómero y se electropolimeriza *in situ* para, finalmente, separar la punta del microscopio del electrodo y estirar el nanohilo hasta la anchura y longitud deseada.

-*Electrospinning*: En esta técnica se utiliza una punta microfabricada para ser usada como una fuente de hilatura. La punta es sumergida en una disolución de polímero hasta formar una gota del material sobre dicha punta. A continuación, se aplica un voltaje sobre la punta formándose un cono de Taylor y cuando se alcanza la diferencia de potencial suficiente un chorro de disolución de polímero es lanzado desde la punta. De ese modo, simplemente moviendo la punta a lo largo de la superficie que actúa como contra-electrodo se pueden depositar fibras o nanohilos pudiéndose crear cualquier diseño.

Todas las técnicas de fabricación mencionadas anteriormente presentan bastantes inconvenientes y dificultades. Las técnicas nanolitográficas son tediosas y

requieren instrumentación cara y personal cualificado, junto con el hecho, de que no son compatibles con la fabricación en masa. Las técnicas donde se generan o utilizan vapores químicos no tienen un gran control sobre la longitud y el diámetro de los nanohilos generándose estructuras de distintas dimensiones que requieren posteriores purificaciones. Por todo ello, la síntesis de nanohilos mediante el uso de moldes ha ganado mucha popularidad en los últimos tiempos ya que es una técnica barata, sencilla, escalable para producción en masa, que permite fabricar nanohilos de cualquier material, de buena calidad y sin impurezas de catalizadores metálicos [53].

Los moldes o máscaras utilizadas de manera más frecuente son las de polímeros porosos, las de mica y las de óxido de aluminio anodizado (AAO). Sin embargo, las membranas de AAO son consideradas las más atractivas debido a su distribución regular de poros, a su alta porosidad y a la gran relación de profundidad respecto al diámetro de poro [54]. Estas membranas son preparadas mediante una anodización electroquímica controlada que implica la oxidación de aluminio en un electrolito apropiado. Los parámetros para el proceso de anodización tales como el voltaje, la corriente, la temperatura del baño electrolítico y la composición de dicho electrolito deben ser ajustados adecuadamente para fabricar el molde con la distribución, tamaño y longitud de poro deseada. También existen muchos trabajos donde utilizan membranas de filtración de AAO comerciales como moldes para la fabricación de nanohilos. Es una manera fácil, barata y rápida para fabricarlos, sin embargo, tiene la limitación de no poder diseñarlos con el diámetro deseado ya que se tienen que ajustar a los diámetros de poro estándar que tienen dichas membranas de filtración.

Tras la elección del molde, se lleva a cabo el proceso de llenado de los poros, entre los que se encuentran la centrifugación, métodos sol-gel, deposición de vapores químicos, solidificación de un fundido o una disolución, procesos electroforéticos y, finalmente, la más utilizada y versátil, la deposición electroquímica [53].

Aunque existen métodos de fabricación que permiten la orientación y apilamiento de los nanohilos (método VLS o el uso de moldes), la falta de procesos o técnicas eficientes para la manipulación o ensamblaje de estas nanoestructuras dificulta el desarrollo de micro o nano dispositivos con arquitecturas más complejas o con conexiones nanométricas. Una buena técnica de ensamblaje de nanoestructuras

debería ser cómoda, rápida, que tolere defectos de los nanomateriales y compatible con una gran variedad de materiales y formas. De hecho, la llave para el futuro éxito de la nanotecnología dependerá de la disponibilidad de técnicas fáciles para ensamblar, orientar o alinear dichas nanoestructuras. Existen distintos métodos de ensamblaje/alineamiento de nanohilos que incluyen técnicas magnéticas, eléctricas, Langmuir-Blodgett y litográficas [6, 55] y se comentarán brevemente a continuación.

Las propiedades magnéticas de los nanohilos fabricados de elementos ferromagnéticos tales como Co o Ni están dominadas por su forma anisotrópica (quasi-unidimensionalidad) comportándose como un dipolo magnético. Cuando estos nanohilos se encuentran en suspensión son fácilmente orientables y manipulables aplicando un pequeño campo magnético. Esta propiedad puede ser aprovechada para colocarlos u orientarlos en cualquier dispositivo [56].

Cuando se aplica un campo eléctrico sobre una suspensión de nanohilos, estos se polarizan por lo cual son forzados a orientarse debido a su anisotropía con la dirección del campo eléctrico aplicado. En uno de los primeros trabajos publicados se orientaron nanohilos de oro sobre un electrodo aplicando un campo eléctrico de corriente alterna. Este proceso dependía de la intensidad de la frecuencia del campo eléctrico y de la longitud del nanohilo, es decir, de su anisotropía [57].

Las técnicas litográficas son empleadas de manera más exhaustiva para ensamblar o colocar nanomateriales dentro de dispositivos y no para su orientación. Existen multitud de estrategias distintas pero son tediosas y caras, sin embargo, son las que mejores resultados están obteniendo a la hora de diseñar y construir nanoarquitecturas complejas [55].

Las técnicas Langmuir-Blodgett consisten en dispersar los nanohilos sobre la superficie del agua mediante el uso de surfactantes. La interacción entre los nanohilos y el surfactante hace que los nanohilos floten sobre el agua y que se alineen paralelos a la depresión que se forma entre el agua y el surfactante, formándose una monocapa compacta que después puede ser transferida a un sustrato plano. Utilizando esta técnica se ha conseguido crear monocapas de nanohilos de plata alineados paralelamente [58].

III.1.3.2. Aplicaciones analíticas de los nanohilos.

Aprovechando las propiedades excepcionales de los nanohilos, el grupo de Lieber desarrolló, por primera vez, un nanosensor sobre una oblea plana de silicio utilizando nanohilos de silicio dopado (semiconductor) como detectores directos sin necesidad de usar un marcador o mediador [59]. El fundamento de este modo de detección directo consistió en usar la nanoestructura como un canal semiconductor de un quimiresistor o, también denominado, transistor de efecto campo (FET). Al producirse cualquier cambio en el campo o potencial eléctrico que hay sobre la superficie del nanohilo se genera automáticamente un cambio en la conductancia a lo largo del nanohilo que puede ser registrado y transducido directamente. Por tanto, si se modifica la superficie del nanohilo con un receptor adecuado, cuando se aproxime y se una el ligando correspondiente generará un cambio en el potencial eléctrico de la superficie del nanohilo que provocará a su vez un cambio en la conductancia. Este modo de detección ha convertido a los nanohilos en un material electródico muy atractivo para el desarrollo de nuevos sensores [6, 60]. Además, es especialmente interesante para la monitorización rápida y en tiempo real de interacciones ligando-receptor (anticuerpos, proteínas, enzimas y DNA), de hecho, existen un gran número de trabajos donde se han determinado una gran variedad de biomoléculas, biomarcadores, bacterias e, incluso, virus [6, 60].

Para ilustrar mejor el funcionamiento de un transistor de efecto campo (FET), en la **figura 8A**, se muestra un sensor de pH fabricado con un nanohilo de silicio dopado con boro basado en dicho concepto [59]. El cambio de pH genera un cambio de carga en la superficie del material que, a su vez, genera un campo eléctrico variable que modifica la conductividad a través del nanohilo. En la **figura 8B** se muestra la relación lineal que hay entre el pH y la conductividad del nanohilo.

Otro campo de aplicación menos convencional de los nanomateriales y, de manera concreta, de los nanohilos, es la creación de sistemas codificados miniaturizados o *nano-códigos de barras*. La creciente demanda existente para el etiquetado de pequeños objetos comerciales y para la monitorización directa de multitud de interacciones químicas distintas ha dado lugar a la exploración de nuevos métodos de codificación en escalas más reducidas [61]. Se han desarrollado

aplicaciones muy interesantes en base a estos *nanocódigos de barras* en el campo del análisis multiplexado [62, 63], del cribado combinatorio [64] o del etiquetado de productos comerciales [61] que han abierto nuevas posibilidades para la investigación en este área.

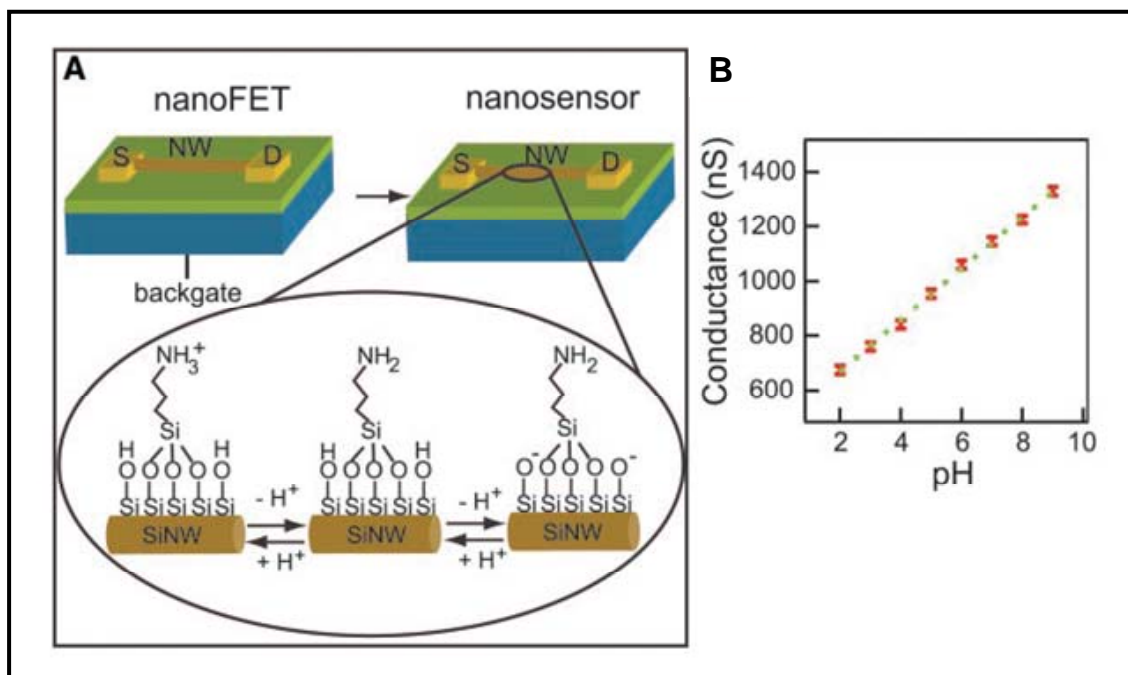


Figura 8. Nanosensor para medir el pH usando nanohilos (NW). (A) Representación esquemática de la conversión de un FET en un sensor de pH. El NW está en contacto con dos electrodos, la fuente (S) y el drenaje (D), para medir la conductancia. Ampliación: Representación de la superficie del NW modificado con 3-aminopropiltriatoxisilano mostrando los cambios químicos que experimenta al variar el pH. (B) Representación gráfica de la conductancia versus pH [59].

De manera ilustrativa y para entender mejor este nuevo campo de aplicación se explicará un trabajo donde se realizó un bioensayo multiplexado utilizando nanohilos codificados. En este trabajo [62], Nicewarner-Peña et al. desarrollaron un inmunoensayo tipo sándwich simultáneo sobre dos clases de nanohilos codificados (tipo 1: Au-Ag-Au longitud 4 μm ; tipo 2: Au-Ni-Au longitud 8 μm). Los nanohilos de tipo 1 se derivatizaron con el anticuerpo de la inmunoglobulina G humana (IgG) mientras que el tipo 2 se derivatizó con el anticuerpo de la IgG de ratón. Las muestras se mezclaron y se expusieron a ambos analitos (IgG humana y de ratón) y, a continuación, se expusieron a sus correspondientes anticuerpos secundarios, los cuales fueron marcados con fluoróforos de distinto color (verde FTIC para el anticuerpo de la IgG

humana y rojo *Texas red* para el de ratón). Los resultados del inmunoensayo se muestran en la **figura 9**. En esta figura aparecen tres imágenes de los mismos nanohilos. La primera imagen (i) fue tomada mediante microscopía óptica de reflexión pudiéndose apreciar las dos clases de nanohilos mientras que las otras dos imágenes se tomaron utilizando una fuente de excitación fluorescente y filtros adecuados para la fluorescencia en la franja del verde (ii) y del rojo (iii). Se puede observar claramente como la fluorescencia verde emana de los nanohilos de tipo 1 y la roja de los del tipo 2 demostrándose la selectividad en la captura de los analitos objetivos.

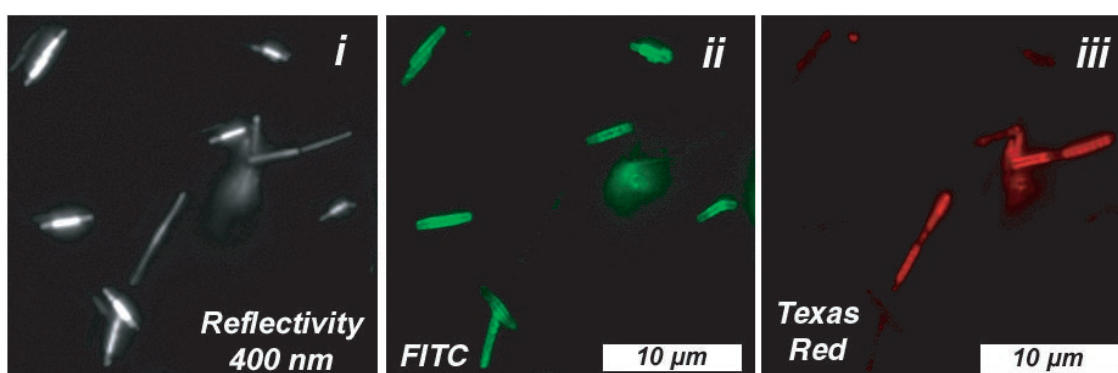


Figura 9. Inmunoensayo tipo sándwich realizado sobre nanohilos codificados usando detección fluorescente para la determinación simultánea de IgG humana y de ratón. (i) Imagen obtenida por microscopía óptica de reflexión, (ii) y (iii) lectura fluorescente usando los filtros correspondientes para FITC y Texas red, respectivamente. Las tres imágenes son de la misma muestra [62].

III.1.3.3. Nanohilos y sistemas microfluídicos de separación.

Existen un gran número de aplicaciones analíticas empleando nanohilos como sensores electroquímicos [6, 12] y se espera que sigan creciendo en los próximos años pero, sin embargo, el uso como detectores electroquímicos en sistemas microfluídicos está emergiendo en la actualidad. Uno de los primeros trabajos que se puede encontrar en la bibliografía consistió en el acoplamiento de un nanohilo de óxido de estaño en un chip microfluídico [65]. El microsistema estaba formado por un microcanal y un mezclador y como detector utilizaba un nanohilo de óxido de estaño conectado a través de dos electrodos de oro. Este nanohilo fue modificado con el anticuerpo adecuado para llevar a cabo la determinación directa (transistor de efecto campo) de la bacteria *E.coli* O157:H7. Este sistema mostró una respuesta proporcional a la concentración de bacteria usando disoluciones patrón pero no fue aplicado a

muestras reales. Otro ejemplo interesante fue desarrollado por Wang y col. [66] donde se utilizaron nanohilos de níquel como detectores electroquímicos para un microchip de electroforesis capilar. Mediante un imán los nanohilos fueron situados justo a la salida del capilar de separación y se logró la separación y detección de varios patrones de aminoácidos y de glucosa. Pero el hecho más destacable fue que variando la dirección del campo magnético generado por el imán pudieron controlar la orientación de los nanohilos respecto a la salida del capilar obteniendo un comportamiento analítico distinto. Cuando los nanohilos estaban orientados en la misma dirección del flujo (posición vertical) se obtenían mejores resoluciones de pico que cuando estaban perpendiculares al flujo (posición horizontal), sin embargo, la sensibilidad descendía (ver **figura 10**). Esta capacidad de manipular magnéticamente los nanohilos permite una cierta adaptabilidad del sistema de análisis en función de la demanda analítica. Este hecho junto con la posibilidad de poder crear nanohilos con segmentos de distinta composición y, por tanto, potencialmente multifuncionales, abre una puerta para el futuro desarrollo de sistemas microfluídicos integrando nanomateriales que contengan sistemas de detección, separación o tratamiento de muestra modulables gracias a la aplicación de un estímulo externo que logre responder de manera satisfactoria a un cambio concreto en las necesidades analíticas (chips inteligentes) [67].

La integración de los nanomateriales dentro de los sistemas microfluídicos es uno de los grandes retos que existen para el desarrollo de sistemas combinados. En este sentido, es preciso destacar un trabajo donde se fabricó y posicionó *in situ* nanohilos poliméricos dentro de un sistema microfluídico obteniendo un sistema totalmente integrado que permitió el desarrollo de nuevos sensores electroquímicos con las ventajas inherentes tanto de la nanotecnología como de la microfluídica (ver **figura 11**) [68].

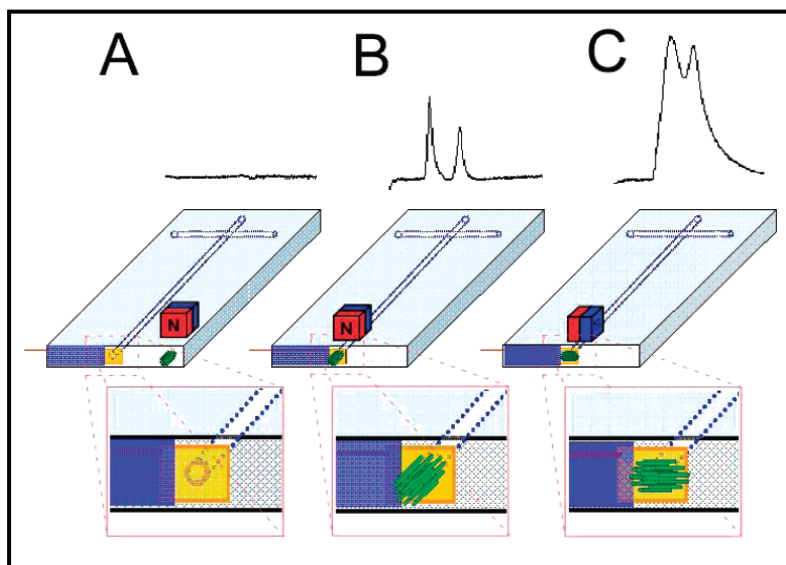


Figura 10. Representación esquemática del detector basado en nanohilos de níquel manipulable magnéticamente para microchip. El control magnético sirve para posicionar y orientar los nanohilos de níquel sobre la lámina de oro depositada sobre la salida del canal microfluídico. En la parte superior de la figura se muestran los correspondientes electroforegramas obtenidos para una mezcla de azúcares sin nanohilos (A) y con nanohilos orientados en vertical (B) y en horizontal (C) [66].

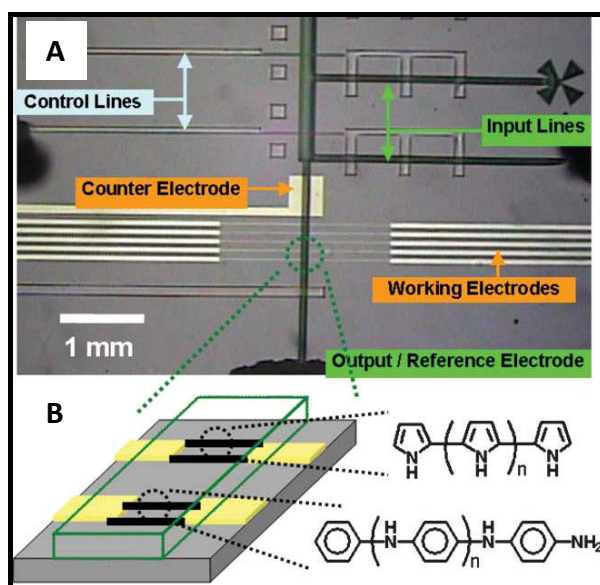


Figura 11. (A) Imagen obtenida por microscopía óptica de un sistema microfluídico con nanohilos integrados. (B) Representación esquemática de la fabricación electroquímica de los nanohilos poliméricos (polianilina y polipirrol) dentro del canal microfluídico [68].

III.2. Parte experimental

III.2. Parte experimental

III.2.1. Nanotubos de carbono.

III.2.1.1. Reactivos

Los patrones de hidroquinona, piridoxina, ácido fólico, arbutina, catequina, florizina, rutina, genisteína y resorcinol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich y el de ácido ascórbico en Fluka Chemie (Buchs, Suiza). Las pastillas de isoflavonas de soja (suplemento nutricional) (GSN[®], 30 mg de isoflavonas por cápsula), los preparados vitamínicos (Vitafardi[®], Aspol[®], Becozyme[®] C Forte, and Hidrosil[®]), las manzanas (*Golden* y *Granny Smith*) y las peras (*Conferencia* y *Blanquilla*) se compraron en establecimientos locales. Por otro lado, la compañía *Exxentia* nos suministró un patrón secundario de referencia para el análisis de isoflavonas el cual presentaba un contenido total de isoflavonas certificado y además, está incluido en la Agencia Nacional del Medicamento (confidencial, *Drug Master File* SW/1211/03). El valor certificado para cada isoflavona se ha obtenido aplicando un método de análisis validado por HPLC. El contenido en isoflavonas totales se ha obtenido como suma de todas las isoflavonas individuales (45.8%, ver anexo V). Es importante señalar que este tipo de muestras certificadas son prácticamente inéditas en el campo de los compuestos polifenólicos en general, donde no existen materiales certificados de análisis ni métodos oficiales y, por consiguiente, presentan una elevada importancia porque nos permite evaluar, de manera adecuada, la exactitud del método. Además, la misma compañía nos suministró otros dos extractos de soja con composición y contenido de isoflavonas distintos (44.2% para extracto 1 y 42.0% extracto 2).

Los distintos nanotubos de carbono (CNT) se adquirieron en Sigma-Aldrich y se describen a continuación; SWCNT (producto no. 519308; longitud, 2–5 μm ; diámetro, 1.2–1.5 nm), MWCNT-200 μm (MWCNT-A) (producto nº 636630; longitud, 0.5–200 μm ; diámetro externo, 30–50 nm; grosor de pared, 12–18 nm; producida por el método de deposición de vapor químico “CVD”) y MWCNT-2 μm (MWCNT-B) (producto nº 636495; longitud, 0.5–2 μm ; diámetro externo, 20–30 nm; grosor de pared, 1–2 nm; producida por CVD). El polvo de grafito (tamaño de partícula 2–10 μm) se adquirió en BDH (UK). Los materiales de carbono fueron purificados mediante agitación mecánica en una disolución de ácido nítrico 6M a 25°C durante 24 h, tras este proceso, se lavaron con agua ultra-pura hasta pH neutro. A continuación, 1 mg de

este material purificado se dispersó en 1 ml de dimetilformamida (DMF) para ser utilizado en la modificación del electrodo.

Las nanopartículas de óxido de níquel (II) (tamaño de partícula <50 nm) y óxido de hierro (II, III) (tamaño de partícula <50 nm) se adquirieron en Aldrich. Se pesó 1 mg of nanopartículas y se dispersaron en 1 mL of DMF.

Todos los reactivos utilizados en la preparación de tampones y electrolitos fueron de grado reactivo. El etanol, metanol y el ácido nítrico fueron comprados a Panreac (España) y el agua ultra-pura se obtuvo mediante un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, USA).

III.2.1.2. Instrumentos y electrodos

Tanto el microsistema analítico como el potencióstato son iguales a los utilizados en la sección anterior (II.2).

La medida de la superficie específica de los MWCNT se realizó mediante el método BET usando el equipo Autosorb 1 (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, USA). Se usó nitrógeno como adsorbato. Antes de los experimentos las muestras de MWCNT fueron deshidratados a 250°C bajo vacío durante 16 horas.

Para todas las técnicas electroquímicas empleadas en esta sección, se utilizó un sistema convencional de tres electrodos, empleando como electrodo de referencia un electrodo de Ag/AgCl (3.0 M) y como electrodo auxiliar un electrodo de platino. Los electrodos de trabajo fueron un electrodo de disco de carbono vitrificado (GCE) de 3 mm de diámetro (BAS, USA) y un electrodo serigrafiado de carbono (SPE) con las siguientes dimensiones 0.3 mm x 2.5 mm.

Los electrodos de trabajo fueron modificados mediante la adición de 2 µL de la suspensión de 1 mg/ml de los distintos materiales de carbono y nanopartículas metálicas en DMF y, a continuación, se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 horas. Se tomaron imágenes de la superficie de los electrodos modificados y sin modificar utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) modelo Zeiss 950 (Alemania).

III.2.1.3. Procedimientos

Patrones

Las disoluciones patrón de cada analito estudiado se disolvieron en metanol y se almacenaron a -20 °C, excepto para genisteína y ácido fólico que se disolvieron en etanol y en una disolución de hidróxido sódico 1M, respectivamente. A partir de dichas disoluciones se prepararon las de trabajo diluyéndolas apropiadamente en el tampón electroforético (tampón fosfato 10 mM pH=7 para vitaminas, borato 50 mM pH=9 para antioxidantes naturales y borato 10 mM pH=8 para isoflavonas). Todas las disoluciones de trabajo se protegieron de la luz y se usaron dentro de las primeras 24 horas tras su preparación.

Muestras reales

Como los preparados vitamínicos son los mismos que los analizados en la sección I, se utilizó el mismo proceso de extracción (ver I.2.4.b) que, además, también se aplicó al nuevo suplemento vitamínico (Becozyne® C Forte).

Tanto las manzanas como las peras fueron peladas separándose la piel de la pulpa. Después, se realizó una extracción con 10 ml de etanol durante una hora y media sobre 5 gramos de cada tipo de muestra. A continuación, se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante y se diluyó al 5% con el tampón de separación para ser analizado [69].

El procedimiento de extracción para los patrones de isoflavonas de Exxentia y para las pastillas de isoflavonas de soja consistió en añadir 20 ml de etanol a una cantidad adecuada de muestra para obtener una concentración final de 2 mM y sonificarlo durante 30 minutos. Después, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 r.p.m. para eliminar toda la materia insoluble. Finalmente, se cogió el volumen adecuado de sobrenadante y se diluyó en el tampón electroforético (tampón borato 10 mM pH=8) antes de ser analizado [70].

Todas las muestras analizadas se protegieron de la luz y se usaron dentro de las primeras 24 horas tras su preparación.

Procedimiento electroforético

El acondicionamiento y montaje del microchip ya se explicó en la sección experimental del anterior bloque (II.2.4.d).

Las condiciones electroforéticas óptimas para cada grupo de analitos fue: vitaminas, tampón fosfato 10 mM pH=7, voltaje de separación 2 kV, inyección a 2 kV durante 3s; antioxidantes naturales, tampón borato 50 mM pH=9, voltaje de separación 2 kV, inyección a 2 kV durante 5s; isoflavonas, tampón borato 10 mM pH=8, voltaje de separación 2 kV, inyección a 2 kV durante 6s.

Detección amperométrica

La célula de detección se llenó con una disolución de HNO₃ 1M porque se mejora la sensibilidad y se aplicó una diferencia de potencial sobre el electrodo de trabajo de +1.2 V para vitaminas e isoflavonas y de +1.0 V para antioxidantes naturales. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

III.2.2. Nanohilos.

III.2.2.1. Reactivos

Las cargas de oro (+99.9 % de pureza) usadas para dorar las membranas de fabricación de nanohilos fueron adquiridas a Denton Vacuum (Moorestown, NJ, USA). Las disoluciones comerciales de oro y plata para electrodeposición (Orotemp 24 RTU RACK y 1025 RTU@4.5 Troy/Gallon) se compraron a Technic Inc. (Anaheim, CA, USA). Las sales de cobre (CuSO₄), níquel (NiCl₂) y platino (H₂PtCl₆), ácido bórico, ácido clorhídrico, hidróxido sódico y ácido perclórico se adquirieron en Sigma-Aldrich. Las membranas de alúmina Anodisc® 25 (25 mm de diámetro, 200 nm de tamaño de poro y 60 mm de grosor) se compraron a Whatman (Maidstone, UK) y se usaron como molde para todas las síntesis de nanohilos.

El patrón de glucosa usado como analito modelo se adquirió en Sigma-Aldrich.

III.2.2.2. Instrumentos y electrodos

El recubrimiento con oro de la membrana de alúmina se realizó con una Denton Vacuum Desk III TSC (Moorestown, NJ, USA). La electrodeposición se llevó a cabo

usando un potenciostato modelo CHI 400 (CH Instruments, Austin, TX) para los nanohilos aleados de oro/plata y un potenciostato modelo Autolab PGSTAT12 de Eco Chemie (Utrecht, Holanda) para los nanohilos de níquel.

Tanto la capa de oro depositada mediante vaporización (*sputtering*) como el segmento de oro inicial electrodepositado en la zona ramificada del molde se eliminaron de la membrana usando una pulidora estándar de muestras para SEM de 8 pulgadas (Modelo 900 Grinder/Polisher, South Bay Technology Inc., San Clemente, CA, USA) junto con una suspensión de polvo de alúmina de 1 mm de tamaño de partícula (Struers, Cleveland, OH, USA).

Para los nanohilos de oro/plata, las imágenes por microscopía óptica se tomaron usando un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon Corp., Tokio, Japón) equipado con un sistema de iluminación fluorescente X-cite 120 (EXFO, Mississauga, Canada) y utilizando un filtro de paso de banda centrado en 390 nm (con una anchura de banda de 120 nm). Las imágenes digitales del microscopio se obtuvieron mediante una cámara CF Photometrics CoolSnap (Roper Scientific, Duluth, GA, USA) y el programa informático MetaMorph 7 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) se tomaron con un microscopio electrónico modelo XL30 (FEI Co., Hillsboro, OR, USA) usando una aceleración de 30 kV. A este microscopio se le acopló un sistema de adquisición EDAX para realizar un análisis por espectroscopia de fluorescencia de rayos X (EDX) de los nanohilos segmentados (Ametek Inc., Mahwah, NJ, USA)

Para los nanohilos de níquel, las imágenes ópticas se tomaron usando un microscopio óptico Motic serie B1 (Xiamen, China) al cual se le acopló un capturador de imagen digital (Microstone infotech Inc., Shanghai, China) y las obtenidas mediante microscopía electrónica usando un SEM Zeiss 950 (Alemania). Asimismo, los SPE se modificaron añadiendo 5 μ L de una suspensión acuosa de nanohilos de níquel (10 μ m longitud y 200 nm de diámetro) siendo activados *in situ* los nanohilos mediante una voltamperometría cíclica (100 ciclos entre -1V y +1V, velocidad de barrido 1 V/s, paso de potencial 0.01 V) mientras se llevaba a cabo el acondicionamiento de los canales del microchip. La manipulación magnética de los nanohilos se realizó usando un imán cilíndrico convencional de Nd/Fe/B (0.5 cm grosor x 0.8 cm diámetro).

III.2.2.3. Procedimientos

Patrones

El patrón de glucosa utilizado para la evaluación de los nanohilos de níquel como detectores electroquímicos se preparó diariamente en una concentración 1 M obteniéndose, a partir de ésta, las distintas disoluciones de trabajo diluyendo hasta la concentración adecuada con una disolución 35 mM de hidróxido sódico.

Todas las disoluciones se prepararon utilizando agua ultrapura.

Síntesis de nanohilos

Para los nanohilos de aleaciones oro/plata, se utilizó una sola disolución de electrodeposición por lo que la capa sacrificial (4 culombios de carga depositada) tenía la misma composición que el primer segmento y se eliminaba mediante pulido (ver sección III.2.2.2). Los nanohilos codificados con segmentos de distinta reflexión óptica se fabricaron aplicando distintos potenciales (-0.50, -0.85 and -1.20 V para los nanohilos con tres niveles de intensidad de reflexión óptica y -0.50, -0.73, -0.96 y -1.20 V para los de cuatro niveles) y depositando distinta carga (de 1 a 3 C).

Para los nanohilos de níquel, se usó una disolución 50 g/l de CuSO_4 para depositar la capa sacrificial (10C a -1 V) y una disolución 50 g/l de NiCl_2 para fabricar los nanohilos (45C a -1V), ambas disoluciones fueron preparadas usando una disolución de ácido bórico (20g/l en agua ultrapura). Se introdujo una capa protectora de platino (3 C electrodepositados a -0.35V usando una disolución 10 g/l de H_2PtCl_6 en HClO_4 1M) entre la capa sacrificial y la capa de níquel para evitar que la añadir el oxidante para eliminar la capa sacrificial se disolviera parte del níquel. La capa sacrificial se eliminó usando una disolución 0.5M de CuSO_4 en ácido clorhídrico al 30%.

Tratamiento de imagen para los nanohilos codificados.

Las imágenes ópticas se tomaron usando un objetivo 100x (LU Plan BD ELWD, Nikon Corp., Tokio, Japón) con el microscopio Nikon 80i equipado con la cámara CoolSnap CF monocromática de 12 bit (mencionado previamente). Después de la adquisición de las imágenes, estas se procesaron utilizando un protocolo desarrollado internamente. Primero, usando el programa informático Photoshop CS2 (Adobe

Systems Incorporated, San Jose, USA), se seleccionó y cortó la parte central a lo largo del eje longitudinal del nanohilo codificado (anchura 4 pixels vs diferentes longitudes), se pegó de nuevo en una escala de grises de 8-bit y, posteriormente, se aplicó la herramienta autocontraste que posee dicho programa informático. La imagen procesada fue introducida en el programa Matlab (The Mathworks Inc., Natick, USA) que realizó un promedio de la intensidad de pixel a lo largo de las columnas de 4 pixel y dibujó el perfil de intensidad de pixel a lo largo de la longitud del nanohilo. La intensidad de reflexión se normalizó usando el valor de intensidad más alto que correspondió al segmento mayoritario en plata depositado a -0.50 V.

III.3. Resultados y discusión

III.3.1. Nanotubos de carbono como detectores electroquímicos para microchip de electroforesis capilar.

III.3.1.1. Elección del soporte electródico para la modificación con nanotubos de carbono.

El uso de nanotubos de carbono como detectores electroquímicos para sistemas microfluídicos de separación ha aportado enormes beneficios en términos de sensibilidad, selectividad y estabilidad, pero se ha demostrado que su efectividad depende fuertemente del soporte electródico elegido para depositar los CNTs. Por esta razón, se procedió en primer lugar a modificar con MWCNT (200 μm de longitud) dos tipos de electrodos de carbono, electrodo de carbono vitrificado (GCE) y electrodo serigrafiado (SPE), y, a continuación, se realizó un estudio comparativo del comportamiento electroquímico de estos soportes electródicos eligiéndose el método de determinación de vitaminas previamente discutido en el capítulo anterior (ver II.3.2). La elección de estos soportes se debe a que el GCE es un electrodo con una excelente transferencia electrónica y ampliamente utilizado en microchips de electroforesis capilar y el SPE es un electrodo miniaturizado y desechable evitando los tediosos protocolos de limpieza de electrodo. La diferencia entre estos dos soportes electródicos no es sólo el estado en que se encuentra el carbono, vítreo para GCE y amorfo para SPE, sino también la superficie de dichos electrodos, mucho más pequeña para el SPE (ver sección experimental).

Como se partió del método optimizado en la sección II para la determinación de vitaminas hidrosolubles (piridoxina, ácido ascórbico y ácido fólico), se procedió directamente a explorar el comportamiento analítico de los nuevos detectores. En primer lugar, se construyeron los voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a cada electrodo utilizando patrones de vitaminas (ver **figura 12**). Se eligió como potencial de detección óptimo +1.2 V ya que a este potencial se alcanzaba la meseta para ácido fólico y ascórbico y, además, por encima de este potencial se producía un gran ensanchamiento para el pico de piridoxina que perjudicaba la detección de los otros dos analitos (resultados no mostrados).

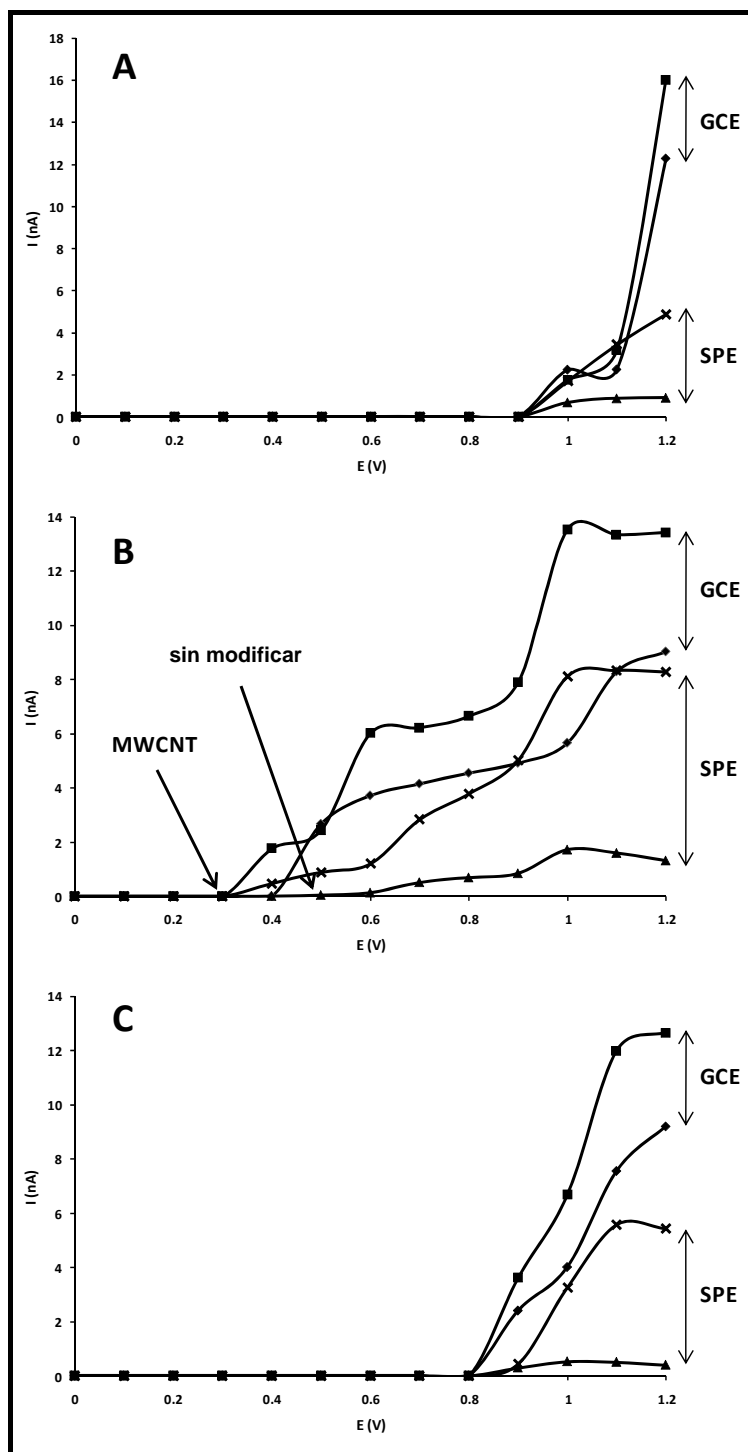


Figura 12. Voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a las vitaminas estudiadas utilizando los distintos electrodos preparados. (A) Piridoxina, (B) ácido ascórbico, (C) ácido fólico. Electrodos: \blacklozenge -GCE; \blacksquare -GCE-MWCNT-A; \blacktriangle -SPE; \times -SPE-MWCNT-A.

Como se muestra en la **figura 12**, cuando se utilizaron electrodos modificados con MWCNTs se observó un comportamiento distinto para el ácido ascórbico con respecto de las otras dos vitaminas. El potencial de oxidación del ácido ascórbico se

redujo en al menos +0.1V al utilizar estos electrodos modificados tanto para SPE como GCE (ver **fig. 12B**). Sin embargo, esta reducción del potencial de oxidación no ocurrió para piridoxina y ácido fólico (ver **fig. 12A y 12C**) por lo que los MWCNTs mostraron una mejora de la transferencia electrónica o efecto “electrocatalítico” preferencial sobre el ácido ascórbico. También, se obtuvieron enormes incrementos de la corriente amperométrica para las tres vitaminas estudiadas al modificar ambos electrodos con MWCNTs.

Asimismo, en la **figura 13** puede observarse claramente este incremento de la señal amperométrica mostrándose, además, la separación electroforética de la mezcla de patrones de las vitaminas estudiadas bajo las condiciones óptimas utilizando GCE (A) y SPE (B) sin modificar (a) y modificados con MWCNT(b).

Este incremento de corriente se debe a la mayor superficie activa que presentan los electrodos modificados con MWCNT comparado con los electrodos sin modificar. La superficie activa de los MWCNTs utilizados fue calculada por el método BET obteniéndose un valor de $104.9 \text{ m}^2/\text{g}$. En base a este valor y al protocolo de modificación utilizado, se estimó la superficie activa de los electrodos modificados obteniéndose incrementos respecto a los no modificados de 48 veces para GCE y 280 veces para SPE (GCE sin modificar, 0.07 cm^2 ; GCE-MWCNT, 3.2 cm^2 ; SPE sin modificar, 0.0075 cm^2 ; SPE-MWCNT, 2.1 cm^2).

Por otra parte, mientras que para el SPE modificado con MWCNTs se obtuvo un gran incremento de la señal amperométrica, para el GCE modificado se produjo tan sólo un leve aumento. Idénticos resultados obtuvieron otros grupos de investigación al utilizar distintos macroelectrodos (3 mm diámetro) [48]. El resultado obtenido para GCE podría ser explicado en base al hecho de que un microchip de electroforesis capilar con detección amperométrica utilizando macroelectrodos se comporta casi como un sistema coulombimétrico ya que la mayoría de la muestra inyectada es oxidada [42]. En nuestros experimentos calculamos que el 88% de la muestra era oxidada cuando se utilizaba GCE y un 95% cuando se usaba GCE-MWCNT, es decir, se oxidaba toda la muestra inyectada, luego una de las principales ventajas de los CNTs, que es la gran relación superficie/volumen, resultó que no era eficiente al utilizar GCE en nuestro sistema microfluídico.

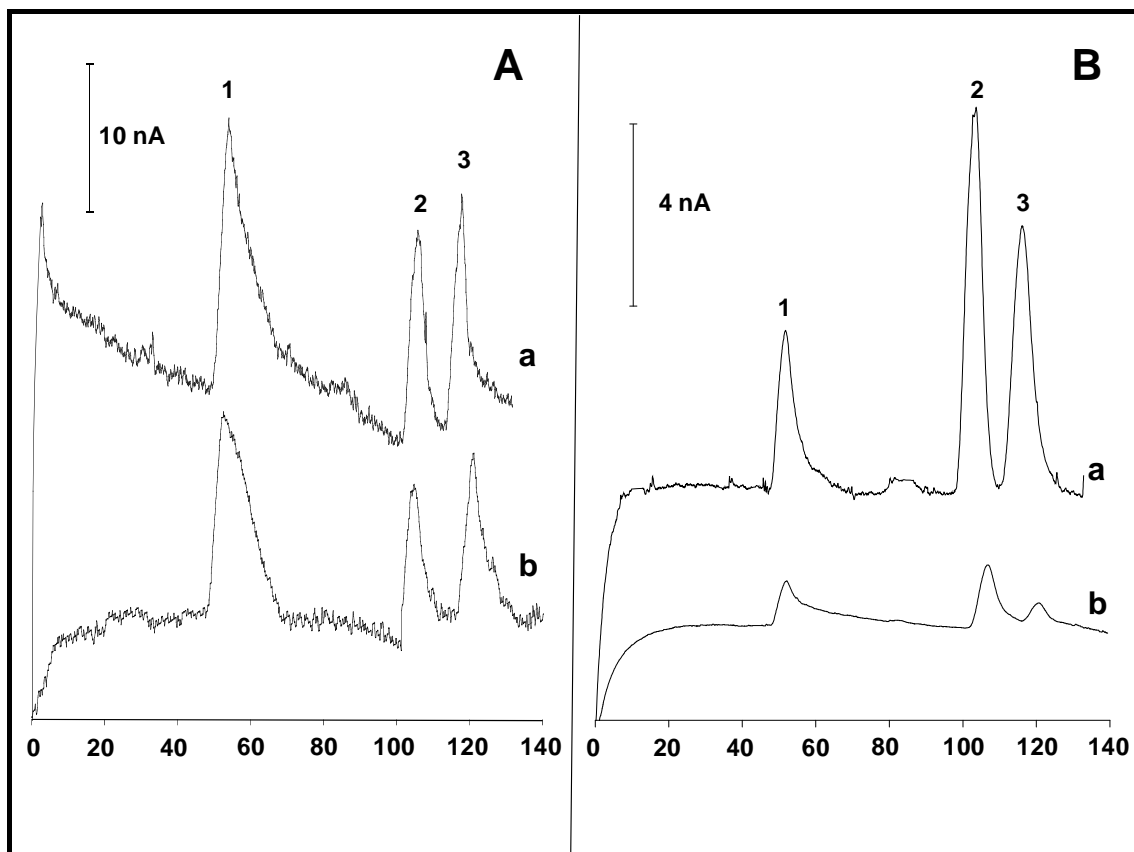


Figura 13. Electroforegramas correspondientes a las vitaminas estudiadas obtenidos utilizando distintos electrodos: A) GCE (a) sin modificar, (b) modificado con MWCNT-A, B) SPE (a) sin modificar, (b) modificado con MWCNT-A. Picos: (1) Piridoxina 100 μM , (2) ácido ascórbico 200 μM , (3) ácido fólico 200 μM . Condiciones: Tampón fosfato (10 mM pH 7), voltaje de separación 2 kV, voltaje de inyección 2 kV durante 3 s, potencial de detección +1.2 V, con HNO_3 1M en la célula de detección.

En la **tabla 1** se recogen los valores de los parámetros más representativos de la separación electroforética obtenidos para cada vitamina utilizando los distintos electrodos. Se puede observar cómo al modificar con MWCNTs no se produce un claro aumento de la relación señal/ruido pero, sin embargo, se pone de manifiesto que este parámetro es mucho mayor para el SPE que para el GCE tanto modificado como sin modificar (un orden de magnitud).

La **tabla 1** también muestra las anchuras de pico en la semialtura para cada analito. Al modificar los electrodos con MWCNTs se produjo una leve reducción de este parámetro independientemente del electrodo utilizado debido a la mejora de la transferencia electrónica por la presencia de los MWCNTs y a la configuración *wall-jet* del detector utilizado como ya se explicó en la introducción (sección III.1.2.3). Además, en esta **tabla 1** se puede observar cómo la modificación con MWCNTs generó un

menor ensuciamiento del electrodo. Por ejemplo, la señal de piridoxina se redujo en un 81% tras diez medidas con un SPE sin modificar pero tan solo un 19% cuando se modificó con MWCNTs. Esta mejora de la estabilidad permite la realización de un mayor número de análisis con el mismo electrodo y, por tanto, se pueden realizar más análisis en condiciones de repetibilidad dentro del ámbito del control de calidad. Esta resistencia al ensuciamiento del electrodo debido a la presencia de los CNTs no está suficientemente explicada en la bibliografía pudiendo estar relacionada con la curvatura de los CNTs que permitiría una desorción más rápida de los productos de oxidación [71] o con su gran superficie activa ($104.9 \text{ m}^2/\text{g}$).

Tabla 1. Comportamiento analítico de los detectores estudiados

	GCE			SPE								
	sin modificar			MWCNT			sin modificar			MWCNT		
	S/R^1	$w_{1/2}$	Pasiv. ²	S/R^1	$w_{1/2}$	Pasiv. ²	S/R^1	$w_{1/2}$	Pasiv. ²	S/R^1	$w_{1/2}$	Pasiv. ²
Piridoxina	17	10.0	55	20	8.0	35	92	6.1	81	58	4.6	19
Ac. ascórbico	13	4.6	36	15	4.7	26	132	5.4	71	140	5.0	37
Ac. Fólico	14	5.0	41	17	3.5	37	41	5.9	54	96	5.4	52

¹Relación señal/ruido.

²Pasivación o ensuciamiento del electrodo evaluada como valor de la disminución de la intensidad de la última señal con respecto a la primera señal en tanto por ciento tras 10 inyecciones consecutivas. Piridoxina $100 \mu\text{M}$, ácido ascórbico $200 \mu\text{M}$, ácido fólico $200 \mu\text{M}$.

El conjunto de resultados obtenidos junto con las características intrínsecas de los SPE (inherente miniaturización y que son desechables) hicieron que se eligiera este tipo de electrodo como el mejor soporte electrodo para los CNTs.

A continuación, se procedió a evaluar el comportamiento electroquímico de CNTs de distintos tipos y con distintas geometrías utilizando SPE como soporte. Para este estudio se utilizaron distintos analitos de interés alimentario (vitaminas, antioxidantes naturales e isoflavonas) y se demostró la capacidad analítica de los CNTs determinando dichos analitos en muestras reales de interés alimentario (suplementos alimenticios, alimentos y extractos vegetales).

III.3.1.2. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafiados modificados con CNTs para la determinación de vitaminas en preparados farmacéuticos.

Para estudiar en profundidad el uso de los electrodos serigrafiados (SPE) modificados con nanotubos de carbono (CNT) es necesario, en primer lugar, observar físicamente el recubrimiento del soporte electródico con los CNTs para asegurarse de su homogeneidad y, después, evaluar su comportamiento electroquímico dentro del sistema de análisis utilizado (microchip de electroforesis capilar). Para este estudio, se seleccionaron distintos CNTs con estructuras y dimensiones distintas (SWCNT, MWCNT-A, MWCNT-B) y se procedió a preparar los correspondientes SPE modificados. En primer lugar, se tomaron fotografías de la superficie de los SPE modificados con los distintos nanotubos de carbono mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM) para comprobar la deposición de la película de CNTs. En la **figura 14**, se puede observar la presencia de los CNTs formando las características marañas de hilos, confiriendo al electrodo una gran superficie activa, junto con las micropartículas que se forman por agregación de CNTs (ver **fig. 14C y 14D**).

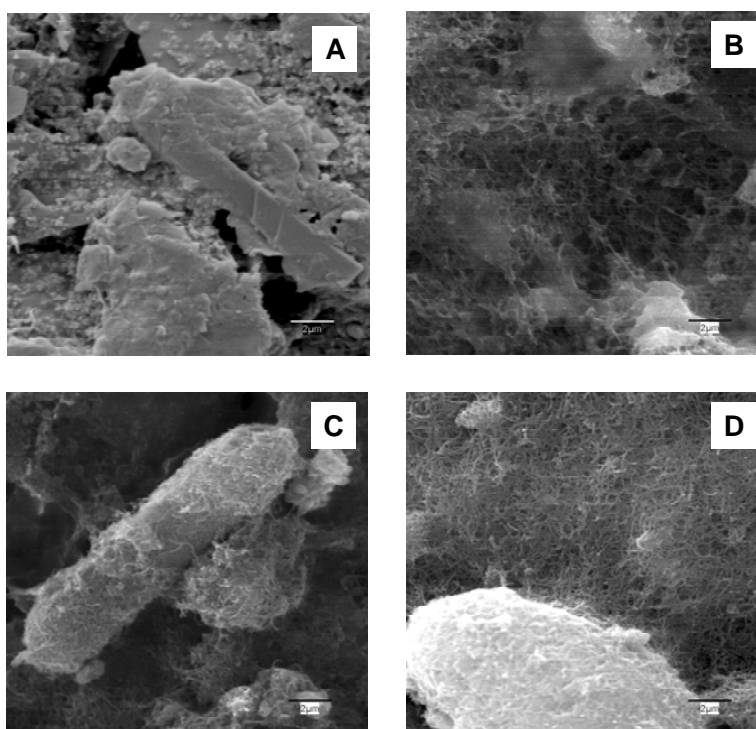


Figura 14. Fotografías obtenidas por SEM de los distintos electrodos utilizados. (A) SPE, (B) SWCNT, (C) MWCNT-B, (D) MWCNT-A. Condiciones: amplificación x5000 a 25 kV.

Para evaluar el comportamiento electroquímico de estos materiales, se procedió a construir los correspondientes voltamperogramas hidrodinámicos (HDV) para las tres vitaminas estudiadas modificando un SPE con cada material tal y como se muestra en la **figura 15**. Se pudieron extraer dos conclusiones de los HDVs obtenidos; la primera de ellas es que se produjo una disminución del potencial de oxidación (del orden de +0.2 V) para el ácido ascórbico independientemente del tipo de CNT empleado (nótese que esta disminución del potencial no fue observada para las otras dos vitaminas) y, la segunda es que la modificación con CNTs generó un aumento de la corriente amperométrica para las tres vitaminas siendo mayor cuando se utilizó SPE-MWCNT-A.

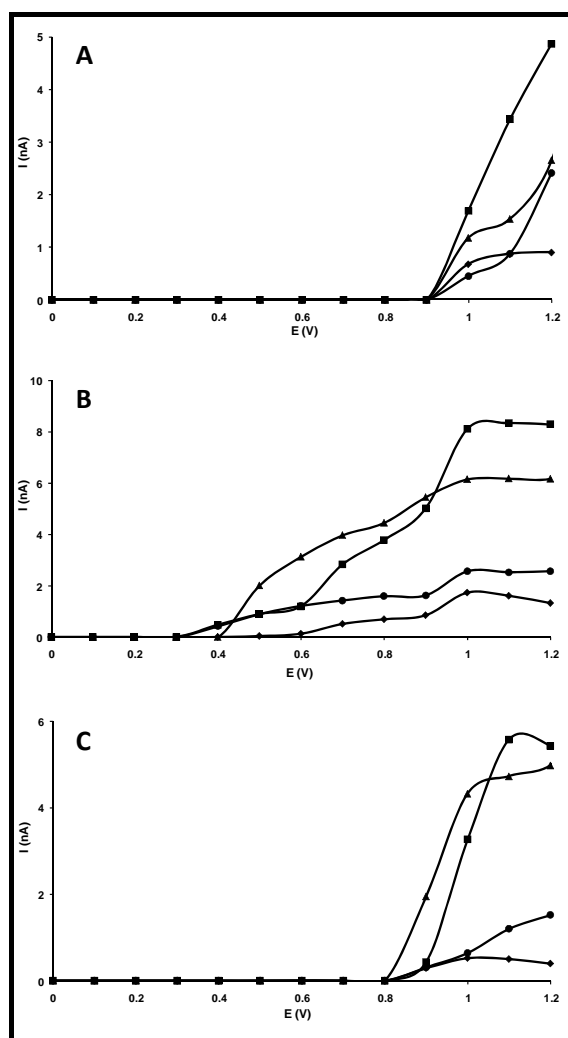


Figura 15. Voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a las vitaminas estudiadas utilizando un SPE modificado con distintos CNTs. (A) Piridoxina, (B) ácido ascórbico, (C) ácido fólico. Electrodo: ■-MWCNT-A; ▲-MWCNT-B; ●-SWCNT; ◆-SPE sin modificar.

En base a los HDVs obtenidos, se eligió como potencial de detección óptimo +1.2 V ya que, como en la sección anterior (III.3.1.1), a este potencial se alcanzaba la meseta para ácido fólico y ascórbico y por encima de este potencial se producía un ensanchamiento enorme del pico de piridoxina perjudicando la detección de los otros dos analitos.

La **figura 16** muestra los electroforegramas correspondientes a una mezcla de patrones de vitaminas en las condiciones electroforéticas óptimas empleando los diferentes materiales electródicos. Se puede observar, de nuevo, el aumento de la señal para cada analito cuando se modifica el electrodo con CNTs siendo mayor el incremento para los MWCNTs que para el SWCNT pero, en contrapartida, también se produjo un incremento del ruido, especialmente para SPE-MWCNT-B.

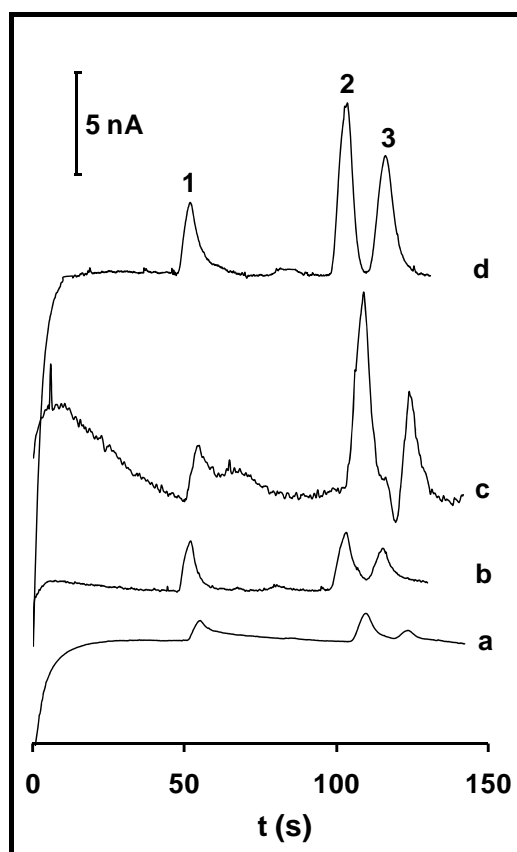


Figura 16. Electroforegramas correspondientes a las vitaminas estudiadas utilizando SPE modificado con distintos CNTs: (a) sin modificar, (b) SWCNT, (c) MWCNT-B, (d) MWCNT-A. Picos: (1) Piridoxina 100 μM , (2) ácido ascórbico 200 μM , (3) ácido fólico 200 μM . Condiciones: Tampón fosfato (10 mM pH 7), voltaje de separación 2 kV, voltaje de inyección 2 kV durante 3 s, potencial de detección +1.2 V, con HNO_3 1M en la célula de detección.

Para evaluar ambos efectos, en la **tabla 2** se muestran las relaciones señal/ruido obtenidas para cada vitamina utilizando los distintos CNTs. Si se tiene en cuenta este parámetro, los electrodos que mostraron mejor comportamiento fueron el SPE sin modificar y el SPE-MWCNT-A. Este hecho no es realmente sorprendente dado que el empleo de los CNTs no solo aumenta la señal electroquímica sino también el ruido de fondo. Esta tabla también recoge los valores de anchura de pico a la semialtura para cada vitamina. En este caso, todos los CNTs mostraron una reducción de la anchura del pico mejorándose levemente la resolución entre picos (datos no mostrados). En cuanto a la pasivación de los electrodos, resultó que la modificación de los mismos con CNTs redujo su ensuciamiento incrementándose el número de análisis que se pudieran realizar con el mismo electrodo. En este caso, el material que mostró mayor resistencia al ensuciamiento fue el SWCNT.

Tabla 2. Comportamiento analítico de los distintos CNTs estudiados para la determinación de vitaminas.

	Piridoxina			Ácido ascórbico			Ácido fólico		
	S/R^1	$w_{1/2}$	$Pasiv.^2$	S/R^1	$w_{1/2}$	$Pasiv.^2$	S/R^1	$w_{1/2}$	$Pasiv.^2$
SPE	92.3	6.1	81	135.3	5.4	71	41.0	5.9	54
SWCNT	30.5	4.2	6	32.0	4.8	31	18.8	4.8	38
MWCNT-B	8.9	5.3	39	32.6	5.2	32	20.0	5.1	42
MWCNT-A	57.3	4.6	19	139.8	5.0	37	95.0	5.4	49

¹Relación señal/ruido.

²Pasivación o ensuciamiento del electrodo evaluada como valor de la disminución de la intensidad de la última señal con respecto a la primera. señal en tanto por ciento tras 10 inyecciones consecutivas.

Piridoxina 100 μ M, ácido ascórbico 200 μ M, ácido fólico 200 μ M

En base a los datos obtenidos se eligió al MWCNT-A como el mejor material electródico para la determinación de vitaminas con nuestro microsistema de CE ya que presentó la mejor relación señal/ruido junto con las ventajas mostradas por todos los nanotubos de carbono estudiados, es decir, reducción de la anchura de pico y del ensuciamiento del electrodo.

A continuación, se procedió a realizar la calibración metodológica para, finalmente, aplicar el método a la determinación de vitaminas hidrosolubles en distintos suplementos vitamínicos.

Para todas las vitaminas estudiadas se obtuvieron unos buenos coeficientes de correlación (r) en el intervalo de concentraciones estudiado (ver **Tabla 3**). Asimismo y sin excepción, el valor de la ordenada en el origen obtenido, estadísticamente hablando, fue cero al nivel de confianza elegido indicando que el proceso de interpolación durante el análisis cuantitativo podría ser independiente del valor de la ordenada utilizando solamente la pendiente de la recta y , y por tanto, simplificándose la ecuación de regresión.

Tabla 3. Parámetros de la calibración externa para SPE-MWCNT-A.

Analitos	Intervalo lineal (μM)	r	$a^1 \pm tS_a^2$ (nA)	$b^1 \pm tS_b^2$ (nA/ μM)	$b_{\text{MWCNT}}/b_{\text{sin modificar}}$	$\text{LOD}_{\text{bare}}^3$ (μM)	$\text{LOD}_{\text{CNT}}^3$ (μM)
Piridoxina	25-300	0.999	-1.1 \pm 1.3	0.118 \pm 0.008	16	29	8
Ác. Ascórbico	50-400	0.995	-2.8 \pm 3.3	0.08 \pm 0.01	4	11	11
Ác. Fólico	50-400	0.993	-5.0 \pm 6.8	0.11 \pm 0.03	5	11	8

¹Recta de regresión: $y=a+bx$ donde “ y ” es la altura de pico (nanoamperios) y “ x ” la concentración (μM).

²Intervalo de confianza $\alpha=0.05$

³Calculado mediante $3s_y/b$

La mejora de la sensibilidad fue evaluada en términos de la variación del valor de la pendiente de la recta de calibrado entre el SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A (**Tabla 3**). Como se observa, la sensibilidad fue mayor usando MWCNT-A (especialmente, para el grupo de las vitaminas B) con incrementos en el valor de la pendiente de entre 4 y 16 veces. Además, los límites de detección fueron del orden micromolar obteniéndose, sin embargo, una fuerte reducción del LOD para piridoxina de 29 a 8 μM cuando se utilizó MWCNT (este hecho tiene cierta importancia dado que el comportamiento electroquímico de la piridoxina es muy complejo), siendo prácticamente iguales para las otras dos vitaminas. El hecho de que los LODs no siempre se vean mejorados empleando CNTs se debe a que los electrodos modificados con estos nanomateriales generan más ruido tal y como se ha comentado precedentemente.

El mismo efecto observado (aumento de la corriente amperométrica) para el análisis de patrones se produjo en muestras reales. Un ejemplo ilustrativo se muestra en la **figura 17** donde se puede observar el incremento notable de las alturas de pico

correspondientes al análisis del suplemento vitamínico Becozyme® cuando se modificó el SPE con MWCNT-A.

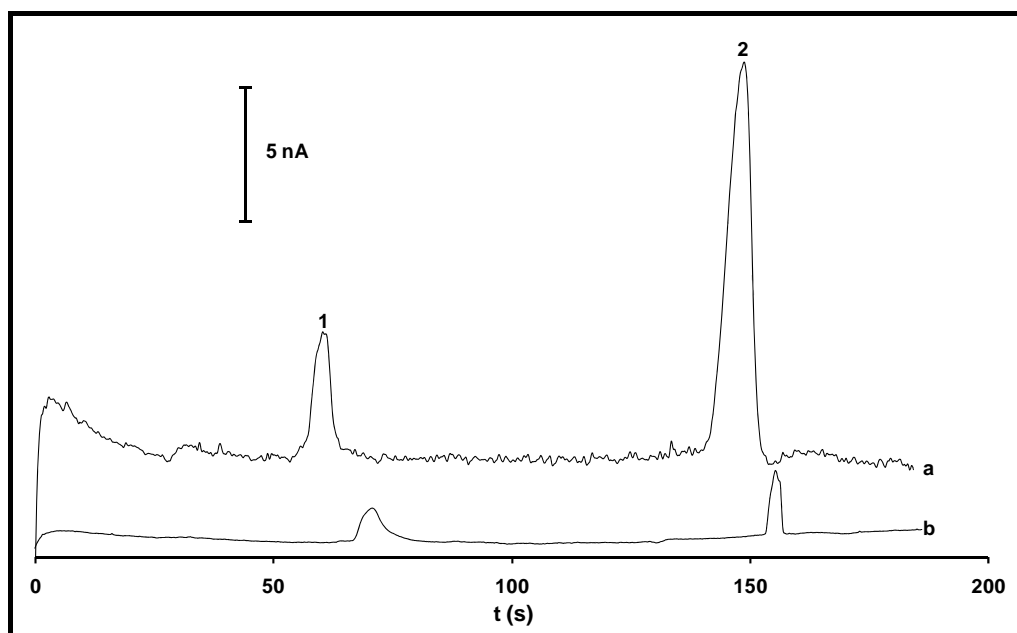


Figura 17. Electroforegramas correspondientes al análisis de Becozyme® utilizando (a) SPE sin modificar y (b) SPE-MWCNT-A. Picos: (1) Piridoxina y (2) ácido ascórbico. Condiciones: ver figura 16.

Para demostrar la capacidad analítica del sistema microfluídico utilizando detectores modificados con MWCNT, se analizaron cuatro suplementos vitamínicos con distinta composición de vitaminas.

En primer lugar, se realizó un análisis cuantitativo del suplemento vitamínico Vitafardi® utilizando la recta de calibración externa y en condiciones de repetibilidad, es decir, tres inyecciones consecutivas de la muestra, para demostrar la viabilidad del método (ver **figura 18**). Se obtuvo una excelente precisión con valores de desviación estándar relativa del 5% y un error sistemático respecto al valor etiquetado por el fabricante del 7%.

La precisión del método también fue evaluada en términos de reproducibilidad empleando tanto el mismo electrodo como diferentes electrodos. Utilizando el mismo electrodo se obtuvieron buenas RSDs ya que fueron inferiores al 11% para las alturas de pico ($n=3$), sin embargo, las RSD empleando distintos electrodos fueron de hasta el 38% ($n=7$).

Para resolver este inconveniente de irreproducibilidad entre electrodos, se volvió a utilizar la estrategia de la calibración integrada ya descrita en la sección II para cuantificar la cantidad de vitaminas presentes en los suplementos vitamínicos analizados. Esta estrategia se pudo utilizar ya que el valor cero de ordenada en el origen está contenido en el intervalo de confianza (ver **Tabla 3**).

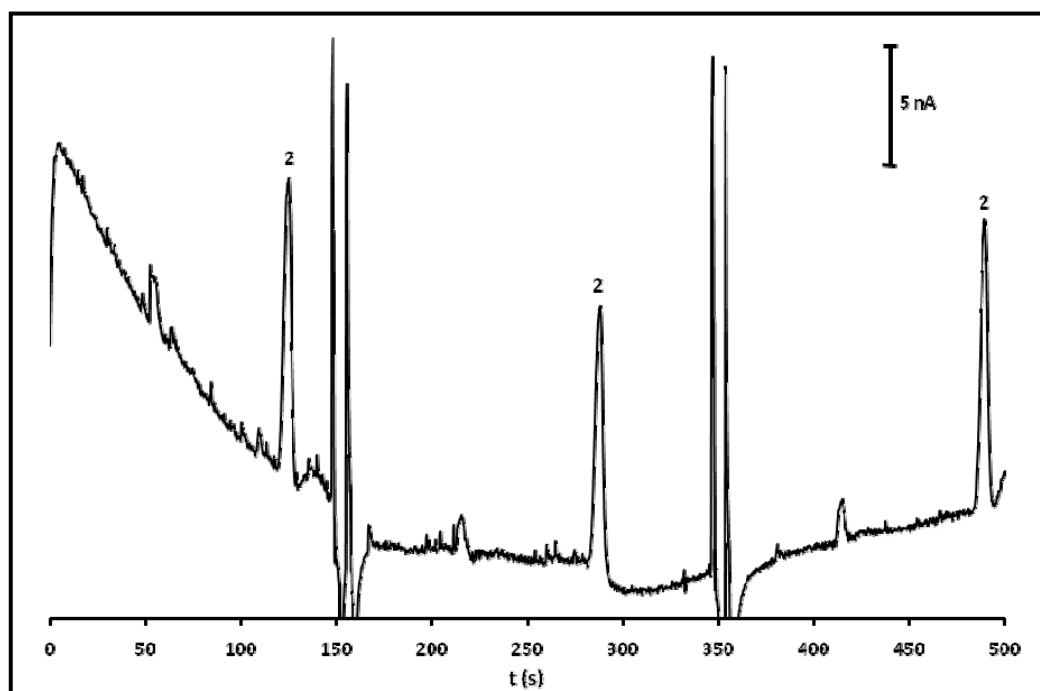


Figura 18. Electroforegramas correspondientes a la inyección por triplicado del fármaco Vitafardi®. Picos: (2) Ácido ascórbico. Condiciones: ver figura 16.

La **figura 19** muestra la estrategia de integración de la calibración y la determinación analítica sobre un esquema del microchip (A) junto con los electroforegramas obtenidos para tres preparados farmacéuticos (B-D) que contenían las tres vitaminas estudiadas. Se analizó primero la muestra farmacéutica (usando uno de los reservorios) y, a continuación, la mezcla de patrones de vitaminas (usando el otro reservorio) que sirvió para llevar a cabo la calibración metodológica y cuantificar las vitaminas de la muestra. El análisis completo se llevó a cabo en menos de 400s. Hay que señalar que en el análisis de Becozyme® (**fig. 19D**) se produjo un aumento de los tiempos de migración de los analitos debido a la gran concentración de sales minerales que presenta dicho preparado.

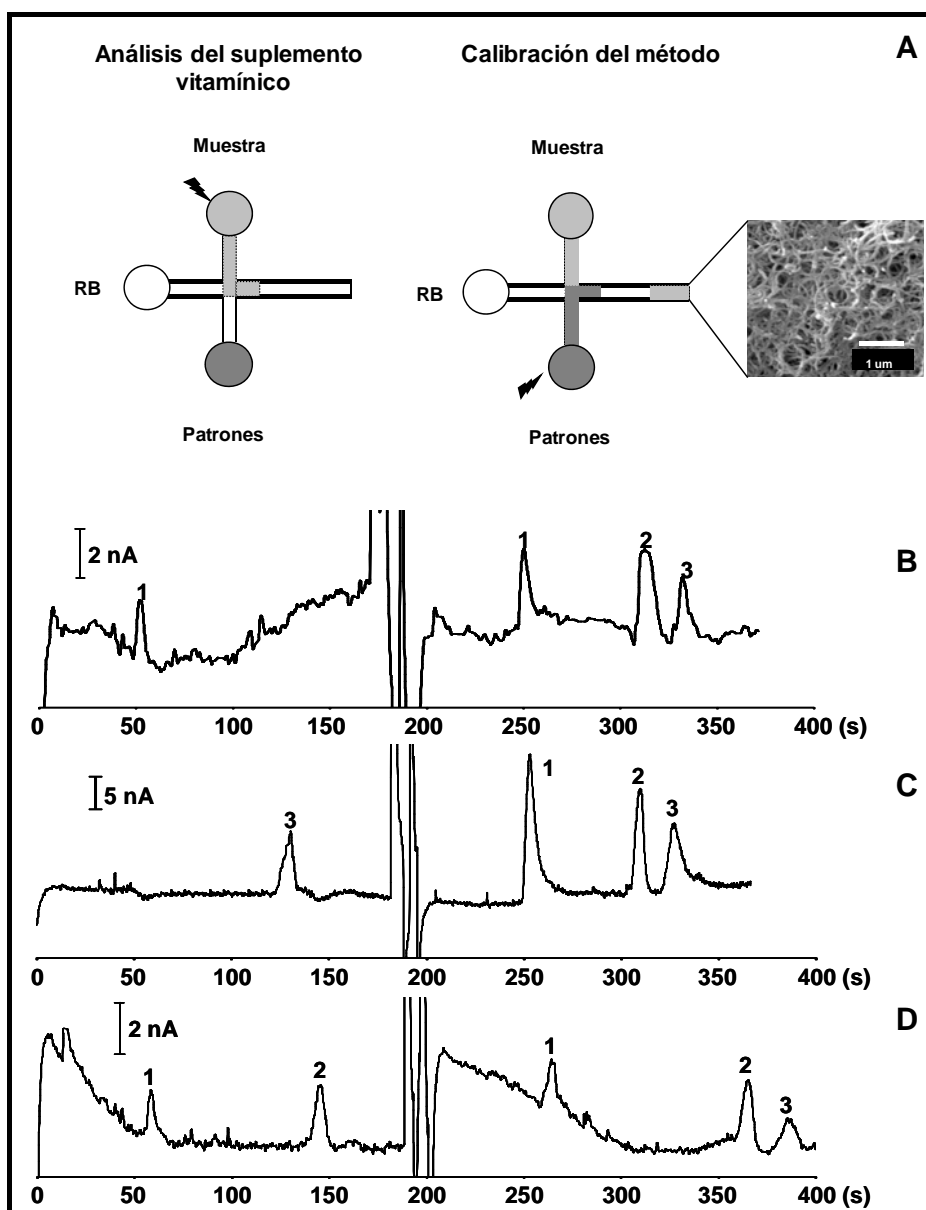


Figura 19. Electroforegramas correspondientes al análisis del preparado farmacéutico (izquierda) y a la calibración (derecha) para las vitaminas estudiadas. (A) Esquema del microchip mostrando la estrategia usada junto con una imagen tomada por SEM x10000 de los MWCNT-A, (B) Hidrosil®, (C) Aspol® y (D) Becozyme®. Picos: (1) Piridoxina, (2) ácido ascórbico y (3) ácido fólico. Condiciones: ver figura 16.

La **tabla 4** recoge los datos cuantitativos obtenidos para el análisis de suplementos vitamínicos y su comparación con los valores declarados por el fabricante. Se obtuvieron errores bajos (menores del 10%) siendo particularmente interesante para el caso del Becozyme® donde se determinaron simultáneamente dos vitaminas, piridoxina y ácido ascórbico, que se encontraban en concentraciones muy distintas (un orden de magnitud de diferencia). Asimismo, es importante destacar el

buen funcionamiento de la estrategia de calibración integrada ya que se obtuvieron errores inferiores a los obtenidos por calibración externa para el análisis de los mismos suplementos vitamínicos (ver apartado II.3.2.3).

Tabla 4. Determinación cuantitativa de vitaminas en preparados farmacéuticos.

Muestra	Analito	Valor obtenido (por cápsula)	Valor declarado (por cápsula)	Error (%)
Hidrosil®	Piridoxina	230 mg ¹	250 mg	8
Vitafardi®	Ácido ascórbico	0.93 g ²	1 g	7
Aspol®	Ácido fólico	9.5 mg ¹	10 mg	5
Becozyne®	Piridoxina	9.7 mg ¹	10 mg	3
	Ácido ascórbico	182 mg ¹	200 mg	9

¹Valores obtenidos mediante calibración integrada.

²Valores obtenidos mediante calibración externa.

III.3.1.3. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafados modificados con CNTs para la determinación de antioxidantes naturales en alimentos.

Como se ha comentado en la introducción, los antioxidantes naturales más abundantes en alimentos, además de la vitamina C, son los polifenoles. Para llevar a cabo este estudio, se han elegido polifenoles representativos de la dieta mediterránea (arbutina, florizina, (+)-catequina y rutina) junto con la vitamina C a fin de realizar un estudio analítico más completo de los antioxidantes naturales.

Una vez seleccionados los antioxidantes, se procedió a construir los voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes utilizando SPE modificado con los distintos nanotubos de carbono (SWCNT, MWCNT-A y MWCNT-B). En la **figura 20** se muestran los HDVs para los polifenoles estudiados. Como puede observarse en la figura, ambos MWCNT se comportaron de manera muy similar produciendo un aumento de la intensidad de corriente y una disminución del potencial de oxidación para todos los compuestos estudiados cuando se comparó con el SPE sin modificar, produciéndose la mayor reducción del sobrepotencial para la florizina (+0.3V, **fig. 20B**). En el caso del SWCNT, su comportamiento fue similar a los MWCNTs para los compuestos arbutina y (+)-catequina pero algo distinto para florizina y rutina tanto en el aumento de la intensidad de corriente como en la disminución del potencial de

oxidación. El aumento de la corriente amperométrica se debió a la gran superficie activa de los CNT como ya se comentó en el apartado anterior (III.3.1.2). Sin embargo, el hecho más destacable fue la notable disminución del potencial de oxidación encontrada para los polifenoles al usar los electrodos modificados con CNTs mostrando inicialmente estos materiales un efecto “electrocatalítico” sobre este tipo de compuestos, visible a través de la mejora de la transferencia electrónica. En base a los HDVs se eligió como potencial óptimo de detección +1.0 V ya que se alcanzaba la meseta de detección para todos los analitos y se obtenía la mejor relación señal/ruido.

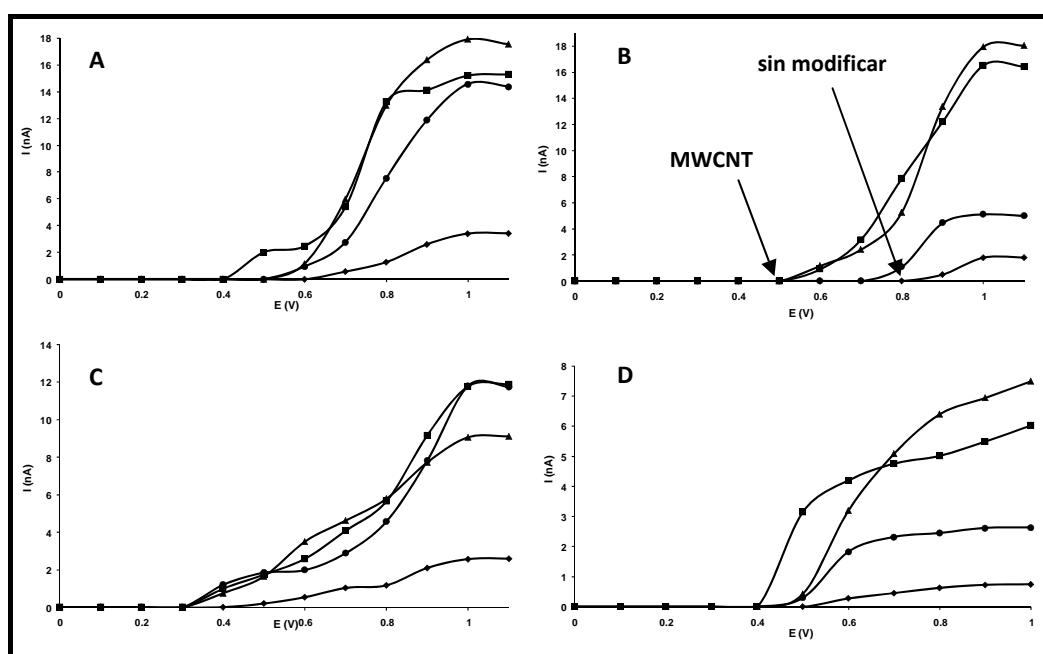


Figura 20. Voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a los polifenoles estudiados utilizando un SPE modificado con distintos CNTs. (A) Arbutina, (B) florizina, (C) (+)-catequina y (D) rutina. Electrodo: ■-MWCNT-A; ▲-MWCNT-B; ●-SWCNT; ◆-SPE sin modificar. Condiciones: Tampón borato (50 mM pH 9), voltaje de separación 2 kV, voltaje de inyección 2 kV durante 5 s, potencial de detección +1.0 V, con HNO₃ 1M en la célula de detección.

Las condiciones de inyección electrocinética, separación electroforética y detección electroquímica fueron previamente optimizadas y en las condiciones óptimas se obtuvo la separación que se muestra en la **figura 21**. Asimismo y como se ha indicado al principio de esta sección, se ha creído conveniente introducir en la separación de los compuestos polifenólicos al ácido ascórbico debido a que es un antioxidante muy potente presente en alimentos. En efecto, en la **figura 21** podemos observar los electroforegramas correspondientes a la separación de una mezcla de

patrones de antioxidantes naturales (arbutina, florizina, (+)-catequina, rutina y vitamina C) mediante microchip de electroforesis capilar con detección electroquímica usando SPE modificado con distintos nanotubos de carbono. La separación de estos cinco antioxidantes se llevó a cabo en tan sólo 250 s.

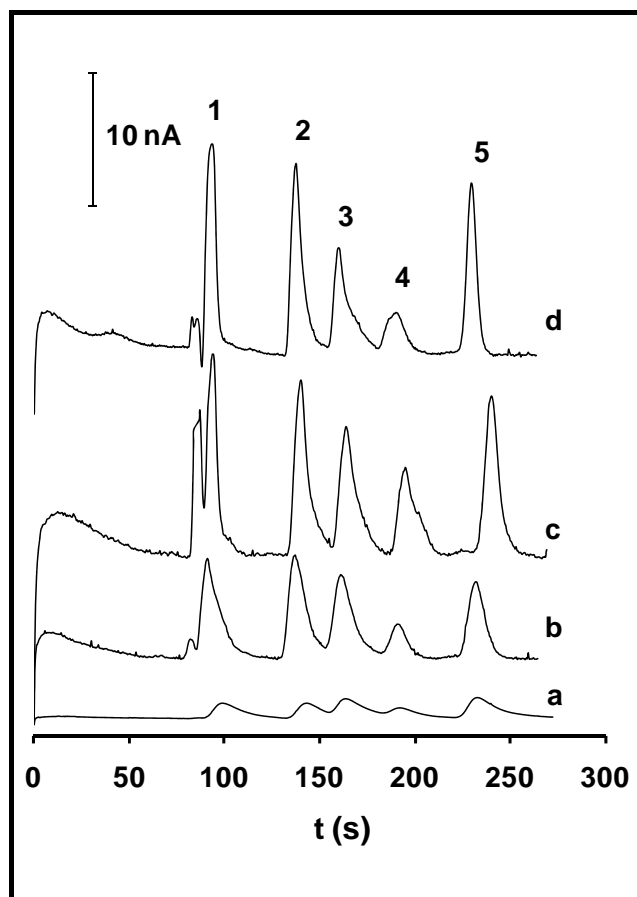


Figura 21. Electroforegramas correspondientes a una mezcla de antioxidantes naturales utilizando SPE modificado con distintos CNTs: (a) sin modificar, (b) SWCNT, (c) MWCNT-B, (d) MWCNT-A. Picos: (1) Arbutina 100 μM , (2) florizina 200 μM , (3) (+)-catequina 200 μM , (4) rutina y (5) ácido ascórbico. Condiciones: Tampón borato (50 mM pH 9), voltaje de separación 2 kV, voltaje de inyección 2 kV durante 5 s, potencial de detección +1.0 V, con HNO_3 1M en la célula de detección.

La **tabla 5** recoge los valores de anchura de pico, número de platos (N) y relación señal/ruido (S/R) para los antioxidantes estudiados utilizando SPE modificados con distintos CNTs. Como puede deducirse de los valores de la tabla, la excelente transferencia electrónica que presentan los CNTs generó una reducción de la anchura de pico y, por tanto, una mejora de la eficacia de la separación (evaluada como número de platos). En efecto, se incrementó el número de platos hasta siete veces

para arbutina y vitamina C. Además, el uso de CNTs fue crucial para la separación de estos compuestos ya que para algunas parejas de picos se obtuvo una resolución entre picos por debajo de 1 (no aceptable para cuantificar) cuando se utilizó SPE sin modificar y valores cercanos a 2 para las mismas parejas utilizando MWCNT (ver **Tabla 6**).

Estos resultados abrieron una interesante posibilidad para los microchip de electroforesis capilar con detección electroquímica (μ CE-ED) ya que, simplemente modificando el detector con CNTs, es posible incrementar la eficacia de la separación, la capacidad de picos y, por tanto, ampliar el número de aplicaciones de estos microsistemas. Como ya se comentó en la introducción (sección III.1.2.3), esta mejora de la separación reside en el aumento de la transferencia electrónica entre los analitos y el electrodo debido a la presencia de los CNTs junto con el comportamiento como detectores coulombimétricos de los detectores amperométricos en configuración *wall-jet*. Asimismo, se pone de manifiesto de nuevo cómo al modificar el SPE con CNTs se produce un gran incremento de la señal amperométrica como ya se vio en los HDVs debido a su alta relación superficie/volumen.

Una vez estudiado el comportamiento de los SPEs modificados con distintos CNTs como detectores amperométricos para microchip de CE-ED, se realizó la calibración metodológica para SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A ya que este último fue el CNT que mostró la mayor sensibilidad junto con las ventajas demostradas por este tipo de materiales (mejora de la eficacia de la separación y reducción del sobrepotencial).

Los parámetros de calibración obtenidos para cada electrodo (SPE y SPE-MWCNT-A) se recogen en la **tabla 7**. Se obtuvieron buenos coeficientes de correlación para todos los analitos usando ambos electrodos. Además, las pendientes de calibración se incrementaron en un orden de magnitud y los límites de detección se redujeron a la mitad cuando se modificó el SPE con MWCNT-A lográndose límites de detección por debajo de 1 μ g/ml para algunos compuestos (arbutina y (+)-catequina). Por tanto, se puede afirmar que los MWCNT-A mejoraron la sensibilidad del método añadiendo, por tanto, una ventaja más a las ya citadas anteriormente.

Tabla 5. Eficacia de la separación y relación señal/ruido para los antioxidantes estudiados utilizando distintos SPE modificados con CNTs.

	Arbutina			Florizina			(+) -catequina			Rutina			Vitamina C		
	$w_{1/2}$	<i>N</i>	<i>S/R</i>	$w_{1/2}$	<i>N</i>	<i>S/R</i>	$w_{1/2}$	<i>N</i>	<i>S/R</i>	$w_{1/2}$	<i>N</i>	<i>S/R</i>	$w_{1/2}$	<i>N</i>	<i>S/R</i>
SPE	15.2	202	612	14.3	510	617	16.7	508	794	17.6	654	412	15.5	1191	828
SWCNT	9.0	568	78	9.3	1206	85	10.1	1411	64	8.8	2610	26	9.4	3378	63
MWCNT-B	5.1	1886	71	7.1	2219	74	8.6	2062	52	9.3	2486	37	7.7	5577	67
MWCNT-A	5.6	1485	172	6.1	2802	163	6.7	3159	86	10.7	1769	32	5.7	8810	146

Tabla 6. Resolución entre picos.

	SPE	SWCNT	MWCNT-B	MWCNT-A
Rs¹	0.78	1.46	1.79	1.91
Rs²	0.98	1.86	2.05	2.05

¹ Resolución entre picos de florizin y (+)-catequina.

² Resolución entre picos de (+)-catequina and rutina.

La precisión del método fue evaluada en términos de reproducibilidad utilizando SPE-MWCNT-A. Se obtuvieron desviaciones estándar relativas (RSD) para la altura de pico por debajo del 10% (n=3) usando el mismo electrodo (reproducibilidad usando el mismo electrodo) pero estos valores crecieron hasta el 26% (n=5) utilizando distintos electrodos (reproducibilidad *inter*-electrodo). Sin embargo, las RSDs para los tiempos de migración fueron inferiores al 6% (n=5) siendo un valor de precisión adecuado para propósitos de identificación provisional.

Tabla 7. Parámetros de calibración.

<i>Analitos</i>	SPE			SPE-MWCNT		
	$b^1 \pm tS_b^2$ (nA· μg^{-1} ·ml)	r	LOD ³ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	$b^1 \pm tS_b^2$ (nA· μg^{-1} ·ml)	r	LOD ³ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Arbutina	0.013±0.002	0.997	1.0	0.28±0.04	0.994	0.5
Florizina	0.006±0.001	0.997	5.0	0.12±0.03	0.993	1.2
(+)-catequina	0.028±0.007	0.993	1.0	0.25±0.03	0.997	0.6
Rutina	0.0021±0.0005	0.994	14.3	0.021±0.01	0.999	7.1
Vitamina C	0.007±0.001	0.998	4.5	0.07±0.02	0.994	2.0

¹ b pendiente de calibración ($y=a+bx$).

² Intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

³ Calculado con el ruido experimental ($S/N=3$).

A continuación, se estudiaron las posibilidades analíticas de este método en muestras reales. Para ello, se eligieron distintas variedades de peras y manzanas como muestras representativas de alimentos que contienen antioxidantes naturales.

El primer paso fue demostrar en muestras reales las ventajas descritas anteriormente para patrones de antioxidantes usando MWCNT-A. En la **figura 22**, se pueden observar los electroforegramas obtenidos al analizar matrices de pieles de manzana (**fig. 22A**) y pera (**fig. 22B**) utilizando un SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A. En el análisis de la piel de manzana (variedad *Golden*) aparecieron dos picos ((+)-catequina y rutina) que se diferenciaban claramente cuando se usó el SPE-MWCNT-A pero apenas visibles cuando se usó el SPE sin modificar. En cuanto al análisis de la piel de pera (variedad *blanquilla*), cuando no se modificó el SPE, no se detectaron picos (**fig. 22B (a)**), pero cuando se modificó con MWCNT-A se detectaron dos picos (arbutina y (+)-catequina) (**fig. 22B (b)**), por lo que el uso de este material resultó indispensable para el análisis de esta muestra.

La identificación provisional de los picos que aparecieron en las muestras reales se realizó mediante la fortificación con patrones de los analitos sobre la muestra real ya que por comparación de los tiempos de migración de los patrones no fue posible (variaciones en los tiempos de migración de los compuestos en la muestra real debido a cambios en el pH y la fuerza iónica).

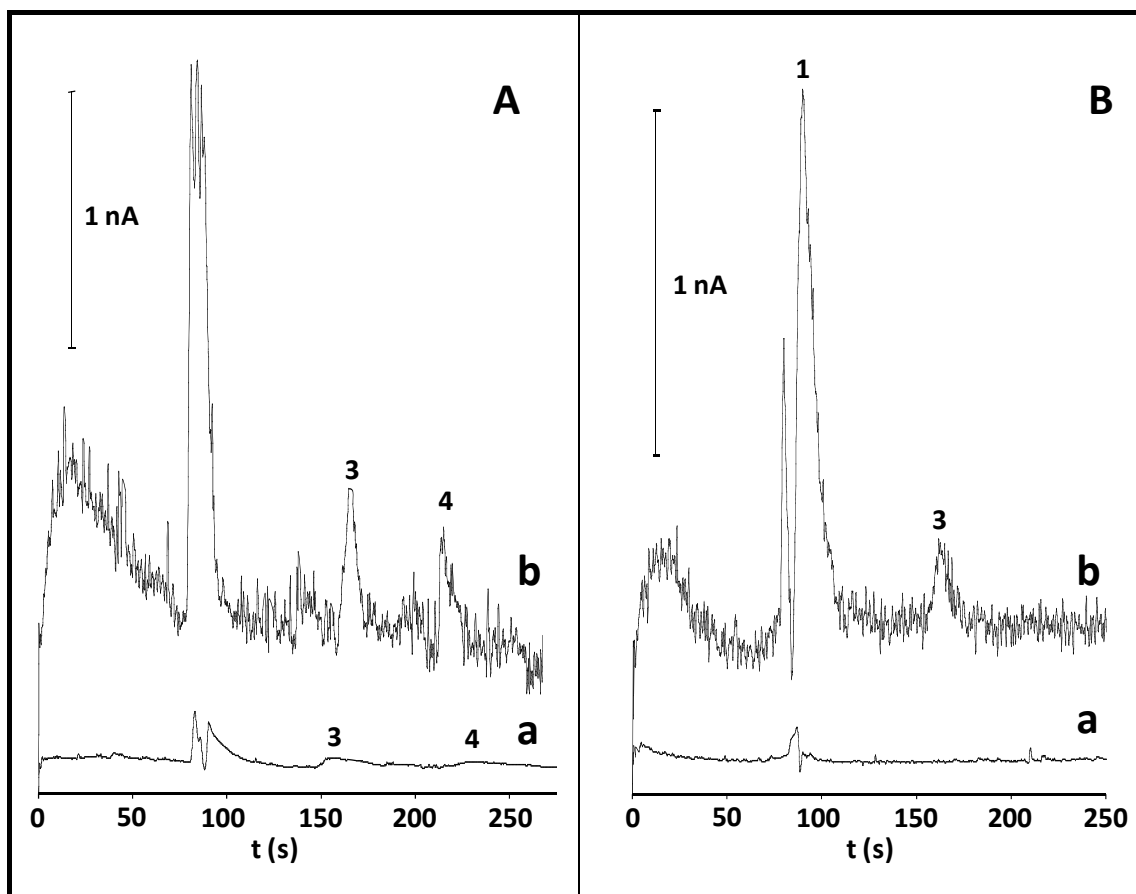


Figura 22. Electroforegramas correspondientes a una piel de manzana, variedad *Golden* (A), y pera, variedad *Blanquilla* (B), con SPE sin modificar (a) y SPE-MWCNT-A (b). Picos: (1) Arbutina, (3) (+)-catequina y (4) rutina. Condiciones: ver figura 21.

La **figura 23** muestra los electroforegramas obtenidos durante la identificación provisional de picos tanto en piel de manzana (**fig. 23A**), variedad *Granny Smith*, como en piel de pera (**fig. 23B**), variedad *Blanquilla*. En el electroforegrama correspondiente al extracto de piel de manzana aparecen dos picos (**fig. 23A (a)**), cuando se añadió rutina a este extracto el segundo pico aumentó (**fig. 23A (b)**) identificándose como

rutina. Además, cuando al extracto de manzana se le añadió (+)-catequina el primer pico aumentó (**fig. 23A (c)**) identificándose como dicho compuesto.

En el electroforeograma obtenido para la piel de pera (**fig. 23B (a)**) aparecen dos picos que fueron identificados de manera análoga a la muestra de manzana, como arbutina (**fig. 23B (b)**) y (+)-catequina. La arbutina es un compuesto polifenólico característico de las peras por lo que su identificación confirmó la viabilidad del método en el dominio cualitativo. Para manzanas existe otro compuesto polifenólico característico que es la florizina, sin embargo, este polifenol no fue detectado en las muestras analizadas porque se encuentra en muy baja concentración [72]. Para demostrar la capacidad del método para determinar simultáneamente los dos compuestos polifenólicos característicos en una muestra real, se añadió 10 ppm de florizina a la muestra de piel de pera (ver **figura 23B (c)**). La florizina añadida fue detectada junto con arbutina y (+)-catequina con una excelente resolución entre picos.

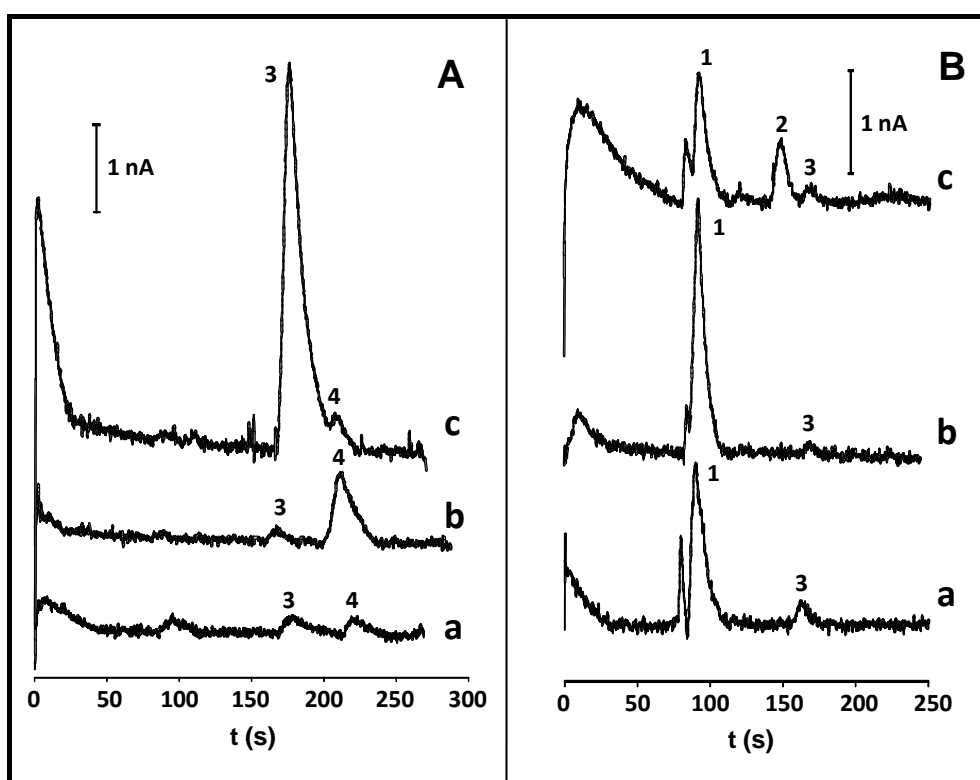


Figura 23. Electroforegramas correspondientes a extractos de piel de frutas utilizando MWCNT-A. (A) Manzana variedad *Granny Smith*: (a) extracto puro, (b) extracto reforzado con 50 ppm de rutina y (c) extracto reforzado con 25 ppm de (+)-catequina. (B) Pera variedad *Blanquilla*: (a) extracto puro, (b) extracto reforzado con 5 ppm de arbutina, (c) extracto reforzado con 10 ppm de florizina. Picos: (1) arbutina, (2) florizina, (3) (+)-catequina y (4) rutina. Condiciones: ver figura 21.

Por último, la **figura 24** muestra el análisis de pulpa (a) y piel (b) de manzana (A), variedad *Granny Smith*, y de pera (B), variedad *Conferencia*. La rutina es un compuesto que solamente se encuentra en pieles de fruta y no en pulpas luego su detección es una prueba inequívoca del origen de la muestra. En el análisis de ambas frutas, este compuesto fue detectado en pieles (**fig. 24 b**) pero no en pulpas (**fig. 24 a**) como era de esperar. Además, la intensidad de los picos fue menor en pulpas que en pieles porque el contenido polifenólico en frutas es siempre mayor en pieles que en pulpas [73]. En conclusión, este método también puede discriminar entre productos que contienen piel de frutas de los que contienen solo pulpa.

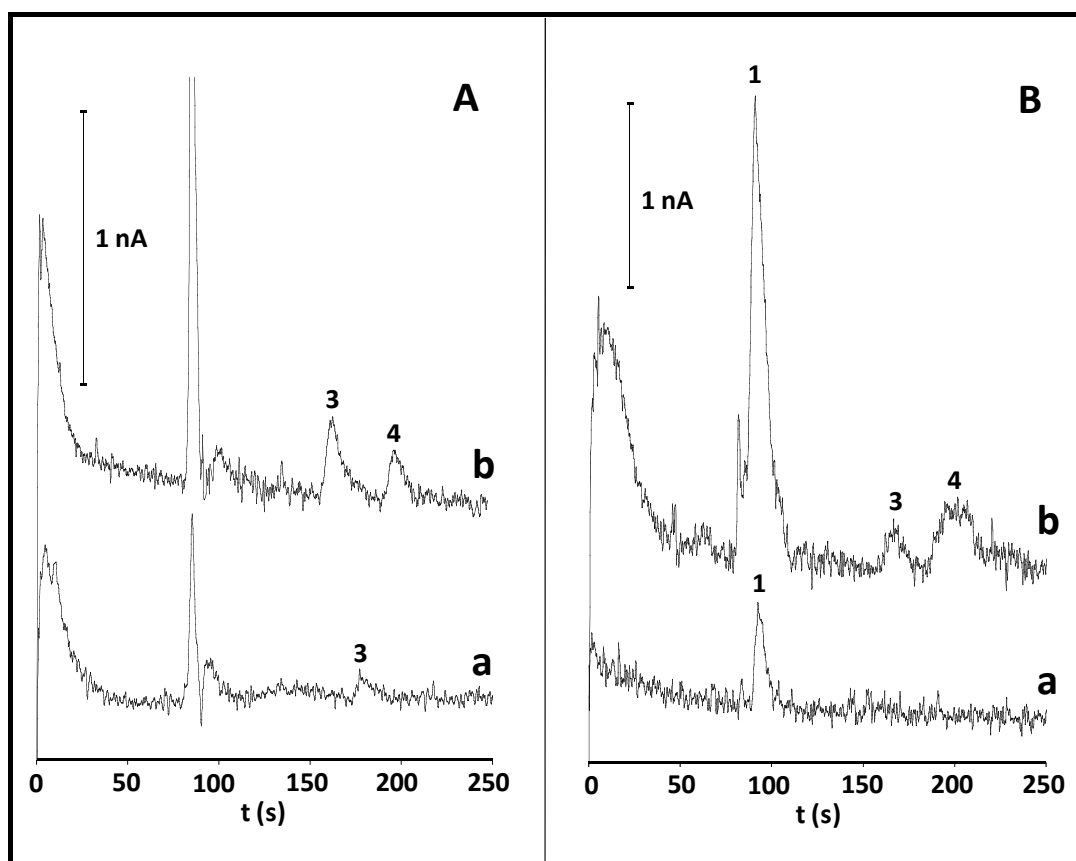


Figura 24. Electroforegramas correspondientes al análisis de extractos de frutas con SPE-MWCNT-A. (A) Manzana *Granny Smith*, (B) Pera de *Conferencia*. a) Pulpa, b) piel. Picos: (1) arbutina, (3) (+)-catequina y (4) rutina. Condiciones: ver figura 21.

III.3.1.4. Nuevos detectores electroquímicos basados en electrodos de carbono serigrafados modificados con CNTs para la determinación de isoflavonas totales en alimentos.

Los microchips de CE como plataforma microfluídica electrocinética pueden ser entendidos también como una plataforma para llevar a cabo análisis voltamperométricos en la microescala. El concepto se basa en el diseño de protocolos de introducción de muestra acoplados directamente a sistemas de detección o caracterización electroquímica sin interfase alguna. El sistema microfluídico permitiría la manipulación y el control de volúmenes de muestra extremadamente pequeños (nL) para llevar a cabo tareas de inyección o preparación de muestra. Esta aproximación tiene algunas ventajas sobre la nanovoltamperometría la cual no permite la toma y preparación de muestra y carecen de la capacidad de controlar y manipular fluidos [74]. Esta nueva visión analítica del empleo de chips microfluídicos se ha aplicado a la determinación de isoflavonas totales en muestras de soja usando el microchip como un sistema miniaturizado de análisis por inyección en flujo (μ -FIA) siendo éste electrocinético en lugar de hidrodinámico.

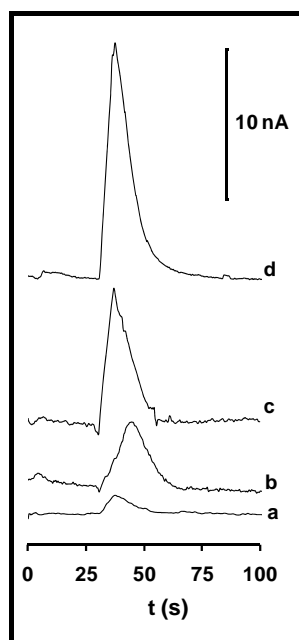


Figura 25. Electroforegramas correspondientes a 20 μ M de genisteína para los electrodos estudiados. SPE sin modificar (a), SWCNT (b), MWCNT-B (c) y MWCNT-A (d). Condiciones: Tampón borato 10 mM pH=8, voltaje de bombeo 2 kV, inyección a 2 kV durante 6 s.

Las variables electrocinéticas para llevar a cabo la determinación de isoflavonas totales mediante el uso del microchip (voltaje y tiempo de inyección, voltaje de transporte y disolución transportadora) fueron optimizadas previamente [70]. La **figura 25** muestra los electroforegramas obtenidos para un patrón de genisteína utilizando SPE modificados con distintos CNTs y sin modificar con el propósito de elegir el mejor material electrodo. Se puede apreciar claramente como el SPE modificado con MWCNT-A mostró la señal más alta y, además, fue el CNT que generó menor ruido. Este mismo comportamiento se describió para los MWCNT-A durante la determinación de vitaminas y antioxidantes naturales por lo que fueron elegidos de nuevo como el mejor material para la detección electroquímica.

Para estudiar el efecto de CNTs sobre la respuesta voltamperométrica y, además, seleccionar el potencial óptimo de detección, se construyeron los correspondientes voltamperogramas hidrodinámicos (HDV) para el SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A que se muestran en la **figura 26**. De nuevo, se puede observar el aumento notable de la señal voltamperométrica al modificar el SPE con MWCNT-A, todo ello, debido a la gran superficie activa de estos materiales. Además, se produjo un adelanto del potencial de detección en +0.1 V, es decir, se mejoró la reacción de transferencia electrónica al usar MWCNT-A. En este caso, dado que el objetivo analítico era la determinación de isoflavonas totales, se eligió como potencial de detección el que ofrecía mayor sensibilidad (+1.2 V).

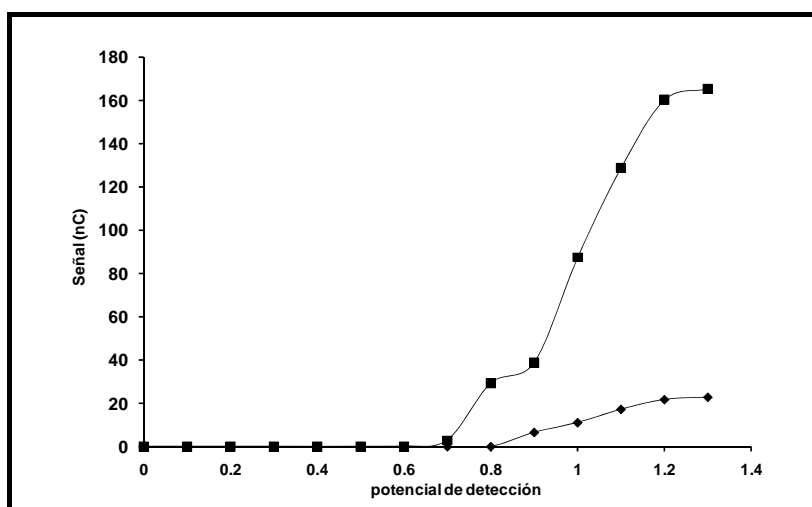


Figura 26. Voltamperogramas hidrodinámicos correspondientes a genisteína utilizando SPE sin modificar (◆) y SPE-MWCNT-A (■).

Una vez seleccionado el potencial de detección, se construyeron los gráficos de calibración externa utilizando genisteína como patrón y empleando como detectores dos tipos de electrodos: SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A. En la **tabla 8** se muestran las características de las rectas obtenidas. Como se observa, la sensibilidad, en términos de pendiente de calibración, es mayor (más de diez veces) para MWCNT-A que para SPE sin modificar, además, el incremento del ruido al modificar el electrodo fue ligero (no mostrado). Esto se tradujo en una disminución del límite de detección ampliándose, por tanto, las aplicaciones potenciales de este microsistema analítico. Además este límite de detección alcanzado es al menos un orden de magnitud inferior que aquellos obtenidos por otros autores con técnicas de detección electroquímicas [75, 76].

Tabla 8. Parámetros correspondientes a las rectas de calibración externas para genisteína usando SPE y SPE-MWCNT-A.

Material	Intervalo lineal (μM)	$a^1 \pm tS_a^2$ (nC)	$b^1 \pm tS_b^2$ (nC/ μM)	r	LOD ³ (μM)
SPE sin modificar	1-50	3.9 \pm 1.6	0.47 \pm 0.06	0.998	0.04 ²
MWCNT-A	1-50	3.3 \pm 9.8	5.9 \pm 0.4	0.999	0.01 ²

¹ Recta de regresión: $y=a+bx$ donde "y" es el área de pico (nanoculombios) y "x" la concentración (μM).

² Intervalo de confianza ($\alpha=0.05$).

³ Calculado con el ruido experimental ($S/N=3$).

El método propuesto se evaluó en términos de precisión y exactitud. Se realizaron estudios de precisión de las señales obtenidas, entre días y en el mismo día, utilizando tanto un patrón de genisteína como el material de referencia proporcionado por *Exxentia* (ver sección experimental III.2.1.1).

Los estudios de exactitud se llevaron a cabo aplicando el método propuesto de determinación de isoflavonas totales utilizando el patrón secundario de referencia de isoflavonas suministrado por *Exxentia*. En estos estudios, se empleó la estrategia denominada *calibración integrada*, explicada anteriormente. En este caso concreto, la estrategia consistió en introducir en uno de los reservorios del microchip una cantidad conocida de patrón de genisteína (reservorio de calibración) y en el otro la muestra problema que contiene isoflavonas (reservorio de la muestra). A continuación y como en el caso de las vitaminas, se inyecta el patrón de genisteína obteniéndose una señal

a partir de la cual podemos obtener el factor de calibración ($f_{\text{calibración}} = \text{Señal}_{\text{Genisteína}} / [\text{Genisteína}]$) ya que el valor de la ordenada en el origen puede ser estadísticamente cero (ver **Tabla 8**). Después, se inyecta la muestra problema y se calcula el contenido total de isoflavonas dividiendo la señal obtenida para dicha muestra entre el factor de calibración ($\text{Señal}_{\text{Muestra}} / f_{\text{calibración}} = [\text{Isoflavonas totales}]$).

Adicionalmente, para la determinación de isoflavonas totales se exploraron dos modos operacionales en base al concepto de *calibración integrada*; uno que consistió en realizar tres inyecciones repetidas de patrón de genisteína y de material de referencia de *Exxentia* (Modo A, ver **figura 27A**) y otro que consistió en inyectar una vez el patrón de genisteína y tres veces el material de referencia de *Exxentia* (Modo B, ver **figura 27B**). En esta figura se puede apreciar como la anchura de pico de la señal de isoflavonas totales es mayor que la del pico de Genisteína debido a la variedad de estructuras de isoflavonas presentes en dicha señal que no migran exactamente igual. Este hecho obligó a realizar tanto la calibración como la cuantificación considerando el área de pico y no la altura del mismo.

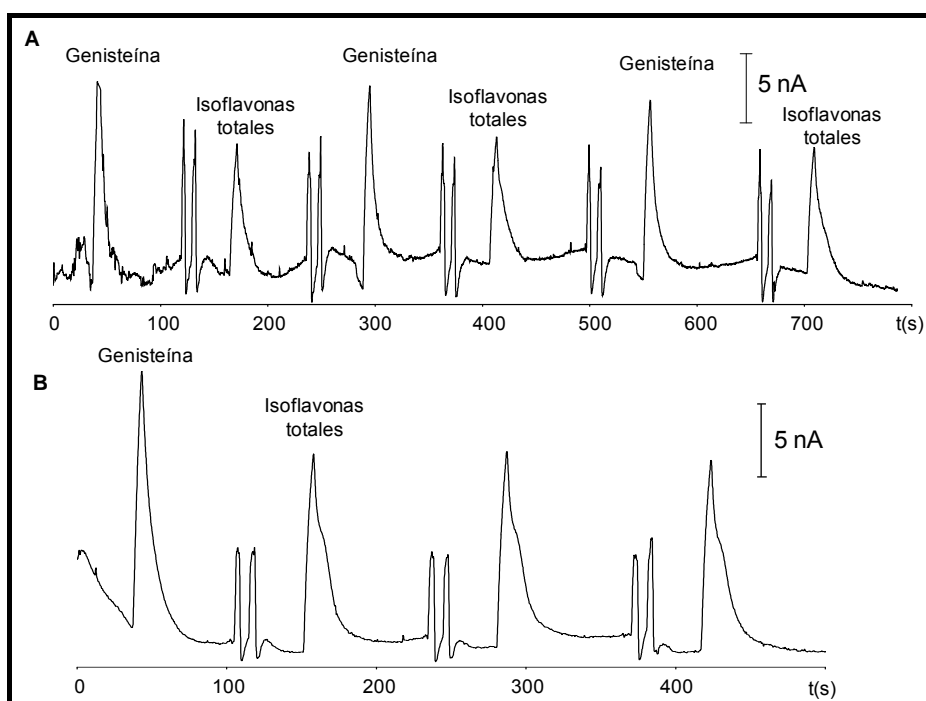


Figura 27. Electroforegramas correspondientes a los modos operacionales propuestos (A y B) para la determinación del contenido en isoflavonas totales del material secundario de referencia suministrado por *Exxentia*. Condiciones: ver figura 25.

La estrategia de calibración y determinación de isoflavonas totales se llevó a cabo en tan sólo 200 s reduciendo drásticamente los tiempos registrados por otras técnicas. Además, los resultados en términos de precisión fueron excelentes y similares en ambos modos operacionales obteniéndose desviaciones estándar relativas (RSD) inferiores al 7% para ambas señales (ver **Tabla 9**).

Tabla 9. Parámetros de precisión y exactitud para los dos modos operacionales utilizados en el microsistema analítico.

Modo (A) Ciclo secuencial de genisteína y determinación de isoflavonas totales en muestra (n=3)							
Calibración de genisteína				Isoflavonas totales			
$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Área (nC)	RSD (%)	$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Área (nC)	RSD (%)
44.2±0.5	1	107±4	4	37.6±0.6	2	102±2	2
Modo (B) Calibración de genisteína y determinación por triplicado de isoflavonas totales en la muestra							
Calibración de genisteína¹				Isoflavonas totales			
$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Área (nC)	RSD (%)	$t_m \pm s$ (s)	RSD (%)	Área (nC)	RSD (%)
40±3	7	171±8	5	37.1±0.9	2	107±2	2

¹reproducibilidad (datos obtenidos en días distintos)

Una vez demostrada la reproducibilidad del método, se procedió a validarlo determinando el contenido en isoflavonas totales de un patrón secundario de referencia y dos extractos de soja, todos ellos, suministrados por *Exxentia* y de contenido en isoflavonas perfectamente conocido, y, finalmente, en unas pastillas de isoflavonas de soja comerciales (con el valor suministrado por el fabricante). Estas muestras presentaban una composición y cantidad en isoflavonas de soja muy distintas entre sí. El análisis se realizó por triplicado utilizando el modo operacional (A). En la **figura 28** se muestran una selección de electroforegramas de las muestras analizadas.

La **tabla 10** muestra los resultados obtenidos para el conjunto de extractos estudiados así como la información referente a la composición de los mismos. Estos resultados fueron muy buenos si se contextualizan en el ámbito de los sistemas

miniaturizados, obteniéndose una precisión en términos de RSD del 4% y errores sistemáticos inferiores al 6% respecto al valor etiquetado por los fabricantes.

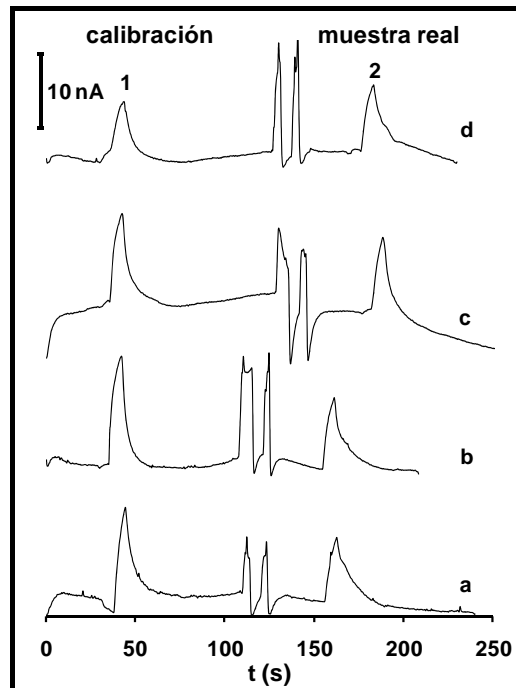


Figura 28. Electroforegramas correspondientes al análisis de muestras reales usando la estrategia de la calibración integrada. (a) Patrón secundario de referencia de *Exxentia*, (b) extracto de soja 1, (c) extracto de soja 2, (d) suplemento dietético GSN®. Picos: (1) Genisteína, (2) Isoflavonas totales. Condiciones: ver figura 25.

Tabla 10. Determinación de isoflavonas totales en muestras derivadas de soja.

Muestra	Composición (% _{w/w})	Valor obtenido (% _{w/w})	RSD (%)	Valor de referencia	Error (%)
Material de referencia (<i>Exxentia</i>)	(bajo patente)	44.2±1.0 % _{w/w}	2	45.8 %	4
Extracto de soja 1	Daidzina (12.5)	41.5±1.6 % _{w/w}	4	44.2 % _{w/w}	6
	Genistina (29.2)				
	Daidzeína (0.2)				
	Genisteína (0.5)				
	Glicitina (1.6)				
Gliciteína (0.2)					
Extracto de soja 2	Daidzin (3.1)	41.5±1.7 % _{w/w}	4	42 % _{w/w}	1
	Genistin (2.8)				
	Daidzein (17.6)				
	Genistein (18.5)				
Suplemento dietético GSN®	Daidzina/Daidzeína (5.3) ¹ Genistina/Genisteína (24.0) ¹ Glicitina/Gliciteína (0.7) ¹	28.1±0.7 mg/cápsula	2	30 mg/cápsula	6

¹ mg de isoflavona por cápsula.

III.3.1.5. Estudio fundamental sobre el comportamiento electrocatalítico preferente de los nanotubos de carbono sobre compuestos que poseen grupos enodiol.

Como se ha mostrado con anterioridad, durante la exploración de los CNTs como detectores electroquímicos se registró la disminución del potencial de oxidación para ciertos analitos y para otros no, es decir, este material mostró un efecto electrocatalítico “preferencial” sobre determinados compuestos.

Desde nuestro punto de vista, las principales implicaciones analíticas de la electrocatálisis de los nanotubos de carbono permanecen todavía sin ser discutidas ni explotadas completamente. Este nanomaterial podría tener un papel predominante en los procesos analíticos con respecto al gobierno de la selectividad y de la sensibilidad del análisis ya que estos pueden potencialmente disminuir el sobrepotencial de las reacciones redox y aumentar las corrientes voltamperométricas. Este efecto electrocatalítico no-universal, es decir, el descenso del sobrepotencial de las reacciones redox, se ha descrito para distintas biomoléculas y biomarcadores tales como aminoácidos [82], NADH [83], citocromo c [84], carbohidratos [85], insulina [86], biomoléculas con grupos tiol [87], homocisteína [88], morfina [89], L-tirosina [90], ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) [91], dopamina [92-95], epinefrina [93] y ácido ascórbico [93, 95]. Sin embargo, tras una cuidadosa lectura de estos trabajos, sorprendentemente, nadie ha propuesto ninguna relación entre la estructura química de los compuestos analizados y el efecto electrocatalítico observado, la cual podría resultar muy útil a la comunidad analítica.

Para explorar y comprender mejor el papel de los nanotubos de carbono sobre la selectividad y la sensibilidad en el análisis, se exploraron una serie de compuestos de alto impacto e interés en distintos campos analíticos (farmacéutico, cosmético y alimentario) algunos de ellos estudiados previamente en esta Tesis. El principal objetivo de este estudio fue encontrar qué analitos son susceptibles de ser electrocatalizados y cuáles no, ayudando de este modo al futuro diseño de nuevas aplicaciones electroanalíticas utilizando CNTs.

Los analitos escogidos para este estudio fueron piridoxina, vainillina, maltol, ácido fólico, genisteína, ácido ascórbico, hidroquinona y (+)-catequina. Asimismo, el

grafito fue elegido como material para llevar a cabo el control electroquímico de los experimentos ya que tanto los CNTs como el grafito presentan la misma composición química (carbonos sp^3) pero distinta estructura y geometría espacial siendo estos últimos el origen de las propiedades excepcionales de los CNTs. Todos estos materiales fueron sometidos al mismo proceso de purificación (ver sección III.2.1.1). Se realizaron voltamperometrías cíclicas de los compuestos seleccionados usando un electrodo serigrafiado (SPE) sin modificar y modificado con los distintos materiales de carbono estudiados (MWCNT-A, MWCNT-B y grafito). No se exploraron los SWCNT porque durante los estudios anteriores mostraron siempre una respuesta electroquímica inferior a los MWCNTs.

Tabla 11. Potenciales redox para los compuestos estudiados utilizando distintos electrodos de carbono.

Grupo electroactivo	Compuestos	SPE	grafito	MWCNT-B	MWCNT-A
Derivado del alcohol bencílico	Vainillina	+0.60	+0.58	+0.58	+0.58
	Piridoxina	+0.73	+0.73	+0.71	+0.72
Enol	Ac. fólico	+0.80	+0.70	+0.71	+0.71
	Maltol	+0.66	+0.63	+0.63	+0.62
	Genisteína	+0.56	+0.49	+0.50	+0.51
Enodiol	Ac. ascórbico	+0.41	+0.09	+0.04	+0.03
	Hidroquinona	+0.31 ^a	+0.10 ^a	+0.09 ^a	+0.09 ^a
		-0.07 ^b	+0.01 ^b	+0.01 ^b	+0.01 ^b
	(+)catequina	+0.33 ^a	+0.20 ^a	+0.19 ^a	+0.20 ^a
		+0.04 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b

^a Barrido anódico.

^b Barrido catódico.

En la **tabla 11** se muestra la clasificación propuesta para los compuestos en base a su grupo electroactivo y los valores de potenciales redox obtenidos usando cada tipo de electrodo. Si se estudian estos valores puede decirse que el comportamiento electroquímico del grafito, MWCNT-A y MWCNT-B fue idéntico independientemente del grupo estudiado, además, considerando el tipo de electrodo usado, no se obtuvieron diferencias notables para el grupo *derivado del alcohol bencílico* formado por piridoxina y vainillina (diferencias inferiores a 20 mV) ni para el grupo denominado *enol* formado por genisteína, maltol y ácido fólico (diferencias que variaron entre 30 y 100 mV). Sin embargo, se encontró un comportamiento totalmente distinto para el

tercer grupo (*enodiol*) con diferencias en los valores de potencial de oxidación superiores a 130 mV entre el SPE sin modificar y el resto de electrodos modificados. Resulta interesante indicar que todos estos compuestos contengan un grupo *enodiol* en su estructura química como centro electroactivo. Éste denominado grupo *enodiol* está formado no sólo por ácido ascórbico e hidroquinona (analitos modelo en electroquímica) sino también por (+)-catequina revelándose inicialmente una potencial relación entre estructura química y el efecto electrocatalítico de los CNTs.

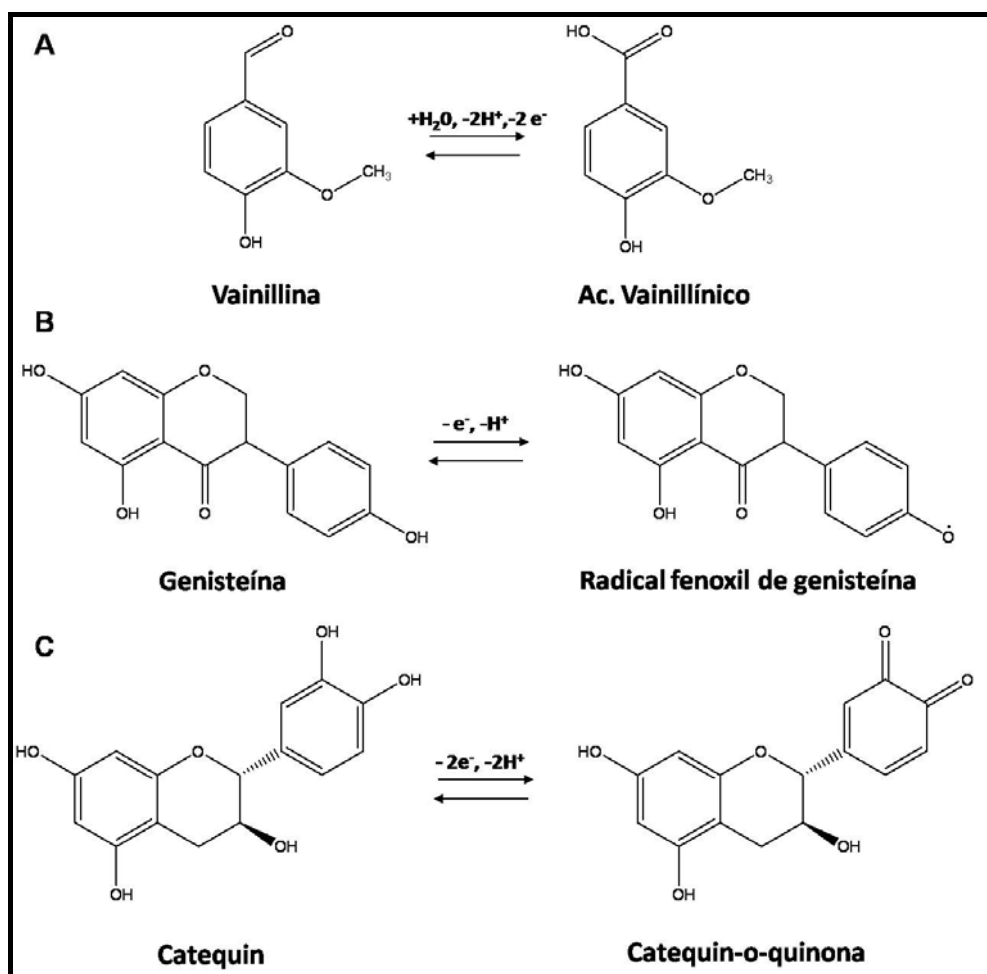


Figura 29. Estructuras moleculares correspondientes a los compuestos estudiados y clasificados en base a su grupo electroactivo y mecanismo de oxidación. (A) Derivado del alcohol bencílico, (B) enol y (C) enodiol.

En la **figura 29** se muestran las estructuras moleculares seleccionadas para cada grupo indicado en la **tabla 11** (vainillina, genisteína y (+)-catequina) junto con sus productos de oxidación correspondientes y en la **figura 30** los perfiles voltamperométricos obtenidos con los distintos electrodos utilizados. Aunque el efecto

electrocatalítico era esperado para ácido ascórbico e hidroquinona, el mismo efecto se observó para (+)-catequina, un compuesto de alto interés alimentario que potencialmente abre la puerta de la electrocatalisis a otros flavonoides y moléculas relacionadas.

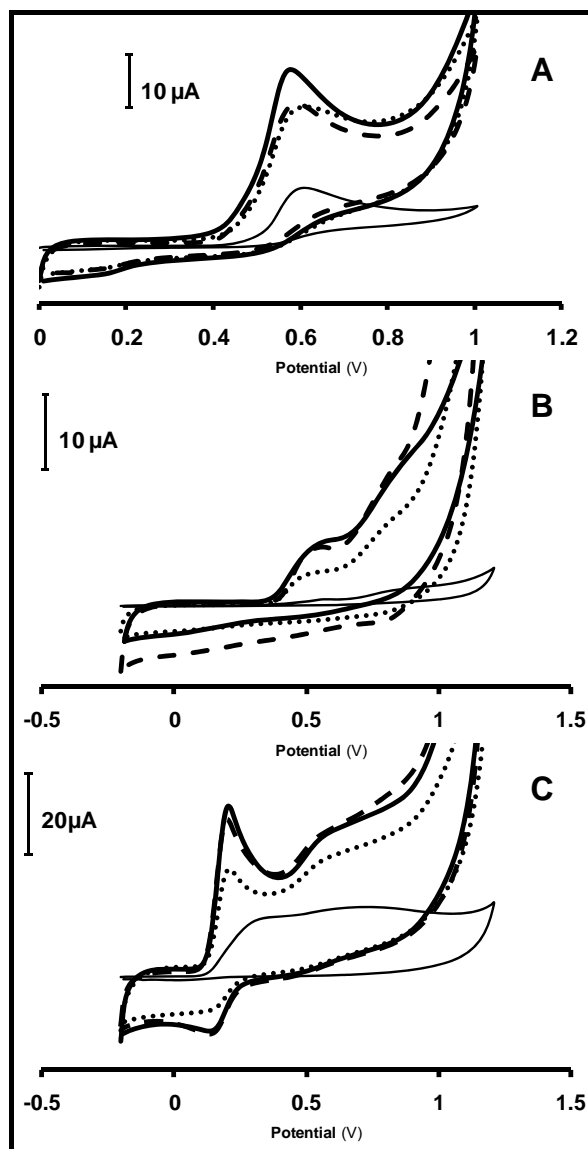


Figura 30. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a vainillina 1mM (A), genisteína 0.1mM (B) y (+)-catequina 1mM (C) utilizando SPE modificado con distintos materiales de carbono; sin modificar (línea delgada), grafito (línea punteada), MWCNT-B (línea rayada) y MWCNT-A (línea gruesa). Condiciones: velocidad de barrido 100mV/s, paso de potencial 0.01V.

Asimismo, tal y como se había indicado antes, el hallazgo más interesante radicaba en que la característica en común que unía a estas tres moléculas (ácido

ascórbico, hidroquinona y (+)-catequina) era la presencia de un enodiol como grupo electroactivo. En aras de conocer si este grupo es electrocatalizado con independencia de la posición relativa de sus alcoholes sustituyentes, es preciso indicar que la posición de los grupos hidroxilos dentro del anillo bencénico solamente se habían estudiado las posiciones *para* y *orto* (hidroquinona y (+)-catequina, respectivamente). Por tanto, cabría preguntarse si este mismo efecto sucedería para la configuración *meta*. Para comprobarlo, se investigó la molécula de resorcinol (1,3-dihidroxibencenodiol) encontrándose un comportamiento electroquímico similar al grupo *enol* (descenso del sobrepotencial de 70 mV para todos los materiales comparado con el SPE sin modificar), es decir, el resorcinol se comportó en términos electroquímicos como un fenol debido a la falta de conjugación que hay entre los dos grupos hidroxilo confirmándose así la idoneidad de la clasificación propuesta. En resumen, el efecto electrocatalítico preferencial está relacionado con las configuraciones enodiol *conjugadas*. Además y sin ninguna excepción, las corrientes voltamperométricas mayores se obtuvieron para los MWCNTs convirtiéndolos en la superficie electródica ideal para la detección electroquímica de compuestos con grupos enodiol.

Para poder controlar y reproducir el efecto electrocatalítico observado sobre los enodios, el origen de esta electrocatalisis debe ser investigado. Con tal motivo, se eligieron ácido ascórbico, hidroquinona y (+)-catequina como enodios representativos.

En la introducción de capítulo de la Tesis, se expuso que las propiedades electrocatalíticas de los CNTs sobre H_2O_2 e hidracina se debían a la presencia de nanopartículas catalíticas metálicas. Como el comportamiento electroquímico del grafito y los CNTs fue idéntico, las impurezas de nanopartículas de óxidos metálicos presentes en los CNTs no deberían ser las responsables de la mejora de la transferencia electrónica porque el grafito no las contiene. De cualquier modo, para confirmar esta afirmación se analizaron los MWCNTs mediante TEM-EDX y se encontraron impurezas de Ni y Fe (MWCNT-A, 89% Ni and 11% Fe; MWCNT-B, 88% Ni and 12% Fe respecto el total de impurezas metálicas encontradas). En consecuencia, se prepararon SPEs modificados con nanopartículas Ni_2O_3 y Fe_3O_4 y se utilizaron como electrodos de trabajo para realizar una voltamperometría cíclica del ácido ascórbico,

hidroquinona y (+)-catequina (ver **fig. 31**). Sin ninguna excepción, los potenciales redox obtenidos con SPE-Ni₂O₃ y SPE-Fe₃O₄ fueron similares a los obtenidos con SPE sin modificar. Además, los sobrepotenciales redox fueron claramente mayores que los obtenidos con el SPE-MWCNT-A (ver **tabla 12**) confirmándose que las nanopartículas metálicas residuales no están significativamente implicadas en el aumento de la velocidad de transferencia electrónica de los CNTs para estos compuestos.

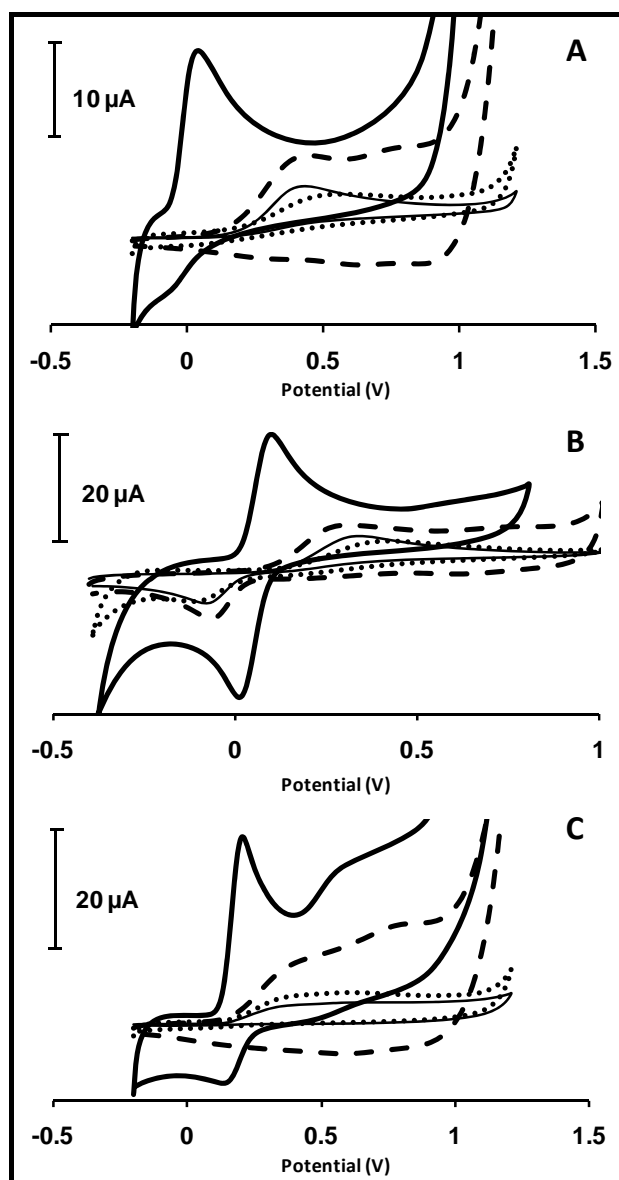


Figura 31. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a (A) ácido ascórbico, (B) hidroquinona y (C) (+)-catequina usando SPEs modificados; sin modificar (línea delgada), partículas de Fe₃O₄ (línea punteada), partículas de NiO (línea rayada) y MWCNT-A (línea gruesa). Condiciones: velocidad de barrido 100mV/s, paso de potencial 0.01V.

Tabla 12. Potenciales redox para SPE modificado con partículas de óxidos metálicos.

	<i>SPE</i>	<i>SPE-NiO</i>	<i>SPE-Fe₂O₃</i>	<i>SPE-MWCNT-A</i>
Ac. ascórbico	+0.41	+0.39	+0.48	+0.03
Hidroquinona	+0.31 ^a	+0.28 ^a	+0.38 ^a	+0.09 ^a
	-0.07 ^b	-0.06 ^b	-0.10 ^b	+0.01 ^b
(+)-catequina	+0.33 ^a	+0.37 ^a	+0.40 ^a	+0.20 ^a
	+0.04 ^b	-	+0.08 ^b	+0.15 ^b

^a barrido anódico^b barrido catódico

Si las partículas metálicas no fueron responsables del efecto electrocatalítico, las especies de oxígeno presentes en la superficie de los CNTs podrían explicar la mejora de la reacción de transferencia electrónica para estos compuestos. Para confirmar el papel crucial de las especies o grupos que contienen oxígeno presentes en la superficie de los CNTs sobre el efecto electrocatalítico registrado para los enodioses, se analizó mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) la superficie de los MWCNT-A tratados y sin tratar con ácido nítrico (directamente como se recibieron del fabricante) (ver **fig. 32**) y, con estos datos, se calcularon las relaciones oxígeno/carbono (O/C) que poseía dicha superficies. La **tabla 13** revela que los MWCNT-A tratados con ácido contenían más especies de oxígeno sobre la superficie (relación O/C) y con mayor grado de oxidación (cetonas, quinonas y ácidos carboxílicos) que los MWCNT-A no tratados confirmando que el tratamiento con ácido no sólo sirve para eliminar parte de los residuos metálicos sino que introduce grupos funcionales con oxígeno [77]. A partir de este punto de la memoria, los MWCNT-A tratados con ácido se les denominarán funcionalizados y los no tratados no funcionalizados.

Tabla 13. Análisis por XPS de los MWCNT estudiados.

Material	Enlace atómico	C 1s (eV)	O 1s (eV)	O/C atom
MWCNT-A tratado con ácido	C-C	284.8 (69) ^a		0.061
	C-O	286.3 (24) ^a	531.5 (36) ^a	
	C=O	288.6 (7) ^a	533.2 (64) ^a	
MWCNT-A no tratado	C-C	284.8 (70) ^a		0.045
	C-O	286.2 (24) ^a	531.5 (41) ^a	
	C=O	288.5 (6) ^a	533.2 (59) ^a	

^a Porcentaje relativo de área de pico para cada tipo de enlace atómico.

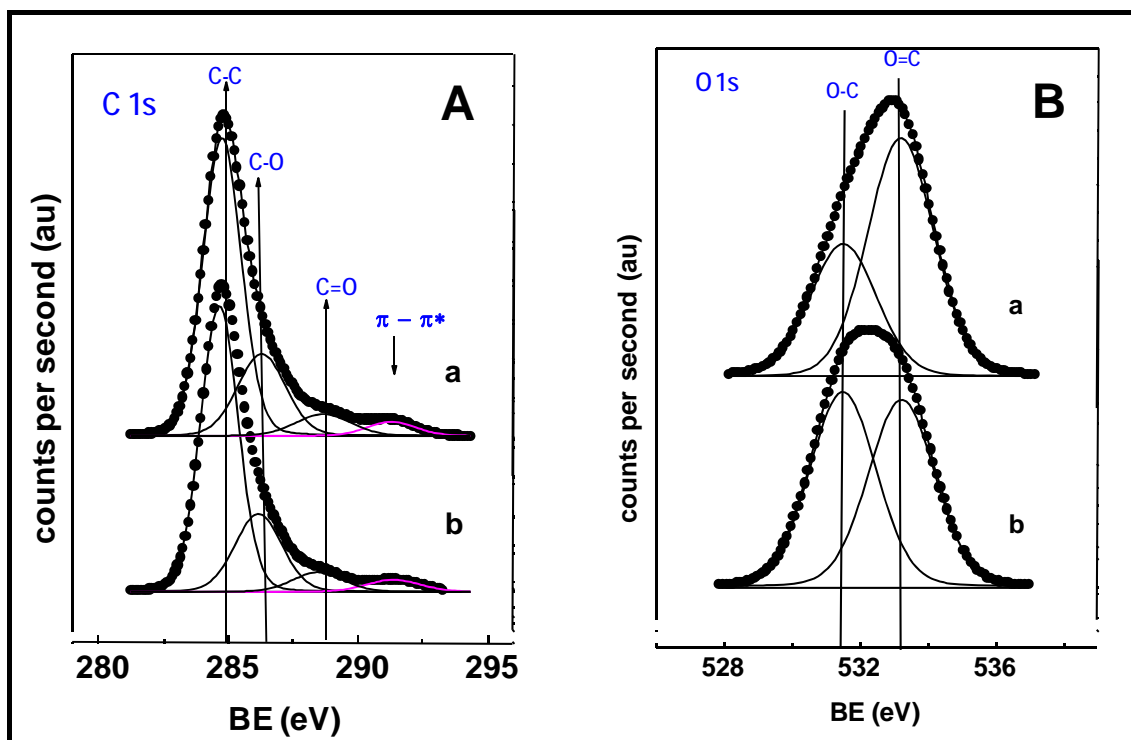


Figura 32. Espectros obtenidos por XPS del C 1s (A) y O 1s (B) para MWCNT-A tratado con ácido nítrico (a) y sin tratar (b).

A continuación, se prepararon SPE modificados con MWCNT-A no funcionalizados y, además, se activaron electroquímicamente varios SPE para generar especies de oxígeno sobre la superficie [78]. Se llevaron a cabo CVs de ácido ascórbico, hidroquinona y (+)-catequina con estos nuevos electrodos y se compararon con SPE sin modificar y modificado con MWCNT-A (ver **figura 33**). Los valores de potenciales de pico obtenidos para cada analito utilizando los distintos electrodos se recogen en la **tabla 14**. Para todos los compuestos, la cinética de la reacción de transferencia electrónica usando MWCNT-A no funcionalizado fue similar al SPE sin modificar. Además, los sobrepotenciales redox obtenidos con MWCNT-A funcionalizados fueron menores que con MWCNT-A sin funcionalizar e idénticos al SPE activado confirmándose que las especies de oxígeno generadas en la superficie de los materiales de carbono tanto por el tratamiento ácido como electroquímico fueron las responsables de la mejora de la reacción de transferencia electrónica para los compuestos estudiados.

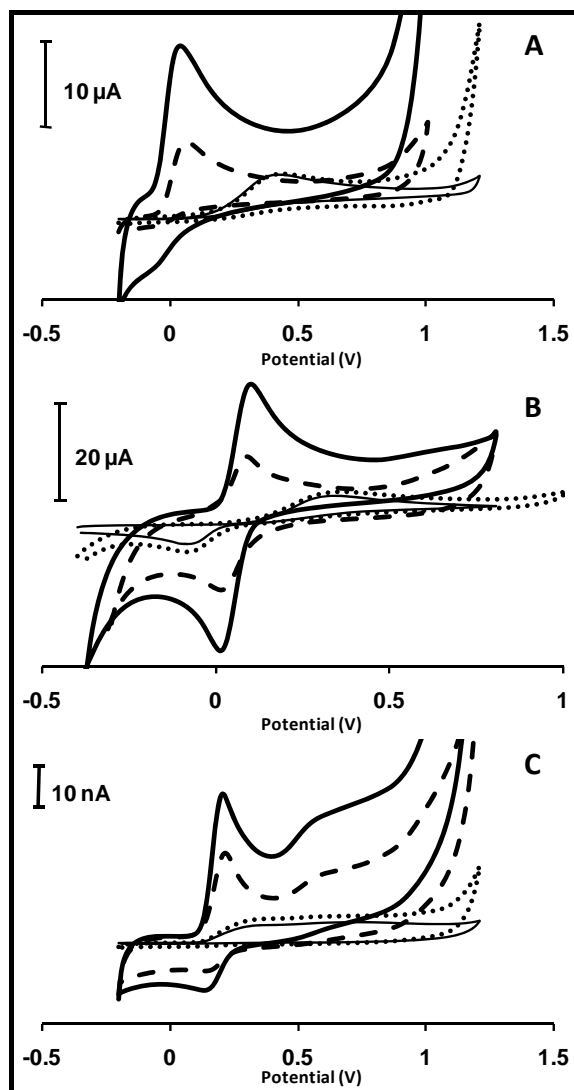


Figura 33. Voltamperogramas cíclicos correspondientes a (A) ácido ascórbico, (B) hidroquinona y (C) (+)-catequina utilizando distintos SPE; sin modificar (línea delgada), activado electroquímicamente (línea rayada), MWCNT-A no funcionalizado (línea punteada), y MWCNT-A funcionalizado (línea gruesa). Condiciones: concentración de los analitos 1 mM, velocidad de barrido 100mV/s, paso de potencial 0.01V.

Tabla 14. Potenciales de pico obtenidos para electrodos de carbono sin y con especies de oxígeno en la superficie.

	<i>SPE</i>	<i>SPE activado</i>	<i>MWCNT-A funcionalizado</i>	<i>MWCNT-A no funcionalizado</i>
Ac. ascórbico	+0.41	+0.06	+0.03	+0.41
Hidroquinona	+0.31 ^a	+0.09 ^a	+0.09 ^a	+0.34 ^a
	-0.07 ^b	+0.03 ^b	+0.01 ^b	-0.08 ^b
(+)-catequina	+0.33 ^a	+0.21 ^a	+0.20 ^a	+0.33 ^a
	+0.04 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b	+0.11 ^b

^a Barrido anódico.

^b Barrido catódico.

Aunque las especies de oxígeno generadas durante el proceso de funcionalización fueron responsables del efecto electrocatalítico, considerando los distintos materiales de carbono utilizados, los MWCNTs funcionalizados se comportaron como la superficie electródica ideal ya que, junto con el efecto electrocatalítico mostrado, estos materiales presentaron el mayor incremento de la corriente voltamperométrica. Desde un punto de vista teórico, la corriente de fondo y la intensidad de pico dependen fundamentalmente de la superficie activa del electrodo por lo que podría pensarse que estos dos magnitudes tanto para MWCNT-A no funcionalizado como funcionalizado deberían ser similares pero no fue así. Para esclarecer este aspecto, se tomaron dos imágenes de la superficie de ambos electrodos usando un microscopio electrónico de barrido (**figura 34**). Se puede apreciar claramente como la película formada sobre el SPE es más compacta para el MWCNT-A sin funcionalizar (**fig. 34 A**) que funcionalizado (**fig. 34 B**) por lo que esto significa que, en este último, hay mas superficie accesible generándose una mayor señal amperométrica y corriente de fondo sobre esta superficie. Esto sucedió porque los CNTs son muy hidrofóbicos por lo que dan lugar a una agregación espontánea incrementándose las posibilidades de formar paquetes y estructuras muy compactas [22] pero cuando son tratados con ácido nítrico aparecen especies de oxígeno sobre la superficie que disminuyen su hidrofobicidad y, por tanto, el empaquetamiento.

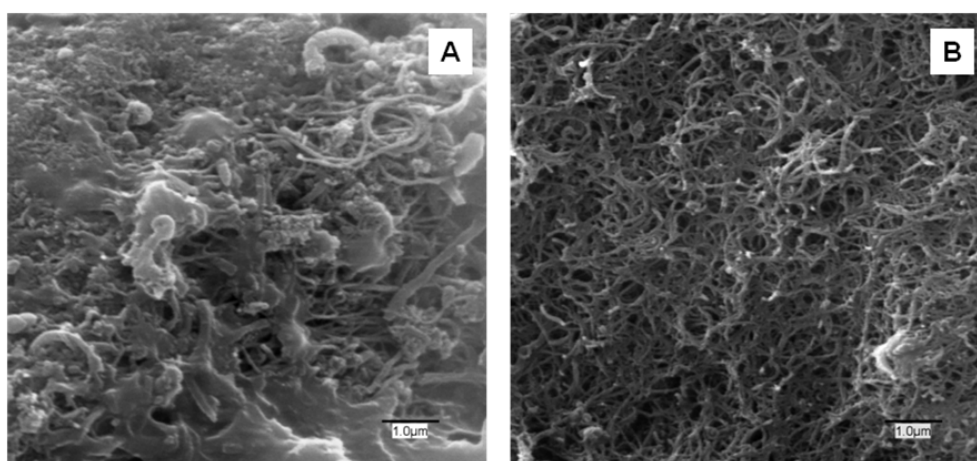


Figura 34. Imágenes tomadas por SEM de la superficie de un SPE modificado con MWCNT-A no funcionalizados (A) y funcionalizados (B). Amplificación x10000 a 25 kV.

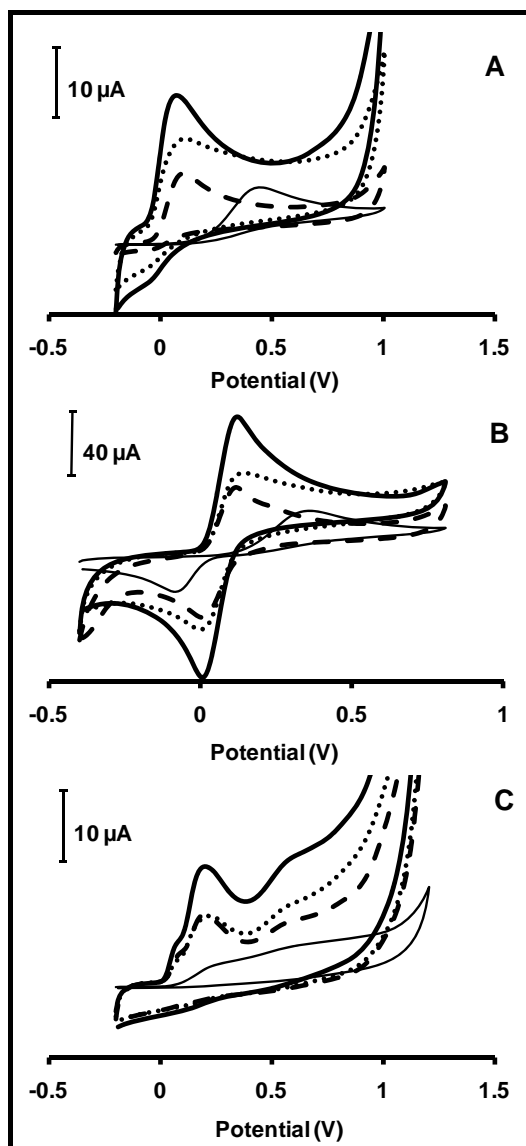


Figura 35. Voltamperogramas cíclicos correspondientes al análisis de muestras reales correspondientes a (A) Vitafardi® (ácido ascórbico); (B) Pigmentasa® (hidroquinona) y (C) Bellsola® (catequinas), utilizando distintos SPE; sin modificar (línea delgada), activado (línea rayada), grafito funcionalizado (línea punteada) y MWCNT-A funcionalizado (línea gruesa). Condiciones: velocidad de barrido 100mV/s, paso de potencial 0.01V.

El potencial analítico de los MWCNTs como sensores electroquímicos para los enodioses en términos de electrocatálisis “preferencial” también fue evaluado para el análisis de muestras reales con distintos grados de complejidad. La **figura 35** muestra los voltamperogramas cíclicos usando distintos SPEs correspondientes a *Vitafardi*® (**fig. 35 A**) (un fármaco que contiene vitamina C), *Pigmentasa*® (**fig. 35 B**) (una crema cosmética que contiene hidroquinona) y *Bellsola*® (**fig. 24C**) (suplemento dietético de extractos de té verde que contiene catequinas). En dicha figura, se puede observar

claramente una reducción de los sobrepotenciales redox (entre 80 y 380 mV) y un incremento en la corriente amperométrica (de 3 a 20 veces) cuando se usaron SPE-MWCNT-A funcionalizados en comparación con el mismo electrodo sin modificar. Además y tal y como se muestra en la **figura 36**, cuando se usaron MWCNTs funcionalizados, se obtuvo una mejora de la selectividad (mayor separación de los picos de oxidación) acoplada a un incremento de la sensibilidad haciendo posible el análisis directo mediante voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) de una muestra real que contenía dos compuestos en concentraciones muy diferentes (ácido ascórbico y piridoxina).

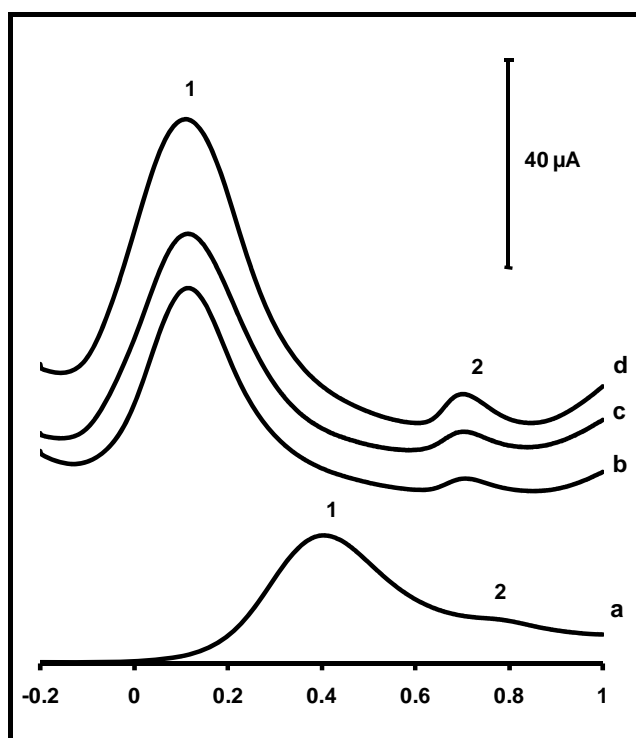


Figura 36. Voltamperograma obtenido por DPV del suplemento vitamínico Becozyme[®], que contiene ácido ascórbico (1) y piridoxina (2), usando distintos SPE; sin modificar (a), activado (b), grafito funcionalizado (c), y MWCNT-A funcionalizado (d). Condiciones: velocidad de barrido 100mV/s, paso de potencial 0.01V.

Aunque la elucidación del mecanismo que explica la disminución de los sobrepotenciales redox para los endioles al utilizarse CNTs funcionalizados requeriría un profundo estudio fundamental alejándose de los objetivos analíticos de esta Tesis, cabría preguntarse sobre el origen de dicho efecto electrocatalítico. Como las especies

químicas implicadas en el proceso electroquímico de los CNTs funcionalizados son las mismas que para los SPE activados, el mecanismo debería ser el mismo para ambos. Cabaniss et al. [78] demostraron que las especies de oxígeno presentes sobre la superficie de GCE activados electroquímicamente electrocatalizaban la reacción de transferencia de carga heterogénea para el compuesto catecol a través de un mecanismo de transferencia electrónica acoplada o asistida por la de protón. Este hallazgo fue extendido posteriormente a otros compuestos que contenían grupos enodiol pero sin poner de manifiesto una relación entre dicha estructura y el mecanismo [27, 78-80]. Este mecanismo consiste en la formación de puentes de hidrógeno entre las especies de oxígeno presentes en la superficie del electrodo y los grupos enodiol del analito [27, 79], lo cual explica el notable aumento de la velocidad de transferencia electrónica para los compuestos que contienen enodios (ácido ascórbico, hidroquinona y (+)-catequina) y no para los otros compuestos.

Finalmente, para reforzar este hallazgo, nuestros resultados fueron contrastados con aquellos encontrados en la bibliografía. Con tal motivo, en la **tabla 15** se muestra una selección de los trabajos más interesantes donde se describe una disminución del sobrepotencial redox para biomoléculas y biomarcadores usando nanotubos de carbono. Hay implicadas una gran diversidad de grupos electroactivos contenidos en estos compuestos pero, en todos los casos, se introdujeron sobre los CNTs especies que contenían oxígeno en algún paso de la preparación de los mismos (tratamiento ácido para la purificación, modificación del electrodo mediante abrasión, activación electroquímica) por lo que esto significa que estas especies de oxígeno podrían tener algún papel importante durante la reacción electroquímica. Solamente en la primera aplicación analítica de los CNTs como detectores electroquímicos [92], no se registró un descenso del sobrepotencial redox para dopamina y ácido ascórbico (enodiol como grupo electroactivo) contradiciendo aparentemente nuestros resultados. Sin embargo, esto sucedió porque no se llevó a cabo ningún procedimiento que generara especies de oxígeno sobre la superficie de los CNTs. En base a estos resultados, sería recomendable introducir algún tipo de control sobre la cantidad y el tipo de especies de oxígeno presentes en la superficie de los CNTs para que, de este modo, se pudieran obtener resultados reproducibles y comparables, especialmente cuando se aseguran

disminuciones en los sobrepotenciales de las reacciones electroquímicas de algún compuesto.

Tabla 15. Revisión bibliográfica sobre los trabajos más relevantes donde se obtuvo una reducción del sobrepotencial redox para biomoléculas utilizando CNTs.

Compuestos	Grupo electroactivo	CNT usado	Proceso de funcionalización	Reducción del sobrepotencial	Ref
Aminoácidos	C α	SWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	Imprescindible el uso de CNT para la detección	82
NADH	nicotinamida	MWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=490$ mV	83
Citocromo c	Fe ^{II} /Fe ^{III}	SWCNT	Activación electroquímica (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=100$ mV	84
Carbohidratos	Aldehído/ cetona	SWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	Imprescindible el uso de CNT para la detección	85
Insulina	disulfuro	MWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=200$ mV	86
Tiocitosina L-cisteína glutatiión	tiol	MWCNT	Inmovilización por abrasión (especies de oxígeno)	Imprescindible el uso de CNT para la detección	87
Homocisteína	tiol	MWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=120$ mV	88
Morfina	enol	MWCNT	Inmovilización por abrasión (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=100$ mV	89
L-tirosina	enol	MWCNT	HNO ₃ /HCl (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=57$ mV	90
Ac. 3,4- dihidroxifenil acético (DOPAC)	enodiol	SWCNT	Aire caliente/HCl (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=100$ mV	91
Dopamina y ác. ascórbico	enodiol	CNT	-	NO	92
Dopamina Epinefrina Ac. ascórbico	enodiol	SWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=80$ mV $\Delta E_p=70$ mV $\Delta E_p=80$ mV	93
Dopamina Serotonina	enodiol enol	MWCNT	HNO ₃ (especies de oxígeno)	$\Delta E_p=60$ mV NO	94
Ac. ascórbico Dopamina Serotonina	enodiol enodiol enol	MWCNT	HCl/ Inmovilización por abrasión (especies de oxígeno)	SI SI NO	95

Por otra parte, el descenso del sobrepotencial redox de bastantes de los compuestos descritos en la **tabla 15** (NADH, biomoléculas que contienen enol y enodiol) se puede explicar en base a nuestra propuesta ya que la reacción redox para

estos compuestos se produce mediante el mecanismo de transferencia de electrón acoplada a la de protón. En referencia directa a la selectividad de los CNTs, existen dos ejemplos interesantes en la bibliografía [94, 95] donde se publicó una disminución del potencial de oxidación para unos compuestos pero para otros no. La electrocatálisis se registró para dopamina y ácido ascórbico pero no para serotonina y los autores no aportaron ninguna explicación a este suceso. Sin embargo, estos resultados podrían haber sido entendidos y previstos considerando un mecanismo de transferencia de electrón acoplada a la de protón a través de las especies de oxígeno generadas en la superficie de los CNTs como se ha propuesto en esta memoria.

III.3.2. Diseño y fabricación de nanohilos como nuevas herramientas analíticas.

En primer lugar y en aras de una mejor comprensión de los resultados mostrados en esta sección, se comentará brevemente en qué consiste el proceso de fabricación de nanohilos mediante electrodeposición usando un molde poroso de alúmina.

Como se comentó en la introducción del capítulo III, la técnica de fabricación de nanohilos mediante el uso de moldes porosos de alúmina es sencilla y económica y permite obtener nanohilos de cualquier material, de buena calidad y sin impurezas de catalizadores metálicos por lo que se ha convertido en una de las técnicas más empleadas en la fabricación de este tipo de nanomateriales.

La **figura 37** muestra un esquema general del proceso de fabricación de nanohilos mediante electrodeposición usando un molde poroso de alúmina. En primer lugar, se deposita una capa de oro de 1000 Å mediante pulverización sobre uno de las caras del molde poroso de alúmina (se utilizó una membrana comercial de filtración) para generar una zona de contacto eléctrico entre dicho molde y el electrodo de trabajo (WE). Después, se lava la membrana con agua ultrapura mediante un sistema de filtración y se introduce en la célula de fabricación. Esta célula está compuesta por un cilindro hueco de teflón que contiene la disolución metálica o polimérica sobre la cual se llevará a cabo el proceso de electrodeposición, un contraelectrodo de platino (CE), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (RE) y una lámina de aluminio que hace la función de electrodo de trabajo (WE) y que se pone en contacto con el molde poroso a través de la capa de oro depositada previamente (ver **figura 37 A**).

Una vez montado el sistema, a continuación se lleva a cabo el proceso de fabricación de nanohilos que está formado por varias etapas. La **figura 37 (B-D)** muestra un esquema ilustrativo de fabricación de nanohilos de oro donde se puede observar una vista transversal del molde poroso que se encuentra dentro de la célula de fabricación junto con las distintas etapas que conlleva dicho proceso. En primer lugar, se añade una disolución de una sal de cobre o plata en el interior de la célula y se realiza una electrodeposición a potencial constante (ver **figura 37 B**). Este primer segmento del poro que se ha sido cubierto se denomina capa sacrificial y sirve para llenar el inicio irregular de los poros ya que estos *per se* presentan ramificaciones cerca de la superficie (como si fueran las raíces de un árbol). Después, se cambia esta disolución por otra que contiene la sal metálica del material en el que se desea construir los nanohilos (M) y se lleva a cabo de nuevo el proceso de electrodeposición que mediante la monitorización de la cantidad de carga depositada se puede controlar la longitud de los nanohilos (etapa de crecimiento) (**fig. 37 C**). Tras el proceso de crecimiento de los nanohilos, se saca el molde poroso de la célula de fabricación y se elimina la capa sacrificial mediante el tratamiento con la disolución oxidante adecuada (**fig. 37 D**). A continuación, se sumerge el molde en una disolución de NaOH 3M disolviéndose dicho molde y liberándose los nanohilos (**fig. 37 E**). Después, estos se lavan varias veces con agua ultrapura hasta alcanzar pH neutro.

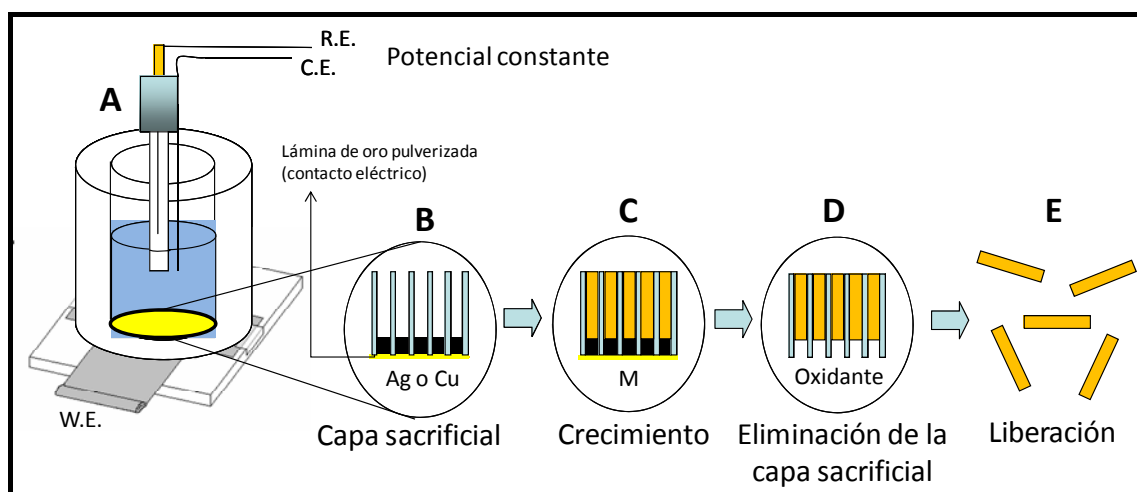


Figura 37. Célula y esquema del proceso de fabricación de nanohilos mediante electrodeposición a potencial constante de una sal metálica empleando un molde poroso de alúmina.

III.3.2.1. Fabricación de nanohilos multi-segmento de oro y plata para desarrollar sistemas codificados o “códigos de barras”.

Los nanohilos han recibido una reciente atención como sistemas de etiquetado para una gran variedad de aplicaciones en identificación, seguimiento y protección de productos comerciales junto con el desarrollo de nuevos sistemas bioanalíticos multiplexados [61, 96]. Esta forma de etiquetado o “códigos de barras” introducidos en nanohilos se preparan de manera habitual por electrodeposición secuencial de distintos metales dentro de un molde poroso para, finalmente, dar lugar a franjas de distintos metales (comúnmente de plata y oro) que pueden distinguirse mediante microscopía óptica de reflexión [62, 97-99]. Mientras más capacidad de información se quiera codificar, se requiere mayor tiempo de fabricación de estos nanohilos codificados ya que implica la realización de múltiples etapas de electrodeposición usando diferentes disoluciones de sales metálicas [100]. Recientemente se ha realizado un gran esfuerzo en simplificar la fabricación de estos nanohilos codificados, por ejemplo, se han fabricado en una sola etapa nanohilos codificados con un solo segmento hechos de aleaciones metálicas para ser leídos electroquímicamente [101] o mediante fluorescencia de rayos X (XRF) [102]. Sin embargo, esta enorme simplificación de la fabricación se vio comprometida por las técnicas de lectura que eran o destructiva (electroquímica) o muy cara (XRF).

El objetivo de este trabajo y teniendo en cuenta lo anteriormente comentado consistió en fabricar nanohilos multi-segmento de aleaciones de oro y plata con diseños de rayas de distinta reflexión óptica y gran capacidad de codificación mediante electrodeposición de una única disolución de oro y plata utilizando distintos potenciales de reducción. La diferente velocidad de reducción de la plata y el oro a los distintos potenciales de electrodeposición utilizados [103] (de -0.5V a -1.20V vs Ag/AgCl) generó segmentos de aleaciones de oro y plata con distinta composición en ambos metales y hasta cuatro segmentos distintos decodificables ópticamente. De estos hallazgos se deduce la posibilidad de fabricar una gran variedad de diseños con franjas distinguibles ópticamente mediante la electrodeposición de segmentos de aleaciones oro/plata en distinto orden y con distinta carga.

La nueva ruta de preparación de nanohilos multi-segmento de aleaciones oro/plata simplifica enormemente la producción de códigos comparado con la deposición secuencial cambiando las disoluciones de los habituales nanohilos bimetálicos codificados [98, 100]. La **figura 38** ilustra el proceso de fabricación de los nanohilos multi-segmento de aleación de oro/plata. Los distintos potenciales de deposición son aplicados secuencialmente en un orden predeterminado y durante diferentes tiempos (A, B, C) para producir segmentos aleados de longitud controlada. Después, se disuelve el molde para liberar los nanohilos (D) y se leen ópticamente los diseños codificados (E).

Si se realiza una comparación con los nanohilos de un solo segmento de aleación codificados electroquímicamente [101] o por XRF [102] desarrollados anteriormente, estos nanohilos aleados multi-segmento pueden ser inicialmente descodificados en base a su diferente reflexión óptica que es un método más rápido y barato.

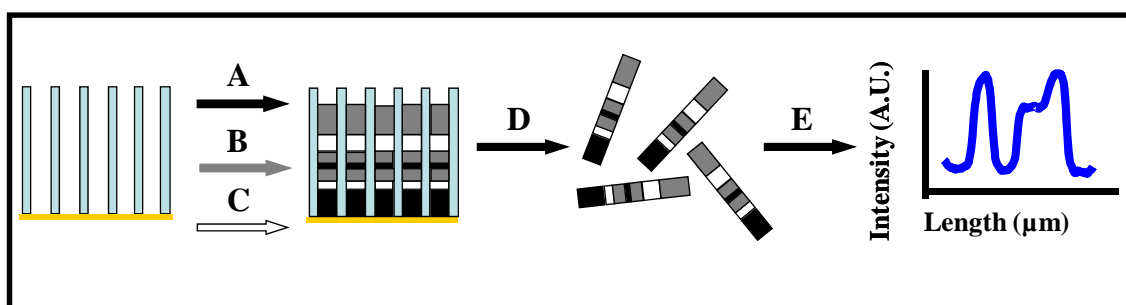


Figura 38. Síntesis de nanohilos codificados multi-segmento de aleaciones de oro/plata utilizando una única disolución de oro/plata mediante electrodeposición de los segmentos a distintos potenciales (A-C) en un orden y duración preseleccionados. (D) y (E) representan la disolución del molde y la lectura de la reflexión óptica del diseño sintetizado, respectivamente.

En la **figura 39** se ilustra la capacidad de modular las propiedades ópticas ajustando el potencial de deposición y de generar nanohilos aleados multi-segmento con códigos de distinta reflexión óptica a partir de una única disolución de electrodeposición. Por ejemplo, la **figura 39 A** muestra una imagen obtenida mediante microscopía óptica y su correspondiente perfil de intensidades de reflexión óptica para un nanohilo con cinco segmentos y con cuatro aleaciones diferentes (a-d). Este nanohilo se preparó a partir de una disolución de oro/plata 85/15 (v/v) aplicando cuatro potenciales distintos en la siguiente secuencia: -1.20V, -0.73V, -0.96V, -0.50V y

-1.20V vs Ag/AgCl. Esta secuencia de deposición de la misma disolución desembocó en cinco segmentos con cuatro aleaciones diferentes que pudieron ser distinguidos en base a su intensidad de reflexión de la luz. Este cambio de intensidad de reflexión se debió al incremento gradual de oro en la aleación al incrementarse el potencial de electrodeposición de -0.5V a -1.20V [103]. El correspondiente perfil de intensidad óptica (parte inferior de la **figura 39 A**) claramente ilustra la capacidad de distinguir cuatro segmentos de distinta composición en la aleación oro/plata. Cada segmento posee un nivel de intensidad de reflexión de la luz característico que permanece constante a lo largo de su longitud permitiendo la distinción conveniente de las franjas adyacentes de aleación y, por supuesto, de las cuatro aleaciones utilizadas.

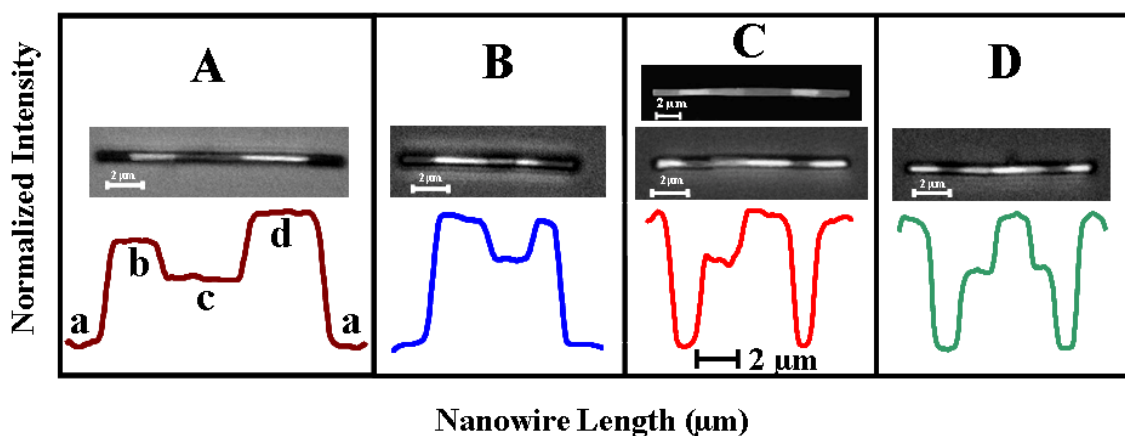


Figura 39. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (parte superior) y sus correspondientes perfiles de intensidad de reflexión (parte inferior) para nanohilos codificados con distintos segmentos de aleación preparados a partir de una disolución de electrodeposición de Au/Ag 85/15 (v/v). Las secuencias de potenciales de electrodeposición para cada nanohilo son (de izquierda a derecha): (A) -1.20, -0.73, -0.96, -0.50 y -1.20 V; (B) -1.20, -0.50, -0.85, -0.50 y -1.20; (C) -0.50, -1.20, -0.85, -0.50, -1.20 y -0.50 V; (D) -0.50, -1.20, -0.85, -0.50, -0.85, -1.20 y -0.50 V. La imagen superior en C muestra la correspondiente imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido.

En la **figura 39 (B-D)** se muestran otros ejemplos de nanohilos codificados donde se puede observar tanto las imágenes obtenidas por microscopía óptica (parte superior) como los correspondientes perfiles de intensidad (parte inferior). Esta vez se aplicaron solamente tres potenciales distintos (-0.50, -0.85 y -1.20V versus Ag/AgCl) en un orden y con una cantidad de carga depositada preestablecida, dando lugar a tres segmentos distinguibles ópticamente (claro, oscuro e intermedio). Además, en la **figura 39 C** se muestra una imagen obtenida mediante microscopía electrónica de

barrido (SEM) para confirmar las imágenes obtenidas por microscopía óptica. Se pueden apreciar de nuevo los distintos segmentos pero con intensidades opuestas a las obtenidas mediante reflexión óptica en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores [99].

Mediante este concepto se podría alcanzar un enorme número de nanohilos con códigos distintos fácilmente identificables. En principio, variando el número de intensidades, longitud de segmento y orden pueden generarse infinitos códigos distintos. La capacidad de códigos es n^m donde n es el número de niveles de intensidad, es decir, aleaciones distintas, y m el número de segmentos en un nanohilo (asumiendo que la dirección del nanohilo puede ser determinada, es decir, se puede diferenciar el comienzo y el final) [100]. Sin embargo, en la práctica, dada las limitaciones de este método, pudiéndose distinguir hasta 5 niveles de intensidad y fabricar hasta 10 segmentos en un nanohilos de 10 μm de longitud, se puede alcanzar hasta 9,765,625 de nanohilos distinguibles. Esta capacidad potencial de generar hasta 4-5 segmentos con aleaciones distintas usando una única disolución de electrodeposición representa una enorme mejora respecto a los habituales nanohilos bimetálicos codificados ($n=2$) preparados mediante deposición secuencial de distintas disoluciones [98, 100]. El proceso de fabricación puede ser controlado con un ordenador para la síntesis simultánea de múltiples diseños de franjas en diferentes moldes.

La deposición multipotencial sobre moldes de una única disolución da lugar a una variación de la composición de la aleación a lo largo del nanohilo. Esta composición y propiedades ópticas modulables fueron estudiadas en profundidad. En la **figura 40**, se muestra la dependencia de la composición del segmento (A) y su intensidad de reflexión (B) con el potencial de deposición para un nanohilo que contenía 4 segmentos de aleaciones distintas junto con un segmento de oro y plata puros (en los extremos del nanohilo). Los segmentos de metal puro, más oscuro (Au) y más claro (Ag), se añadieron para normalizar la intensidad de los segmentos de aleación y se les asignaron valores de 0.0 (Au) y 1.0 (Ag), respectivamente. También se puede observar en la **figura 40** una imagen de este nanohilo con los cuatro segmentos de aleaciones distintas y los dos de metal puro. El contenido en plata en la aleación

desciende siguiendo un modelo casi sigmoideal del 92% al 53% cuando se aumenta el potencial de deposición de -0.50V a -1.20V (A). Esta relación refleja el aumento de la co-deposición de oro a potenciales más negativos debido a los diferentes potenciales estándar de reducción de las sales cianuro de plata (-0.53V) y cianuro de oro (-0.82V), que son los componentes mayoritarios de las disoluciones de deposición. El grupo de Searson [103] demostró que la deposición de oro empieza a crecer alrededor de -0.9V hasta alcanzar la meseta alrededor de -1.2V , mientras que para la deposición de plata a estos potenciales ya está cerca de la meseta y cambia ligeramente de -0.7V a -1.2V . Como indica la **figura 40 B**, la intensidad óptica se incrementa de manera casi lineal al descender el potencial de deposición de -0.5V a -1.2V . La pequeña diferencia en los perfiles A y B (con una mayor curvatura en la dependencia del potencial de deposición con la composición) se atribuye a una correlación no lineal entre el contenido en plata de la aleación y la intensidad de reflexión [103].

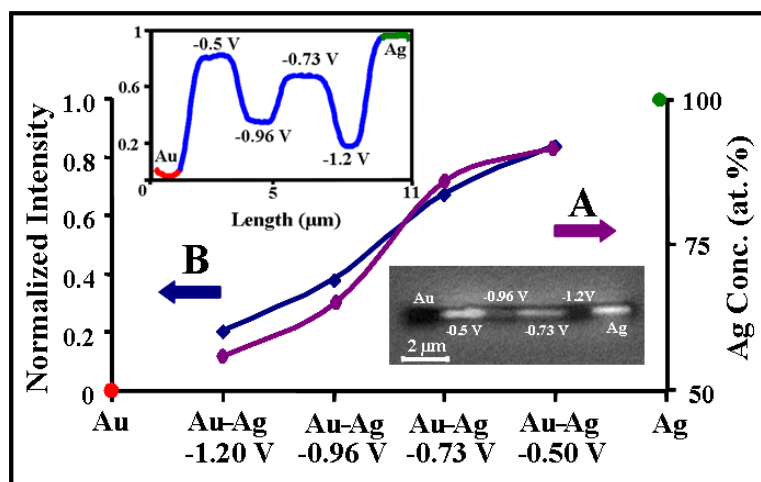


Figura 40. Dependencia de la composición de la aleación (% atómico en plata) (A) y la intensidad de reflexión óptica normalizada (B) con el potencial de deposición. **Inset:** imagen obtenida por microscopía óptica (abajo) y su perfil de intensidades (arriba) de un nanohilo multi-segmento que contenía; cuatro segmentos de aleaciones (deposición entre -0.5V y -1.20V), uno de oro y otro de plata (-0.90V). La composición de la aleación se obtuvo por un análisis por EDX.

La preparación mediante molde de nanohilos aleados multi-segmento generó unos diseños de franjas muy reproducibles. La **figura 41** muestra la reproducibilidad de dos poblaciones ($n=10$) de nanohilos con diferente código (A, B). Las desviaciones estándar relativa (RSD) para las respectivas intensidades de cada segmento variaron

entre el 3.8% y el 13.7% para A y entre el 3.7% y el 10.0% para B. La longitud media de estos nanohilos fue 13.59 μm para A y 13.32 μm para B (RSD de 1.9% y 4.1%, respectivamente). Los RSD de las longitudes para cada segmento oscilaron entre el 4.1% y el 7.6% para los dos diseños.

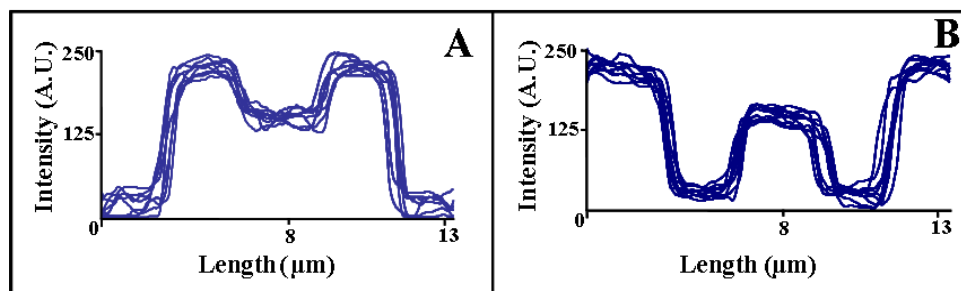


Figura 41. Reproducibilidad de los perfiles de intensidad para nanohilos multi-segmento codificados ($n=10$ para dos diseños distintos A y B). Estos nanohilos están compuestos de 5 segmentos (2 culombios cada segmento) depositados usando la siguiente secuencia de potenciales: A) -1.20 V, -0.50 V, -0.85 V, -0.50 V, -1.20 V. B) -0.50 V, -1.20 V, -0.85 V, -1.20 V, -0.50 V. La intensidad fue medida usando una escala de grises de 8-bits.

III.3.2.2. Fabricación de nanohilos de níquel y su exploración inicial como detectores electroquímicos en microchip de electroforesis capilar.

Con la experiencia adquirida durante el desarrollo de los nanohilos multi-segmento codificados, se planteó abrir una nueva línea de trabajo estudiando la posibilidad de utilizar este tipo de nanoestructuras como detectores electroquímicos para microchips de electroforesis capilar.

El mayor reto de la combinación de los nanohilos y el sistema microfluídico es la manipulación y control de dichas nanoestructuras. En la bibliografía actual sólo existe un trabajo donde se utilicen nanohilos como detectores electroquímicos en un sistema microfluídico de separación [66]. En este trabajo utilizaron nanohilos de níquel, que poseen propiedades magnéticas, pero la estrategia de integración usada era tediosa y cara. Ésta consistió en someter el final del canal microfluídico a un tratamiento de limpieza con una disolución *piraña* para, a continuación, dorar esta zona mediante pulverización y, de esa manera, conseguir un punto de contacto eléctrico. Después se unió a esta zona cubierta con oro un cable de cobre mediante una resina epoxi conductora para, a su vez, hacer de conexión con el potencióstato. Una vez preparado

el microchip de electroforesis capilar, se depositó sobre la superficie de oro una cantidad de nanohilos de níquel cuya orientación y manipulación espacial se llevó a cabo aprovechando las propiedades magnéticas del níquel mediante el uso de un imán.

Aprovechando también las propiedades magnéticas de los nanohilos de níquel se decidió llevar a cabo la integración de los nanohilos en nuestro sistema microfluídico usando una estrategia que fuera fácil de operar, sencilla y barata.

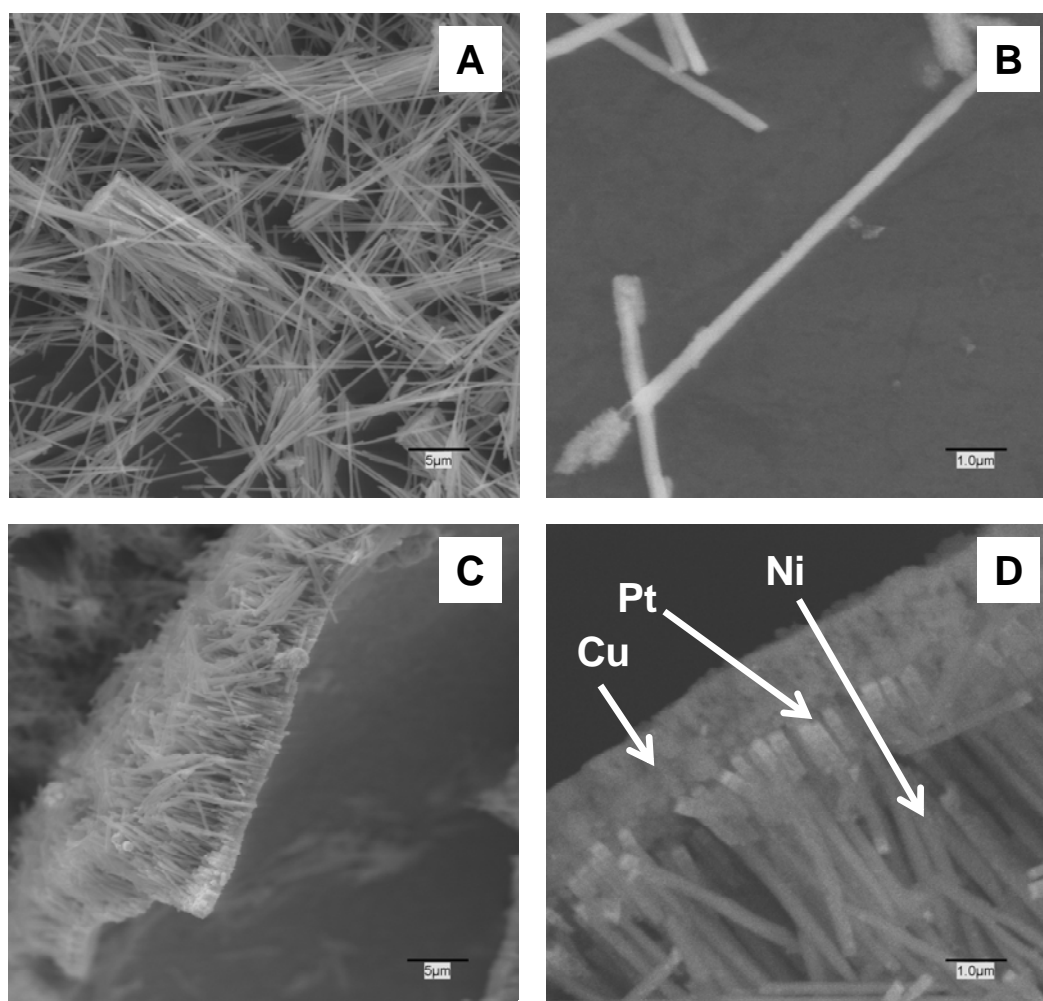


Figura 42. Imágenes tomadas por SEM a 2000 (A, C) y 10000 (B, D) aumentos trabajando a 25 kV de los nanohilos de níquel sintetizados. En los nanohilos de las imágenes C y D no se eliminó la capa sacrificial de cobre. La imagen D se tomó usando el modo de detección BSE.

En primer lugar, se procedió a implantar el método de fabricación aprendido en Estados Unidos, que se basa en la electrodeposición de sales metálicas en una membrana porosa de alúmina comercial. La primera etapa consistió en depositar una

capa sacrificial de cobre (10 C de carga depositada), después una capa protectora de platino (3 C de carga depositada) y, finalmente, se depositó níquel hasta alcanzar la longitud deseada (45C de carga depositada, longitud 8-10 μm). Los resultados fueron satisfactorios obteniéndose nanohilos con las dimensiones deseadas y con pocas fragmentaciones (ver **figura 42 A, B**). Además, de manera ilustrativa, se tomaron imágenes por SEM de una muestra de nanohilos donde la capa sacrificial no fue eliminada y, simplemente, se disolvió la membrana con NaOH 3M (ver **figura 42 C, D**). Los nanohilos se mantienen unidos como en bloques debido, como ya se expuso en la parte experimental, a la zona ramificada final que existe en la membrana porosa. Aprovechando el detector de electrones retrodispersados (BSE) que poseía el microscopio electrónico de barrido (SEM) utilizado y que permite distinguir zonas donde hay elementos con mayor peso atómico, se pudo observar (ver **figura 42 D**) los tres segmentos metálicos depositados; la zona unida que corresponde al cobre, la zona más brillante o clara que corresponde al platino por ser el átomo más pesado de los tres, y la zona donde se aprecian los cilindros que corresponde al níquel.

Una vez optimizado el proceso de fabricación de los nanohilos de níquel, se procedió a evaluar sus propiedades magnéticas para su potencial uso como método de manipulación e integración de los nanohilos en el sistema microfluídico. Para ello, se depositó una gota de la suspensión de nanohilos de níquel en un portamuestras y se manipuló su orientación mediante un imán. Este proceso se monitorizó con un microscopio óptico y los nanohilos se orientaron perfectamente en la dirección del campo magnético. En la **figura 43** se puede apreciar como al aplicar un campo magnético sobre la suspensión de nanohilos estos se agregan formando hilos de la dimensión del milímetro cuya longitud depende de la intensidad del campo magnético aplicado [104].

La elección de níquel como material para la fabricación de los nanohilos no sólo se debió a sus propiedades magnéticas sino también a sus demostradas propiedades catalíticas hacia aminoácidos [105], alcoholes y azúcares [106].

Realizada la caracterización de los nanohilos magnéticos se procedió a su integración en nuestro sistema microfluídico. Para ello se modificó la superficie de un SPE de carbono con nanohilos de níquel y se introdujo en la célula de detección.

Previamente, se colocó un imán cilíndrico justo detrás del SPE (delante del tornillo, ver **figura 44**) a un centímetro de separación. La función de este imán es doble; primera, sostener los nanohilos y que no caigan por gravedad y, segunda, orientarlos perpendicularmente a la superficie del SPE para formar un nanobosque de nanohilos con una gran superficie activa que incremente la sensibilidad del método.

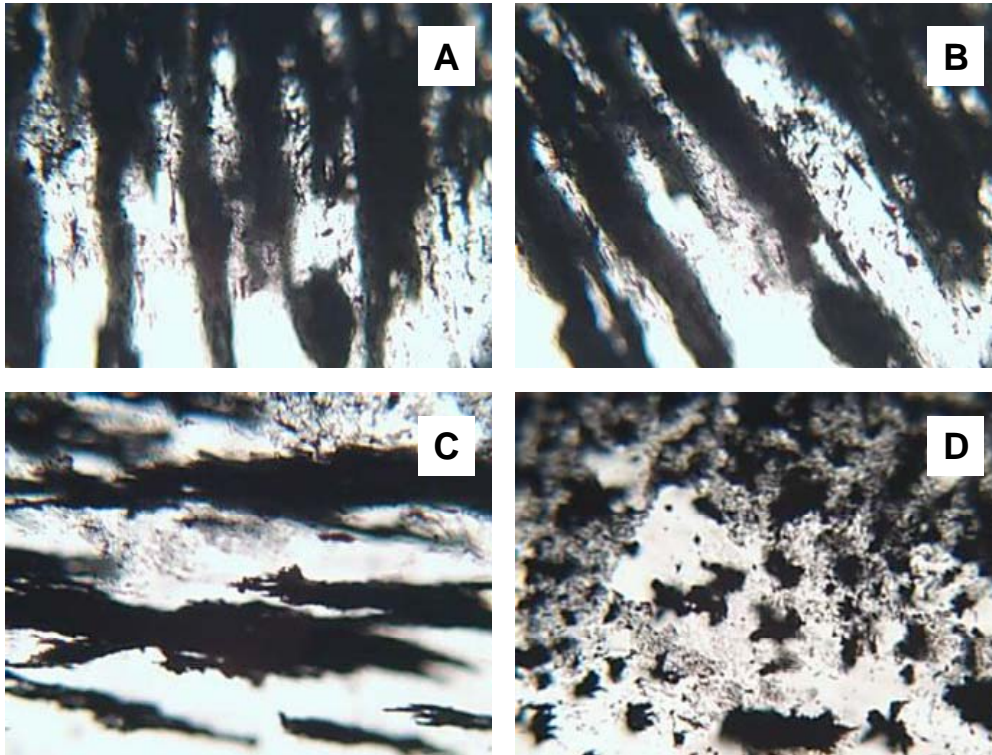


Figura 43. Imágenes obtenidas por microscopía óptica (100x) de la orientación de los nanohilos de níquel mediante la aplicación de un campo magnético externo. Los nanohilos se agrupan y orientan en función de la dirección del campo eléctrico (A-D).

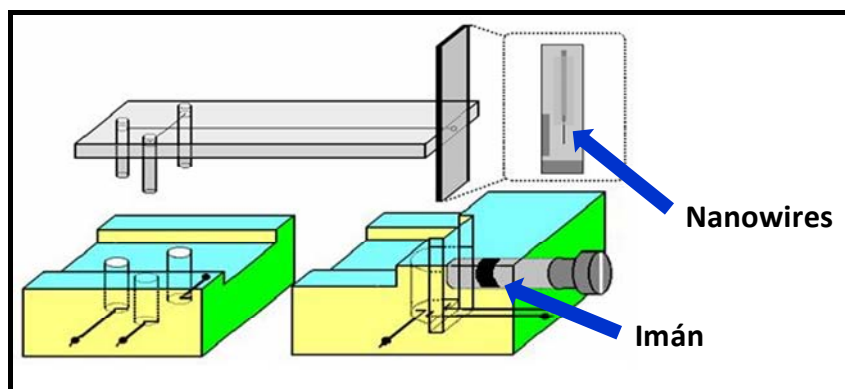


Figura 44. Esquema de la integración de los nanohilos en el microsistema analítico.

Como el objetivo de este trabajo era evaluar a los nanohilos como detectores electroquímicos en plataformas electrocinéticas usando la estrategia de integración previamente propuesta, se utilizaron condiciones electroforéticas bibliográficas [66] y glucosa como analito. Se optimizó el potencial de detección, la cantidad de nanohilos y la cantidad de muestra inyectada para, a continuación, estudiar la orientación espacial de los nanohilos y su estabilidad mecánica como nuevos detectores electroquímicos.

Para llevar a cabo esta tarea, los nanohilos fueron orientados perpendicularmente a la superficie del SPE y activados electroquímicamente *in situ* mediante CV dentro de la célula de detección (ver sección experimental III.2.2.2) y, simultáneamente, se realizó el acondicionamiento del microchip. En primer lugar, se procedió a construir el voltamperograma hidrodinámico para estos nuevos detectores y, de ese modo, evaluar su respuesta electroquímica y seleccionar el potencial óptimo de detección (ver **figura 45**). Aunque la meseta de curva de potenciales se alcanza a +0.8V, se escogió +0.7V como potencial de trabajo debido al aumento del ruido instrumental al incrementarse el potencial de detección que generó, por tanto, una pérdida de sensibilidad en términos de relación señal/ruido (ver **tabla 16**).

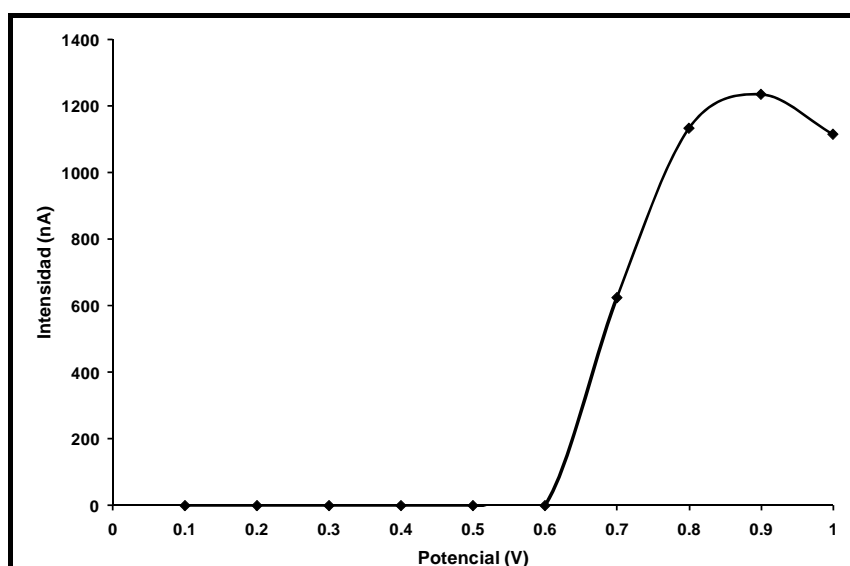


Figura 45. Voltamperograma hidrodinámico correspondiente a Glucosa 500 μM usando un SPE modificado con nanohilos de níquel. Condiciones: tampón de separación 35mM NaOH, $V_{\text{sep}}=2$ kV, $V_{\text{iny}}=2$ kV durante 5s, cantidad de nanohilos 10 μL , medio de detección 0.1M NaOH.

Tabla 16. Valores de ruido y relación señal/ruido obtenidos a distintos potenciales de detección para la detección de glucosa 500 μM usando nanohilos de níquel.

Potencial (V)	Ruido (nA)	S/R
+0.7	3	209
+0.8	25	45
+0.9	100	13
+1.0	100	12

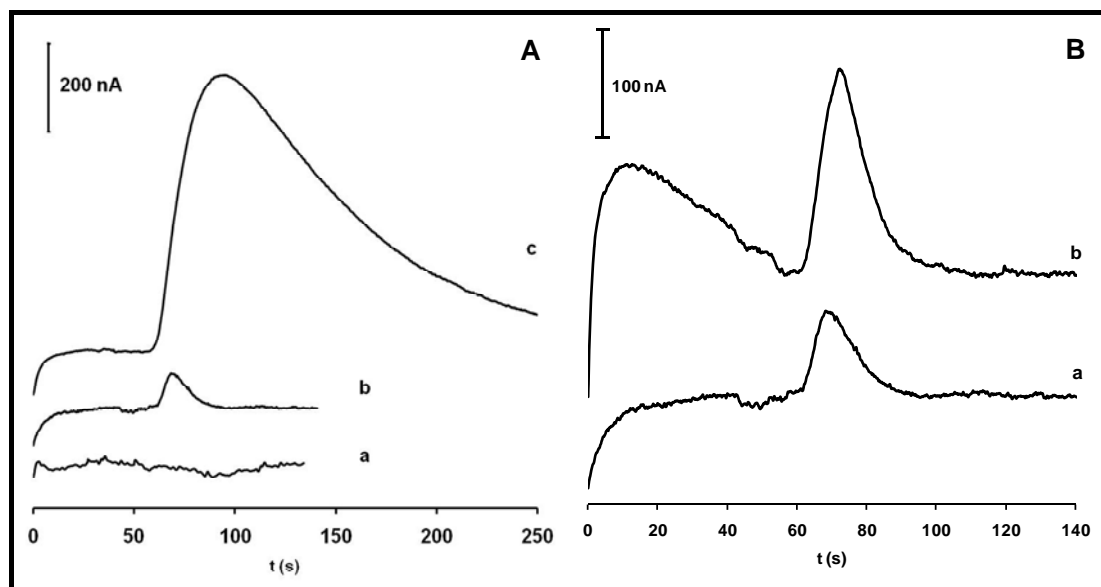


Figura 46. Optimización de las variables de detección para 500 μM de glucosa usando nanohilos de níquel. (A) Estudio de la cantidad de nanohilos depositados sobre el SPE; a) 2 μL , b) 5 μL , c) 10 μL ; Condiciones: tampón de separación 35mM NaOH, $V_{\text{sep}}=2$ kV, $V_{\text{iny}}=2$ kV durante 5s. (B) Estudio de tiempo de inyección de muestra; a) 5s, b) 10s. Condiciones: tampón de separación 35mM NaOH, $V_{\text{sep}}=2$ kV, $V_{\text{iny}}=2$ kV, cantidad de nanohilos 5 μL , potencial de detección +0.7 V, medio de detección 0.1M NaOH.

Además de la optimización del potencial de detección, se llevó a cabo la optimización tanto de la cantidad de nanohilos depositados sobre el electrodo como del tiempo de inyección de muestra. En la **figura 46 A** se observa con claridad como la cantidad óptima de nanohilos es 5 μL (b) de una suspensión acuosa de 10 mg/ml de nanohilos. Al añadir 2 μL (a) no aparece ninguna señal debido, seguramente, a que no es cantidad suficiente para cubrir de manera homogénea toda la superficie del SPE y cuando se añadió 10 μL (c) se obtuvo un pico muy intenso pero con una anchura desproporcionada contraproducente para futuras separaciones electroforéticas, en consecuencia, esta variable resultó crucial. La **figura 46 B** ilustra el estudio de tiempos

de inyección optándose por 5s de inyección (a) en lugar de 10s (b) primando su posible influencia en la selectividad (anchura de pico en la base 26.6 s y 32.9 s, respectivamente) a la sensibilidad.

En todos los estudios mostrados, los nanohilos estaban orientados perpendicularmente a la superficie del SPE y, de ese modo, formar un nanobosque de nanohilos con una gran superficie activa y ganar sensibilidad. Para confirmar esta afirmación, se orientaron los nanohilos en posición vertical (perpendiculares a la superficie del electrodo) y horizontal (paralelos a la superficie del electrodo) gracias al uso de un imán externo y se realizó un estudio comparativo. En la **figura 47** se puede observar claramente como en la posición vertical, es decir, formando un nanobosque, se obtuvo mayor señal amperométrica que en la posición horizontal confirmándose nuestras predicciones.

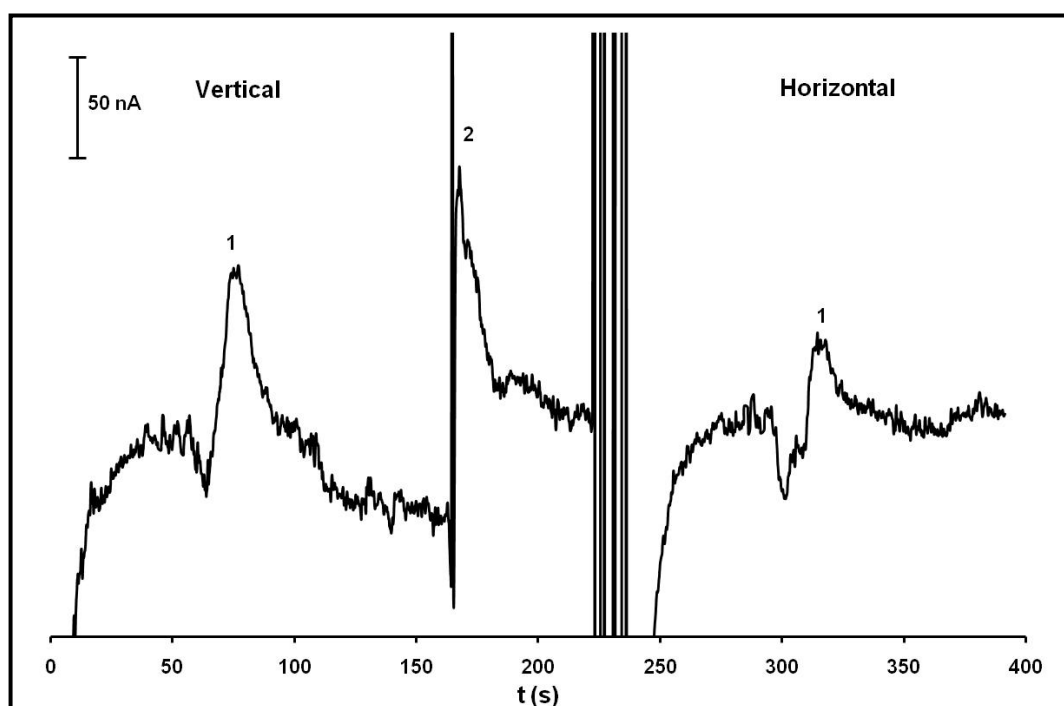


Figura 47. Electroforegramas correspondientes a la determinación de glucosa 500 μM usando nanohilos de níquel orientados en posición vertical o en horizontal respecto a la superficie del SPE. Picos: (1) Glucosa, (2) cambio de la dirección del campo magnético aplicado. Condiciones: tampón de separación 35mM NaOH, $V_{\text{sep}}=2$ kV, $V_{\text{iny}}=2$ kV durante 5s, cantidad de nanohilos 5 μL , potencial de detección +0.7 V, medio de detección 0.1M NaOH.

Por último y con respecto a los estudios de precisión realizados, la **tabla 17** recoge los valores de desviaciones estándar relativa obtenidos para los tiempos de migración y alturas de pico al analizar una muestra patrón de 500 μM de glucosa. Los valores fueron aceptables demostrándose la buena reproducibilidad del nanobosque de nanohilos formado sobre el SPE (ver **figura 48**) usando una estrategia sencilla y económica.

Tabla 17. Precisión del método en términos de repetibilidad y reproducibilidad para un patrón de glucosa 500 μM .

Repetibilidad (n=5)			
$t_m \pm S$ (s)	RSD (%)	$h_m \pm S$ (nA)	RSD (%)
71.7 ± 0.6	0.9	83 ± 6	7
Reproducibilidad (n=3)			
$t_m \pm s$	RSD (%)	$h_m \pm s$ (nA)	RSD (%)
71 ± 2	3	74 ± 8	11

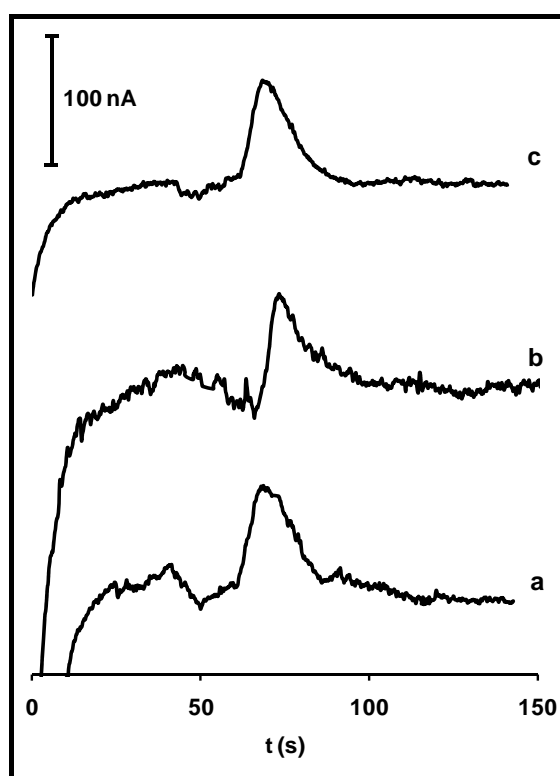


Figura 48. Electroforeogramas correspondientes a glucosa 500 μM obtenidos en días distintos (a-c) de una muestra patrón de. Condiciones: como en la figura 47.

III.4. Conclusiones

Durante la exploración del uso de los nanotubos de carbono como detectores electroquímicos en microchips de electroforesis capilar (μ CE-ED) para la determinación de analitos de interés alimentario, se llevó a cabo tanto la optimización del soporte electródico para depositar los CNTs como del tipo de material de CNT empleado en dicha modificación. Además, se desarrollaron metodologías para determinar tres grupos de compuestos diferentes (vitaminas, antioxidantes naturales e isoflavonas) en distintas matrices alimentarias (suplementos dietéticos, alimentos frescos y extractos vegetales). El mejor electrodo para todos los analitos estudiados resultó ser el electrodo de carbono serigrafiado (SPE) modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple de longitud de 200 μ m (MWCNT-A) revelándose como el mejor detector de los explorados para los μ CE-ED en el análisis alimentario. El uso de este nanomaterial generó un descenso del potencial de oxidación mostrándose en consecuencia un efecto electrocatalítico así como una mejora de la sensibilidad y de la resolución entre picos para los compuestos analizados tanto en patrones como en muestras reales. Además, se obtuvieron buenas exactitudes respecto a los valores dados por los fabricantes e incluso se validó uno de los métodos usando un material de referencia secundario. Asimismo, durante este trabajo se observó un comportamiento electroquímico distinto de los CNTs en función del compuesto analizado. Se demostró que este material tiene una preferencia electrocatalítica sobre los compuestos que tienen un grupo enodiol conjugado como centro electroactivo estableciéndose, en consecuencia, por primera vez una relación entre la estructura de los analitos y el efecto electrocatalítico de los nanotubos de carbono. Además, se demostró que los residuos de partículas metálicas generados durante la fabricación de los CNTs no eran los responsables de la mejora de la transferencia electrónica sino las especies de oxígeno generadas durante el proceso de purificación, es decir, el tratamiento con ácido nítrico generó más especies que contenían oxígeno sobre la superficie de los CNT que promovieron la reacción de transferencia electrónica. El mecanismo que explica esta mejora es la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo enodiol del analito y los grupos cetona, quinona o carboxílico presentes en los defectos de la superficie de los CNTs ayudando a la reacción de transferencia de electrón acoplada a protón. En consecuencia, se hace preciso el control sobre la cantidad y clase de estas especies de oxígeno para poder obtener resultados reproducibles y comparativos,

especialmente, en el caso de proponer disminuciones del sobrepotencial redox para algún compuesto.

Finalmente, los nanotubos de carbono multipared fue el único material que mostró una mejora de la selectividad acoplada a una alta sensibilidad para este tipo de compuestos (enodiol como grupo electroactivo) con independencia de la matriz real estudiada. Por tanto, este hallazgo podría tener un impacto importante a la hora de diseñar métodos electroquímicos de análisis usando nanotubos de carbono ampliándose el número de aplicaciones y simplificándose el proceso analítico.

Por otra parte, se han mostrado dos ejemplos representativos de fabricación de nanohilos abriéndose, además, dos posibles aplicaciones de estos nanomateriales en el campo analítico; la primera, su uso como sistemas de codificación o de etiquetado tanto para la identificación, seguimiento y protección de productos comerciales como para el desarrollo de nuevos métodos bioanalíticos multiplexados y, la segunda, como detectores electroquímicos acoplados a plataformas electrocinéticas miniaturizadas.

Respecto a la primera aplicación, se ha demostrado la preparación de nanohilos aleados de oro/plata con códigos basados en la distinta reflexión óptica de cada segmento o aleación, a partir de una única disolución de electrodeposición. La diferente reflexión óptica de cada franja o segmento permitió la identificación de cada diseño o código mediante microscopía óptica convencional. El nuevo protocolo de diseño de códigos en base a segmentos con aleaciones de distinta composición en oro/plata combinó una alta capacidad de codificación con una enorme simplificación del proceso de fabricación comparado con los protocolos habituales de codificación bimetalica mediante cambio de disolución de electrodeposición, por lo que se convierte en una gran promesa para el desarrollo de nuevas aplicaciones de etiquetado o marcaje.

El segundo ejemplo representativo de fabricación de nanohilos con fines analíticos está relacionado con el uso de nanohilos de níquel como detectores electroquímicos para microchips de electroforesis capilar. Los nanohilos de níquel fueron depositados sobre electrodos serigrafiados (SPE) y retenidos y orientados para formar un nanobosque con gran superficie activa y, por tanto, mayor sensibilidad, mediante la colocación de un imán cilíndrico justo detrás del SPE. Los valores de reproducibilidad tanto en tiempos de migración como en altura de pico fueron buenos

demostrándose la estabilidad de los nuevos detectores y el buen funcionamiento de esta nueva estrategia.

III.5. Bibliografía

-
- [1] B. Bhushan, "Springer handbook of nanotechnology", 2nd edition, ed. Springer, 2007.
- [2] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, "Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow", *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 1881-1887.
- [3] J. Grunes, J. Zhu, G.A. Somorjai, "Catalysis and nanoscience", *Chem. Commun.*, 2003, 2257-2260.
- [4] M. Daniel, D. Astruc, "Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology", *Chem. Rev.*, 2004, 104, 293-346.
- [5] X.G.Hu, S.J. Dong, "Metal nanomaterials and carbon nanotubes - synthesis, functionalization and potential applications towards electrochemistry", *J. Mater. Chem.*, 2008, 18, 1279-1295.
- [6] A.K. Wanekaya, W. Chen, N.V. Myung, A. Mulchandani, "Nanowire-Based Electrochemical Biosensors", *Electroanalysis* 2006, 18, 533-550.
- [7] Y. Li, F. Qian, J. Xiang, C.M. Lieber, "Nanowire electronic and optoelectronic devices", *Materials today*, 2006, 9, 18-27.
- [8] P. M. Ajayan, "Nanotubes from Carbon", *Chem. Rev.*, 1999, 99, 1787-1799.
- [9] R.H. Baughman, A.A. Zakhidov, W.A. de Heer, "Carbon Nanotubes—the Route toward applications", *Science*, 2002, 297, 787-792.
- [10] E. Roduner, "Size matters: why nanomaterials are different", *Chem. Soc. Rev.*, 2006, 35, 583-592.
- [11] J. Wang, "Nanomaterial-based electrochemical biosensors", *Analyst*, 2005, 130, 421-426.
- [12] G. Chen, "Carbon nanotube and diamond as electrochemical detectors in microchip and conventional capillary electrophoresis", *Talanta*, 2007, 74, 326-332.
- [13] Y.J. Ko, J.H. Maeng, Y. Ahn, S.Y. Hwang, N.G. Cho, S.H. Lee, "Real-time immunoassay with a PDMS-glass hybrid microfilter electro-immuno sensing chip using nanogold particles and silver enhancement", *Sens. Act. B*, 2008, 132, 327-333.
- [14] C. Nilsson, S. Birnbaum, S. Nilsson. "Use of nanoparticles in capillary and microchip electrochromatography". *J.Chromatogr. A*, 2007, 1168, 212-224.
- [15] C. Luo, Q. Fu, H. Li, L. Xu, M. Sun, Q. Ouyang, Y. Chen, H. Ji. "PDMS microfluidic device for optical detection of protein immunoassay using gold nanoparticles". *Lab Chip*, 2005, 5, 726-729.
- [16] S. Iijima, "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature*, 1991, 354, 56-58.

- [17] S. Iijima, T. Ichihashi, "Single shell carbon nanotubes of 1-nm diameter", *Nature*, 1993, 363, 603-605.
- [18] D.S. Bethune, C.H. Kiang, M.S. De Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, "Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls", *Nature*, 1993, 363, 605-607.
- [19] M. Terrones, "Science and technology of the twenty-first century: Synthesis, properties and applications of carbon nanotubes", *Annual Rev. Mater. Res.*, 2003, 33, 419-501.
- [20] M. Trojanowicz, "Analytical applications of carbon nanotubes: a review", *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, 480-489.
- [21] A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Pérez, M. del Valle, S. Alegret, "New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes", *Trends Anal. Chem.*, 2005, 24, 826-838.
- [22] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, "Role of carbon nanotubes in analytical science", *Anal. Chem.*, 2007, 79, 4788-4797.
- [23] L. Agüí, P. Yañez-Sedeño, J.M. Pingarrón, "Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review", *Anal. Chim. Acta*, 2008, 622, 11-47.
- [24] A. Chou, T. Böcking, N.K. Singh, J.J. Gooding, "Demonstration of the importance of oxygenated species at the ends of carbon nanotubes for their favourable electrochemical properties", *Chem. Comm.*, 2005, 842-844.
- [25] C.E. Banks, T.J. Davies, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, "Electrocatalysis at graphite and carbon nanotube modified electrodes: edge-plane sites and tube ends are the reactive sites", *Chem. Comm.*, 2005, 829-841.
- [26] K. Gong, S. Chakrabarti, L. Dai, "Electrochemistry at carbon nanotube electrodes: Is the nanotube tip more active than the sidewall?", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47, 5446-5450.
- [27] R.L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry", *Chem. Rev.*, 2008, 108, 2646-2687.
- [28] C.E. Banks, R.G. Compton, "New electrodes for old: from carbon nanotubes to edge plane pyrolytic graphite", *Analyst*, 2006, 131, 15-21.
- [29] C. E. Banks, A. Crossley, C. Salter, S. J. Wilkins, R.G. Compton, "Carbon nanotubes contain metal impurities which are responsible for the "Electrocatalysis" seen at some nanotube-modified electrodes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45, 2533-2537.
- [30] B. Sýljukic, C.E. Banks, R.G. Compton, "Iron oxide particles are the active sites for hydrogen peroxide sensing at multiwalled carbon nanotube modified electrodes", *Nano Lett.*, 2006, 6, 1556-1558.

- [31] M. Pumera, "Carbon nanotubes contain residual metal catalyst nanoparticles even after washing with nitric acid at elevated temperature because these metal nanoparticles are sheathed by several graphene sheets", *Langmuir* 2007, 23, 6453-6458.
- [32] G.G. Wildgoose, C.E. Banks, H.C. Leventis, R.G. Compton, "Chemically modified carbon nanotubes for use in electroanalysis", *Microchim. Acta*, 2006, 152, 187-214.
- [33] J.J. Gooding, "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing", *Electrochim. Acta*, 2005, 50, 3049-3060.
- [34] T. Guo, P. Nikoleav, A.G. Rinzler, D. Tomanek, D.T. Colbert, R.E. Smalley, "Self-assembly of tubular fullerenes", *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 10694-10697.
- [35] Y.H. Yan, M.B. Chan-Park, Q. Zhang, "Advances in carbon-nanotube assembly", *Small*, 2007, 3, 24-42.
- [36] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, "Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors", *Angew Chem. Int. Ed.*, 2004, 43, 2113-2117.
- [37] J. Wang, G. Liu, M. Jan, "Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events", *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 3010-3011.
- [38] M. Chicharro, A. Sanchez, E. Bermejo, A. Zapardiel, M.D. Rubianes, G.A. Rivas, "Carbon nanotubes paste electrodes as new detectors for capillary electrophoresis", *Anal. Chim. Acta*, 2005, 543, 84-91.
- [39] X. Yao, X.J. Xu, P.Y. Yang, G. Chen, "Carbon nanotube/poly(methyl methacrylate) composite electrode for capillary electrophoretic measurement of honokiol and magnolol in Cortex Magnoliae Officinalis", *Electrophoresis*, 2006, 27, 3233-3242.
- [40] G. Chen, "Carbon nanotube and diamond as electrochemical detectors in microchip and conventional capillary electrophoresis", *Talanta*, 2007, 74, 326-332.
- [41] M. Pumera, A. Escarpa, "Nanomaterials as electrochemical detectors in capillary electrophoresis and microfluidics: fundamentals, designs, and applications", *Electrophoresis*, 2009, *in press*.
- [42] M. Pumera, A. Merkoci, S. Alegret, "Microchip electrophoresis with wall-jet electrochemical detector: Influence of detection potential upon resolution of solutes", *Electrophoresis*, 2006, 27, 5068-5072.
- [43] W.R. Heineman, P.T. Kissinger, "Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry", 2ª edición, eds. P.T. Kissinger, W. R. Heineman, Marcel Dekker, 1996, pp 51-139.
- [44] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, "Capillary electrophoresis microchip with a carbon nanotube-modified electrochemical detector", *Anal. Chem.*, 2004, 76, 298-302.

- [45] G. Chen, L. Zhang, J. Wang, "Miniaturized capillary electrophoresis system with a carbon nanotube microelectrode for rapid separation and detection of thiols", *Talanta*, 2004, 64, 1018-1023.
- [46] J. Wang, G. Chen, M. Wang, M.P. Chatrathi, "Carbon-nanotube/copper composite electrodes for capillary electrophoresis microchip detection of carbohydrates", *Analyst* 2004, 129, 512-515.
- [47] M. Pumera, X. Llopis, A. Merkoçi, S. Alegret, "Microchip capillary electrophoresis with a single-wall carbon nanotube/gold electrochemical detector for determination of aminophenols and neurotransmitters", *Microchim. Acta*, 2006, 152, 261-265.
- [48] M. Pumera, A. Merkoçi, S. Alegret, "Carbon nanotube detectors for microchip CE: Comparative study of SWCNT, MWCNT, and graphite powder films on glassy carbon, gold, and platinum electrode surfaces", *Electrophoresis*, 2007, 28, 1274-1280.
- [49] X. Yao, H. Wu, J. Wang, S. Qu, G. Chen, "Carbon Nanotube/Poly(methyl methacrylate) (CNT/PMMA) Composite Electrode Fabricated by In Situ Polymerization for Microchip Capillary Electrophoresis", *Chem. Eur. J.*, 2007, 13, 846-853.
- [50] J. Xu, H. Zhang, G. Chen, "Carbon nanotube/polystyrene composite electrode for microchip electrophoretic determination of rutin and quercetin in Flos Sophorae Immaturus", *Talanta*, 2007, 73, 932-937.
- [51] M. Vlcková, M.A. Schwartz, "Determination of cationic neurotransmitters and metabolites in brain homogenates by microchip electrophoresis and carbon nanotube-modified amperometry", *J. Chromatogr. A*, 2007, 1142, 214-221.
- [52] N. Wang, Y. Cai, R.Q. Zhang, "Growth of nanowires", *Mater. Sci. Eng. R*, 2008, 60, 1-51.
- [53] G.Z. Cao, D.W. Liu, "Template-based synthesis of nanorod, nanowire, and nanotube arrays", *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2008, 136, 45-64.
- [54] J. Sarkar, G.G. Khan, A. Basumallick, "Nanowires: properties, applications and synthesis via porous aluminium oxide template", *Bull. Mater. Sci.*, 2007, 30, 271-290.
- [55] S.J. Koh, "Strategies for controlled placement of nanoscale building blocks", *Nano. Res. Lett.*, 2007, 2, 519-545.
- [56] M. Tanase, L.A. Bauer, A. Hultgren, D.M. Silevitch, L. Sun, D.H. Reich, P.C. Searson, G.J. Meyer, "Magnetic Alignment of Fluorescent Nanowires", *Nano Lett.*, 2001, 1, 155-158,
- [57] B.M.I. van der Zande, G.J.M. Koper, H.N.W. Lekkerkerker, "Alignment of rod-shaped gold particles by electric fields", *J. Phys. Chem. B*, 1999, 103, 5754-5760.

- [58] A. Tao, F. Kim, C. Hess, J. Goldberger, R. He, Y. Sun, Y. Xia, P. Yang, "Langmuir-blodgett silver nanowire monolayers for molecular sensing using surface-enhanced Raman spectroscopy", *Nano Lett.*, 2003, 3, 1229-1233.
- [59] Y.Cui, Q.Weiz, H.Park, C.M. Lieber, "Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species", *Science*, 2001, 293, 1289-1292.
- [60] F. Patolsky, G.F. Zheng, C.M. Lieber, "Nanowire-based biosensors", *Anal. Chem.*, 2006, 78, 4260-4269.
- [61] N.H. Finkel, X. Lou, C. Wang, L. He, "Barcoding, the microworld", *Anal. Chem.*, 2004, 76, 352A-359A.
- [62] S.R. Nicewarner-Peña, R.G. Freeman, B.D. Reiss, L. He, D.J. Peña, I.D. Walton, R. Cromer, C.D. Keating, M.J. Natan, "Submicrometer Metallic Barcodes", *Science*, 2001, 294, 137-141.
- [63] W.C.W. Chan, D.J. Maxwell, X. Gao, R.E Bailey, M. Han, S. Nie, "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging", *Curr. Opin. Biotech.*, 2002, 13, 40-46.
- [64] B.J. Battersby, M. Trau, "Novel miniaturized systems in high-throughput screening", *Trends Biotechnol.*, 2002, 20, 167-173.
- [65] X.J. Huang, Y.Y. Zhang, "Electrical determination of E-coli O157 : H7 using tin-oxide nanowire coupled with microfluidic chip", *IEEE Sensors J.*, 2006, 6, 1376-1377.
- [66] E. Piccin, R. Laocharoensuk, J. Burdick, E. Carrilho, J. Wang, "Adaptive nanowires for switchable microchip devices", *Anal. Chem.*, 2007, 79, 4720-4723.
- [67] J. Wang, "Adaptive Nanowires for On-Demand Control of Electrochemical Microsystems", *Electroanalysis*, 2008, 20, 611-615.
- [68] J. Wang, Y.L. Bunimovich, G. Sui, S. Savvas, J. Wang, Y. Guo, J.R. Heath, H.R. Tseng, "Electrochemical fabrication of conducting polymer nanowires in an integrated microfluidic system", *Chem. Comm.*, 2006, 3075-3077.
- [69] A. Escarpa, M.C. González, "High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties", *J. Chromatogr. A*, **1998**, 823, 331-337.
- [70] A.J. Blasco, A.G. Crevillén, P. de la Fuente, M.C. González, A. Escarpa, "Electrochemical valveless flow microsystems for ultra fast and accurate analysis of total isoflavones with integrated calibration", *Analyst*, **2007**, 132, 323-329.

- [71] Z. Wang, J. Liu, Q. Liang, Y. Wang, G. Luo, "Carbon nanotube-modified electrodes for the simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid", *Analyst*, 2002, 127, 653–658.
- [72] A. Escarpa, M.C. González, "Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources", *J. Chromatogr. A*, 2000, 897, 161–170.
- [73] A.J. Blasco, M.C. González, A. Escarpa, "Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants", *Anal. Chim. Acta*, 2004, 511, 71–81.
- [74] J. Wang, R. Polsky, B. Tian, M. P. Chatrathi, "Voltammetry on Microfluidic Chip Platforms", *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5285–5289.
- [75] Y. Peng, Q. Chu, F. Liu, J. Ye, "Determination of isoflavones in soy products by capillary electrophoresis with electrochemical detection", *Food Chem.*, 2004, 87, 135–139.
- [76] J.L. Peñalvo, T. Nurmi, H. Adlercreutz, "A simplified HPLC method for total isoflavones in soy products", *Food Chem.*, 2004, 87, 297-305.
- [77] M. Pumera, B. Šmíd, K. Veltruská, "Influence of nitric acid treatment of carbon nanotubes on their physico-chemical properties", *J.Nanosci.Nanotechnol.*, 2008, 9, 1-6.
- [78] G.E. Cabanis, A.A. Diamantis, W.R. Murphy, Jr., R.W. Linton, T.J. Meyer, "Electrocatalysis of proton-coupled electron-transfer reactions at glassy carbon electrodes", *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 1845-1853.
- [79] H.V. Huynh, T.J. Meyer, "Proton-Coupled Electron Transfer", *Chem. Rev.*, 2007, 107, 5004-5064.
- [80] S.H. DuVall, R.L. McCreery, "Self-catalysis by Catechols and Quinones during Heterogeneous Electron Transfer at Carbon Electrodes", *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 6759-6764.
- [81] S.R. Hernández, G.G. Ribero, H.C. Goicoechea, "Enhanced application of square wave voltammetry with glassy carbon electrode coupled to multivariate calibration tools for the determination of B-6 and B-12 vitamins in pharmaceutical preparations", *Talanta*, 2003, 61, 743-753.
- [82] R.P. Deo, N.S. Lawrence, J. Wang, "Electrochemical detection of amino acids at carbon nanotube and nickel-carbon nanotube modified electrodes", *Analyst*, 2004, 129, 1076-1081.

- [83] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoçi, Y. Lin, "Low-potential stable NADH detection at carbon-nanotube-modified glassy carbon electrodes", *Electrochem. Commun.*, 2002, 4, 743-746.
- [84] J.X. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, Z. Gu, "Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 1993-1997.
- [85] R.P. Deo, J. Wang, "Electrochemical detection of carbohydrates at carbon-nanotube modified glassy-carbon electrodes", *Electrochem. Commun.*, 2004, 6, 284-287.
- [86] J. Wang, M. Musameh, "Electrochemical detection of trace insulin at carbon-nanotube-modified electrodes", *Anal. Chim. Acta*, 2004, 511, 33-36.
- [87] A. Salimi, R. Hallaj, "Catalytic oxidation of thiols at preheated glassy carbon electrode modified with abrasive immobilization of multiwall carbon nanotubes: applications to amperometric detection of thiocytosine, L-cysteine and glutathione", *Talanta*, 2005, 66, 967-975.
- [88] N.S. Lawrence, R.P. Deo, J. Wang, "Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes", *Talanta*, 2004, 63, 443-449.
- [89] A. Salimi, R. Hallaj, G.R. Khayatian, "Amperometric detection of morphine at preheated glassy carbon electrode modified with multiwall carbon nanotubes", *Electroanalysis*, 2005, 17, 873-879.
- [90] Q. Xu, S.F. Wang, "Electrocatalytic oxidation and direct determination of L-tyrosine by square wave voltammetry at multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrodes", *Microchim. Acta*, 2005, 151, 47-52.
- [91] J.X. Wang, M.X. Li, Z.J. Shi, N.Q. Li, Z.N. Gu, "Electrocatalytic oxidation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes", *Electrochim. Acta*, 2001, 47, 651-657.
- [92] P.J. Britto, K.S.V. Santhanam, P.M. Ajayan, "Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine", *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1996, 41, 121-125.
- [93] H. Luo, Z. Shi, N. Li, Z. Gu, Q. Zhuang, "Investigation of the electrochemical and electrocatalytic behavior of single-wall carbon nanotube film on a glassy carbon electrode", *Anal. Chem.*, 2001, 73, 915-920.
- [94] K. Wu, J. Fei, S. Hu, "Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes", *Anal. Biochem.*, 2003, 318, 100-106.

- [95] Z.H. Wang, Q.L. Liang, Y.M. Wang, G.A. Luo, "Carbon nanotube-intercalated graphite electrodes for simultaneous determination of dopamine and serotonin in the presence of ascorbic acid", *J. Electroanal. Chem.*, 2003, 540, 129-134.
- [96] C.D. Keating, M.J. Natan, "Striped metal nanowires as building blocks and optical tags", *Adv. Mater.*, 2003, 15, 451-454.
- [97] B.D. Reiss, R.G. Freeman, I.D. Walton, S.M. Norton, P.C. Smith, W.G. Stonas, C.D. Keating, M.J. Natan, "Electrochemical synthesis and optical readout of striped metal rods with submicron features", *J. Electroanal. Chem.*, 2002, 522, 95-103.
- [98] S.R. Nicewarner-Peña, A.J. Carado, K.E. Shale, C. D. Keating, "Barcoded metal nanowires: Optical reflectivity and patterned fluorescence", *J. Phys. Chem. B*, 2003, 107, 7360-7367.
- [99] R.L. Stoermer, K.B. Cederquist, S.K. McFarland, M.Y. Sha, S.G. Penn, C.D. Keating, "Coupling molecular beacons to barcoded metal nanowires for multiplexed, sealed chamber DNA bioassays", *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 16892-16903.
- [100] I.D. Walton, S.M. Norton, A. Balasingham, L. He, D.F. Ovisio, D. Gupta, P.A. Raju, M.J. Natan, R.G. Freeman, "Particles for multiplexed analysis in solution: detection and identification of striped metallic particles using optical microscopy", *Anal. Chem.*, 2002, 74, 2240-2247.
- [101] J. Wang, G. Liu, "Templated one-step synthesis of compositionally encoded nanowire tags", *Anal. Chem.*, 2006, 78, 2461-2464.
- [102] S. Sattayasamitsathit, J. Burdick, R. Bash, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, J. Wang, "Alloy nanowires bar codes based on nondestructive x-ray fluorescence readout", *Anal. Chem.*, 2007, 79, 7571-7575.
- [103] C. Ji, G. Oskam, Y. Oskam, Y. Ding, J.D. Erlebacher, A.J. Wagner, P.C. Searson, "Deposition of $Au_x-Ag_{x-1}/Au_y-Ag_{y-1}$ multilayers and multisegment nanowires", *J. Electrochem. Soc.*, 2003, 150, C523-C528.
- [104] M. Tanase, D.M. Silevitch, A. Hultgren, L.A. Bauer, P.C. Searson, G.J. Meyer, D.H. Reich, "Magnetic trapping and self-assembly of multicomponent nanowires", *J. Appl. Phys.*, 2002, 91, 8549-8551.
- [105] I.C. Casella, M. Gatta, T.R.I. Cataldi, "Amperometric determination of underivatized amino acids at a nickel-modified gold electrode by anion-exchange chromatography", *J. Chromatogr. A*, 2000, 878, 57-67.
- [106] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, "Nickel amperometric detector prepared by electroless deposition for microchip electrophoretic measurement of alcohols and sugars", *Electroanalysis*, 2004, 16, 1603-1608.

IV. Conclusiones generales

Los microchips comerciales de vidrio con diseño de cruz sencilla, aun presentando una inherente dificultad experimental presentan un enorme potencial analítico y constituyen una de las alternativas contemporáneas más atractivas para la resolución de problemas químico-analíticos. Para aceptar dicho potencial, el microchip debería ser entendido como un sistema microfluídico que contiene en el caso más sencillo un capilar donde se lleva a cabo una o varias etapas del proceso analítico general. Asimismo, estos microchips deberían ser también entendidos como una plataforma electrocinética cerrada donde los fluidos son transportados con relativa facilidad y donde se pueden variar las condiciones de introducción de muestra tan sólo modificando la intensidad de las fuerzas externas eléctricas. Aquellos sistemas químico-analíticos que, de alguna manera, presenten un comportamiento analítico excepcional en alguno sentido, son candidatos a una investigación ulterior fundamentalmente relacionada con ambicionar diseños y microfluídica más compleja que vengan a satisfacer las necesidades analíticas pertinentes. Un ejemplo inmediato es la realización de numerosos análisis de manera simultánea en distintos canales a la vez. Este avance químico y tecnológico ya se ha producido en el análisis del ADN pero en otros campos tales como en el ámbito del análisis de los alimentos todavía dista mucho de alcanzarse.

En este contexto y con independencia de las bondades anteriormente señaladas, se hace estrictamente necesario la búsqueda de estrategias de detección sensibles y selectivas para paliar dos de los grandes inconvenientes derivados de la disminución del escalado: la sensibilidad y la selectividad. En este sentido, la detección electroquímica por estar miniaturizada en sí misma y por ser compatible con la tecnología de sala blanca constituye una de las alternativas naturales más importantes en este tipo de microsistemas. Y en el ámbito de dicha detección, la incorporación de nanomateriales tales como los nanotubos de carbono y otras nanoestructuras constituyen otro gran eslabón en el proceso de la *selección natural analítica* para la mejora de estos dispositivos.

A la luz de este pensamiento, creemos que los microchips de electroforesis capilar constituyen una importante alternativa para la determinación de vitaminas hidrosolubles, antioxidantes naturales polifenólicos e isoflavonas. En efecto, las aproximaciones analíticas propuestas para su determinación final en muestras reales

se han basado en la detección y determinación de los analitos diana en tiempos y volúmenes de muestra impensables en escalados convencionales. Un aspecto interesante es que se ha demostrado la integración secuencial de una etapa de calibración previa o ulterior a dicha determinación que simplifica notablemente las metodologías desarrolladas empleando estos microsistemas.

Es preciso señalar que, estos hallazgos están inherentemente unidos al empleo de nanotubos de carbono de pared múltiple, que han demostrado ofrecer las mejores prestaciones analíticas a la detección electroquímica en microchips tales como el aumento de la sensibilidad en el análisis de muestras reales donde el empleo de estos nanodetectores ha permitido la detección directa de determinados analitos no detectables en su ausencia. Asimismo, estos nanomateriales presentan unas características electrocatalíticas selectivas a determinados analitos, como son los enodiolos, cuya relación estructural y electrocatalisis observada se ha propuesto en este trabajo y, por primera vez, en la bibliografía.

En consecuencia, creemos que la incorporación de nanotubos de carbono a los microchips de electroforesis capilar de primera generación ha originado una segunda generación de los mismos con estos nanomateriales integrados. Un adecuado diseño de canales paralelos y detectores electroquímicos sería una etapa tecnológica siguiente que ofrecería unas grandes perspectivas analíticas.

En esta dirección y sobre todo en la incorporación de otros nanomateriales estamos caminando con la prudencia necesaria pero con la certeza de que seguimos uno de los caminos naturales de la microfluídica: la mejora de la sensibilidad analítica a través de nuevas estrategias y sistemas de detección.

V. Anexos

**V.1. Composición del material secundario
de referencia suministrado por *Exxentia***



Extracto : E.N. ISOFLAVONAS DE SOJA 40/26

Nº lote : X052301-SOJ

Nombre Científico : Glycine max.

Caducidad : 23/01/08

Droga: Semillas.

Solubilidad: Parcialmente soluble en soluciones hidroalcohólicas.

Descripción Polvo de color ocre, de olor y sabor no característicos.

ANALISIS	ESPECIFICACION	METODOS	RESULTADOS
pH	4 - 7	Eu. Pharm. 02 (II ed., 2.2.3)	5.6
Humedad	< 5,5%	Eu. Pharm. 02 (II ed. 2.2.32)	2.6%
Cenizas Totales	< 10%	Eu. Pharm. 02 (II ed. 2.4.16)	2.8%
Título	Min. 40%	(HPLC)	45.8% Isoflavonas
Ratio			
Densidad	> 0,4 g/ml	Eu. Pharm. 02 (II ed., 2.9.15)	0.710 g/ml
Densidad aparente	> 0,3 g/ml		0.436 g/ml
Tamaño partícula		Eu. Pharm. 02 (II ed., 2.9.12)	
> 180 micras			12.4%
180 - 150 micras			14.7%
150 - 100 micras			41.1%
< 100 micras			31.8%
Microbiología		Eu. Pharm. 02 (II ed., III B)	
Bacterias aerobias	< 10.000 ufc/g		Cumple
Enterobacterias	< 100 ufc/g		Cumple
Escherichia coli	Ausencia (1g)		Cumple
Salmonella	Ausencia (10g)		Cumple
Hongos	< 100 ufc/g		Cumple
S. aureus	Ausencia		Cumple
P. aeruginosa	Ausencia		Cumple
Disolv. residuales		Eu. Pharm. 02	Cumple
—			
Metales pesados	20 ppm max.	Eu. Pharm. 02 (II ed., 2.4.8)	
Plomo			Cumple
Arsenico			Cumple
Mercurio			Cumple
Cadmio			Cumple
Pesticidas	Lim. farmacop.	Eu. Pharm. 02 (II ed., 2.8.13)	Cumple
Aflatoxinas	Ausencia		Cumple

Conservación : Recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz

Origen : España

Calificación : APTO

CONFORMIDAD	
Dirección Técnica	Control calidad

V.2. Acrónimos

AFM	Microscopía de fuerza atómica
BET	Método de Brunnauer, Emmett y Teller
BSE	Detección de electrones retrodispersados
CE	Electroforesis capilar
CNT	Nanotubo de carbono
CV	Voltamperometría cíclica
CVD	Deposición de vapor químico
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
DMF	Dimetilformamida
DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos
ED	Detección electroquímica
EDX	Espectroscopía por fluorescencia de rayos X
EOF	Flujo electroosmótico
GCE	Electrodo vitrificado de carbono
HDV	Voltamperograma hidrodinámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HP-β-CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
LIF	Fluorescencia inducida por láser
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MFA	Monofluoroacetato
MWCNT	Nanotubo de carbono de pared múltiple
NW	Nanohilo
PAD	Detección amperométrica por impulsos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetacrilato de metilo
PVA	Polialcohol vinílico
SEM	Microscopia electrónica de barrido
SPE	Electrodo serigrafiado
STM	Microscopía de efecto túnel
SWCNT	Nanotubo de carbono de pared sencilla

TAS	Sistemas de análisis total
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TOPAS	Copolímero de ciclo-olefinas
UV	Detección ultravioleta visible
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
μCE	Microchip de electroforesis capilar

**V.3. Producción científica fruto de esta
memoria**

Microchip-electrochemistry route for rapid screening of hydroquinone and arbutin from miscellaneous samples: Investigation of the robustness of a simple cross-injector system

Agustín G. Crevillén, Inés Barrigas, Antonio Javier Blasco, María Cristina González, Alberto Escarpa*

Dpto. Química Analítica e Ingeniería Química, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received 30 November 2005; received in revised form 17 January 2006; accepted 18 January 2006

Available online 2 March 2006

Abstract

This work examines in deep the analytical performance of an example of “first-generation” microdevices: capillary electrophoresis microchip (CE) with *end-channel* electrochemical detection (ED). A hydroquinone and arbutin separation strategically chosen as route involving pharmaceutical–clinical testing, public safety and food control scenes was carried out. The reproducibility of the unpinched electrokinetic protocol was carefully studied and the technical possibility of working indiscriminately and/or sequentially with both simple cross-injectors was also demonstrated using a real sample (R.S.D.’s less than 7%). The robustness of the injection protocol allowed checking the state of the microchip/detector coupling and following the extraction efficiency of the analyte from real sample. Separation variables such as pH, ionic strength and, separation voltage were also carefully assayed and optimized. Analyte screening was performed using borate buffer (pH 9, 60 mM) in less than 180 s in the samples studied improving dramatically the analysis times used for the same analytes on a conventional scale (15 min), with good precision (R.S.D.’s ranging 5–10%), accuracy (recoveries ranging 90–110%) and acceptable resolution ($R_s \geq 1.0$).

In addition, the excellent analytical performance of the overall analytical method indicated the quality of the whole analytical microsystem and allowed to introduce the definition of robustness for methodologies developed into the “lab-on-a-chip” scene.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Capillary electrophoresis microchip; Electrochemical detection; Injection protocol; Robustness; Hydroquinone and arbutin

1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) microchips have been demonstrated to be very attractive analytical microsystems because of their inherent features regarding analysis speed and low sample volumes required [1,2]. Electrochemical detection (ED) is one of the most important detection routes in these microsystems due to its inherent features of miniaturisation and its compatibility with advanced micromachining and sensitivity [3–6]. Among others, different and excellent designs have been proposed using *end-channel* [7–9], *in channel* [10,11] and *off-channel* [12,13] configurations. Also, a very interesting approach has demonstrated some of unique advantages of totally microfabricated systems designed for CE–ED [14]. Microdevices combining

simple cross-microchips with *end-channel* amperometric detection have been pointed out as one of the most representative analytical microsystems of the micro-TAS environment because of their ruggedness and simplicity [6]. It covers the establishment and transference of well-known principles from conventional CE to microchip format, the performance of integrated microfabricated designs involving separation and detection schemes (fast analysis, good separation efficiency, adequate LODs), and the design of sophisticated protocols and schemes that lead to relevant applications. These microdevices have demonstrated to play a prominent role in bioanalytical and clinical applications mainly when sample treatment is simple because of the high selectivity/specificity of the bio-reagents used. However, the incorporation of new applications including forensic security, food and cosmetics is until now very scared [15,16].

Apart from introducing novel concepts and technological improvements, advanced research should involve

* Corresponding author. Tel.: +34 918854972; fax: +34 918854971.

E-mail address: alberto.escarpa@uah.es (A. Escarpa).

methodological routes to demonstrate the real power of the so-called “first-generation analytical microsystems”.

The success of analytical methodologies should be closely related to the quality of the whole analytical microsystem, which ought to include as much the set-up of the microfabricated CE-microchip as its performance. In this way, checking the quality and the technical possibilities of commercial CE-microchips fixed in suitable set-ups should be also carried out. Other aspects related to analytical performance, such as the robustness should also be addressed as a prior step in validating the methods when using this kind of microsystems. The analytical robustness of miniaturised electrophoresis could be evaluated according to precision, accuracy, and resolution of the electrophoretic separation in the same way as in conventional-scale separations [17].

In order to study deeply analytical performance of the “first-generation analytical microsystems”, an analyte separation of miscellaneous significance involving different real samples from pharmaceutical, clinical, cosmetic and food scenes should be chosen as strategy route.

In this way, free hydroquinone and hydroquinone glycoside (arbutin) have been chosen because of their wide miscellaneous significance acting as antioxidants, disinfectants in lower-urinary-tract-infection therapy or as skin lighteners and subsequently they could be analyzed in samples involving different areas such as food, pharmaceutical, clinical and cosmetic.

Arbutin is present as active principle in herbal medicinal products (HMPs) containing extracts from bearberry leaves [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.)] which are used as disinfectants in therapy of lower urinary tract infections. After oral administration of HMPs containing arbutin, extracts are renally excreted as hydroquinone conjugates of hydroquinone (glucuronide and glucoside). Free hydroquinone is discussed to be responsible for efficacy of HMPs containing bearberry leaf extracts. Validation of methods for direct determination of hydroquinone in human urine after arbutin oral intake has been proposed using HPLC and CE conventional scale with good results [18,19].

On the other hand, hydroquinone-based skin lighteners can cause itch, dermatitis and erythema in individuals with especially sensitive skin as well as changes in skin colour upon prolonged treatment. For these reasons, the European Union [20] issued directive 84/415 to restrict the maximum allowed amount of hydroquinone in cosmetic products. The simultaneous HPLC determination of hydrophilic whitening agents in cosmetic products have been also studied [21]. Also, both analytes could be occurring in different food samples such as broccoli, coffee, wheat products and red wine [22].

In addition, direct analytical determinations for each analyte have been also reported underlining the individual significance of these analytes. In fact, an electrochemical sensor based on a clay-coated screen printed electrode for the determination of arbutin in cosmetic bleaching products [23] and a direct chemiluminiscent determination of hydroquinone in pharmaceutical formulations [24] have been published.

As consequence of the analytes significance described above, the aim of this work has been to develop just one analytical method incorporating clinical testing (control of nutraceuti-

cal intakes/hydroquinone urine excretion), public safety (control of arbutin/hydroquinone in cosmetic/pharmaceutical formulations) and food control (screening in wine samples) scenes.

The screening analytical protocol should combine the analyte significance with the inherent benefits of miniaturisation such fast analysis and low sample/reagents consumption. Also, to our best knowledge this analytical proposal has never been studied into microchip format.

2. Experimental

2.1. Materials and standards

Hydroquinone and hydroquinone-1-*O*- α -D-glycoside (arbutin) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Food-related samples (Gayuba, *A. uva-ursi* L.), cosmetics (Pigmentasa formulation) and red wine were purchased in local markets (Madrid, Spain). Urine samples were recollected from our research team.

All chemicals used in buffer preparation and in supporting electrolytes were reagent grade. Methanol was acquired from Sharlau. In all cases, high-quality water, purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), was used.

2.2. Apparatus

The adapted CE–ED microsystem previously reported [25] and recently implemented in our laboratory [26] was used in this paper. The glass chip was fabricated by Micalyne (Model MC-BF4-001, Edmond, Canada) using wet chemical etching and thermal bonding techniques. The microchip consisted of a glass plate (88 mm \times 16 mm) with a four-way injection cross, a 74-mm-long separation channel, and side arms measuring 5 mm long. The original waste reservoir was cut off, leaving the channel outlet at the end of the chip to facilitate end-channel amperometric detection. The channels were 50 μ m wide and 20 μ m deep. The glass chip was fixed using a Plexiglas holder that was fabricated in a machine shop and adapted for our laboratory. The holder contained reservoirs for the sample and buffer solutions, a detection reservoir, and another reservoir used for other analytical purposes. Pipette tips were inserted into each of the three holes in the glass chip for solution contact between the channel and the corresponding reservoir in the chip holder. A platinum wire was inserted into each reservoir to serve as a contact for the high-voltage power supply. The amperometric detector (on the end-channel side), consisted of an Ag/AgCl wire reference, a platinum wire electrode, and a glassy carbon disk electrode (\varnothing 2 mm) as a working electrode. The working electrode was further held in place by a plastic screw which pressed the electrode against the channel outlet. We also introduced a spacer (easily removable adhesive tape) (60 μ m) between the electrode surface and the channel outlet to control the distance between the electrode and the channel separation with reproducibility as professor Wang's group introduced [8]. The spacer was cut and pasted accordingly in order to keep the surface

of electrode free. The simple combination of spacer and screw allowed us to carry out electrode alignment with reproducibility. Optical control of the alignment was also checked with the aid of a magnifying glass. Amperometric detection was performed using a Potentiostat Autolab PGSTAT12 from Eco Chemie. The high-voltage power supply (from Glassman High Voltage Inc.) had an adjustable voltage range between 0 and +5000 V.

2.3. Procedures

Stock solutions of hydroquinone-1-*O*- α -D-glycoside (arbutin) and hydroquinone were dissolved in MeOH to obtain a final concentration of 5 g/L and then stored at -20°C . Working solutions for the studies were appropriately diluted in the electrophoresis buffer. All working solutions were well protected from light and used within 24 h after preparation.

Twenty-five capsules of Gayuba (*A. uva-ursi* L.) were opened and then emptied and mixed into a recipient. About 5 mg of this mixture was introduced into a glass flask and 25 ml of borate buffer (60 mM pH 9) was added. The sample was extracted using an ultrasonic bath for 10 min and then it was centrifuged at 3700 rpm for another 10 min. The process was repeated twice using the residue with 5 ml of borate buffer. About 0.1 g of cream was placed into a flask and 10 ml of borate buffer was added and then the flask was immersed in an ultrasonic bath for 10 min. The urine sample was filtered before using it and diluted in borate buffer in a 6:1 ratio. The wine sample also was filtered and diluted in the same buffer in a 7:3 ratio.

All samples were filtered using $0.45\ \mu\text{m}$ nylon membrane filters (Millipore Millex-HN) prior to their use.

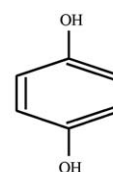
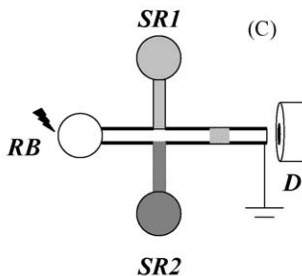
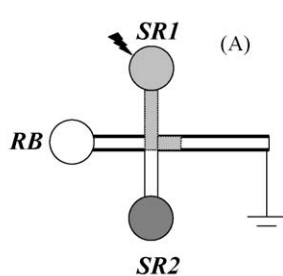
2.3.1. Glassy carbon electrode cleaning procedure

Before each session, the electrode was cleaned using three kinds of treatments: physical, chemical and electrochemical. The physical treatment consisted of manually polishing the electrode with alumina powder ($\text{Ø} = 0.3 + 0.05\ \mu\text{m}$) for 1 min and then rinsing it with deionised water. During the chemical treatment, the electrode was sonicated in an HCl (1:1) solution for 3 min, then rinsed with deionised water and sonicated in ethanol for 3 min, finally being rinsed again with deionised water. The electrochemical treatment consisted of subjecting the electrode to cyclic voltammetry at a scan rate of 10 V/s for 15 min. The state of the electrode was checked using $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ solution 0.1 M. During the session, the electrode was electrochemically cleansed using cyclic voltammetry at 1000 cycles at 10 V/s only when necessary.

2.3.2. Electrophoretic procedure

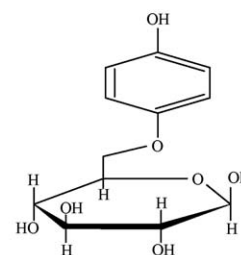
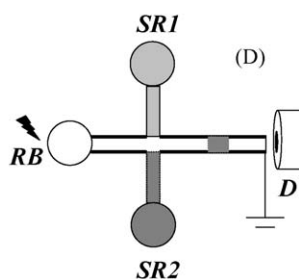
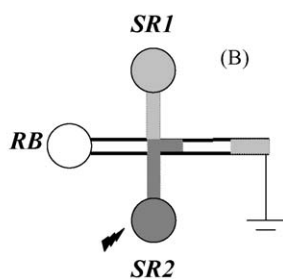
The channels of the glass microchip were treated before use and between groups of runs by rinsing them with 0.1 M NaOH and deionised water for 10 min each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. The optimum electrophoresis buffer consisted of 60 mM borate buffer (pH 9). The running buffer and all reservoirs were filled with electrophoresis running buffer solution. The detection reservoir was filled with the running buffer solution. A voltage of 2000 V was applied for 20 s to the buffer reservoir to facilitate filling the separation channel while the detection reservoir was grounded and the others were floating. This process was performed to each sample reservoir for 20 s to facilitate filling the injection channel (between the separation channel and the sample reservoir), then the voltage was applied for 5 min to the running buffer reservoir

Injector 1



Hydroquinone

Injector 2



Arbutin

Fig. 1. Chemical structures, microchip layout and electrokinetic protocol for sequentially using both injectors. Pre-injection steps (2 kV, 30 s) (A + B), injection steps (1 kV, 5 s) (C + D). RB: running buffer reservoir, SR1 and SR2 sample reservoirs.

to eliminate the remains of the previously introduced samples from the separation channel.

2.3.3. Amperometric detection

A detection voltage of +1.0 V was applied to the working electrode during electrophoretic separation. All experiments were performed at room temperature.

2.3.4. Safety considerations

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

3. Results and discussion

The analytical route proposed to introduce a robustness definition for methods developed into micron-size environments has been: (i) to choose an analytical microsystems such as CE simple cross-microchip with ED *end-channel* configuration (example of “first-generation” microsystem), (ii) to study the reproducibility of injection protocol using both injectors (in order to check the efficiency of the electrokinetic phenomena, connexions and reproducibility in the sample plug injected), (iii) to choose analytes of significance (hydroquinone and arbutin) involved in different kind of samples: nutraceuticals, urine, cosmetics, wines, and (iv) to involve heterogeneous analysis scenes (clinical testing, public safety and food control).

In addition, the whole robustness of one analytical method developed into microchip format should include two contributions which could be termed *technical* and *analytical*. In order to explore the “technical” contribution to robustness the injection efficiency of both injectors was carefully checked. The robustness of the analytical method should be checked on the basis

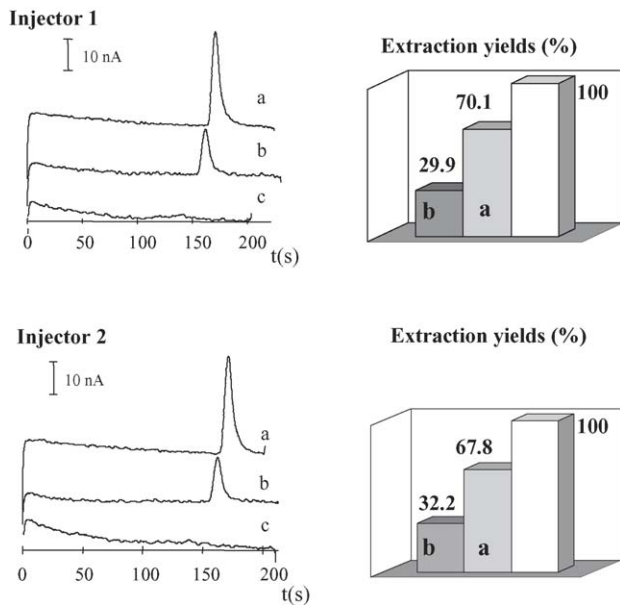


Fig. 2. Extraction efficiency of arbutin from nutraceutical HMP using injectors 1 and 2: electrophoregrams and bars diagrams obtained for (a) first, (b) second, and (c) third extractions. Conditions: borate buffer 60 mM pH 9, injection voltage 2 kV for 10 s, detection potential +1.0 V. Other conditions see Section 2.

Table 1

Intra-injector and inter-injector precisions obtained in the extraction of hydroquinone glycoside (arbutin) from Gayuba (HMP) using both injectors (1 and 2)

Extract 1 ^a		Extract 2 ^b	
Migration time (s)	Peak height (nA)	Migration time (s)	Peak height (nA)
Intra-injector (1) ^c	Peak area ($\times 10^7$ C)	Peak area ($\times 10^7$ C)	Peak area ($\times 10^7$ C)
170.1	2.37	162.8	11.8
171.4	2.34	163.4	12.6
171.6	2.47	163.2	12.5
171.3 \pm 0.4 (R.S.D. = 2%)	2.39 \pm 0.07 (R.S.D. = 3%)	163.1 \pm 0.3 (R.S.D. = 0.2%)	12.3 \pm 0.4 (R.S.D. = 3%)
Intra-injector (2)			
171.8	2.12	164.0	13.0
171.8	2.34	164.0	13.3
171.2	2.30	162.6	13.7
171.4 \pm 0.4 (R.S.D. = 0.2%)	2.25 \pm 0.12 (R.S.D. = 5%)	163.5 \pm 0.8 (R.S.D. = 0.5%)	13.3 \pm 0.3 (R.S.D. = 2%)
Inter-injectors (1–2) ^d			
171.4 \pm 0.4 (R.S.D. = 0.2%)	2.32 \pm 0.11 (R.S.D. = 5%)	163.3 \pm 0.6 (R.S.D. = 0.4%)	12.8 \pm 0.7 (R.S.D. = 7%)

^a First extract obtained from HMP in 25 mL.

^b Second extract obtained from HMP in 5 mL.

^c Values for migration time, peak height and peak area obtained from injector labelled 1 and 2 for extracts 1 and 2. Values are expressed as an average value \pm S.D.

^d Values for migration time, peak height and peak area taking into account all values obtained from both reservoirs. Values are expressed as average value \pm standard deviation (S.D.) (R.S.D. = relative standard deviation).

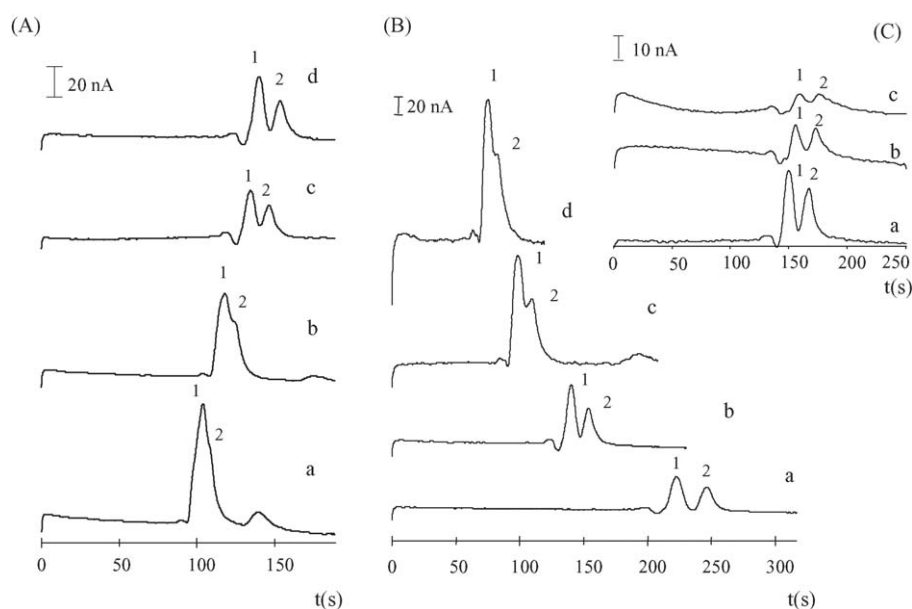


Fig. 3. (A) Influence of ionic strength on electrophoretic separation: (a) 30 mM, (b) 40 mM, (c) 50 mM, and (d) 60 mM. Conditions: separation voltage 1.5 kV, injection voltage 2 kV for 10 s, and detection potential +1.0 V. (B) Influence of the voltage separation on the resolution of the peaks: (a) 1 kV, (b) 1.5 kV, (c) 2 kV, and (d) 2.5 kV. Conditions: borate buffer 60 mM pH 9, injection voltage 2 kV for 10 s, and detection potential +1.0 V. (C) Influence of the separation distance between the detector and the outlet of the electrophoresis channel: (a) 60 μm , (b) 120 μm , and (c) 180 μm . Conditions: borate buffer 60 mM pH 9, injection voltage 2 kV for 10 s, and detection potential +1.0 V. Peak labels correspond to: (1) hydroquinone 200 ppm and (2) arbutin 200 ppm.

of its precision, accuracy and separation resolution using both standard (hydroquinone and arbutin) and target samples.

3.1. Injection efficiency: technical use of both simple cross-injectors

In the most of the papers found in the literature, one of the reservoirs in simple cross-layout microchips is an unused reservoir termed “sample waste reservoir (SW)”. However, since the sample introduction is still done manually, the potential use of both injectors should be very useful, furthermore enhancing the analytical power of these microchips since their throughput should be multiplied by a factor of 2. In order to explore the injection efficiency of both injectors and to demonstrate the possibilities of working indiscriminately and/or sequentially with both simple-T injectors in the commercial microchip used, in this work the arbutin extraction from a nutraceutical herbal medicinal plant (HMP) has been chosen.

The easiest injection procedure is the unpinched approach because of this principle can be carried out using just a single power supply (in general, it is the common strategy used [5]). Chemical structures studied in connection with the microchip layout and the injection protocol involving both injectors (SR1 and SR2) as proposal are shown in Fig. 1. After large injection from both sample reservoirs (A + B), a high voltage is applied to the sample reservoir for a short time with the electrochemical reservoir held at ground (*injection*). Sample is introduced directly into the separation channel by electrokinetic injection. After the injection is completed, the high voltage is switched back to the buffer reservoir and the separation is initiated (*run/separation*) (C + D). This approach does not use pushback voltages to keep sample into the main separation channel and can result in irreproducible injections and large plugs. In our work, the novelty has been to extent this well-known protocol using both injectors and to study in deep their efficiency and reproducibility.

Table 2
Repeatability and reproducibility of the screening method

Hydroquinone						Arbutin					
tm \pm S.D. (s)	R.S.D. (%)	Height \pm S.D. (nA)	R.S.D. (%)	Area \pm S.D. ($\times 10^7$ C)	R.S.D. (%)	tm \pm S.D. (s)	R.S.D. (%)	Height \pm S.D. (nA)	R.S.D. (%)	Area \pm S.D. ($\times 10^7$ C)	R.S.D. (%)
Repeatability^a											
130 \pm 1	0.8	33 \pm 1	3	2.67 \pm 0.12	5	142 \pm 1	0.7	22 \pm 1	4	1.70 \pm 0.14	8
Reproducibility^b											
137 \pm 10	7	32 \pm 2	6	2.44 \pm 0.17	7	150 \pm 13	9	21 \pm 2	9	1.82 \pm 0.16	9

^a Precision evaluated as repeatability ($n = 3$ same day).

^b Precision evaluated as reproducibility ($n = 3$ different days).

To provide a quantitative look, Table 1 lists the results obtained for arbutin extraction in HMP samples. *Intra-injector* precision has been defined as the relative standard deviation obtained in the repetitive arbutin analysis carried out using the same injector and *inter-injector* precision as the relative standard deviation obtained in the repetitive arbutin analysis carried out using both injectors. A very good results with respect to migration time, peak height and peak area were obtained with R.S.D. values at less than 4% when just one injector was used (*intra-injector* precision). When the results obtained from both injectors (*inter-injector* runs) were compared, differences of less than 7% were obtained. These experiments were carried out using two different extracts (different analyte concentration) to confirm the indiscriminate use of both injectors.

Therefore, the results obtained indicate good reproducibility between injectors and open the possibility of working indiscriminately and/or sequentially with both injectors, at least when the same sample is deposited in both reservoirs. Also, the microchip-based protocol allowed the monitoring of the optimization of sample extraction, since allowed to read until *blank* electrophoregram indicating the efficiency of the extraction as Fig. 2 depicts. As observed, the extraction efficiency was closer to 70% in the first extract and, closer to 30% in the second one with independency of the injector used. In order to confirm the suitability of the microchip, these extracts were analyzed off-chip using a differential pulse voltammetry and confirmed the absence of analyte in the third extract.

3.2. Analyte separation and detection

Firstly, chemical variables such as pH and ionic strength were assayed. pH influence on the separation resolution was checked

from 8.5 to 9.5 pH, with pH 9 being the most suitable value (electrophoregrams are not shown). Fig. 3A shows the influence of ionic strength on the separation process when the ionic strength varied from 30 to 60 mM using a borate buffer (pH 9) as a separation media in steps of 10 mM each. As expected, when the ionic strength increased, migration times also increased, and resolution improved. Acceptable resolution was obtained ($R_s = 1.2$) when ionic strength was 60 mM and, subsequently, this value was chosen as optimal.

The influence of the separation voltage was also checked. Fig. 3B shows the electrophoregrams obtained when the separation voltage varied from 1.0 to 2.5 kV in steps of 0.5 kV each. As expected, when separation voltage increased, migration times decreased and a loss of resolution was observed. A 1.5 kV separation voltage was chosen as the optimal voltage to achieve a complete and fast separation of both analytes with acceptable resolution ($R_s = 1.2$).

It is well known, that distance between the outlet channel and the working electrode surface is crucial in *end-channel* configurations because it can dramatically affect the efficiency and sensitivity of the analysis. Fig. 3C shows the influence of the electrode/outlet channel distance on the sensitivity, efficiency and resolution of the separation. The distance between the outlet channel and the working electrode was varied by using one, two or three strips of adhesive tape as a way of obtaining distances of 60, 120 and 180 μm , respectively (see Fig. 3Ca–c). As expected, when the separation distance was increased, efficiency decreased. In fact, the number of plates was reduced from 1804 to 679 for free hydroquinone and from 1834 to 520 for arbutin when the separation distance went from 60 to 180 μm . When the adhesive tape did not cover the electrode, a high noise was detected. In addition, since electrode alignment was always

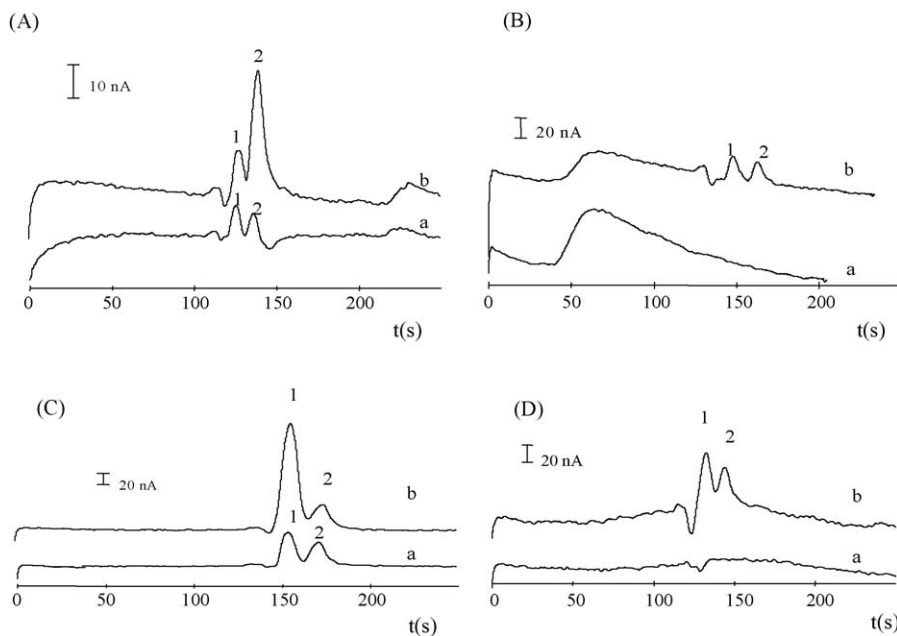


Fig. 4. Real sample analysis. Electrophoregrams of nutraceutical HMP (A), urine (B), cosmetic formulation (C), and wine (D) samples. Peak labels correspond to: (1) hydroquinone and (2) arbutin. (a) Spiked with 150 ppm of analyte not found: (A) hydroquinone and (C) arbutin; (b) spiked with 150 ppm of hydroquinone and 125 ppm of arbutin. Other conditions see caption for Fig. 3C.

carried out as far as the separation channel stop, the use of this spacer allowed the electrode-channel outlet to be controlled with reproducibility. As a consequence, 60 μm was chosen as the optimal distance between the channel outlet and the working electrode.

Although the influence of separation voltage is minimal on the potential applied to the electrochemical detector because most of the voltage is lost across the channel, the separation voltage can cause a small but significant shift in the potential of the working electrode. Therefore, it is necessary to obtain a hydrodynamic voltammogram for the compound of interest under the same separation conditions (HDV profiles for both analytes under optimal conditions are not shown). A +1.0 V was chosen as the optimal detection potential because of its signal/noise characteristics.

3.3. Analytical performance

Analytical robustness was accordingly studied in regard to precision, accuracy and resolution. Precision was carefully evaluated as repeatability and reproducibility. Table 2 shows the repeatability and reproducibility obtained for migration times, peak heights and peak areas of both analytes. As expected, R.S.D. values obtained for repeatability were lower than those found for reproducibility in all cases examined. Very good repeatability was obtained with both analytes behaving similarly with R.S.D. values of less than 0.8% for migration times, less than 4% for peak height and less than 8% for peak areas. Reproducibility (calculated after different days/operators) was also very good. Again both analytes exhibited the same behaviour with R.S.D. values ranging from 7 to 9% for migration times, 6 to 9% for peak heights, and 7 to 9% for peak areas.

To demonstrate the accuracy, recovery studies were carried out and external calibration was performed for both analytes (electrophoregrams are not shown). Different linear ranges and sensitivities were obtained showing a higher calibration slope (0.074 $\text{C mg}^{-1} \text{L}$) for free hydroquinone and for its related glycoside (0.052 $\text{C mg}^{-1} \text{L}$). A very well concentration dependence was also obtained with correlation coefficients of 0.990 and 0.999 for free hydroquinone and arbutin, respectively. The detection and quantification limits were calculated using $S/N=3$ and 10 criteria, respectively. Detection and quantification limits obtained were of 3.0 and 10 mg/mL and they were suitable to determine this kind of analytes in these real samples.

3.4. Application to samples

Fig. 4 shows the electrophoregrams obtained for nutraceutical (HMP) (A), urine (B), cosmetic formulation (C), and red wine (D).

Arbutin was completely extracted from the formulation detected in presence of spiked free hydroquinone in less than 180 s with good resolution (Fig. 4A). To check the matrix effects, the same analyte separation was carried out using real urines samples where both analytes were again really detected in less than 180 s with good resolution (Fig. 4B). Therefore, the proposed microchip protocol allowed the quality testing of the

Table 3
Evaluation of analytical robustness in the real sample analysis

Sample	Sample preparation	Hydroquinone				Arbutin				R _s ^d		
		tm \pm S.D.	R.S.D. (%) ^a (migration)	R.S.D. ^b (%) (height)	R.S.D. ^c (%) (area)	Recovery (%)	tm \pm S.D.	R.S.D. (%) ^a (migration)	R.S.D. ^b (%) (height)		R.S.D. ^c (%) (area)	Recovery (%)
HMP	Ultrasonic extraction	127.9 \pm 0.7	0.5	2.2	5.0	110	138.8 \pm 0.7	0.5	6.1	5.5	100	1.12
Urine	Filtration/dilution	148.1 \pm 0.4	0.3	5.0	9.8	85	162.9 \pm 0.5	0.3	6.8	9.9	91	1.55
Cosmetic	Ultrasonic extraction	154.8 \pm 0.3	0.2	2.0	2.6	70	172.5 \pm 0.1	0.1	1.2	2.1	97	1.12
Red wine	Filtration/dilution	132.9 \pm 0.6	0.5	2.4	5.0	103	144.3 \pm 0.6	0.4	2.9	8.5	95	1.03

^a Relative standard deviation ($n=3$) obtained for migration times.

^b Peak heights.

^c Peak areas.

^d Resolution obtained in each sample.

nutraceutical by detecting the presence of active principle and the clinical testing from the potentially excreted hydroquinone in urine samples.

Also, free hydroquinone was really extracted and detected very fast in cosmetic formulations in both absence and presence of their glycoside arbutin (Fig. 4C). Subsequently, the method allowed checking of the hydroquinone concentration being detected simultaneously in the presence of arbutin which could be also added being these concentrations under control in this kind of samples. Therefore, the microchip protocol could be useful in public safety domain.

Finally, the fast detection of both analytes in wine samples where both analytes could be potentially present were achieved under acceptable resolution conditions allowing the food quality control (Fig. 4D).

In all cases examined, both analytes were spiked to confirm their identity in the target samples studied (electrophoregrams b).

On the other hand, Table 3 lists quantitative data obtained from real sample analysis: precision in the migration times, in peak heights, peak areas and recoveries, as well as the separation resolution obtained in each analysis.

As can be observed, very good precision was also obtained for all repetitive analyte screening performed in every sample studied with very acceptable R.S.D. values. Good recoveries ranging between 90 and 110% were also obtained, being the lowest ones those found in urine samples.

The sample preparation procedures employed (extraction, filtration and/or dilution) had influence on the migration times; however, very fast separation was achieved in all cases with analysis times under 180 s without losing resolution in any case ($R_s \geq 1.0$).

4. Conclusions

Because analytical microsystems are being incorporated into our laboratories, methods with analytical robustness should be devised which involve both technical and analytical components. In the particular case of CE–ED microchips, analytical robustness should be evaluated with regard to precision, accuracy and resolution separation in the same way as in conventional-scale separations. However, the robustness of the electrokinetic unpinched protocol should also be included to check the state of the microchip/detector coupling and subsequently of the whole analytical microsystem.

The successful use of both injectors employed in this work (differences in R.S.D. values less than 7% between inter-injector runs) allowed both injectors to potentially be used indiscriminately and/or sequentially.

Analytical robustness was clearly demonstrated because good precision in the analytical signal (R.S.D.'s ranging 5–10%), good recoveries (ranging 90–110%) and acceptable resolution ($R_s \geq 1.0$) were all obtained from the analysis of real samples.

In addition, the proposed route to screen free hydroquinone and its related glycoside was very fast (less than 180 s), decreasing notably the analysis time with respect to those used for these analytes on a conventional scale (15 min). Consequence of the robustness studies, the proposed method was reliable (acceptable accuracy, good precision) and constituted an excellent alternative with respect to conventional ones to determine these analytes. Finally, since the successful of the method was clearly demonstrated into pharmaceutical–clinical testing, public safety and food control scenes it allowed an enhancement the power of CE–ED microchips into the domain of real analysis.

Acknowledgement

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) (BQU 2002-01116) is gratefully acknowledged.

References

- [1] V. Dolník, S. Liu, S. Jovanovich, *Electrophoresis* 21 (2000) 41.
- [2] G.J.M. Bruin, *Electrophoresis* 21 (2000) 3931.
- [3] N.A. Lacher, K.E. Garrison, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 22 (2001) 2526.
- [4] W.R. Vandaveer, S.A. Pasas, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 23 (2002) 3667.
- [5] J. Wang, *Talanta* 56 (2002) 223.
- [6] A.J. Blasco, A. Escarpa, in: M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier (CAC Series), Amsterdam, 2005, p. 703.
- [7] A.T. Woolley, K. Lao, A.N. Glazer, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 70 (1998) 684.
- [8] J. Wang, B. Tian, E. Sahlin, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5436.
- [9] R.S. Martin, A.J. Gawron, S.M. Lunte, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3196.
- [10] R.S. Martin, K.L. Ratzlaff, B.H. Huynh, S.M. Lunte, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1136.
- [11] Y. Liu, J.A. Vickers, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1513.
- [12] C.-C. Wu, R.-G. Wu, J.-G. Huang, Y.-C. Lin, H.-C. Chang, *Anal. Chem.* 75 (2003) 947.
- [13] C.J. Lai, C.-H. Chen, F.-H. Ko, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 143.
- [14] R.S. Keynion, T.J. Roussel Jr., M.M. Crain, D.J. Jackson, D.B. Franco, J.F. Naber, K.M. Walsh, R.P. Baldwin, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 95.
- [15] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 556.
- [16] T. Vilkner, D. Janasek, A. Manz, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3373.
- [17] L.A. Currie, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
- [18] J. Wittig, S. Wittemer, M. Veit, *J. Chromatogr. B* 761 (2001) 125.
- [19] I. Glöckl, G. Blaschke, M. Veit, *J. Chromatogr. B* 761 (2001) 261.
- [20] Fifth Amendment Comisión Directive 84/415/EEC, *Off. J. Eur. Commun.*, 1984, L228.
- [21] M.-L. Chang, C.-M. Chang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 617.
- [22] M.N. Clifford, *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1126.
- [23] Y. Shih, J.M. Zen, *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 63.
- [24] B. Gómez Taylor Corominas, M. Catalá Icardo, L. Lahuerta Zamora, J.V. García Mateo, J. Martínez Calatayud, *Talanta* 64 (2004) 618.
- [25] J. Wang, A. Escarpa, M. Pumera, J. Feldman, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 249.
- [26] A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, *Electrophoresis* 26 (2005) 3043.

Agustín González Crevillén
Antonio Javier Blasco
María Cristina González
Alberto Escarpa

University of Alcalá,
Madrid, Spain

Received April 6, 2006
Revised June 5, 2006
Accepted June 6, 2006

Research Article

A fast and reliable route integrating calibration and analysis protocols for water-soluble vitamin determination on microchip-electrochemistry platforms

A novel analytical route to determine water-soluble vitamins (B group and C) using single channel microchip-electrochemistry platforms is presented. The electrochemical detection protocol was carefully optimized, and it was shown that it was crucial to use 1 M nitric acid in the detector compartment to detect folic acid. A phosphate buffer (pH 6, 10 mM) and a separation voltage of 2 kV gave the complete separation of vitamins in less than 130 s, with good reproducibility (RSDs less than 10%) and accuracy (error less than 9%). In addition, a methodological innovation integrating calibration and analysis of water-soluble vitamins on the chip is also proposed. The strategy consisted in sequentially using both reservoirs (named calibration and analysis reservoirs) as well as a calibration factor (defined as signal/concentration of analyte). The analytical route required 350 s in the overall protocol (employing 130 s in calibration plus 130 s in analysis), an improvement over the times used in both conventional and microchip protocols.

Keywords: Calibration / CE microchip / Electrochemical detection / Water-soluble vitamins
DOI 10.1002/elps.200600213

1 Introduction

CE microchips combine the inherent characteristics of CE (fast analysis times, low sample requirements, good efficiency) and the inherent benefits of miniaturization (dramatic decrease of separation times, sample and reagents consumption and costs). The known chemistry of materials used in their microfabrication, which exhibit good electroosmotic flows (e.g., glass, PDMS, polymethylmethacrylate), and the microfabrication techniques, as well as the easy use of electrokinetic phenomena to move accurate volumes of fluids into a network of channels just by inserting platinum electrodes and applying an electric field, are among the most relevant characteristics. The CE microchips in a planar format have been demonstrated to be functional without losing per-

formance. One of the most active fields in the development of analytical microsystems has been the change from conventional separation techniques (macro scale) to planar chip formats. This transfer has been made possible through the sophisticated separation-detection designs, method development, and exploration of the analytical possibilities in the real world applications [1–4]. Recently, taking into account the miniaturization in analytical chemistry as a whole, the challenges of analytical microsystems have been critically discussed [5]. In the miniaturization map, CE microchips have, without any doubt, become one of the best and unique examples of a micro-total analysis system (μ TAS), with a potential, exciting future [5].

Although LIF plays the role of standard detection in CE microchips [6], electrochemical detection (ED) is the most valuable alternative because of its inherent miniaturization, without losing performance and high compatibility with microfabrication techniques [7–10]. High sensitivity, responses that are not dependent on the optical path length or sample turbidity, and its few power supplier requirements are also additional advantages. The relevant role of CE-ED microchips has clearly been demonstrated

Correspondence: Professor Alberto Escarpa, Dpto. Química Analítica e Ingeniería Química, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

E-mail: alberto.escarpa@uah.es

Fax: +34-918854971

Abbreviation: ED, electrochemical detection

by the publication of excellent designs [11–18] and applications [18–21]. In addition, new designs [19, 20], technical and methodological strategies [21], and applications [22–27] strengthen the evidence for a practical use for CE-ED microchips.

Novel methodological routes to demonstrate the real power of CE-ED microsystems in analytical scenes of various significance are still needed [5]. Indeed, the introduction of the μ TAS concept was intimately linked to clinical/bioanalytical areas because of its unique suitability in the decentralization of analysis (“point-of-care testing”). Environmental applications are also important areas in which CE microchips have a predominant role as a consequence of their inherent negligible wastes (“environmental friendly”). However, applications in food production are now emerging as μ TAS environments [24–27] and CE microchips constitute themselves to a clear trend in the miniaturization scene and a new technique in food analysis [28].

With respect to analyte significance, natural antioxidants are among the most important analytes in food environments. Natural antioxidants are classified in two main groups: polyphenolic compounds and vitamins. Vitamins are a group of organic substances that are essential compounds for the functioning of the human organism. These compounds cannot be synthesized by our body, so they have to be obtained from food or dietary supplements, and a lack of them can lead to deficiency diseases. Vitamins can be classified into two groups: fat-soluble vitamins (A, D, E, and K), and water-soluble vitamins (C and B-group vitamins).

Vitamins are present in minute amounts in natural food-stuffs. However, multivitamin preparations, beverages and food fortified mainly with water-soluble vitamins (nutraceuticals/formulations), are widely used in therapeutics to compensate for the very common lack of vitamins. The analysis of vitamins in these two kinds of samples (food stuffs and nutraceuticals) is very different.

Analytical determination of water-soluble vitamins is routinely performed by a reversed-phase HPLC [29, 30]. There is still great interest in developing new methods in HPLC to simultaneously determine a larger number of possible vitamins [31, 32]. A very good alternative to HPLC is CE because of its better resolution and, generally, shorter analysis time [30, 33, 34]. Excellent separations have been achieved using CZE [35, 36] and MEKC [37–39] in vitamin supplements. However, only two of the papers mentioned above [32, 39] used ED to determine pyridoxine (B6), cyanocobalamin (B12), nicotinamide (VPP), and ascorbic acid (C). ED of water-soluble vitamins in pharmaceutical preparations and food has

been performed with good results for B6, B12, C and biotin (H) [40–44]. In addition, quality control in the modern food industry using synthetic vitamins needs not only very powerful separation techniques, but also cheap methods to reduce costs for the industry. CE microchips could potentially have a very exciting future in this area because of their inherent fast separation, low sample consumption, and compatibility with *in situ* analysis. It is expected that in the near future the “lab-on-a-chip” concept could be moving into food environments.

Here, a novel microchip-electrochemistry application involving the integration of fast calibration and the separation and analysis of water-soluble vitamins (pyridoxine “B6”, ascorbic acid and folic acid “B9”) is presented. The aim of this work was to critically study the analytical possibilities of CE microchips in the detection and quantification domains of the prominent water-soluble vitamins found in commercial formulations.

Special attention to vitamin C has already been made in the recent applications [22, 24]; however, to the best of our knowledge, the determination of B-group water-soluble vitamins by CE microchips has not yet been reported. The structures of the vitamins studied are shown in Fig. 1.

2 Materials and methods

2.1 Materials and standards

Folic acid, cyanocobalamin (vitamin B₁₂) and pyridoxine hydrochloride (vitamin B₆) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), and ascorbic acid from Fluka Chemie (Buchs, UK).

The pharmaceutical preparations were Vitafardi[®] (containing 500 μ g hydroxocobalamin hydrochloride, 1 g ascorbic acid per tablet), Aspol[®] (containing 10 mg folic acid per capsule), Supradyn[®] (containing 2 mg pyridoxine, 60 mg ascorbic acid, 200 μ g folic acid per tablet, and other vitamins and mineral salts), Hidrosil[®] (containing 500 μ g hydroxocobalamin hydrochloride, 1 g pyridoxine hydrochloride, 250 mg thiamine hydrochloride per tablet), and Dayamineral[®] (containing 1.5 mg pyridoxine, 150 mg ascorbic acid, and 250 μ g folic acid per tablet, and other vitamins and mineral salts). All of them were purchased in local markets (Madrid, Spain).

All chemicals used in buffer preparations and in supporting electrolytes were of reagent grade. Methanol was acquired from Sharlau. In all cases, water purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used.

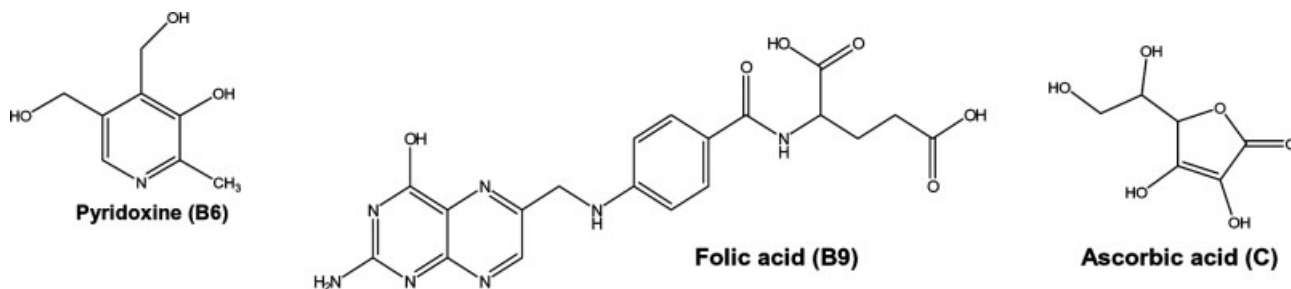


Figure 1. Structures of the studied vitamins.

2.2 Apparatus

A single-channel glass microchip fabricated by Micralyne (Model MC-BF4-001, Edmond, Canada) using wet chemical etching and thermal bonding techniques was used. The microchip consisted of a glass plate (88 mm × 16 mm) with a four-way injection cross, a 74-mm separation channel, and side arms measuring 5 mm. The original waste reservoir was cut off, leaving the channel outlet at the end of the chip to facilitate end-channel amperometric detection. The channels were 50 μm wide and 20 μm deep.

In our laboratory, the glass chip was fixed in the implemented microsystem, which has been described previously [24] and is based on the design proposed by Wang *et al.* [12, 45].

A new holder from the one previously used containing both sample reservoirs and a separation buffer, each 100 μL, was employed in this work. Pipette tips were inserted into each of the three holes in the glass chip for solution contact between the channel and the corresponding reservoir in the chip holder. A platinum wire was inserted into each reservoir to serve as contact for the high-voltage power supply. The amperometric detector (on the end-channel side) consisted of an Ag/AgCl wire as reference electrode, a platinum wire electrode as counter electrode, and a glassy carbon disk electrode (2 mm φ) as working electrode. The working electrode was further held in place by a plastic screw, which pressed the electrode against the channel outlet. Amperometric detection was performed using a Potentiostat Autolab PGSTAT12 from Eco Chemie. The high-voltage power supply (from Glassman High Voltage Inc.) had an adjustable voltage range between 0 and +5000 V.

2.3 Procedures

2.3.1 Standards

Stock solutions of ascorbic acid and pyridoxine were dissolved in MeOH to obtain a final concentration of 0.1 M and 0.05 M, respectively, and then stored at

−20°C. Folic acid was dissolved in 1 M NaOH to a final concentration of 0.1 M. Cyanocobalamin was dissolved in separation buffer to a final concentration of 0.02 M. Working solutions for the studies were appropriately diluted in the electrophoresis buffer. The electrophoretic buffer was filtered using 0.22-μm nylon filters. All working solutions were well protected from light and used immediately.

2.3.2 Sample preparation

Ten tablets of each formulation were pulverized and mixed into a recipient. About 50 mg of this powder was introduced into a glass flask, and 25 mL of 10 mM phosphate buffer pH 6 was added. This buffer was previously bubbled with N₂ for 30 min. The flask was submerged in an ultrasonic bath until the sample was totally dissolved at room temperature.

All samples were protected from light, filtered through a 0.45-μm nylon filter (Millipore Millex-HN) prior to their use, and used within 24 h after preparation.

2.3.3 Glassy carbon electrode cleaning procedure

The electrode was cleaned before each session using three kinds of treatments: physical, chemical and electrochemical. The physical treatment consisted of manually polishing the electrode with alumina powder (φ 1 μm and φ 0.05 μm) for 3 min each, and then rinsing with deionized water. During the chemical treatment, the electrode was sonicated in ethanol solution for 15 s and then sonicated in deionized water for 15 s. The electrochemical treatment consisted of subjecting the electrode to cyclic voltammetry from −0.5 V to +1.5 V at a scan rate of 10 V/s for 15 min. The state of the electrode was checked using 0.1 M Fe(CN)₆^{4−} solution. The cleaning procedure was repeated after each analysis.

2.3.4 Electrophoretic procedure

The glass microchip's channels were treated before use and between groups of runs by rinsing them with 0.1 M NaOH and deionized water for 15 min each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. The optimum electrophoresis buffer consisted of 10 mM phosphate buffer pH 6. The running buffer and sample reservoirs were filled with their respective solutions. The detection reservoir was filled with 1 M HNO₃. A voltage of 2000 V was applied for 5 min to the buffer reservoir to fill the separation channel, while the detection reservoir was grounded and the others were floating. This process was performed on each sample reservoir for 20 s to facilitate filling the injection channel (between the separation channel and the sample reservoir), and then the voltage was applied for 5 min to the running buffer reservoir to eliminate the remains of the previously introduced samples from the separation channel.

2.3.5 Amperometric detection

A detection voltage of +1.2 V was applied to the working electrode during electrophoretic separation. All experiments were performed at room temperature. A spacer (easily removable adhesive tape) (60 μm) between the electrode surface and the channel outlet was also used to reproducibly control the distance between the electrode and the channel separation [21].

2.3.6 Safety considerations

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

3 Results and discussion

3.1 Electrochemical detection and electrokinetic routes

The aim of this work was to explore the analytical possibilities of CE-ED microchips in the analysis of water-soluble vitamins of food-health significance, and to critically evaluate the potential use of these microsystems in a control analysis.

Figure 2 displays the separation of a mixture containing the water soluble-vitamins under optimum separation conditions. The peaks are well resolved, requiring less than 130 s, and so dramatically improving the time required by conventional methods (15–25 min).

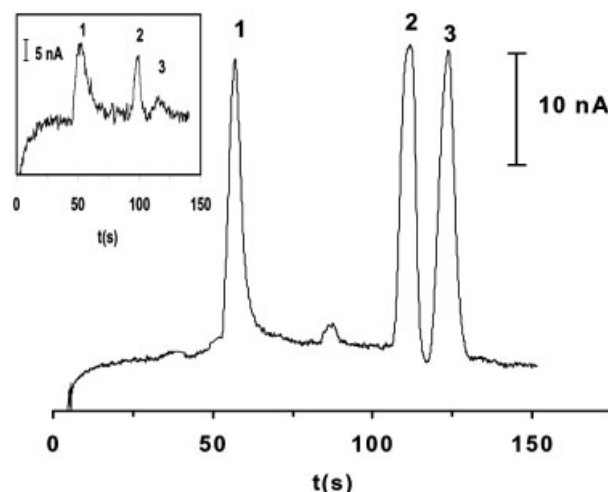


Figure 2. CZE separation of a mixture of three standard vitamins. Conditions: 10 mM phosphate buffer pH 6; separation voltage 2 kV; injection voltage 2 kV for 3 s; detection voltage 1.2 V; with 1 M HNO₃ in the detection reservoir. Inset: Separation buffer in the detection reservoir. Peaks: (1) 0.1 mM pyridoxine, (2) 0.2 mM ascorbic acid, (3) 0.2 mM folic acid.

The use of different pHs in separation and detection media was firstly introduced by the Smyth and colleagues [46] in the detection of phenolic acids. This strategy was extended to microchip format for the first time by the Henry's group [47] for glucose analysis, and then by Wang's group [25] for detecting phenolic acids as well. In the present work, we have extended this strategy for detecting water-soluble vitamins. Figure 2 (inset) displays the electrophoregrams obtained for a mixture containing three prominent water-soluble vitamins with a separation buffer in the detection reservoir. The presence of 1 M nitric acid dramatically improved the detection performance of folic acid. Under these acid conditions the folic acid was a neutral compound because of the protonation of carboxylic groups, and was therefore not repelled from the electrode surface. In addition, sharper peaks, better sensitivity and less baseline noise were obtained when nitric acid was present in the detector compartment. The observed enhancement of folic acid electroactivity off-chip using differential pulse voltammetry was also confirmed. A dramatic enhancement of oxidation bands was observed when 1 M nitric acid was used as a supporting electrolyte (results are not shown). Therefore, 1 M nitric acid was introduced in the detector reservoir in all subsequent experiments.

The hydrodynamic voltammogram profiles for the vitamins studied are shown in Fig. 3. While the current value for ascorbic acid rose rapidly after +0.5 V, the current value for folic acid and B6 was only noticed when a

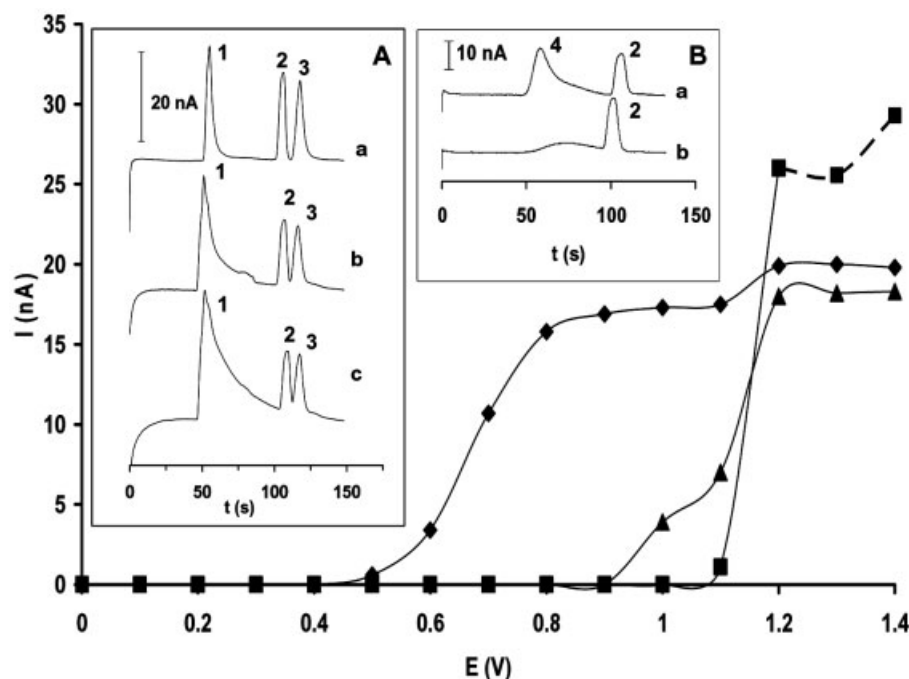


Figure 3. Hydrodynamic voltammogram of three vitamins. ■: pyridoxine; ◆: ascorbic acid; ▲: folic acid. Inset A: Widening of the pyridoxine (B_6) peak with detection potential. (a) 1.2 V; (b) 1.3 V, (c) 1.4 V. Peaks: (1) 0.3 mM pyridoxine, (2) 0.25 mM ascorbic acid, (3) 0.2 mM folic acid (these results correspond to a discontinuous line in the hydrodynamic voltammogram profile). Inset B: Electrochemical behavior of cyanocobalmin (B_{12}) with voltage detection. (a) +1.4 V, (b) +1.2 V. Peaks: (4) 1 mM cyanocobalmin; (2) 0.2 mM ascorbic acid. Conditions: same as Fig. 2.

potential of +0.9 V and 1.1 V, respectively, was applied. The detection potential also had an important influence on the B_6 oxidation. When the oxidation potential increased and reached the constant zone in the sigmoid curve, the B_6 vitamin peak became a tailing peak affecting the detection of the others (Fig. 3 inset A). In addition, to detect vitamin B_{12} , the application of a +1.4 V in the detector was needed (Fig. 3 inset B). However, as we have already mentioned before, when the detector potential was fixed at values higher than +1.2 V, the detection of B_6 worsened. Therefore, the detection potential is crucial in the analysis of water-soluble vitamins and an optimum value of +1.2 V based on S/N characteristics was selected in subsequent experiments.

The results obtained can be understood by comparison with relevant literature data [40, 48, 49]. While the electrochemistry of vitamin C is well known, showing an irreversible behavior with an anodic peak at around +0.4 V, the electrochemistry of vitamin B_6 is very complex and irreversible, showing two anodic peaks at +0.75 V and +1.30 V. The vitamin B_6 electrodic process is pH dependent due to complex distribution of species in solution provided by acid-base tautomerism and hydration equilibria. The pyridoxine oxidation process involves pyridoxal formation (first step) to pyridoxic acid formation (last step), which is basically the oxidation from a hydroxyl group (-OH) to a carboxylic group (-COOH). With respect to folic acid, while its reduction process is well known, its

oxidation on a solid electrode has scarcely been studied [48]. Two possible electrochemical processes have been proposed: an oxidation process at 1.03 V and a reduction process at -0.25 V. In both processes a maximum current response at pH 1 (0.1 M perchloric acid) was obtained. Therefore, the complexity of the vitamin mixture studied requires a strict control of the redox potential in connection with a suitable pH in the detector compartment.

The injection and separation electrokinetic protocols were carefully optimized. Phosphate buffer (10 mM, pH 6) was the most suitable medium, allowing the CZE separation of B_6 as an almost neutral compound, and of both ascorbic and folic acids according to their charge/mass ratios [$pK_a(B_6) = 5$, $pK_a(C) = 4.04$, $pK_a(FA) = 4.5$]. An increase in the buffer concentration decreases the EOF, which leads to longer analysis times and provokes an increase of conductivity and generates heat. A concentration buffer ranging from 10 to 30 mM was assayed and 10 mM was shown to be a crucial value to achieve the separation of ascorbic and folic acids. Although the nature and concentration of the buffer can considerably influence the separation, the most important parameter of the separation buffer was its pH value since vitamins exhibit acid-base reactions. The phosphate buffer used (pH 6, 10 mM) gave a suitable pH, taking into account the pK_a values of the vitamins studied and giving appropriate charge differences to achieve a separation. In addition, among the separation voltages assayed, a value of 2 kV was chosen as optimum, showing the lowest background noise.

The optimized electrophoretic conditions comprised both the best resolution ($R_s = 1.2$) and the separation time (130 s) for involved analytes.

3.2 Integration of the calibration and analysis protocols

Reliability (understood as interdependent precision-accuracy) is a very important issue to address when exploring the real analytical power of the analysis. Precision was thoroughly evaluated with respect to repeatability and reproducibility according to migration times, peak currents, and peak areas. Table 1 shows the results obtained for the studied vitamins. Very good repeatability was always obtained, with RSD values of less than 0.7% for migration times and less than 6% for peak height and peak areas. Reproducibility was also very good. Again, all vitamins exhibited the same behavior with RSD values close to 3% for migration times, ranging from 5% to 10% for peak heights and 7% to 12% for peak areas.

An external calibration protocol was carefully performed. The analytical parameters corresponding to the calibration curves (slope, R^2 values and detection/determination limits) are listed in Table 2. From these results, three interesting observations can be seen. Firstly, the vitamins tested showed a similar sensitivity (calibration slopes), indicating that the proposed electrochemical strategy to improve the analyte electro-

activity allowed us to obtain a similar sensitivity for folic acid with respect to that found for vitamin C. Secondly, statistically speaking, the intercept obtained in all cases examined was zero, which allowed us to carry out the quantitation using only the calibration slope. This fact is very important since it allows us to perform a very fast calibration using a calibration factor (only one calibration point). Thirdly, and as a consequence of their similar slopes and intercepts, similar and suitable detection limits were achieved for all water-soluble vitamins.

To demonstrate the capabilities of the proposed CE-ED microchip method, a quantitative analysis was performed for several formulations containing one or more of the analyzed vitamins at different concentration levels. The analysis was performed in triplicate to test its precision and accuracy. Table 3 lists the amount obtained for each vitamin *versus* nominal values, as well as the relative error obtained as a measure of provisional accuracy. The amount of each vitamin declared by the manufacturer (per capsule) in the label closely matched the values obtained by the microchip protocol (relative error range 2–9%). As a consequence, these results constituted a good approach to the accuracy of the overall method. RSD values obtained within the analyzed samples were also acceptable, indicating a good precision in the overall protocol. Figure 4A shows electrophoregrams corresponding to the representative samples analyzed (a–d). Analysis of other commercial formulations was also performed (e, f). The well-known problems associated with

Table 1. Precision of the method

Analyte	Repeatability ^{a)}					
	Migration time (s)		Height (nA)		Area ($\times 10^6$) (C)	
	$t_m \pm s$	RSD (%)	$h_m \pm s$	RSD (%)	$a_m \pm s$	RSD (%)
Pyridoxine	54.3 \pm 0.3	0.5	19 \pm 1	6	8.7 \pm 0.4	5
Vitamin C	108.8 \pm 0.6	0.5	30.2 \pm 0.4	2	16.0 \pm 0.2	2
Folic acid	120.0 \pm 0.7	0.6	39 \pm 1	3	21.9 \pm 0.4	2

Analyte	Reproducibility ^{b)}					
	Migration time (s)		Height (nA)		Area ($\times 10^6$) (C)	
	$t_m \pm s$	RSD (%)	$h_m \pm s$	RSD (%)	$a_m \pm s$	RSD (%)
Pyridoxine	54 \pm 1	2	24 \pm 2	8	12 \pm 1	7
Vitamin C	105 \pm 3	3	19 \pm 1	5	9 \pm 1	9
Folic acid	115 \pm 3	3	17 \pm 2	10	9 \pm 1	12

a) Using a mixture of 300 μ M B6, 400 μ M vitamin C, and 400 μ M folic acid.

b) Using a mixture of 275 μ M B6, 250 μ M vitamin C, and 200 μ M folic acid.

Table 2. External calibration parameters

Analyte	$a \pm t S_a$ ($\times 10^6$) (C) ^{a)}	$b \pm t S_b$ ($\times 10^8$) (C μM^{-1}) ^{a)}	R^2	LOD ^{b)} (μM)	LOQ ^{c)} (μM)
Pyridoxine (B6)	0.5 ± 0.6	0.040 ± 0.003	0.99	15	25
Vitamin C	-0.9 ± 0.9	0.043 ± 0.003	0.99	21	50
Folic acid	-1.4 ± 1.6	0.054 ± 0.006	0.99	28	50

a) Confidence intervals ($\alpha = 0.05$).

b) Estimated S/N = 3.

c) Quantification limit really measured.

Table 3. Analysis of vitamins in formulations

Formulation	Analyte	Precision (%) ^{a)}	Nominal value (per capsule)	Obtained value (per capsule)	Error (%) ^{b)}
Hydroxyl [®]	Pyridoxine (B6)	10	250 mg	267 mg	7
Vitafardi [®]	Vitamin C	3	1 g	1.1 g	9
Aspol [®]	Folic acid	8	10 mg	9.8 mg	2

a) Expressed as the relative standard deviation obtained for $n = 3$ independent analysis.

b) Evaluation of accuracy, expressed as relative error.

the inherent features of electrokinetic injection (modification of ionic strength, compatibility between buffers and solvents/matrices) made quantitation more difficult in

samples e and f, especially due to the presence of a high mineral salt content. However, analysis was also possible in these samples.

In addition, since the intercept was statistically zero, only the calibration slope could be used in quantitation. In the present work, we have proposed the sequential use of both injectors, arms/reservoirs, to integrate calibration and vitamins analysis on board the chip employing two single runs. For calibration, a standard mixture is introduced in a reservoir (named calibration reservoir) to obtain a factor (defined as signal/concentration standard). A vitamin sample is then introduced into the second reservoir (vitamin analysis reservoir). Figure 4 shows the microchip layout used (Fig. 4B) in connection with the electrophoregrams obtained (Fig. 4C) in the sequential injection of a standard mixture of both ascorbic and folic acids (calibration step) and in the analysis of vitamin C (target analysis) from a formulation. As a consequence, calibration plus analysis protocols were performed in less than 350 s using the voltage program described in Table 4, dramatically improving the overall analysis time. No significant differences were found between the ascorbic slopes obtained in this run ($0.039 \text{ C } \mu\text{M}^{-1}$) with respect to those found in the calibration protocol establishments ($0.043 \text{ C } \mu\text{M}^{-1}$), clearly indicating the suitability of the concept. In a general sense, the advantages of this proposal are: (i) the standard mixture concentration used for calibration can be designed taking into account the analyte concentration expected in the target sample,

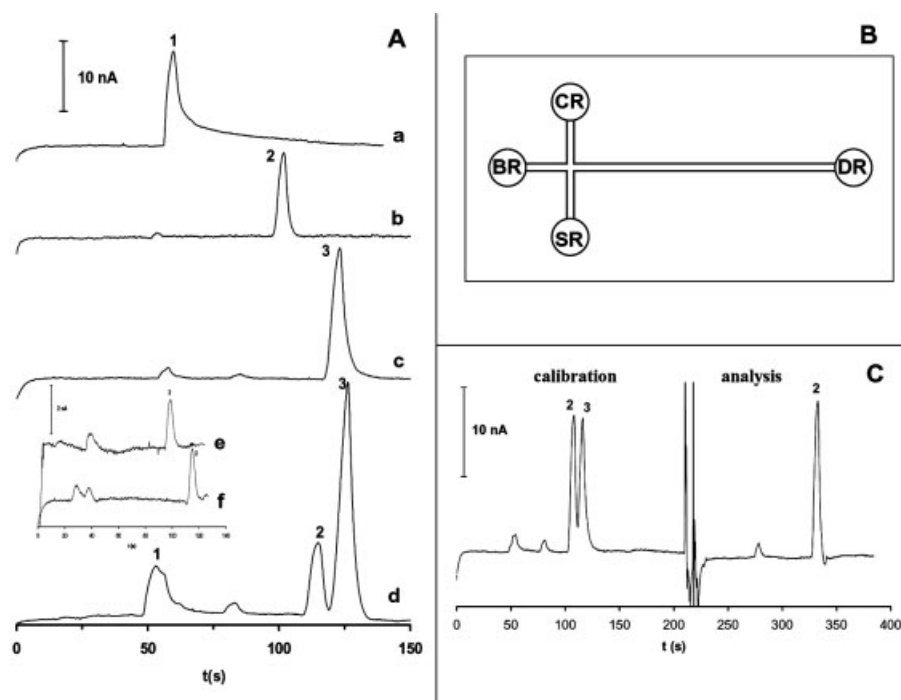


Figure 4. (A) Determination of vitamins in pharmaceutical supplements. (a) Hidrosil[®]; (b) Vitafardi[®]; (c) Aspol[®]; (d) Aspol[®] spiked with 0.1 mM pyridoxine and 0.2 mM ascorbic acid. Peaks: (1) 0.2 mM pyridoxine, (2) 0.2 mM ascorbic acid, (3) 0.2 mM folic acid. (e) Supradyn[®]; (f) Dayamineral[®]. Peaks: (1) pyridoxine (2) ascorbic acid (3) folic acid. Conditions: same as in Fig. 2. (B) Scheme of the chip with reservoirs labeled as BR (buffer reservoir), CR (calibration reservoir), SR (sample reservoir) and DR (detection reservoir). (C) Measurement of ascorbic and folic acid standards (calibration measured) and Vitafardi[®] (analysis of ascorbic acid) using, sequentially, both injectors.

Table 4. Voltage program used in the sequential calibration and analysis of vitamins

Order	Analytical step	Electrokinetic step	Calibration reservoir	Analysis reservoir	Separation reservoir	Detection reservoir
1	Calibration	Injection	2 kV	Float	Float	Ground
		Separation	Float	Float	2 kV	Ground
2	Analysis	Injection	Float	2 kV	Float	Ground
		Separation	Float	Float	2 kV	Ground

(ii) the analysis can be carried out under replicable conditions improving the precision of the analysis, and (iii) the calibration and analysis are carried out in the same set-up, dramatically improving the overall time and accuracy of the analysis if a loss of performance occurs.

4 Concluding remarks

A very attractive analytical route to perform analysis of water-soluble vitamins, involving B-group vitamins and vitamin C using microchip format has been demonstrated for the first time. Nitric acid and oxidation potential as detection parameters and concentration of phosphate buffer were crucial in the optimization of the separation-detection route. The separation time of the vitamins was under 130 s with a good resolution, improving on the separation times required using conventional methods, which are approximately 10–15 min. The integration of calibration-analysis protocols *on-chip* using both arms/reservoirs is demonstrated. The external calibration and vitamin analysis were performed sequentially in less than 350 s (130 s for standard calibration separation and 130 s for vitamin analysis in the target sample), dramatically improving the overall analysis time and opening new expectations for the “lab-on-a-chip” food domain. Excellent precision and accuracy were obtained in the formulation analysis, suggesting that CE microchips are a very attractive analytical alternative with respect to conventional analysis.

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. A. G. Crevillén acknowledges the fellowship received from Spanish Ministry of Education and Science.

5 References

- [1] Colyer, C. L., Tang, T., Chiem, N., Harrison, D. J., *Electrophoresis* 1997, 28, 1733–1741.
- [2] Dolník, V., Liu, S., Jovanovich, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 41–54.
- [3] Bruin, G. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3931–3951.
- [4] Rossier, J., Reymond, F., Michel, P. E., *Electrophoresis* 2002, 23, 858–867.
- [5] Ríos, A., Escarpa, A., González, M. C., Crevillén, A. G., *Trends Anal. Chem.* 2006, in press.
- [6] Schwarz, M. A., Hauser, P. C., *Lab Chip* 2001, 1, 1–6.
- [7] Vandaveer, W. R., Pasas, S. A., Martín, R. S., Lunte, S. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3667–3677.
- [8] Tanyanywa, J., Leuthardt, S., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2002, 23, 3659–3666.
- [9] Wang, J., *Talanta* 2002, 56, 223–231.
- [10] Blasco, A. J., Escarpa, A., in: Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M. (Eds.), *Electrochemical Detection in Capillary Microchips (CAC Series)*, Elsevier, Amsterdam 2005, pp. 703–758.
- [11] Woolley, A. T., Lao, K., Glazer, A. N., Mathies, R. A., *Anal. Chem.* 1998, 70, 684–688.
- [12] Wang, J., Tian, B., Sahlin, E., *Anal. Chem.* 1999, 71, 5436–5440.
- [13] Martín, R. S., Gawron, A. J., Lunte, S. M., Henry, C. S., *Anal. Chem.* 2000, 72, 3196–3202.
- [14] Zeng, Y., Chen, H., Pang, D. W., Wang, Z. L., Cheng, J. K., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2441–2445.
- [15] Martín, R. S., Ratzlaff, K. L., Huynh, B. H., Lunte, S. M., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1136–1143.
- [16] Liu, Y., Vickers, J. A., Henry, C. S., *Anal. Chem.* 2004, 76, 1513–1517.
- [17] Wu, C.-C., Wu, R.-G., Huang, J.-G., Lin, Y.-C., Chang, H.-C., *Anal. Chem.* 2003, 75, 947–952.
- [18] Lai, C.-C. J., Chen, C.-H., Ko, F.-H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1023, 143–150.
- [19] Chen, G., Bao, H., Yang, P., *Electrophoresis* 2005, 26, 4632–4640.
- [20] Vickers, J. A., Henry, C. S., *Electrophoresis* 2005, 26, 4641–4647.
- [21] Crevillén, A. G., Barrigas, I., Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A., *Anal. Chim. Acta* 2006, 562, 137–144.
- [22] Law, W. S., Kubán, P., Zhao, J. H., Li, F. Y., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 4648–4655.
- [23] Shiddily, M. J. A., Park, D.-S., Shim, Y.-B., *Electrophoresis* 2005, 26, 4656–4663.
- [24] Blasco, A. J., Barrigas, I., González, M. C., Escarpa, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 4664–4673.
- [25] Scampicchio, M., Wang, J., Mannino, S., Chatrathi, M. P., *J. Chromatogr. A* 2004, 1049, 189–194.
- [26] Hompesch, R. W., García, C. D., Weiss, D. J., Vivanco, J. M., Henry, C. S., *Analyst* 2005, 5, 694–700.
- [27] Wang, J., Manino, S., Cámara, C., Chatrathi, M. P. et al., *J. Chromatogr. A* 2005, 1091, 177–182.

- [28] Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 283–302.
- [29] Rizzolo, A., Polesello, S., in: Deyl, Z., Mikik, I., Tagliaro, F., Tesárová, E. (Eds.), *Advanced Chromatographic and Electromigration Methods in Biosciences*, Elsevier Science, Amsterdam 1998, pp. 652–735.
- [30] Frazier, R. A., Ames, J. M., Nursten, H. E., *Electrophoresis* 1999, 20, 3156–3180.
- [31] Heudi, O., Kiliç, T., Fontannaz, P., *J. Chromatogr. A* 2005, 1070, 49–56.
- [32] Marszall, M. L., Lebiezinska, A., Czarnowski, W., Szefer, P., *J. Chromatogr. A* 2005, 1094, 91–98.
- [33] Herrero, M., Ibáñez, E., Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 883–897.
- [34] Trenerry, V. C., *Electrophoresis* 2001, 22, 1468–1478.
- [35] Shieve, J., Mrestani, Y., Neubert, R., *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 255–259.
- [36] Fotsing, L., Fillet, M., Bechet, I., Hubert, P., Crommen, J., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1997, 15, 1113–1123.
- [37] Buskov, S., Møller, P., Sørensen, H., Sørensen, J. C., Sørensen, S., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 233–241.
- [38] Scheiner, M., Rasáis, E., Luf, W., *Nahrung/food* 2003, 47, 243–247.
- [39] Hu, Q., Zhou, T., Zhang, L., Li, H., Fang, Y., *Anal. Chim. Acta* 2001, 437, 123–129.
- [40] Hernández, S. R., Ribero, G. G., Goicoechea, H. C., *Talanta* 2003, 61, 743–753.
- [41] Qu, W., Wu, K., Hu, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 36, 631–635.
- [42] Versari, A., Mattioli, A., Parpinello, G. P., Galassi, S., *Food Control* 2004, 15, 355–358.
- [43] Thompson, C. O., Trenerry, V. C., *Food Chem.* 1995, 53, 43–50.
- [44] Kamata, K., Hagiwara, T., Takahashi, M., Uehara, S. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 1986, 356, 326–330.
- [45] Wang, J., Escarpa, A., Pumera, M., Feldman, J., *J. Chromatogr. A* 2002, 952, 249–254.
- [46] Moane, S., Park, S., Lunte, C. E., Smith, M. R., *Analyst* 1998, 123, 1931–1936.
- [47] García, C. D., Henry, C. S., *Anal. Chim. Acta* 2004, 508, 1–9.
- [48] O’Shea, T. J., Costa García, A., Muñón Blanco, P., Smyth, M. R., *J. Electroanal. Chem.* 1991, 307, 63–71.
- [49] Gu, H.-Y., Yu, A. M., Chen, H. Y., *Anal. Lett.* 2001, 34, 2361–2374.

Food Analysis on Microfluidic Devices Using Ultrasensitive Carbon Nanotubes Detectors

A. González Crevillén,[†] Mónica Ávila,[†] Martín Pumera,[‡] María Cristina González,[†] and Alberto Escarpa^{*†}

Department of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain, and ICYS, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki, Japan

Microfluidic devices using carbon nanotube (CNT) materials (single-walled and two multiwalled (MWCNT)) for the analysis of selected analyte groups of significance in foods such as dietary antioxidants, water-soluble vitamins, vanilla flavors, and isoflavones involved in representative food samples have been explored for the first time. Ultrafast separations resulted in well-defined and resolved peaks with enhanced voltammetric current in comparison with those obtained from unmodified screen-printed electrodes, turning MWCNT into an ideal material for electrochemical sensing in food analysis. Resolution was improved by a factor of 2, and sensitivity was dramatically enhanced with amplification factors toward calibration slopes from 4- to 16-fold. In both qualitative and quantitative domains, this impressive performance of CNTs integrated on microfluidics allowed solving specific challenges in food environments such as the direct detection of analytes in complex natural samples and unambiguous analytes in the control of fraud, which was not possible on nonmodified surfaces, avoiding the integration of complex preconcentration steps on these microdevices. The use of these unique materials in microfluidics for food analysis has opened new expectations in “lab-on-a-chip” domains.

It has been demonstrated that microfluidic devices are very attractive analytical microsystems because of their inherent features regarding analysis speed and required low sample volumes.¹ However, lab-on-a-chip technology is not implemented in all research areas with the same degree of intensity. In comparison with clinical applications, food applications constitute a representative example of emerging applications using microfluidic devices that have been recently revised, giving a critical view of its state of the art.² One of the most important differences between clinical and food analysis is how the selectivity and sensitivity are reached. In the clinical field, selectivity and sensitivity are often achieved by using biological materials such as enzymes and antibodies, while in food analysis, this strategy

is less developed, with sample preparation protocols being needed. Food analysis on microfluidics is still in its infancy, and it is now emerging since food samples present complex matrixes where the selectivity and sensitivity become the main challenges. Consequently, in food-related works, CE microchips are used as microsystems to perform fast separations of analytes of high food significance coupled to suitable detectors.^{3–9} Several challenges such as direct detection of analytes in the samples without complex preconcentration steps in authenticity control or fraud detection remain because of the low concentration of these analytes in connection with the extremely low sample volumes introduced in these microdevices. In addition, quantitative data are also very important in food analysis since very strict normative and quality control is based on the accurate measurement of an analyte or cutoff concentration. In consequence, the validation of the methods toward accuracy and precision (reliability) using microfluidic devices is an additional challenge when incorporating these devices in our laboratories. The inherent low concentrations of several food analytes require the systematic use of two different approaches to solve the analysis: to carry out a preconcentration step before separation (which is still performed off-chip because the total integration of analytical steps into microchip format is very difficult¹⁰) or to use ultrasensitive detectors. In the second approach, LIF is the standard detection procedure in microchips¹¹ due to their inherent sensitivity; however, it often needs derivatization schemes. Electrochemical detection (ED) is the most important alternative as a detection route in these microsystems, due to its inherent features of miniaturization without loss of performance and its compatibility with advanced micromachining.¹² Also, many analytes of food significance exhibit more

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: alberto.escarpa@uah.es.

[†] University of Alcalá.

[‡] National Institute for Materials Science.

(1) Dittrich, P. S.; Tachikawa, K.; Manz, A. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3887–3908.

(2) Escarpa, A.; González, M. C.; Crevillén, A. G.; Blasco, A. J. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1002–1011.

(3) Scampicchio, M.; Wang, J.; Mannino, S.; Chatrathi, M. P. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1049*, 189–194.

(4) Hompesch, R. W.; García, C. D.; Weiss, D. J.; Vivanco, J. M.; Henry, C. S. *Analyst* **2005**, *5*, 694–700.

(5) Blasco, A. J.; Barrigas, I.; González, M. C.; Escarpa, A. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 4664–4673.

(6) Crevillén, A. G.; Blasco, A. J.; González, M. C.; Escarpa, A. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5110–5118.

(7) Kuban, P.; Hauser, P. C. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3169–3178.

(8) Kato, M.; Gyoten, Y.; Sakai-Kato, K.; Toyooka, T. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1013*, 183–189.

(9) Blasco, A. J.; Crevillén, A. G.; de la Fuente, P.; González, M. C.; Escarpa, A. *Analyst* **2007**, *132*, 323–329.

(10) Ríos, A.; Escarpa, A.; González, M. C.; Crevillén, A. G. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 467–479.

(11) Schwarz, M. A.; Hauser, P. C. *Lab Chip* **2001**, *1*, 1–6.

(12) Wang, J. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1133–1140.

significant electroactivity than native fluorescence, so only one contribution using LIF was reported in relation to microchip food analysis.⁸ High sensitivity and responses not dependent on optical path length or sample turbidity are additionally very attractive features.

On the other hand, carbon nanotubes (CNTs) are a new group of nanomaterials with unique geometrical, mechanical, electronic, and chemical properties.^{13,14} There are two main types of carbon nanotubes that can have high structural perfection: single-walled nanotube (SWCNT), which consists of a single graphite sheet seamlessly wrapped into a cylindrical tube, and multiwalled nanotube (MWCNT) which comprises an array of such nanotubes that are concentrically nested like rings of tree trunk.^{13,15–18} Since their discovery, CNTs^{15–18} have been widely exploited in electroanalysis because of a common current fad among electroanalysts seeking new surface properties to properly modify a suitable electrode substrate, generally glassy carbon, with a film or layer of CNT. The interesting properties of CNT in electrochemical measurements are the large active surface at electrodes of small dimensions, the enhancement of electronic transfer, and the strong sorption capacity. Therefore, large number of applications can be found in the literature, and several reviews have recently been devoted to this scope.^{19–21}

CNTs have been widely used in electroanalysis; however, these materials have been scarcely explored as detectors in CE microchip and they have never been applied to the real sample analysis. These unique materials were used as microchip detectors for the first time by Wang's group,²² using several analyte classes (carbohydrates, hydrazine, phenol, purine, amino acids, thiols²³) and also exploring the CNT–copper composites in the detection of carbohydrates.²⁴ Recently, Pumera et al. have explored the SWCNT–gold electrodes for microfluidics in the detection of aminophenols and neurotransmitters,²⁵ and the same authors have developed a fundamental study on modification of different electrode materials such as glassy carbon, gold, and platinum surfaces with CNT on a microchip platform using neurotransmitters as model analytes.²⁶ Chen's group used a PMMA/CNT composite electrode for detection of model phenolic pollutants and purines.²⁷ Very recently, Vlčková and Schwartz used CNT-modified electrodes for microchip CE/electrochemistry detection neurotransmitters²⁸ in human urine.

However, the exploration of these novel materials in electrochemical sensing on a CE microchip platform was performed using only standards, and their application in the analysis of real samples (from a broad point of view) and in food analysis (from a particular point of view) is clearly negligible (in both qualitative and quantitative domains). In consequence, new advances from the coupling between the inherent expected benefits from both CE microchips (ultrafast separations, high peak capacity) and CNT-modified electrodes (high sensitivity) in food sample analysis are highly expected.

The purpose of this paper has been to explore the analytical possibilities of CNT coupled to CE microchips as a novel material in the electrochemical sensing of analytes with significance in foods using representative solid samples. To reach this objective, three different CNT materials (SWCNT, MWCNT-A, MWCNT-B) and four groups of analytes of food significance (polyphenols, water-soluble vitamins, vanilla flavors, total isoflavones) covering dietary antioxidants, functional foods, and flavor enhancers were chosen. This food selection was also made because of the need for highly sensitive analysis in the areas of food or nutrient control (evaluation of antioxidant content and reliable detection of frauds and checking quality control in functional foods) in which a relevant role from CNT materials is expected.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials and Standards. Folic acid, pyridoxine hydrochloride, genistein, arbutin, phloridzin, catechin, rutin, vanillin alcohol, maltol, ethyl maltol, and ethyl vanillin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ascorbic acid and vanillin were from Fluka Chemie (Buchs, UK).

Pharmaceutical preparations (Becozyme C Forte), apples, and natural vanilla beans were purchased in local markets (Madrid, Spain). A secondary standard reference and well-documented in the Drug Master File (SW/1211/03) was used as reference material (confidential, property of Exxentia, Madrid, Spain) for the analysis of isoflavones.

Carbon nanotube materials were obtained from Sigma Aldrich. SWCNT (product no. 519308; length, 2–5 μm ; diameter, 1.2–1.5 nm), MWCNT-200 μm (MWCNT-A; product no. 636630; length, 0.5–200 μm ; o.d., 30–50 nm, wall thickness, 12–18 nm, CVD method produced), and multiwall carbon nanotubes MWCNT-2 μm (MWCNT-B; product no. 636495; 0.5–2 μm ; o.d., 20–30 nm; wall thickness, 1–2 nm, CVD method produced) were purchased from Aldrich. Further purification of carbon material was accomplished by stirring the CNT in 2 M nitric acid (Panreac, Barcelona, Spain) at 80 °C for 24 h and washing with distilled water to neutral pH.²⁹ A 1-mg sample of carbon material was dispersed in 1 mL of dimethyl formamide (DMF, from Sigma-Aldrich) and consequently used for electrode modification.

All chemicals used in buffer preparation and in supporting electrolytes were reagent grade. Methanol and ethanol absolute were acquired from Panreac. In all cases, high-quality water, purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA), was used.

Apparatus and Electrodes. A CE-ED microsystem previously reported³⁰ and recently implemented in our laboratory was used.⁵ The glass chip was fabricated by Micralyne (model MC-BF4-001,

(13) Ajayan, P. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1787–1799.

(14) Trojanowicz, M. *Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 480–489.

(15) Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.

(16) Oberlin, A.; Endo, M.; Koyama, T. *J. Cryst. Growth* **1976**, *32*, 335–349.

(17) Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* **1993**, *363*, 603–605.

(18) Bethune, D. S.; Kiang, C. H.; De Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R. *Nature* **1993**, *363*, 605–607.

(19) Wang, J. *Analyst* **2005**, *130*, 421–426.

(20) Merkoçi, A.; Pumera, M.; Llopis, X.; Pérez, B.; del Valle, M.; Alegret, S. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 826–838.

(21) Banks, C. E.; Compton, R. G. *Analyst* **2006**, *131*, 15–21.

(22) Wang, J.; Chen, G.; Chatrathi, M. P.; Musameh, M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 298–302.

(23) Chen, G.; Zhang, L.; Wang, J. *Talanta* **2004**, *64*, 1018–1023.

(24) Wang, J.; Chen, G.; Wang, M.; Chatrathi, M. P. *Analyst* **2004**, *129*, 512–515.

(25) Pumera, M.; Llopis, X.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Microchim. Acta* **2006**, *152*, 261–265.

(26) Pumera, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Electrophoresis* **2007**, *28*, 1274–1280.

(27) Yao, X.; Wu, H.; Wang, J.; Qu, S.; Chen, G. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 846–853.

(28) Vlčková, M.; Schwartz, M. A. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1142*, 214–221.

(29) Pumera, M.; Merkoçi, A.; Alegret, S. *Sens. Actuators B* **2006**, *113*, 617–622.

(30) Wang, J.; Tian, B.; Sahlin, E. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5436–5440.

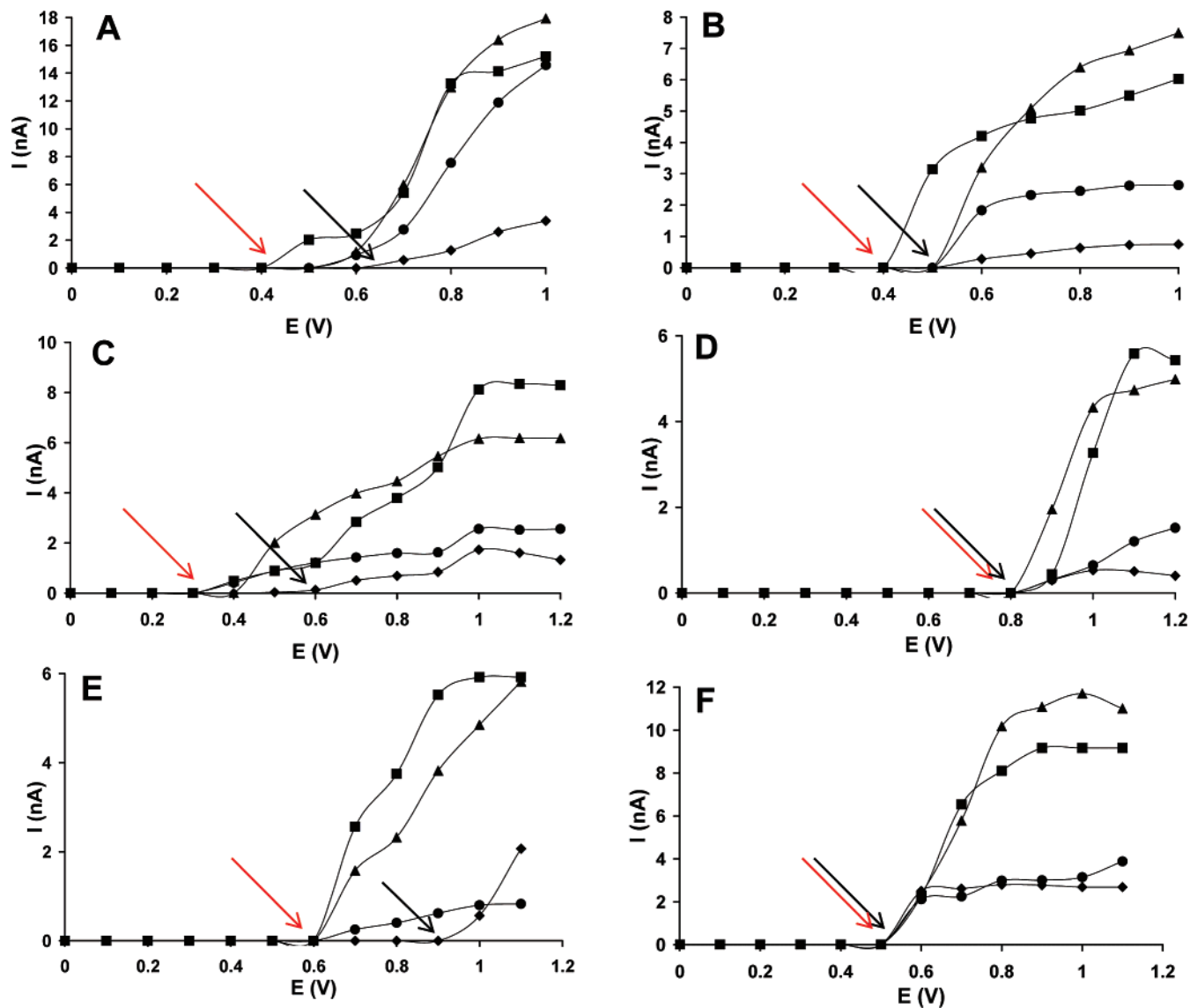


Figure 1. Hydrodynamic voltammograms of different compounds obtained from each kind of electrode studied. ■, SPE-MWCNT-A; ▲, SPE-MWCNT-B; ●, SPE-SWCNT; ◆, SPE bare. (A) Arbutin, (B) rutin, (C) ascorbic acid, (D) folic acid, (E) maltol, and (F) vanillin.

Edmond, Canada) and consisted of a glass plate (88 mm × 16 mm) with a four-way injection simple cross, a 74-mm-long separation channel, and side arms measuring 5 mm long. The dimensions of the channels were 20 μm in depth and 50 μm wide. The amperometric detector (end-channel detection) consisted of an Ag/AgCl wire as a reference electrode, a platinum wire as a counter electrode, and a carbon thick-film screen-printed electrode (0.3 × 2.5 mm) as a working electrode. These electrodes were provided by Dr. Wang's laboratory (Arizona State University³⁰). We introduced a spacer (easily removable adhesive tape; 60 μm) between the electrode surface and the channel outlet to control the distance between the electrode and the channel separation with reproducibility.

The working electrode was modified by casting 2 μL of DMF containing 1 mg/mL carbon material and allowing it to dry at room temperature for 12 h.³¹

Amperometric detection was performed using a Potentiostat Autolab PGSTAT12 from Eco Chemie. The high-voltage power

supply (from Glassman High Voltage, Inc.) had an adjustable voltage range between 0 and +5000 V.

Procedures. Standards. All stock solutions of standards were dissolved in MeOH and then stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ except folic acid, which was dissolved in a solution of 1 M NaOH. Working solutions for the studies were appropriately diluted in the electrophoresis buffer. All working solutions were well protected from light and used within 24 h after preparation.

Food Sample Preparation. Formulation Samples. Ten tablets of Becozyme (containing 10 mg of pyridoxine and 200 mg of ascorbic acid per tablet and other vitamins) were pulverized and added into a recipient. About 50 mg of this powder was introduced into a glass flask and 25 mL of phosphate buffer (10 mM pH 6) was added, previously bubbled with N_2 for 30 min. The sample was totally dissolved. A suitable aliquot was taken for analyses.

Vanilla Pod Samples. A 0.2 g sample of vanilla bean was finely chopped and macerated for 12 h at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ with 2 mL of water in a closed vessel. Ethanol (2 mL) was added, and the mixture was mixed thoroughly and macerated again for 3 days. The mixture

(31) Pumera, M.; Merkoci, A.; Alegret, S. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5068–5072.

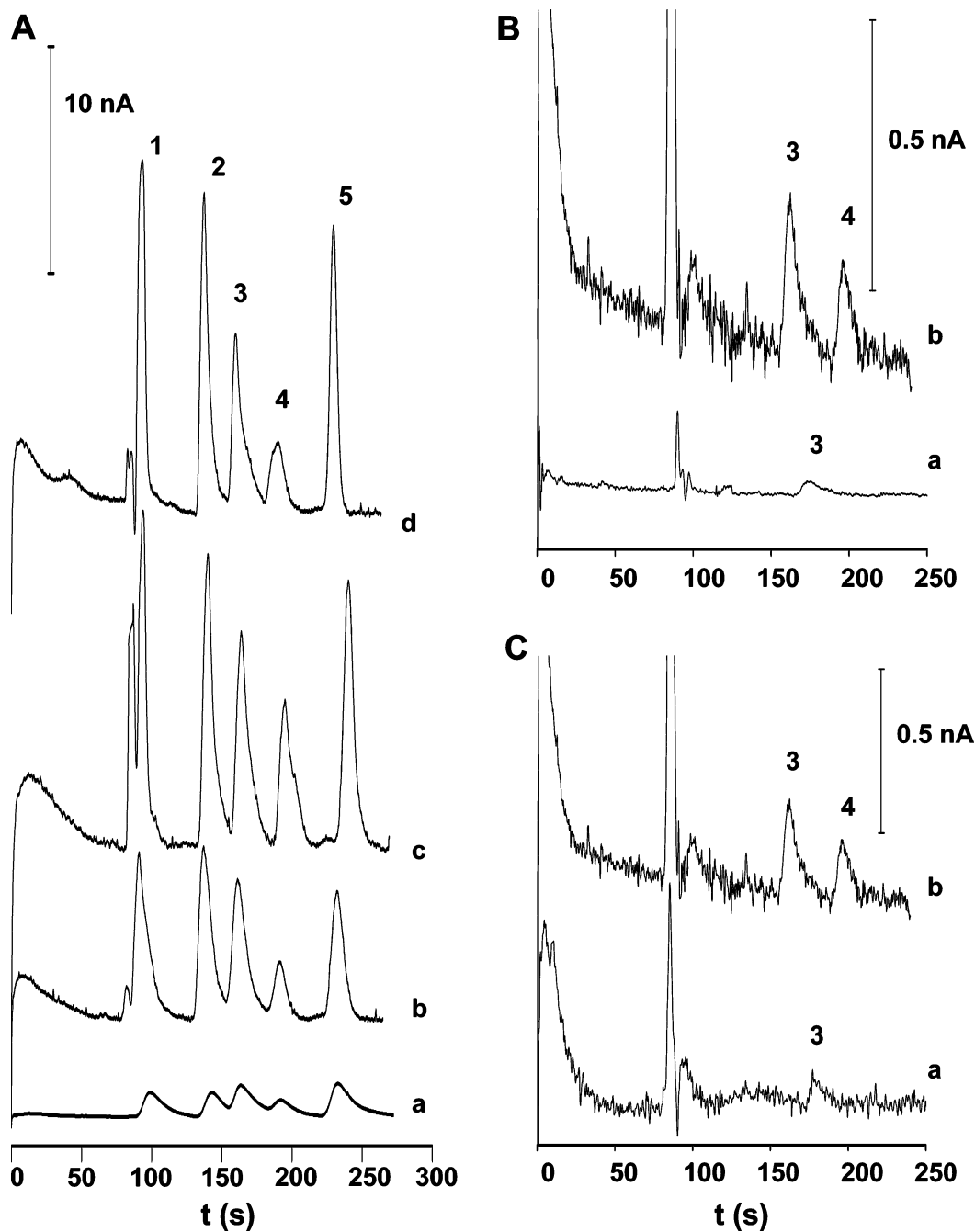


Figure 2. (A) Microchip electropherograms corresponding to a mixture of antioxidant standards with electrode materials studied: (a) SPE bare, (b) SPE-SWCNT, (c) SPE-MWCNT-B, and (d) SPE-MWCNT-A. (B) Electropherograms corresponding to extract from apple peels: (a) SPE bare, (b) SPE-MWCNT-A. (C) Analysis of apple extract with SPE-MWCNT-A: (a) pulp, (b) peel. Peaks: (1) arbutin, (2) phloridzin, (3) catechin, (4) rutin, and (5) ascorbic acid. Conditions: borate buffer 50 mM pH 9, separation voltage 2 kV, injection voltage 2 kV for 5 s, detection voltage 1 V, with 1 M HNO₃ in the detection reservoir.

was poured through a sintered filter funnel and the filtrate collected (adapted from ref 32).

Apple Peel and Pulp Samples. Apple was peeled to separate pulp and peel. Five grams of each was extracted, separately, with 10 mL of methanol for 1 h and 30 min. Samples were centrifuged at 13706g for 10 min (adapted from ref 33).

A secondary standard referenced in the Drug Master File (SW/1211/03) was used as reference material (property of Exxentia);

a certain amount was weighed to contain ~2 mM total isoflavones. A 20-mL volume of ethanol was added to the sample, and the resultant mixture was sonicated for 30 min. Samples were centrifuged for 10 min at 2000g in order to eliminate insoluble matter.

All samples were protected from the light and used within 24 h after preparation.

Electrophoretic Procedure. The channels of the glass microchip were treated before use and between groups of runs by rinsing them with 0.1 M NaOH and deionized water for 15

(32) Herrmann, A.; Stöckli, M. *J. Chromatogr., A* **1982**, *246*, 313–316.

(33) Escarpa, A.; González, M. C. *J. Chromatogr., A* **1998**, *823*, 331–337.

min each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. The optimum electrophoresis buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (pH 7) for vitamins, 50 mM borate buffer (pH 9) for polyphenols, 20 mM borate buffer (pH 9.5) for flavors, and 10 mM borate buffer (pH 8) for isoflavones. The running buffer and sample reservoirs were filled with the respective solution. The detection reservoir was filled with a 1 M HNO₃ solution. A voltage of 2000 V was applied for 5 min to the buffer reservoir to fill the separation channel while the detection reservoir was grounded and the others were floating. This process was performed on each sample reservoir for 20 s to facilitate filling the injection channel (between the separation channel and the sample reservoir), and then the voltage was applied for 5 min to the running buffer reservoir to eliminate the remains of the previously introduced samples from the separation channel.

Amperometric Detection. A detection voltage of +1.2 V was applied to the working electrode for vitamin and isoflavone analysis, +0.9 V for flavors, and +1.0 V for polyphenols. All experiments were performed at room temperature.

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

RESULTS AND DISCUSSION

In order to study the effect of the CNTs on the voltammetric response and to find the suitable detection potential, hydrodynamic voltammograms (HDVs) using both unmodified (SPE) and CNT-modified electrodes (SWCNT, MWCNT-A, MWCNT-B) were constructed. Figure 1 shows selected HDV profiles for each analyte group (polyphenols, vitamins, flavors, isoflavones) where two surface effects were observed: the lowering of oxidation potential and the enhancement of voltammetric current.

For dietary antioxidants (polyphenols), their oxidation in the presence of CNTs always started at substantially lower potential (about +0.4 or +0.5 V), decreasing the oxidation potential by ~0.3 V when CNT-modified electrodes with respect to use of bare SPE. Figure 1A,B shows the HDVs corresponding to two very different phenolic structures (arbutin and rutin) where the CNT surface effect is easily observed. On the contrary, while a profound lowering of potential effect was noticed for vitamin C (Figure 1C), the oxidation potential obtained for B-group vitamins (B₆ and folic acid) was not lower than +0.8 V with independence of the CNT material explored (Figure 1D). With respect to vanilla flavors and flavor enhancers, malthol (Figure 1E) and ethyl maltol (HDV not shown) showed notably a lower potential with oxidation starting at +0.6 V instead of +0.9 V when CNTs were used while neither vanillin (HDV not shown) nor ethyl vanillin (Figure 1F) showed this effect. The lowering of the potential of genistein from +0.9 to +0.7 V (HDV profiles not shown) was also observed.

The CNTs have a much larger specific surface area, so that current density is low and overpotentials are also lowered. That real effect was exhibited mainly when MWCNT materials were used, with independence of the analyte under study. The whole of the results revealed the complexity of the target analyte mixtures since not all compounds involved in each group exhibited the same electrochemical behavior. On the basis of all HDVs obtained, a relationship between this surface area effect and structures of the analytes was observed. Decreasing of the oxidation potential happened only on the analytes with enol and enediol as electroactive groups (polyphenols, ascorbic acid,

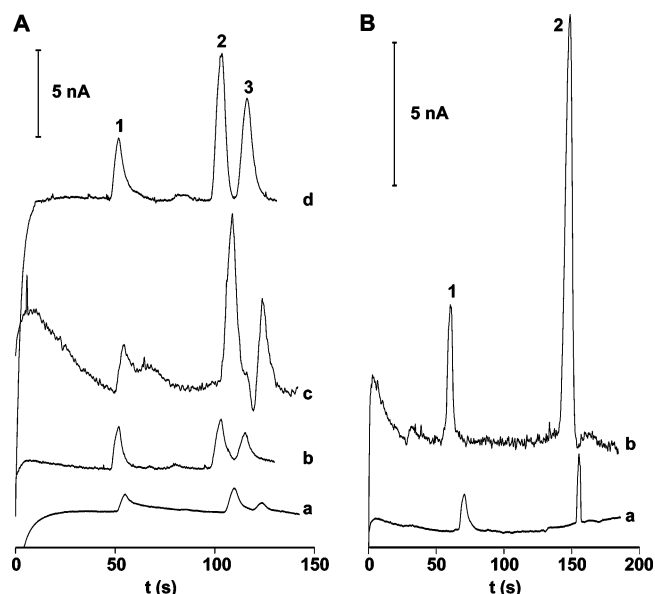


Figure 3. (A) Microchip electropherograms corresponding to a mixture of water-soluble vitamin standards with each kind of electrode studied: (a) SPE bare, (b) SPE-SWCNT, (c) SPE-MWCNT-B, and (d) SPE-MWCNT-A. (B) Determination of vitamins in a pharmaceutical supplement (Becozyme): (a) SPE bare and (b) SPE-MWCNT-A. Peaks: (1) pyridoxine, (2) vitamin C, and (3) folic acid. Conditions: phosphate buffer (10 mM pH 7), separation voltage 2 kV, injection voltage 2 kV for 3 s, detection voltage 1.2 V, with 1 M HNO₃ in the detection reservoir.

isoflavones, maltol). On the contrary, this effect was not observed for vanillin and pyridoxine containing carbonyl and hydroxymethyl as electroactive groups, respectively.

Analytical Merits of Carbon Nanotubes in Qualitative Analysis Domain. As we have previously mentioned, voltammetric profiles indicated a second important surface effect: CNT materials involved (SWCNT, and mainly MWCNT-A and MWCNT-B) offered a greatly improved sensitivity. Figure 2A shows the electropherograms obtained for dietary antioxidant standards at all CNT materials used where an enhancement of sensitivity with independence of CNT material used was clearly observed. Sharp and well-resolved peaks of four polyphenols (arbutin, phlorizin, (+)-catechin, rutin) and ascorbic acid were obtained in contrast with tailing unresolved peaks of these analytes using unmodified SPE. Since MWCNT-A gave the best sensitivity and the lowest noise, it was chosen as a material optimum for the analysis of antioxidants in food samples. Figure 2B,C shows selected examples of apple samples (peel and pulp). Figure 2B shows the surface area effect observed during the detection of (+)-catechin and rutin from apple peels when MWCNT-A was used. When bare SPE was used only a smoothly tailing peak for (+)-catechin was observed (electropherogram a). These results revealed the suitability of the modified electrodes for detection of both antioxidants. In addition, Figure 2C shows the electropherograms obtained for peel and pulps when MWCNTs-A was used. As expected, rutin was only detected in peels (this analyte is a fingerprint of these matrixes (Figure 2C, b) indicating again the suitability of the CNTs as novel materials in antioxidant detection. This fact could be very important in controlling adulteration of apple juices using peels in their elaboration.

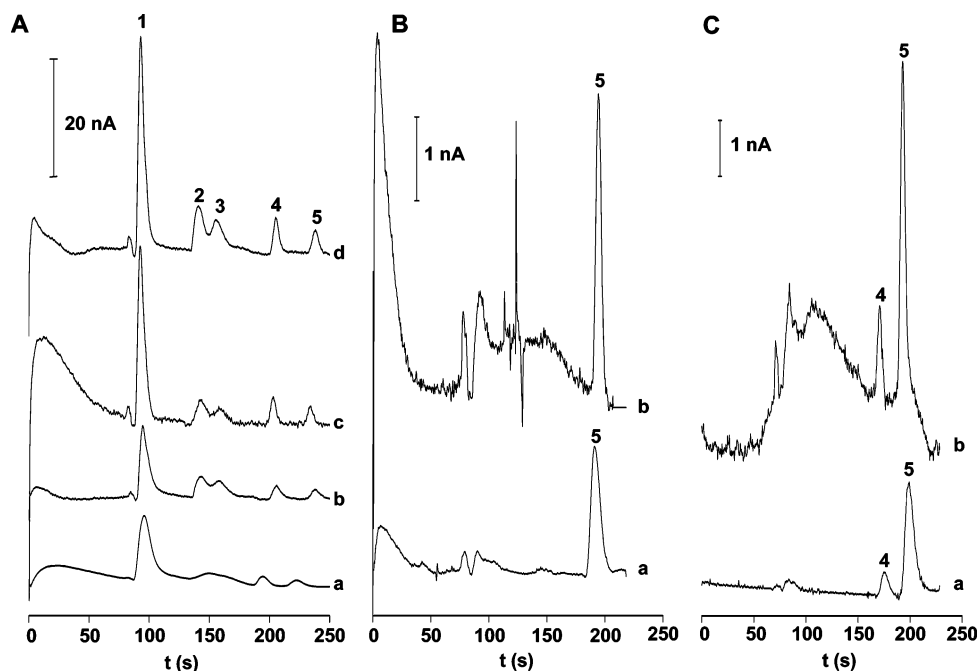


Figure 4. (A) Microchip electropherograms corresponding to a mixture of flavor standards with each kind of electrode studied: (a) SPE bare, (b) SPE-SWCNT, (c) SPE-MWCNT-B, and (d) SPE-MWCNT-A. (B, C) Analysis of vanilla beans. Electropherograms: (B) natural vanilla extract, (C) spiked with ethyl vanillin. (a) SPE bare and (b) SPE-MWCNT-A. Peaks: (1) vanillic alcohol, (2) ethyl maltol, (3) maltol, (4) ethyl vanillin, and (5) vanillin. Conditions: borate buffer (pH 9.5, 20 mM), separation voltage 2 kV, injection voltage 2 kV for 3 s, detection potential +0.9 V, with 1 M HNO₃ in the detection reservoir.

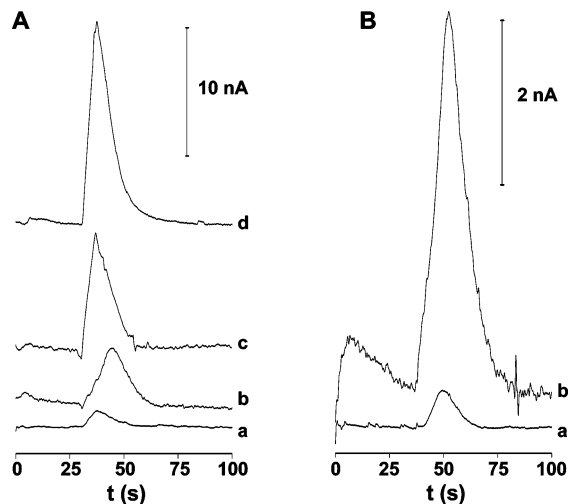


Figure 5. (A) Microchip electropherograms corresponding to genistein standard with each kind of electrode studied: (a) SPE bare, (b) SPE-SWCNT, (c) SPE-MWCNT-B, and (d) SPE-MWCNT-A. (B) Analysis of a total isoflavones in a reference sample (a) SPE bare and (b) SPE-MWCNT-A. Conditions: borate buffer 10 mM pH 8, separation voltage 2 kV, injection voltage 2 kV for 6 s, detection voltage +1.2 V, with 1 M HNO₃ in the detection reservoir.

Figure 3 shows the separation of prominent B group and C vitamin standards (A) in connection with their analysis in a selected formulation (B) using bare SPE and a CNT-modified electrode. In this case, a profound enhancement of the sensitivity was noticed when MWCNTs were used in the detection of standards. MWCNT-A was chosen as optimum material for vitamin detection in formulations showing an enhancement of the sensitivity in the analysis of vitamins B₆ and C in the formulations examined (see Figure 3B).

Table 1. Resolution Obtained for Analytes Couples of Food Significance

food group	analyte couple	resolution		
		SPE bare	SPE-MWCNT-A	ratio ^a
polyphenols	phloridzin-(+)-catechin	0.8	1.9	2.3
	(+)-catechin-rutin	1.0	2.1	2.1
vitamins	vitamin C-folic acid	1.8	1.4	const ^b
vanilla flavors	maltol-ethyl maltol	0.6	1.0	1.7
	vanillin-ethyl vanillin	1.7	2.9	1.7
	<i>vanilla sample^c</i>	<i>1.1</i>	<i>2.4</i>	<i>2.2</i>

^a Ratio was calculated as resolution obtained using SPE-MWCNT-modified electrode/resolution obtained using SPE-bare electrode. ^b Resolution ratio obtained was 0.8 and understood as constant. ^c Italic type indicates that this resolution was obtained during analysis in vanilla samples.

Figure 4A shows the enhancement of sensitivity observed when CNT materials (b–d) were used as modifiers of SPE bare (a) electrodes in the detection of vanilla flavors and related compounds. To illustrate the power of CNT in the detection of frauds, natural vanilla samples were also analyzed (Figure 4B,C). The enhancement of sensitivity was also clearly noticed during the analysis of natural vanilla samples (Figure 4B) when MWCNT-A was used as optimum material (electropherogram 5B, b). Under these high sensitivity conditions, ethyl vanillin was not detected while vanillin was really detected. This result confirmed the natural origin of the vanilla pod examined and indicated the suitability of these detectors for controlling their authenticity. Also, vanilla extract was fortified in ethyl vanillin in order to evaluate the capability of the method to detect a possible adulteration in vanilla samples using again both MWCNT-A modified and bare electrode (Figure 4C). The enhancement of sensitivity was also

Table 2. Selected Analytical Information Obtained from Sample Analysis

food group	analytes	SPE bare			SPE-MWCNT-A			slope ratio ^b
		<i>w</i> _{1/2}	S/N	LOD ^a (μ M)	<i>w</i> _{1/2}	S/N	LOD ^a (μ M)	
polyphenols	(+)-catechin	11.8	4	4	8.2	6	2	9
	rutin	nd ^c	nd	23	8.6	4	12	11
vitamins	pyridoxine	4.8	83	29	4.0	15	8	16
	vitamin C	2.5	159	11	5.6	50	11	4
vanilla flavors	ethyl vanillin	7.9	25	15	5.3	8	7	9
	vanillin	9.4	180	12	5.4	58	7	7
total isoflavones	genistein	11.3	63	1	14.3	76	0.8	8

^a LODs were calculated as S/N = 3 criteria. ^b Determined as the ratio between the calibration slope obtained using SPE-MWCNT-A/calibration slope obtained using SPE bare ($r > 0.990$ for all calibration curves studied). ^cnd, not detected

clearly observed during the detection of the ethyl vanillin–vanillin target couple.

“Total isoflavones”⁹ (genistein and daidzein and their related glycosides genistin and daidzin) form a very important group of compounds, which possess various health-promoting functions and form a group that occurs naturally in soybeans. In the analysis of isoflavones, the differentiation of their possible forms seems to be sometimes irrelevant because only aglycons are absorbed in the human gastrointestinal tract, the most important information being the “total isoflavones” content. Figure 5 shows the enhancement of sensitivity observed when CNT materials were used as modifiers of SPE electrodes in the detection of both genistein (A) (as representative prominent isoflavone standard) and nonseparated total isoflavones in the reference material (B).

In all food analytes of significance examined before, both the sharp and well-resolved peaks using MWCNT-A-modified electrodes indicated the faster electron transfer that resulted in smaller values of the half-peak widths and had as a clear consequence the improvement of resolution during the analysis of the solid samples. Table 1 lists the resolution obtained for each target analyte couple when unmodified (SPE) and modified (MWCNT-A) samples were used, as well as the resolution ratio obtained between them. While no significant improvement of resolution peak to peak (i.e., vitamin C to folic acid) was obtained (from 1.8 to 1.4), the resolution of all analyte couples involved was improved (for example, malthol–ethyl malthol resolution was improved from the unacceptable value of 0.6 to the acceptable one of 1.0). Interestingly, ethyl vanillin–vanillin resolution was also improved during the analysis of natural vanilla from 1.1 to 2.4, revealing the analytical power of these materials in food sample analysis. In order to interpret these data suitably, the resolution ratio was also calculated (between resolutions obtained with modified and unmodified detectors), finding that the improvement factor of resolution was constant and around 2 with independence of the analytes studied. It opens new directions in the area of complex separations where many analytes could constitute the final composition.

Table 2 summarizes the relevant information obtained from food sample analysis when MWCNT-A was used as optimum material. As has been reported in other standards of clinical and environmental significance, half-peak widths were also dramatically decreasing in food analyte standards (i.e., half-peak widths for arbutin, phloridzin, (+)-catechin, rutin, and ascorbic acid standards: 5.6 vs 15.2; 6.1 vs 14.3; 6.7 vs 16.7; 10.7 vs 17.6; 5.7 vs

15.5 s), and, interestingly, it was also noticed in the food sample analysis (see Table 2). Indeed, during the detection of samples of complex flavonoids as well as during the detection of the ethyl vanillin–vanillin couple, half-peak widths were also decreased while no significant decrease of half-peak widths was obtained when water-soluble vitamins and total isoflavones were really detected in the samples. Signal-to-noise ratio and estimated LODs were also good during analysis, allowing the detection of analytes. In general, LODs were of micromolar range and were also improved when modified detectors were used for antioxidants (2 vs 4 μ M 12 vs 23 μ M (+)-catechin and rutin, respectively; 8 vs 30 μ M for pyridoxine) as well as vanilla flavors (12 vs 7 μ M).

The enhancement of sensitivity was also coupled to the resistance of the surface fouling and hence to good stability. While signal at bare SPE was decreased to 20% for some polyphenols, 80% of the total signal was kept for selected analytes after repetitive injections ($n = 10$) when optimum material was used (MWCNT-A).

Analytical Merits of MWCNT in Quantitative Analysis Domain. Quantitative analysis is very important in food analysis. Several quality and security controls are based on accurate measurements of concentration of target analyte. In this way, it is very important to explore the behavior of CNTs in this domain of the analysis. Analytical performance of the MWCNT-A detector as optimum material in terms of precision was studied, and calibration plots were obtained for all analyte groups. Precision was evaluated in the analytical signals obtained from selected analytes with RSDs values of less than 10% for polyphenols, 11% for vitamins, 9% for flavors, and 3% for isoflavones. In addition, calibration plots were performed using both unmodified (SPE) and modified detectors (MWCNT-A), and good linear correlations were obtained in all cases examined ($r > 0.990$). The enhancement of sensitivity was rigorously evaluated from the calibration slope ratio between MWCNT-A and bare SPE (see also Table 2). An impressive slope ratio ranging from 4- to 16-fold was observed for the selected analytes, quantitatively indicating the improvement of analytical sensitivity of CNT materials.

As we have previously mentioned when describing the problematic analysis of isoflavones, a total amount of isoflavone aglycons (total isoflavones) could provide sufficient information when different soy products are considered for consumption. In addition, analysis of total isoflavones assures the quality of the products, such as pharmaceuticals or food. Consequently, the fast and reliable quantitation of total isoflavones should become

Table 3. Reliability of the Methods and Quantitative Data Using MWCNT-A as New Detectors in Food Analysis

sample	analytes	level	precision (RSD (%))	reference value	accuracy (%)	remarks
secondary std	total isoflavones	43.6 ± 1.4 (%)	3	45.8 (%)	5	accurate and traceable determination
apple	(+)-catechin	0.25 mg/100 g	nd	na ^a	nd	quantitative data found in agreement with relevant literature
formulation	rutin pyridoxine	1.9 mg/100 g 9.6 ± 0.6 mg/tablet	6	10 mg/tablet	4	comparison of quantitative data obtained with those given by manufacturer. accurate determination
vanilla pod	vitamin C ethyl vanillin vanillin	182 ± 8 mg/tablet recovery 101 ± 3(%) 60 ± 3 mg/g	4 3 5	200 mg/tablet 100% na	9 1 nd	excellent recovery (close to 100%) quantitative found data in agreement with relevant literature

^a na, not available.

essential in food–drug quality control of market production. In this way, the reliability (precision and accuracy) of the proposed new MWCNT detectors in the quantitative domain was rigorously evaluated using a reference material (a secondary standard from Drug Master File SW/1211/03; containing 45.8% (w/w) (indicated for the secondary standard). As can be observed, the precision (RSD less than 3%) and accuracy obtained (systematic error of 5%) were excellent, indicating a very good reliability of these materials coupled to microfluidic platforms in quantitative domains. Because of this performance, MWCNT-A was extended to the other samples with quantitative purposes. Table 3 also lists the quantitative analyte levels as well as the evaluation of the precision and accuracy (where appropriate) obtained in the analysis from the food samples examined. The results obtained in all cases studied confirmed the suitability of nanotube detectors in the quantitative domain.

CONCLUSION

Carbon nanotube-modified SPE detectors coupled in microfluidic chips are a new and promising material for electrochemical sensing of food analytes of significance in both qualitative and quantitative domains. These unique materials allowed the decrease

of the overpotential, enhancing sensitivity, and improving the resolution in the detection of dietary antioxidants, water-soluble vitamins, vanilla flavors, and total isoflavones during their analysis in food samples. In addition, very good accuracy was also obtained when these materials were used in the analysis of referenced samples with high traceability. These materials coupled to the well-established advantages of the first-generation CE microchips are going to break some frontiers in the near future advancing clearly toward the “food lab-on-a-chip” concept.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. A.G.C. acknowledges the fellowship received from the Spanish Ministry of Education and Science. M.P. is grateful to the Japanese Ministry for Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) for funding through the ICYS program.

Received for review June 13, 2007. Accepted July 24, 2007.

AC0712471

Agustín G. Crevillén¹
Martín Pumera²
María Cristina González¹
Alberto Escarpa¹

¹Department of Analytical
Chemistry and Chemical
Engineering,
University of Alcalá,
Madrid, Spain

²ICYS, National Institute
for Materials Science,
Ibaraki, Japan

Received December 27, 2007

Revised March 7, 2008

Accepted March 16, 2008

Research Article

Carbon nanotube disposable detectors in microchip capillary electrophoresis for water-soluble vitamin determination: Analytical possibilities in pharmaceutical quality control

In this work, the synergy of one mature example from “lab-on-chip” domain, such as CE microchips with emerging miniaturized carbon nanotube detectors in analytical science, is presented. Two different carbon electrodes (glassy carbon electrode (GCE) 3 mm diameter, and screen-printed electrode (SPE) 0.3 mm × 2.5 mm) were modified with multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and their electrochemical behavior was evaluated as detectors in CE microchip using water-soluble vitamins (pyridoxine, ascorbic acid, and folic acid) in pharmaceutical preparations as representative examples. The SPE modified with MWCNT was the best electrode for the vitamin analysis in terms of analytical performance. In addition, accurate determination of the three vitamins in four different pharmaceuticals was obtained (systematic error less than 9%) in only 400 s using a protocol that combined the sample analysis and the methodological calibration.

Keywords:

Capillary electrophoresis microchip/ Carbon nanotubes / Electrochemical detection
DOI 10.1002/elps.200700947

1 Introduction

Recent excellent reviews [1, 2] have clearly stated that after almost two decades from the introduction of the micro-total analysis system (micro-TAS) concept, the field of microfluidics is in early adolescence and it still lacks essential requirements of integration of components and their use by nonexperts is not viable. Also, recently Haerberle and Zengerle [3] have pointed out from a technological point of view that the described practice of assembling discrete components, at least in the field of lab-on-a-chip applications, belongs to the past and we do not expect that it will continue in the future. They have clearly stated that the research community really needs validated and easy-to-operate

microfluidic platforms which should be producible by a standardized cost-efficient technology.

In spite of the weakness cited above, however, CE microchips, as an important part belonging to microfluidics field, are unique examples of the maturity reached in these “lab-on-a-chip” domains. They were one of the early parents of microfluidics and, nowadays, the most representative examples of analytical microsystems [2]. In addition, the microchip format approach shows nicely the concept of integration of all required analytical channels using easy electrokinetic pumping. Using CE microchips, analysis times can be reduced to seconds and high separation efficiencies can be achieved using extremely low volume samples [4]. EOF has been successfully implemented using different types of materials to manufacture the channels, glass being the most commonly used because of (i) its well-known microfabrication techniques, (ii) its well-known surface chemistry, (iii) its high and reproducible EOF, and (iv) its commercial availability [3, 4].

Detection is still one of the main drawbacks of these microsystems since extremely few molecules reached the detector area. Apart from LIF which was the original detection technique applied, it is nowadays the standard detection technique used for microchip separation [5]; electrochemical detection constitutes the most attractive alternative because

Correspondence: Professor Alberto Escarpa, Department of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
E-mail: alberto.escarpa@uah.es
Fax: +34-91-8854971

Abbreviations: CNT, carbon nanotube; GCE, glassy carbon electrode; HDV, hydrodynamic voltammogram; MWCNT, multiwalled carbon nanotube; SPE, screen-printed electrode

of its inherent sensitivity and miniaturization without loss of performance and high compatibility with the micro-fabrication techniques used in CE microchips' fabrication [6, 7]. Another advantage of electrochemical detection is its inherent miniaturization which allows the low cost fabrication of disposable detectors for easy use. This advantage is very compatible with the end channel configuration where the replacement of the electrode is extremely simple and reproducible and clearly independent of clean-room facilities. In this way, another added functionality is the opened opportunity to modify these surfaces suitably with nanomaterials to break frontiers in new applications. An excellent example of this are carbon nanotubes (CNTs). CNTs are a new group of nanomaterials with unique geometrical, mechanical, electronic, and chemical properties which offers notably exciting possibilities involving the large active surface at electrodes of small dimensions, the enhancement of electronic transfer, and the strong sorption capacity [8, 9]. There are two main types of CNTs that can have high structural perfection: single-walled CNTs (SWCNTs) which consist of a single graphite sheet seamlessly wrapped into a cylindrical tube, and multi-walled CNTs (MWCNTs) which comprise an array of such nanotubes that are concentrically nested like rings of a tree trunk [10–13]. A large number of applications can be found in the literature and several reviews have recently been devoted to this scope [14–16].

The analytical microsystems as one of the products of microfluidic platforms are now emerging in the scene of food analysis [17], and the combination of both total miniaturized approaches, CE microchips and CNT, has generated excellent results in this area in terms of lowering oxidation potentials, enhancement of sensitivity, and decrease in LODs [18, 19].

In this work, the analytical power of CNTs detectors in CE microchips for the determination of water-soluble vitamins in pharmaceutical formulations will be demonstrated. Water-soluble vitamin supplements are widely used in therapeutics to supply the very common lack of vitamins due to their high impact on our health. Previously, we have demonstrated the suitability of CE microchips in the determination of these analytes *versus* highly time-consuming and nonenvironmentally friendly protocols such as RP HPLC [20]. In this paper, we explore the use of CNTs as electrochemical detectors in CE microchips modifying two kinds of carbon electrodes (glassy carbon electrode (GCE) and screen-printed carbon electrode) with the objective of increasing the sensitivity, reducing the LOD, and improving the electrode stability; so, finally, the analytical possibilities of these microsystems could be amplified. In addition, we will demonstrate the suitability of CNT-modified screen-printed disposable electrodes for the accurate vitamin determination in the analysis of different formulations. It should allow proposing these microsystems (CE microchip-CNT) as future candidates for routine analysis in our laboratories.

2 Materials and methods

2.1 Materials and standards

Folic acid and pyridoxine hydrochloride were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Ascorbic acid was from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland).

Pharmaceutical preparations (Vitafardi[®], Aspol[®], Becozyme[®] C Forte, and Hidrosil[®]) were purchased from local markets (Madrid, Spain).

MWCNT-200 (product no. 636630; length, 0.5–200 μm ; od, 30–50 nm, wall thickness, 12–18 nm, CVD method produced, surface-specific area 104.8 m^2/g) was purchased from Aldrich.

All chemicals used in buffer preparation and in supporting electrolytes were of reagent grade. Methanol absolute was acquired from Panreac (Barcelona, Spain). In all cases, high-quality water, purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), was used.

2.2 Apparatus and electrodes

The adapted CE-ED microsystem used in this paper is described elsewhere [20]. The glass chip was fabricated by Micralyne (Model MC-BF4-001, Edmond, Canada) and consisted of a glass plate (88 mm \times 16 mm) with a four-way injection cross, a 74 mm long separation channel, and side arms measuring 5 mm long. The amperometric detector (end-channel detection) consisted of an Ag/AgCl wire as a reference electrode, a platinum wire as a counter electrode, and a carbon thick-film screen-printed electrode (SPE) (0.3 mm \times 2.5 mm) or a GCE (3 mm diameter) as a working electrode. These SPEs were provided by Dr. Wang's lab. We also introduced a spacer (easily removable adhesive tape) (60 μm) between the electrode surface and the channel outlet to control the distance between the electrode and the channel separation.

Amperometric detection was performed using a Potentiostat Autolab PGSTAT12 from Eco Chemie. The high-voltage power supply (from Glassman High Voltage) had an adjustable voltage range between 0 and 5 kV.

SEM micrographs of CNTs dispersed on the electrode surface were obtained by Scanning Electron Microscope (Zeiss 950, Germany).

The surface specific area was measured by Autosorb 1 equipment (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, FL, USA) using a multipoint BET method; nitrogen was used as an adsorbate. Prior to the adsorption experiments, the samples were dehydrated at 250°C under vacuum for 16 h.

2.3 Procedures

2.3.1 Preparation and characterization of carbon nanotube electrodes

The as received MWCNTs were first functionalized by refluxing them in 6 M nitric acid at 80°C for 24 h to give surface

oxygen-containing groups (carboxyl, carbonyl, and hydroxyl) at the defect sites of the outer graphene layer of the MWCNTs [21, 22] and to remove residual metallic impurities [23].

The surface-specific area of functionalized MWCNT was determined by BET measurements and it was found to be $104.8 \text{ m}^2/\text{g}$. Subsequently, distilled water washed and dried oxygen containing group functionalized MWCNTs were dispersed in DMF (1 mg/mL) and $2 \mu\text{L}$ for SPE and $3 \mu\text{L}$ for GCE of this dispersion was deposited on the surface of bare electrode and allowed to dry at room temperature for 12 h. Figure 1 illustrates (A) an SPE bare surface and (B) a well-dispersed sponge-like MWCNT film on the surface of the electrode. The surface area of deposited MWCNTs was found to be 3.2 and 2.1 cm^2 for GC and SPE, respectively which were much higher when compared to the surface area of bare electrodes of 0.07 and 0.0075 cm^2 for GC and SPE, respectively. These data support the superior electrochemical performance as we will see later in Section 3.

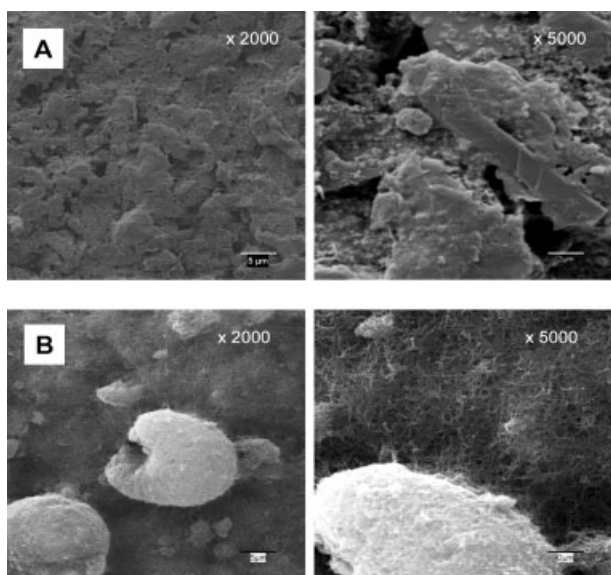


Figure 1. SEM micrographs of bare SPE electrode (A), and CNTs dispersed on the SPE electrode surface (B).

2.3.2 Standards

All stock solutions of standards were dissolved in MeOH and then stored at -20°C except folic acid that was dissolved in a solution of 1 M NaOH. Working solutions for the studies were appropriately diluted in the electrophoresis buffer. All working solutions were well protected from light and used within 24 h after preparation.

2.3.3 Sample preparation

Ten tablets of each formulation were pulverized and added into a recipient. About 50 mg of this powder was introduced into a glass flask and 25 mL of phosphate buffer (10 mM,

pH 7) was added, previously bubbled with N_2 for 30 min. The sample was totally dissolved. A suitable aliquot was taken for analyses.

For the medicine Aspol, the procedure was modified. Ten capsules were opened and then emptied and mixed into a recipient. About 50 mg of this mixture was introduced into a glass flask and 25 mL of phosphate buffer (10 mM, pH 7) was added. The sample was submerged into an ultrasonic bath for 30 min at 40°C and then it was centrifuged at 3500 rpm for another 10 min. The supernatant was taken and diluted to suitable concentration.

All samples were protected from light and used within 24 h after preparation.

2.3.4 Glassy carbon electrode cleaning procedure

Before each session, the electrode was cleaned using two kinds of treatments: physical and chemical. The physical treatment consisted of manually polishing the electrode with alumina powder (diameter of $1 \mu\text{m}$ and later diameter $0.05 \mu\text{m}$) for 3 min and then rinsing it with deionized water. During the chemical treatment, the electrode was sonicated in ethanol solution for 15 s and then sonicated in deionized water for 15 s. The cleaning procedure was repeated after each analysis.

2.3.5 Electrophoretic procedure

The channels of the glass microchip were treated before use and between groups of runs by rinsing them with 0.1 M NaOH and deionized water for 15 min each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. The optimum electrophoresis buffer consisted of 10 mM phosphate buffer (pH 7). The running buffer and sample reservoirs were filled with the respective solutions. The detection reservoir was filled with a 1 M HNO_3 solution. A voltage of 2000 V was applied for 5 min to the buffer reservoir to fill the separation channel while the detection reservoir was grounded and the others were floating. This process was performed to each sample reservoir for 20 s to facilitate filling the injection channel (between the separation channel and the sample reservoir), then the voltage was applied for 5 min to the running buffer reservoir to eliminate the remains of the previously introduced samples from the separation channel.

2.3.6 Amperometric detection

A detection voltage of $+1.2 \text{ V}$ was applied to the working electrode. All experiments were performed at room temperature.

2.3.7 Safety considerations

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

3 Results and discussion

3.1 Electrochemical behavior of water-soluble vitamins on carbon nanotube surfaces

When using electrodes modified with MWCNTs, an interesting different behavior was observed between vitamin C and B-group vitamins. Indeed, while an “electrocatalytic” effect was noticed for vitamin C (the oxidation potential of vitamin C was decreased in +0.1 V in both modified electrodes (GCE or SPE)), the oxidation potential for B-group vitamins (B6 and folic acid) was the same independent of the electrode used. The different behaviors between vitamin C and B-group could be explained on the basis of the corresponding oxidizable group in their structure. In the case of ascorbic acid, the electrochemical group is an endiol group, the same as in catechol. For this compound it has been proposed that the oxygen species presents on active carbon electrodes catalyze their oxidation by a proton-coupled electron-transfer mechanism [24]. Gooding and co-workers [25] have demonstrated the presence of oxygen species (carbonyl, ether, hydroxyl) on CNT surface and they proposed these groups as responsible for the fast electron transfer of these materials. So, these oxygen species can explain the preference of electrocatalytic effect over the ascorbic acid oxidation. Actually, the active groups for pyridoxine and folic acid are hydroxymethyl joined to the benzene ring [26] and phenol group [27], respectively, and their oxidation mechanism is more complex and not well known.

The two electrochemical behaviors found are depicted on the selected hydrodynamic voltammograms (HDVs) in Fig. 2 for (A) ascorbic acid (lowering oxidation potential) and (B) folic acid (not lowering oxidation potential). The optimal detection potential was found at +1.2 V because higher oxidation potential generated a huge noise in the background (results not shown).

In contrast, from these HDV profiles, a clear increase in the amperometric current was observed when modified electrodes were used independent of the electrode and vitamin studied. This increase is due to the high surface area of

CNT when compared with bare electrodes. On the basis of our modification protocol and BET data (104.9 m²/g), the calculated active surface was higher for modified electrodes compared with the bare ones (for GCE bare: 0.07 cm², modified: 3.2 cm², 48 times higher surface area; for SPE bare: 0.0075 cm², modified: 2.1 cm², 280 times higher surface area). This enhancement of the sensitivity can also be observed in Fig. 3. It displays the separation of a mixture solution containing the water-soluble vitamins under optimum separation conditions (optimization data are not shown) using both (A) GCE and (B)SPE in both (a) bare and (b) modified surfaces.

The results were different for each electrode, while for SPE a great increase in amperometric signal was achieved between the electrodes with and without CNT, for the GCE this signal was hardly increased. Identical results were obtained by other researchers [28] using different macroelectrodes (3 mm diameter). This finding can be explained by the fact that amperometric detection in microchip CE with macroelectrodes can be considered as a coulometry because all injected analytes are oxidized [29]. In our experiment we found that 88% of the analytes were oxidized using GCE and 95% using GCE-MWCNTs. So, the main advantage of the CNTs, which is the high surface/volume ratio, is of limited use for GCE.

A comparison of analytical remarks between bare and modified electrodes is presented in Table 1. Firstly, the common characteristic observed for modified electrodes is that using CNTs clearly increases the fouling resistance in both electrodes. Indeed, of particular interest is the significant decrease in the analytical signal when SPE bare electrodes are used (80% for pyridoxine) in contrast with those obtained with modified ones (20%) after ten consecutive injections. This interesting characteristic permits to perform a greater number of analyses so, finally, more replicate of analyses is performed in repeatable conditions for quality control. This behavior is expected when these nanomaterials are used because they exhibit curvature morphology which allows oxidized products to desorb faster than on planar graphite as well as high surface area of 104.9 m²/g.

Table 1. Analytical remarks of the detectors studied

Vitamin	GCE				SPE			
	Bare		Modified		Bare		Modified	
	S/N ^(a)	Fouling ^(b)	S/N ^(a)	Fouling ^(b)	S/N ^(a)	Fouling ^(b)	S/N ^(a)	Fouling ^(b)
Pyridoxine	17	55	20	35	92	81	58	19
Ascorbic acid	13	36	15	26	132	71	140	37
Folic acid	14	41	17	37	41	54	96	52

a) Ratio between the amperometric signal and the instrumental noise for a mixture of standards (100 μM vitamin B₆, 200 μM vitamin C, 200 μM folic acid).

b) Estimated as percentage of amperometric signal decreasing with respect to the first signal after ten consecutive measurements.

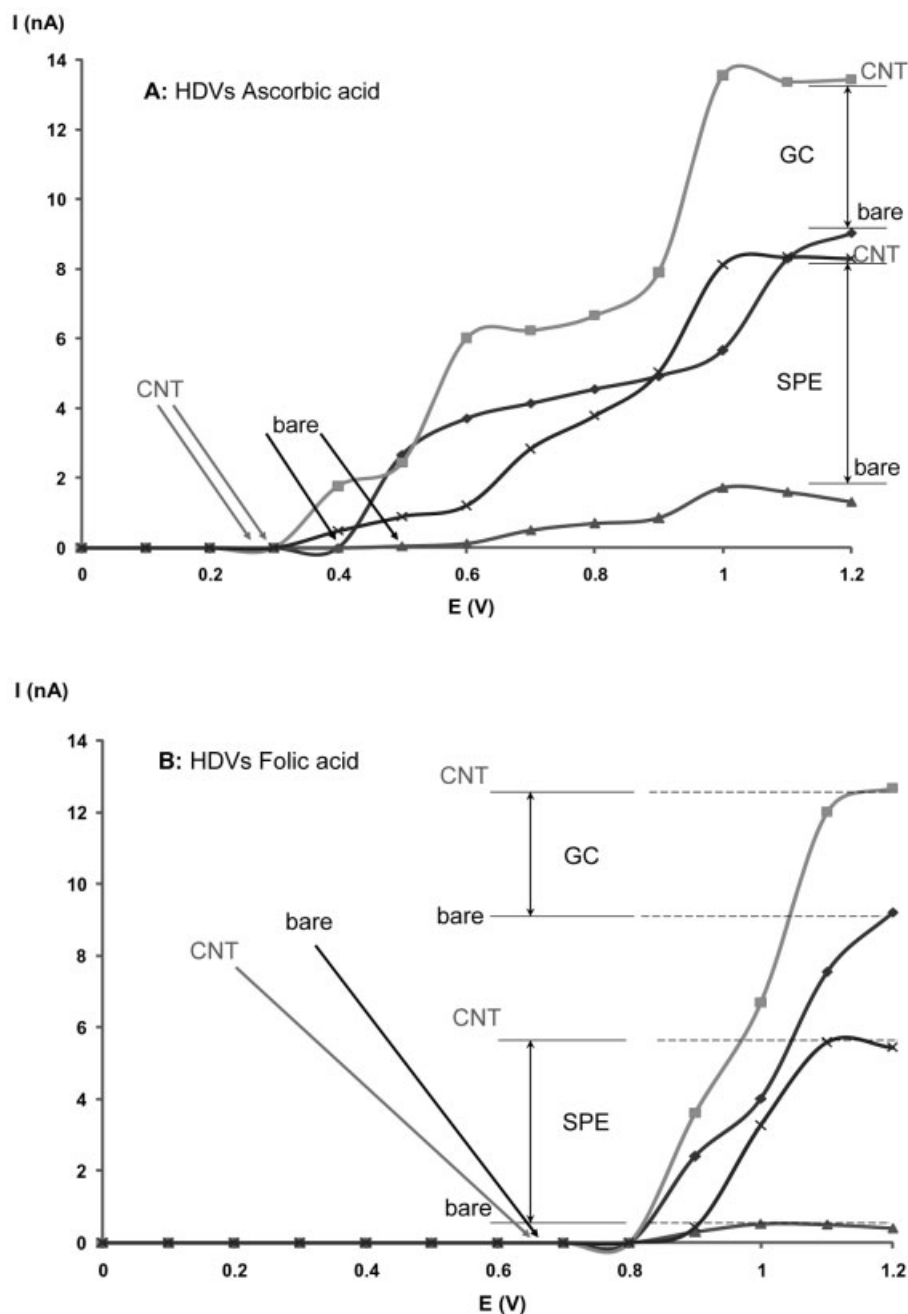


Figure 2. HDVs corresponding to the two electrochemical behaviors found: (A) ascorbic acid, (B) folic acid. \blacklozenge , GCE; \blacksquare , GCE-MWCNT 200; \blacktriangle , SPE; \times , SPE-MWCNT 200.

Secondly, the SPE format (bare and modified) showed better S/N ratios than GCE. Indeed, the S/N ratio of SPE (modified and nonmodified) was better than that of GCE (modified and nonmodified) by almost one order of magnitude.

The characteristics presented by SPE electrodes, such as its inherent miniaturization, easy surface modification and disposability (reducing operative costs), allowed it to be selected as the best electrode for the analysis of real samples.

3.2 Reliability of disposable carbon nanotubes in the determination of water-soluble vitamins on CE microchips

Analytical figures for water-soluble vitamins with SPE bare and SPE-CNTs are listed in Table 2. Very good correlation coefficients were obtained in the linear range examined. For all vitamins, intercept values obtained, statistically speaking, were zero at the significance level chosen indicating that the interpolation process during quantitative

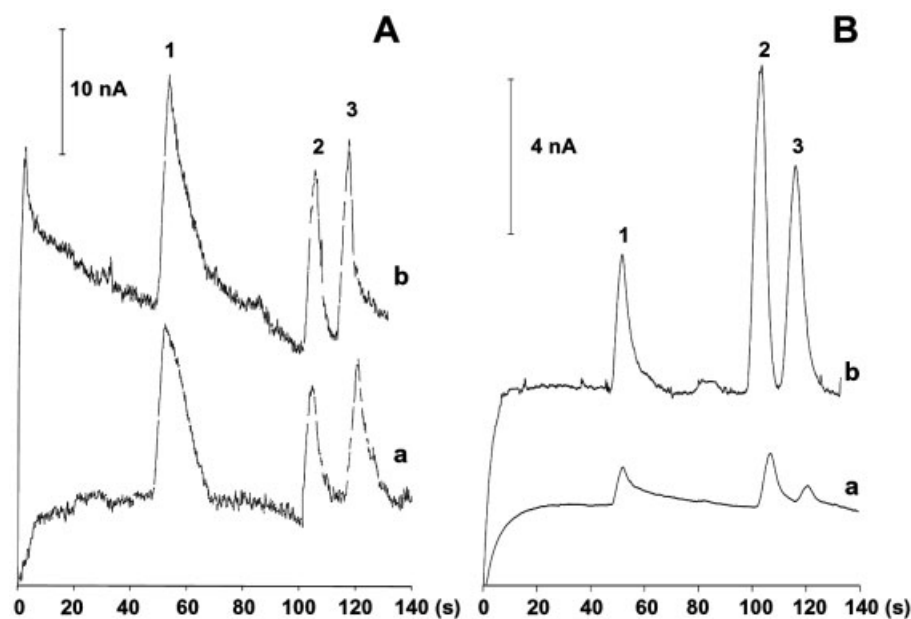


Figure 3. Microchip electrophoresis traces corresponding to a mixture of water-soluble vitamin standards with each kind of electrode studied: (A) GCE; (a) bare, (b) modified with MWCNT 200. (B) SPE; (a) bare, (b) modified with MWCNT 200. Peaks: (1) pyridoxine 100 μM , (2) ascorbic acid 200 μM , and (3) folic acid 200 μM . Conditions: phosphate buffer (10 mM pH 7), separation voltage 2 kV, injection voltage 2 kV for 3 s, detection voltage 1.2 V, with 1 M HNO_3 in the detection reservoir.

Table 2. Analytical figures of merit

Analyte	Lineal range (μM)	r	$a \pm tS_a^{\text{a}}$ (nA)	$b \pm tS_b^{\text{a}}$ (nA/ μM)	$b \pm tS_b^{\text{b}}$ (nA/ μM)	$b_{\text{CNT}}/b_{\text{bare}}$	$\text{LOD}^{\text{c}}_{\text{bare}}$ (μM)	$\text{LOD}^{\text{c}}_{\text{CNT}}$ (μM)	$\text{LOQ}^{\text{d}}_{\text{CNT}}$ (μM)
Pyridoxine	25–300	0.999	-1.1 ± 1.3	0.12 ± 0.01	0.007 ± 0.001	16	29	8	25
Ascorbic acid	50–400	0.990	-2.8 ± 3.3	0.08 ± 0.01	0.020 ± 0.006	4	11	11	37
Folic acid	50–400	0.990	-5.0 ± 6.8	0.11 ± 0.03	0.020 ± 0.008	5	11	8	28

a) Confidence intervals of intercept and slope using SPE CNTs ($\alpha = 0.05$).

b) Confidence intervals of slope using SPE bare carbon detectors ($\alpha = 0.05$).

c) $\text{LOD } S/N = 3$.

d) $\text{LOQ } S/N = 10$.

analysis could be independent of the intercept using just the slope and as a consequence simplifying the regression equation.

Analytical sensitivity enhancement was evaluated toward the variation observed in calibration slope when bare and modified electrodes were systematically used (Table 2). Interestingly, the sensitivity was higher (mainly for B-group vitamins) using MWCNT surfaces with slope ratios ranging from 4 to 16 as also listed in Table 2. Estimated S/N characteristics allowed for obtaining detection limits in the micromolar range. The LODs obtained ($S/N = 3$) using SPE-MWCNTs were better than those obtained using bare SPE for B-group vitamins. Indeed, while no significant differences for ascorbic acid were observed, an important improvement of the LOD for pyridoxine from 29 to 8 micromolar was clearly noticed. This fact was notably important since the electrochemical behavior of this vitamin becomes complex in previous works [20]. Precision was also thoroughly studied for both repeatability and reproducibility with

the same electrode. Very good RSDs were obtained in all cases examined, indicating a good precision with RSDs values lower than 11%. However, when the reproducibility interelectrode is evaluated, values up to 38% ($n = 7$) were obtained. This result would require the making of a calibration curve for each electrode, reducing the performance of this kind of electrodes.

To solve this handicap, an integration concept of calibration and quantitative determination previously proposed [20] has been adapted to this analysis when the new detectors were used since zero was present in the confidence interval of the intercept (see Table 2). The analytical injection protocol used in this work to integrate the analysis of the samples and the calibration (control of quality) was as follows: the vitamin sample is electrokinetically loaded from one reservoir for 5 s and sequentially a standard mixture is electrokinetically loaded from the another reservoir to obtain a calibration factor (defined as signal/concentration standard) with quality control purposes (see Fig. 4A).

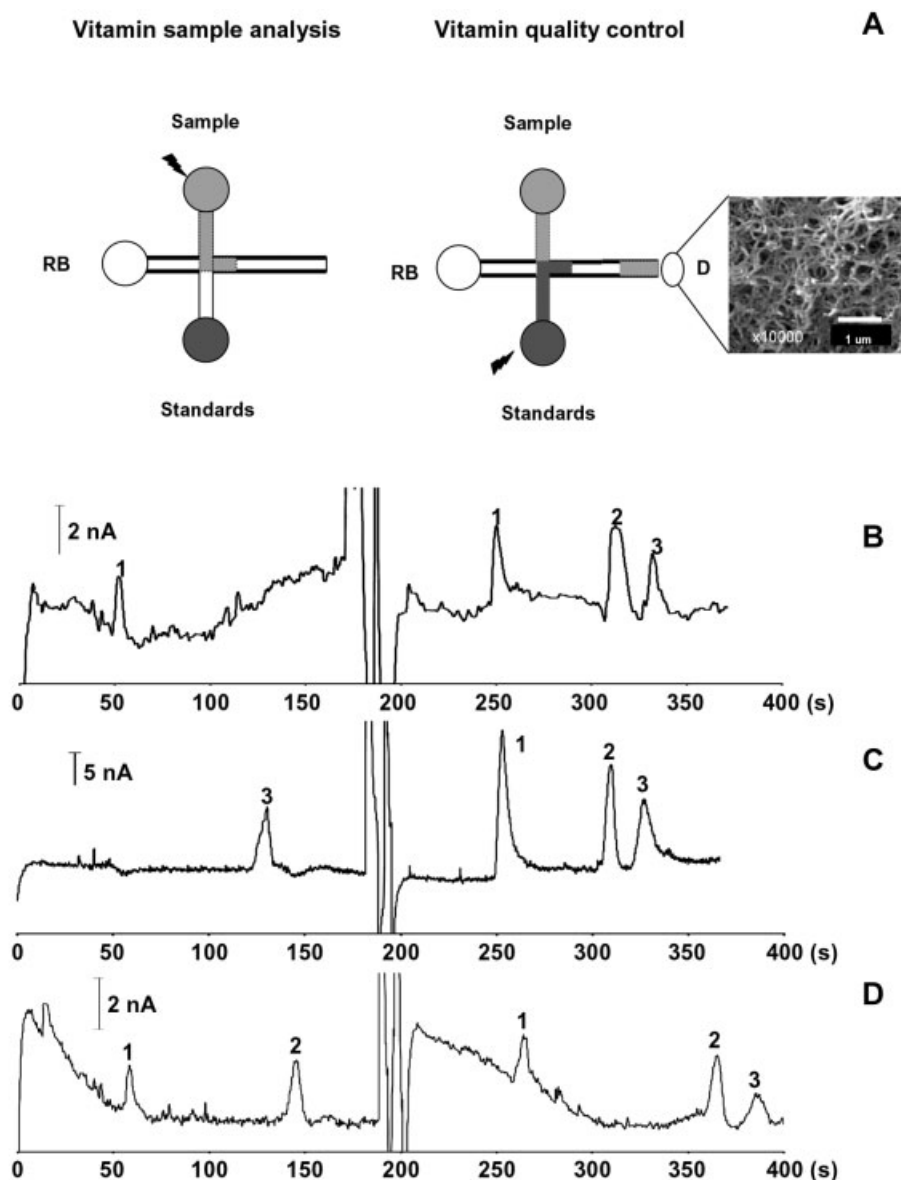


Figure 4. Integration of both analysis and calibration for some pharmaceuticals: design of strategy with photograph of MWCNTs as detectors ($\times 10\,000$) (A). Analysis of supplements: Hidrosil (B), Aspol (C), and Becozyme (D). Peaks: (1) pyridoxine, (2) ascorbic acid, and (3) folic acid. Conditions as in Fig. 3.

It is important to point out that one of the advantages of the integration of calibration is that it can be designed involving just the analytes present in the sample at the desired concentration level (vitamin concentrations equal to those expected in the supplement sample in order to decrease the interpolation error are highly recommended). This fact occurs very often in pharmaceutical formulations where the level of concentrations is quite different since the level required for health function is also very different.

To demonstrate the reliability of the CNTs as a new miniaturized detectors approach, four target vitamin samples were strategically chosen to show the power of CNTs in the analysis of the pharmaceutical formulations.

Figure 4 shows clearly the integration concept on microchip layout (A) as well as the electropherograms

obtained for three formulations (B–D) containing pyridoxine, folic acid, and a mixture of pyridoxine and vitamin C when the analysis of formulation was performed firstly (using one reservoir of the microchip) and sequentially, a designed mixture of vitamin standards was separated as quality control (using the other one reservoir of the microchip). All analyses were performed in less than 400 s. In Fig. 3D, an increase in the migration time of the analytes was observed due to the presence of the salts in the pharmaceutical formulation. Table 3 lists the quantitative levels obtained using integrated calibration compared with the reference value declared by a manufacturer as well as the recovery reached. Excellent recoveries (ranging from 91 to 97 meaning inversely low systematic errors ranging between 3 and 9%) were obtained in all cases examined;

Table 3. Accuracy of the method using disposable CNT detectors

Formulation	Analyte	Obtained value (per unit)	Real value (per unit)	Recovery (%)
Hidrosil	Pyridoxine	230 mg	250 mg	92
Vitafardi	Ascorbic acid	0.93 g	1 g	93
Aspol	Folic acid	9.5 mg	10 mg	95
Becozyme	Pyridoxine	9.7 mg	10 mg	97
	Ascorbic acid	182 mg	200 mg	91

being of particular attention the low error obtained in the simultaneous determination of both pyridoxine (B6) and vitamin C in a formulation where their relative concentrations were very different.

4 Concluding remarks

Modified SPE-CNTs have become the best approach since their improvement of sensitivity and lowered LODs with the advantages of easy surface modification, inherent miniaturization, and disposability. An excellent reliability in the quality control analysis has been obtained with an excellent accuracy in terms of real recoveries (low systematic error). In consequence, we understand that electrokinetic's platform and in particular CE microchips are soon going to become one of the best choices in the miniaturization scene. The new generation of analytical microsystems in our labs should take into account these high-maturity products involving microfluidics and analytical nanotechnology such as CE microchips with CNTs integrated.

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. A. G. C. acknowledges the fellowship received from Spanish Ministry of Education and Science. M. P. is grateful to the Japanese Ministry for Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) for funding through ICYS program. The authors gratefully acknowledge Scanning Electronic Microscopy services from University of Alcalá.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Whitesides, G. W., *Nature* 2006, 442, 368–373.
- [2] Janasek, D., Franzke, J., Manz, A., *Nature* 2006, 442, 374–380.
- [3] Haeblerle, S., Zengerle, Z., *Lab Chip* 2007, 7, 1094–1110.
- [4] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887–3908.
- [5] Schwarz, M. A., Hauser, P. C., *Lab Chip* 2001, 1, 1–6.
- [6] Wang, J., *Electroanalysis* 2005, 17, 1133–1140.
- [7] Pumera, M., Merkoçi, A., Alegret, S., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 219–235.
- [8] Ajayan, P. M., *Chem. Rev.* 1999, 99, 1787–1799.
- [9] Trojanowicz, M., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 480–489.
- [10] Iijima, S., *Nature* 1991, 354, 56–58.
- [11] Oberlin, A., Endo, M., Koyama, T., *J. Cryst. Growth* 1976, 32, 335–349.
- [12] Iijima, S., Ichihashi, T., *Nature* 1993, 363, 603–605.
- [13] Bethune, D. S., Kiang, C. H., De Vries, M. S., Gorman, G. *et al.*, *Nature* 1993, 363, 605–607.
- [14] Wang, J., *Analyst* 2005, 130, 421–426.
- [15] Merkoçi, A., Pumera, M., Llopis, X., Pérez, B. *et al.*, *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 826–838.
- [16] Banks, C. E., Compton, R. G., *Analyst* 2006, 131, 15–21.
- [17] Escarpa, A., González, M. C., Crevillén, A. G., Blasco, A. J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1002–1011.
- [18] Crevillén, A. G., Ávila, M., Pumera, M., González, M. C., Escarpa, A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 7408–7415.
- [19] Chen, G., *Talanta* 2007, 74, 326–332.
- [20] Crevillén, A. G., Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 5110–5118.
- [21] Kordas, K., Mustonen, T., Toth, G., Jantunen, H. *et al.*, *Small* 2006, 2, 1021–1025.
- [22] Pumera, M., Šmíd, B., Peng, X.-S., Golberg, D. *et al.*, *Chem. Eur. J.* 2007, 13, 7644–7649.
- [23] Pumera, M., *Langmuir* 2007, 23, 6453–6458.
- [24] Cabanis, G. E., Diamantis, A. A., Murphy, Jr., W. R., Linton, R. W., Meyer, T. J., *J. Am. Chem. Soc.* 1985, 107, 1845–1853.
- [25] Chou, A., Böcking, T., Singh, N. K., Gooding, J. J., *Chem. Commun.* 2005, 842–844.
- [26] Hernández, S. R., Ribero, G. G., Goicoechea, H. C., *Talanta* 2003, 61, 743–753.
- [27] Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B. S., Chattopadhyay, S., Mukherjee, T., *Free Radic. Biol. Med.* 2001, 30, 1390–1399.
- [28] Pumera, M., Merkoçi, A., Alegret, S., *Electrophoresis* 2007, 28, 1274–1280.
- [29] Pumera, M., Merkoçi, A., Alegret, S., *Electrophoresis* 2006, 27, 5068–5072.

Towards lab-on-a-chip approaches in real analytical domains based on microfluidic chips/electrochemical multi-walled carbon nanotube platforms

Agustín G. Crevillén,^a Martin Pumera,^b María Cristina González^a and Alberto Escarpa^{*a}

Received 12th June 2008, Accepted 23rd September 2008

First published as an Advance Article on the web 31st October 2008

DOI: 10.1039/b809963d

“Lab-on-a-chip” approaches based on the novel marriage between an electrokinetic microfluidic platform and nanotechnology is proposed for analytical domains. Conceptually, the analytical challenges are linked with the analytical promises offered from the integration of lab-on-a-chip and nanotechnologies. The analytical suitability of the electrokinetic microfluidic platform with multi-walled carbon nanotubes as detectors is proposed based on its dual format/use as a flow and separation system, independently. Two relevant applications of high significance, determination of total isoflavones and fast detection of antioxidant profiles were chosen to demonstrate their analytical potential. For both analytical uses, the target challenges, the strategy proposed, the expected role of microfluidics and carbon nanotubes and future prospects are discussed and demonstrated. A good analytical performance of the proposed microfluidic platform in terms of reliability, versatility and fast analytical solutions is demonstrated.

Introduction

The ability to perform laboratory operations on a small scale using miniaturized devices is very appealing. These aspects have been joined under the micro-TAS^{1,2} or “lab-on-a-chip” terms.^{3,4} *Microfluidics* exploits both characteristics: small size and less obvious characteristics of fluids in microchannels. Small volumes reduce the time taken to analyse a product; the unique behaviour of liquids at the microscale allows greater control of molecular concentrations and interactions; and reagent costs and the amount of chemical waste can be greatly reduced.

With independence of the terminology used, micro-TAS, microfluidic system or lab-on-a-chip, all of them must have a series of generic components: a method of introducing reagents and samples; methods for moving these fluids around on the platform, and for combining and mixing them; and a detector system. This drives to the integration concept.^{4,5} Thus, it should be possible to combine components or subsystems from different developers/suppliers into one microsystem, where the natural tendency exists to look for monolithic integration.

An analytical classification of microsystems has been proposed,⁶ and very recently an excellent review proposing a classification of microfluidics for lab-on-a-chip applications has been published⁷ and their use in real domains is highly demanded. Fluidic pumping by hydrodynamic and electrokinetic forces are among the most common approaches. The electrokinetic platform is the most used because EOF benefits lab-on-a-chip devices in three ways.⁸ Firstly, EOF generates an essential

flat velocity profile, as compared to the parabolic profile from pressure-driven flow. This results in less band broadening and hence an increase in separation efficiency. Secondly, the flow in multiple channels on a microchip can be easily controlled with a few electrodes. This further simplifies the apparatus by eliminating valves and pumps (dead volumes are zero and band broadening is reduced, yielding better pumping and separation efficiency). Thirdly, scaling down the size of electrophoresis channels yields both a reduction in analysis time and an increase in separation efficiency.

Detection in lab-on-a-chip devices is a subject of paramount importance. Its development is intrinsically linked to the birth of the micro-TAS concept since the early 90s.⁹ Indeed, detection has been one of the main challenges for analytical microsystems, since very sensitive techniques are needed as a consequence of the ultra-small sample volumes used in micron-sized environments. In principle, a wide variety of detection alternatives can be used in *analytical microsystems*, which can be categorized into optical and electrochemical detections, mass spectrometry and other unconventional detection schemes. However, laser-induced fluorescence and electrochemical detection (ED), primarily, are the routes most commonly used. While laser-induced fluorescence (LIF) was the original detection technique and it is the most often used detection scheme in microsystems because of its inherent sensitivity,^{10–13} electrochemical detection is a valuable alternative because of its inherent miniaturization without loss of performance and its high compatibility with microfabrication techniques.^{14–17}

On the other hand, nanotechnology offers valuable tools for *microfluidics*. Indeed, analytical nanotechnology is the natural alternative in respect to well known *microfluidic* challenges such as selectivity (peak capacity) and sensitivity, as we have mentioned above. The new generation of lab-on-a-chip devices should take into account nanotechnology tools integrated in its architecture. Apart from its high sensitivity and inherent

^aDepartment of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Chemistry, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, 28871, Spain. E-mail: alberto.escarpa@uah.es; Fax: +34918854971; Tel: +34918854995

^bBiomaterial Systems Group, Biomaterials Center and International Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Material Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki, Japan

miniaturization, another added functionality of electrochemical detection is the opened opportunity to modify these surfaces suitably with nanomaterials to break frontiers in new applications. An excellent example of this is carbon nanotubes (CNTs).^{18,19} CNTs are a new group of nanomaterial with unique geometrical, mechanical, electronic and chemical properties which offers notably favorable possibilities involving the large active surface at electrodes of small dimensions, the enhancement of electronic transfer and strong sorption capacity.^{20–24} These properties have a clear influence on their analytical sensitivity which is enhanced by the use of these nanomaterials. There are two main types of carbon nanotubes that can have high structural perfection: single-walled nanotubes (SWCNT) which consist of a single graphite sheet seamlessly wrapped into a cylindrical tube, and multi-walled nanotubes (MWCNT) which comprise of an array of such nanotubes that are concentrically nested like rings of a tree trunk.^{25–27}

The *microfluidic* literature is vast and rapidly expanding with emerging applications to real samples. Extracting out examples of real sample analysis from the body of papers in this area is a demanding task. In addition, a development of applications for a new technology is always a confirmation that the technology is maturing. The ability to efficiently process raw samples (from the laboratory, the body or the field) and subsequently perform the required analytical operations “on chip” will be key in defining the eventual success and an application of *microfluidic* systems. Although the volume of research in this area is impressive, real sample analysis is still in its infancy and constitutes one of the major challenges of *microfluidics*. Our research group recently has discussed the state of the art of the role of *microfluidics* in real samples.²⁸ However, after the first publication of microchips with CNTs using standards,¹⁸ the use of nanotechnology in microfluidic devices dealing directly with real samples has been only occasional.²⁹

As a consequence, from the combination of lab-on-a-chip and nanotechnologies, new advances in synergic ways are highly expected in the real analytical domains. In this work, the analytical potency of microfluidic chips with multi-walled carbon nanotubes as electrochemical detectors, in two analytical formats—flow injection and separation electrokinetic driven systems—using real samples is deeply explored in order to advance towards true labs-on-a-chip. Accordingly with “fitness-to-purpose” two applications of high significance have been chosen to demonstrate the suitability of the electrokinetic’s platform integrating nanoelectrochemical detectors (see Fig. 1): the determination of total isoflavones and the fast detection of the major natural antioxidants where microfluidic chips were used as flow injection and separation formats, respectively. In both cases, the significance of these analytes have been widely documented.^{30,31}

Materials and methods

Materials and standards

Genistein, arbutin, phloridzin, (+)-catechin, rutin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and ascorbic acid from Fluka Chemie (Buchs, UK).

A secondary standard reference and well documented in the Drug Master File (SW/1211/03) was used as reference material

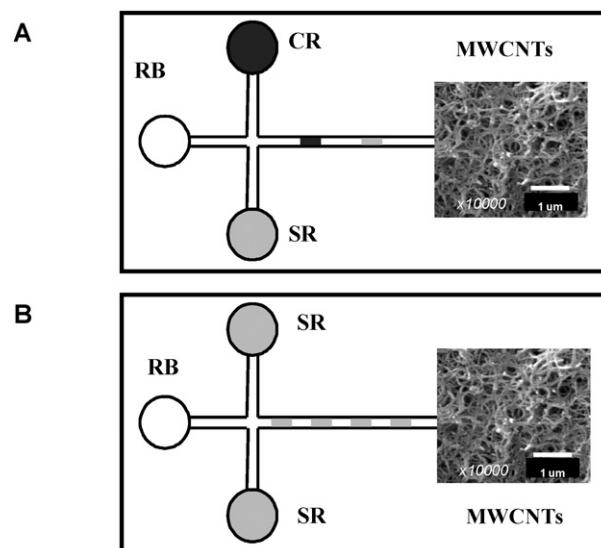


Fig. 1 Dual format of microfluidics with carbon nanotubes detectors for analytical domains. A Flow injection format for isoflavones determination (RB running buffer, CR calibration reservoir, SR, sample reservoir). Separation format for fast detection of antioxidants (RB, running buffer reservoir, SR, sample reservoirs).

(confidential, property of Exxentia) for analysis of isoflavones. In addition, three reference standards of isoflavones with different compositions were supplied by the same company (Exxentia). Apples (Granny Smith and Golden variety) and pears (Conference and blanquilla variety) were purchased in local markets (Madrid, Spain).

MWCNT-200 (product no. 636630; length, 0.5–200 μm; od, 30–50 nm, wall thickness, 12–18 nm, CVD method produced) was purchased from Aldrich. Further purification of carbon material was accomplished by stirring the CNT in 2 M nitric acid (Panreac, Spain) at 80 °C for 24 h.²⁹ A 1 mg of carbon material was dissolved in 1 mL of dimethyl formamide (DMF, from Sigma-Aldrich).

All chemicals used in buffer preparation and in supporting electrolytes were reagent grade. Methanol and ethanol absolute was acquired from Panreac (Barcelona, Spain). In all cases, high-quality water, purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), was used.

Apparatus and electrodes

The adapted CE-ED microsystem was previously reported and described elsewhere.^{29,32} The glass chip was fabricated by Micralyne (Model MC-BF4-001, Edmond, Canada) and consisted of a glass plate (88 mm × 16 mm) with a four-way injection cross, a 74 mm-long separation channel, and side arms measuring 5 mm long. The amperometric detector (end-channel detection) consisted of an Ag/AgCl wire as a reference electrode, a platinum wire as a counter electrode, and a carbon thick-film screen-printed electrode (SPE) (0.3 × 2.5 mm) as a working electrode. The working electrode was modified by casting 2 μL of DMF containing 1 mg/mL carbon material and allowing to be dried at room temperature for 12 h.

Amperometric detection was performed using a Potentiostat Autolab PGSTAT12 from Eco Chemie. The high-voltage power

supply (from Glassman High Voltage Inc.) had an adjustable voltage range between 0 and +5000 V.

Procedures

Standards. All stock solutions of standards were dissolved in methanol and then stored at -20°C , except genistein which was dissolved in ethanol. Working solutions for the studies were appropriately diluted in the electrophoresis buffer, well protected from light and used within 24 h after preparation.

Sample preparation. Apples and pears were peeled in order to separate pulp and peel. Ten grams of each one were extracted, separately, with 10 mL of methanol for 1 h, 10 mL for 30 min and then 5 mL for 30 min. The three extracts were combined giving a final volume of 25 mL. Samples were centrifuged at 13706 g for 10 min.³³

For secondary standard 'reference material' and the rest of standards of isoflavones, a certain amount was weighted to contain approximately 2 mM total isoflavones. A 20 mL volume of ethanol was added to the sample and was sonicated for 30 min. Samples were centrifuged for 10 min at 2000 g in order to eliminate insoluble matter.³⁴

All samples were protected from the light and used within 24 h after preparation.

Electrophoretic procedure. The channels of the glass microchip were treated before use and between groups of runs by rinsing them with 0.1 M NaOH and deionised water for 15 min each. This procedure was carefully monitored to obtain reproducible results. The optimum electrophoresis buffer consisted of 50 mM borate buffer (pH = 9) for polyphenols and 10 mM borate buffer

(pH = 8) for isoflavones. The running buffer and sample reservoirs were filled with respective solution. The detection reservoir was filled with a 1M HNO_3 solution.³⁵ A voltage of 2000 V was applied for 5 min to the buffer reservoir to fill the separation channel while the detection reservoir was grounded and the others were floating. This process was performed to each sample reservoir for 20 s to facilitate filling the injection channel (between the separation channel and the sample reservoir), then the voltage was applied for 5 min to the running buffer reservoir to eliminate the remains of the previously introduced samples from the separation channel.

Amperometric detection. A detection voltage of +1.2 V was applied to the working electrode for isoflavone analysis and +1.0 V for polyphenols. All experiments were performed at room temperature.

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

Results and discussion

Microfluidic chips/electrochemical multi-walled carbon nanotube platforms as a flow injection system: analytical determination of total isoflavones

The first exploration about the behaviour of MWCNTs as detectors of electrokinetic microfluidic platforms with analytical purposes was its use as a flow injection system to determinate fast and accurate total isoflavones determination.

It is important to underline that electrokinetic microfluidic platform should be understood as an ideal platform for

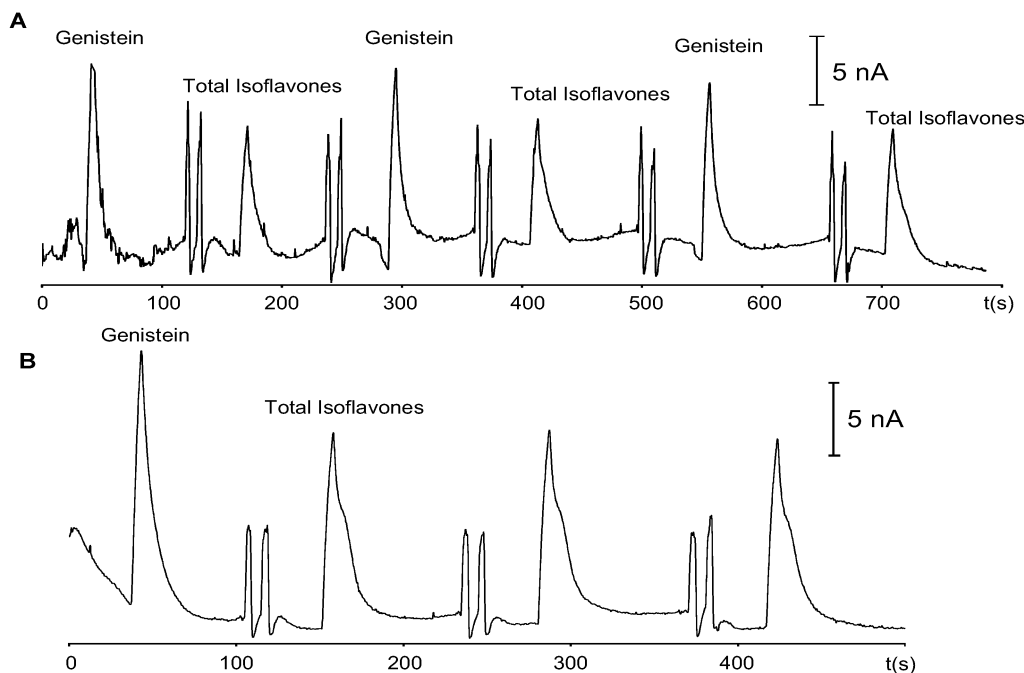


Fig. 2 EMP-MWCNTs as flow injection system: operation working modes for integration of genistein calibration and determination of total isoflavones. Mode A: injection of genistein standard and sequential injection of total isoflavones in alternative cycles. Mode B: injection of genistein standard and performing three repetitive injections corresponding to the total isoflavones.

Table 1 Operational modes on electrokinetic microfluidic platforms (EMP) with MWCNT for total isoflavone determination

Mode A. Repetitive and sequential cycles of genistein calibration and total isoflavones determination									
Genistein calibration					Total isoflavones peak determination				
tm ± s (s)	RSD (%)	Area (nC)	RSD (%)	N	RSD (%)	tm ± s (s)	RSD (%)	Area (nC)	RSD (%)
44.2 ± 0.5	1	107 ± 4	4	210	≤12 ^a ≤20 ^b	37.6 ± 0.6	2	102 ± 2	2

Mode B. Genistein calibration and repetitive total isoflavones determination										
Genistein ^c calibration					Total isoflavones peak determination					
tm ± s (s)	RSD (%)	Area (nC)	RSD (%)	N		tm ± s (s)	RSD (%)	Area (nC)	RSD (%)	N
40 ± 3	7	171 ± 8	5	113	37.1 ± 0.9	2	107 ± 2	2		50

^a Reproducibility for calibration factor (intra-electrode). ^b Reproducibility for calibration factor (inter-electrodes). ^c Reproducibility (data obtained in different days).

Table 2 Figures of merit for genistein

Analyte	Lineal range (µg mL ⁻¹)	a ± tS _a ^a (nC)	b ± tS _b ¹ (nC ⁻¹ µg ⁻¹ mL)	R ^b	LOD ² (ng/ml)
Genistein	0.3–15	3.3 ± 9.8	22 ± 1	0.999	4 ^b

^a Confidence intervals (α = 0.05). ^b Estimated with experimental noise S/N = 3.

performing microscale voltammetric analysis. The concept deals with the introduction of voltammetric protocols as detection/electrochemical characterization after pumping the analyte using the microfluidic chips as “injection/sample preparation/liquid manipulation system” because it allows the use of ultra-small detection volumes. This approach is advantageous over nanovoltammetry, which lacks the sample preparation, liquid-handling, and fluid control or manipulation capabilities.³⁶

On the other hand, isoflavonoids form a very important group of compounds that possess various health-promoting functions and form a group that occurs naturally in soybeans (*Glycine max*). These compounds are very unique because they are considered natural active ingredients. The major active

components in soybeans are isoflavones, such as genistein and daidzein and their related glycosides genistin and daidzin. In the determination of isoflavones, the differentiation of their possible forms seem to be sometimes irrelevant because the physiological effects are due to the aglycone form and all isoflavone forms are hydrolyzed in the body to aglycones and absorbed in the human gastro-intestinal tract. Therefore, a total amount of isoflavones could provide sufficient information in food-drug quality control of market production.³⁷ As a consequence; the analytical route proposed should avoid the ionization/separation of the large number of structures which can constitute the final sample. An optimized fast electrokinetic pumping with amperometric detection (borate buffer pH 8 10 mM, 2 kV, +1.0 V) was used.³⁴

Table 3 Analytical reliability of electrokinetic microfluidic platforms (EMP) with MWCNT in the determination of total isoflavones

Sample	Composition (% _{w/w}) (declared by Exxentia)	Obtained value (% _{w/w})	RSD (%)	Reference value (% _{w/w})	Error (%)
1	Confidential	44.2 ± 1.0	2	45.8	3
2	Daidzin (12.5) Genistin (29.2) Daidzein (0.2) Genistein (0.5) Glicitin (1.6) Glicitein (0.2)	41.5 ± 1.6	4	44.2	6
3	Daidzin (3.1) Genistin (2.8) Daidzein (17.6) Genistein (18.5)	41.5 ± 1.7	4	42.0	1
4 (Dietary supplement)	Daidzin/Daidzein (5.3) ^a Genistin/Genistein (24.0) ^a Glicitin/Glicitein (0.7) ^a	28.1 ± 0.7 (mg/tablet)	2	30 (mg/tablet)	6

^a mg of isoflavones per tablet.

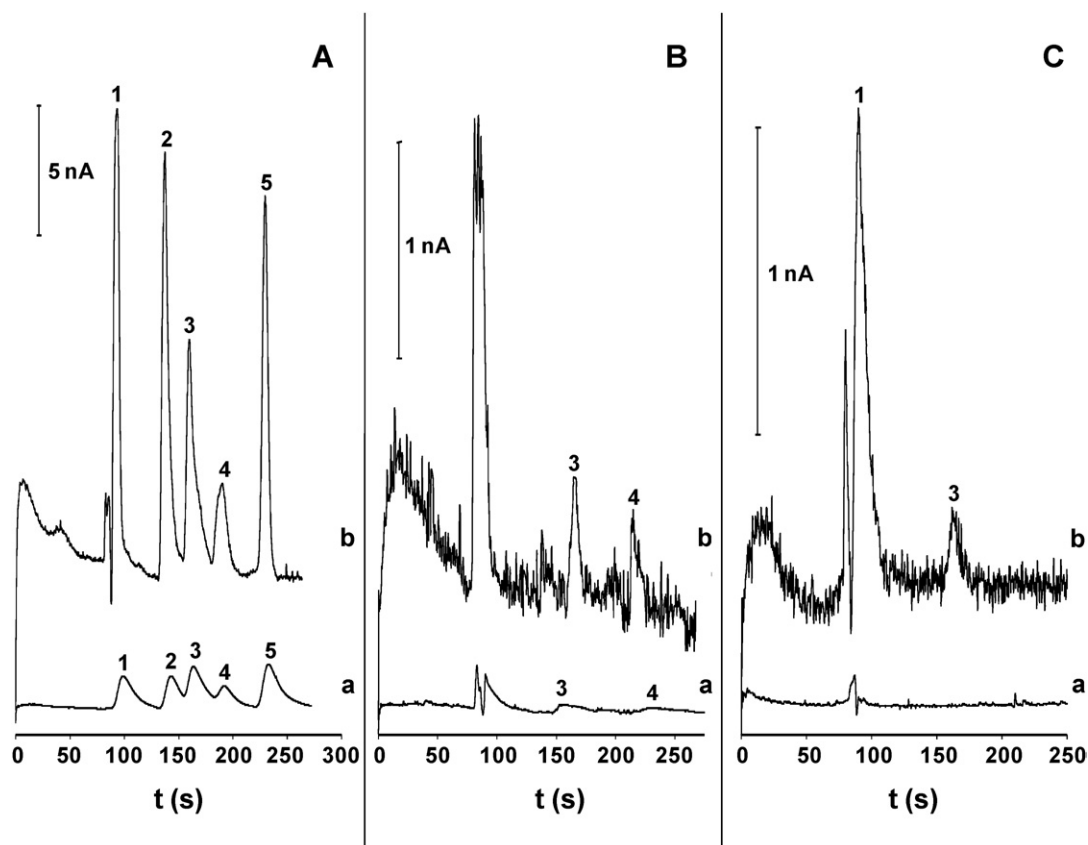


Fig. 3 EMP-MWCNTs as separation system (I): Analytical potential of MWCNTs in detection of antioxidants (A) Standards of five antioxidants. (B) Golden variety: (a) SPE bare, (b) SPE-MWCNT. (C) Blanquilla variety: (a) SPE bare, (b) SPE-MWCNT. Peaks: (1) arbutin, (2) phloridzin, (3) (+)-catechin and (4) rutin and (5) ascorbic acid.

In this paper, two working operation modes on the platform using always a reservoir for calibration (genistein determination) and the other reservoir for sample analysis (total isoflavones determination) are proposed: (i) injection of genistein (less than 100s) and sequential determination of total isoflavones (less than 100s) in alternative cycles (three cycles in less than 100s) (Fig. 2, mode A) and (ii) injection of genistein and then performing three repetitive injections corresponding to the determination of total isoflavones (Fig. 2, mode B). For both operational modes, Table 1 lists the relevant data about their performance. With independence of the operational mode used, migration time repeatability ($RSDs \leq 2\%$) and reproducibility ($RSDs \leq 7\%$) were acceptable and peak area repeatability ($RSDs \leq 4\%$) and reproducibility ($RSDs \leq 5\%$) were also very good. These data indicated the stability of EOF and the possibility of performing a quantitative analysis due to the excellent precision obtained for migration times and peak areas, respectively. In both modes, a matrix effect was noticed towards the reproducible decreasing of migration time and number of plates when real total isoflavones were determined. Indeed, a wide number of chemical structures could contribute to the width of the peak observing a decrease of efficiency in comparison with the number of plates obtained for genistein standard. The decrease of the number of plates for total isoflavone peaks was higher in the second operational mode. Another interesting reading of these reproducibility data is the

Table 4 Improvement of selectivity using MWCNTs electrochemical detectors

Analyte	SPE		SPE-MWCNTS	
	N	Rs	N	Rs
Arbutin	202	1.77	1485	4.40
Phloridzin	510	0.78	2802	2.11
(+)-Catechin	508	0.98	3159	2.04
Rutin	654	1.45	1769	2.84
Ascorbic acid	1191		8810	

high stability of the MWCNT films which could allow use in control analysis.

To demonstrate the analytical reliability of the electrokinetic platform in integrating these novel materials (MWCNTs) three reference materials (obtained from Exxentia) of total isoflavones (TI) with different isoflavone composition were analyzed using the operation mode A previously discussed (see Fig. 2A). External calibration was performed using genistein as isoflavone standard. The figures of merit are listed in Table 2. As observed, the intercept was statistically zero and as a consequence the external calibration and quantitation was simplified using just a calibration factor (f) defined as $f_{\text{calibration}} = \text{Signal}_{\text{genistein peak}} / [\text{genistein}]$. Sequentially, the same amount of real sample was injected from the TI reservoir and a new signal was obtained

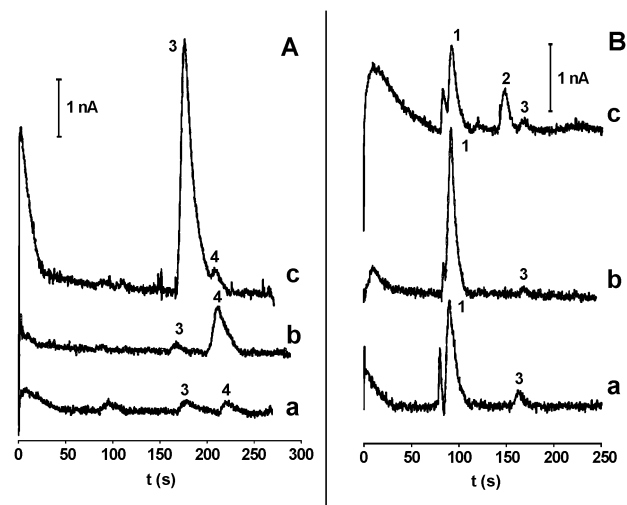


Fig. 4 EMP-MWCNTs as separation system (II): Identification of the finger print antioxidants in apples (A) Granny Smith variety: (a) pure extract, (b) extract spiked with 50 ppm of rutin, (c) extract spiked with 25 ppm of (+)-catechin. Identification of the finger print antioxidants in pears (B) Blanquilla variety: (a) pure extract, (b) extract spiked with 5 ppm of arbutin, (c) extract spiked with 10 ppm of phloridzin. Peaks: (1) arbutin, (2) phloridzin, (3) (+)-catechin and (4) rutin.

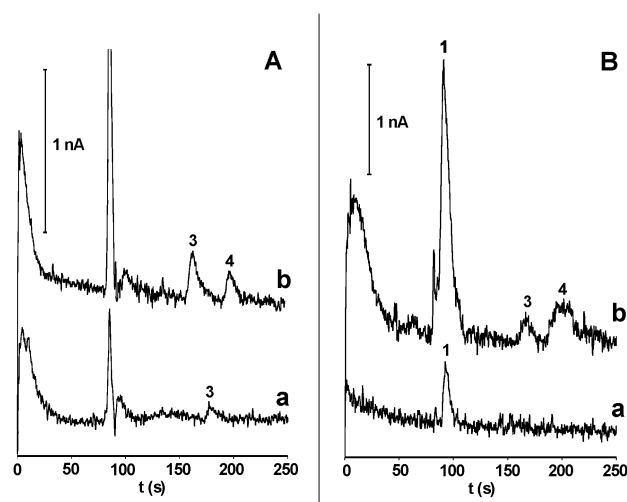


Fig. 5 EMP-MWCNTs as separation system (III): Identification of the finger print antioxidants in peels and pulps. (A) Granny Smith variety: (a) pulp, (b) peel. (B) Conference variety: (a) pulp, (b) peel. Peaks: (1) arbutin, (3) (+)-catechin and (4) rutin.

Table 5 Figures of merit for the antioxidants studied

Analyte	Lineal range ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	a \pm tS_a^a (nA)	b \pm tS_b^1 ($\text{nA}^{-1}\mu\text{g}^{-1}\text{mL}$)	R^b	LOD ² ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Arbutin	5–100	1.2 ± 2.0	0.28 ± 0.04	0.994	0.5
Phloridzin	10–150	-0.1 ± 2.5	0.12 ± 0.03	0.990	1.2
Catechin	5–100	0.6 ± 1.6	0.25 ± 0.03	0.995	0.6
Rutin	25–200	-0.01 ± 0.09	0.02 ± 0.01	0.999	7.1
Ascorbic acid	25–200	0.2 ± 2.5	0.07 ± 0.02	0.990	2.0

^a Confidence intervals ($\alpha = 0.05$). ^b Estimated with experimental noise $S/N = 3$.

which corresponded to all isoflavones from each standard (signal total isoflavone peak).

Since the calibration factor is a constant of the analysis, the concentration of total isoflavones (TI) in the samples is calculated only as genistein equivalents, as $\text{TI} = S_{\text{total isoflavonoid peak}} / f_{\text{calibration}}$. This calibration factor was determined for every analysis. The reproducibility of the calibration factors obtained following the integration concept was studied in depth using the same electrode and different electrodes. The RSD obtained for intra-electrode assays ($n = 5$) was less than 12% and for inter-electrode assays ($n = 3$) was less than 20% indicating an acceptable reproducibility in the modification of these electrodes. This data also revealed the reproducibility/stability of the different modifications carried out and the behaviour of these electrodes as disposable detectors and enhancing the versatility of the platform.

For each reference material assayed, Table 3 shows the precision and accuracy obtained using our lab-on-a-chip approach as well as the data provided by Exxentia using a validated HPLC method. A very good precision with values of RSDs less than 4% and an excellent accuracy with low systematic errors were obtained independent of the individual isoflavone composition. Also, a very good precision and accuracy were obtained during the analysis of total isoflavones in a dietary supplement with values obtained very close to those declared by the manufacturer (sample number 4).

Because analytical accuracy is a supreme analytical feature, these data are very valuable since they reveal that high accuracy values were obtained in these analytical determinations when MWCNTs were used. Also, these results also revealed the suitability of the “total isoflavonoids” concept since in the materials examined a large number of different structures were confined. It opened a new gate to use microfluidic chips in the quality control of soy-derived products for pharmaceutical and food industries.

Microfluidic chips/electrochemical multi-walled carbon nanotube platforms as separation systems: fast discrimination of antioxidant profiles

The second approach of the electrokinetic platform integrating carbon nanotubes with analytical purposes was its use as a separation system where the analysis of complex extracts in regard to the antioxidant composition was chosen as an example of high impact in food/pharmaceutical industry.

Natural antioxidants are constituted mainly by polyphenolic compounds (including mainly chalcones, flavan-3-ols, flavonols) and ascorbic acid and they are among the most important

compounds in food science since they exhibit anti-carcinogenic properties. The analytical chemistry of polyphenols is very complex because of the difficulty in extracting them from matrices, the large variety of structures or compounds and the low concentration in food matrix.³⁰

Microfluidics inherently offer fast separations but sensitivity is a challenge due to the small sample volumes used and, in addition, sometimes the peak capacity is decreased in comparison to conventional schemes. Conceptually speaking, carbon nanotubes offer a valuable alternative because of the excellent electron transfer kinetic showed by MWCNT,^{20,23} as a consequence improving sensitivity and resolution of the analysis.³⁸

In contrast with the conditions used for isoflavone determination (where no separation of individual isoflavones are required), here borate buffer was used to control the extent of the ionization in order to obtain antioxidant separation. Under optimized conditions (borate pH 9, 50 mM), up to five natural antioxidants (arbutin, phloridzin, (+)-catechin, rutin and ascorbic acid) were separated in less than 250 s (Fig. 3A). Table 4 lists the improvement of selectivity using MWCNTs towards the increasing of the number of plates and resolution. The number of plates was increased seven times for arbutin and ascorbic acid. Moreover, the use of MWCNT was critical for the separation of these compounds. While peak resolution values below 1 (not acceptable for quantification) were obtained for some couples of analytes using bare SPE, resolution values close to 2 were achieved using SPE-MWCNT (see Table 4). This result opens an interesting area for microfluidic electrokinetic separations because only modifying the detector is possible to increase the peak capacity and amplify the number of applications for these kinds of microsystems.

To demonstrate the suitability of the EMP-MWCNTs complex fruit extracts were analyzed. The analytical strategy was based on the identification of finger print antioxidants: arbutin (typical of pear and not present in apples) and phlorizin (typical of apples and not present in pears) as well as the unequivocal presence of rutin in peels matrix and its non identification in pulps ones. The relevant electrophoretic profiles showing the power of these labs-on-a-chips are shown in Fig. 3(B–C)–5.

Firstly, the valuable analytical potential of nanotubes was observed during real analysis since the antioxidant detection was observed only when carbon nanotubes were used as it is shown in Fig. 3 in both apples (B) and pears (C). Indeed, while using CNTs detectors (+)-catechin and rutin were detected in apple and arbutin and (+)-catechin in pears with multi-walled carbon nanotubes, no detection of antioxidants was noticed when bare detectors were used.

Secondly, Fig. 4 shows the identification of the finger print antioxidants for fruits, apples and pears. Peak identification was performed by spiking in the samples with the corresponding standard because the identification by comparison with the migration time of standards was not easy (possible variations in migration time by changes in ionic strength and pH). When the apple peel (Granny Smith) was spiked with rutin (see Fig. 4A (b)) and (+)-catechin (see Fig. 4A (c)), both peaks increased so they can be labelled as (+)-catechin (3) and rutin (4). The electropherogram of a pear peel is showed in Fig. 4B (a) and two peaks can be seen. The sample was spiked with arbutin and the first peak was increased (see Fig. 4B (b)). Since arbutin is

Table 6 Summary of analytical features and merits of the electrokinetic platform integrating multi-walled carbon nanotube detectors

Analytical format/ <i>strategy</i>	Analytes	Analytical application	Analytical challenge	Why microfluidics	Why MWCNTs	Future prospects
Flow injection system (<i>avoiding ionization, no analyte separation</i>)	Genistein Daidzein Genistein Daidzin Others	Evaluation of quality of soy-derived products	Fast and accurate determination of total isoflavones	Ultra fast determinations with calibration integrated using standard microfluidic chips	To investigate the accuracy of the analytical methods using these novel surfaces	Multiplexing-array nanotubes with calibration integrated.
Separation system (<i>allowing ionization, analyte separation</i>)	Arbutin Phloridzin (+)-catechin Rutin Ascorbic acid	Fast evaluation of adulterations and antioxidant capacity of foods	Sensitivity and peak capacity (resolution of peaks as many as possible in real samples)	Fast discrimination of antioxidant/adulteration profiles	Improving sensitivity and resolution in complex samples	Multiplexing-array nanotubes for multiple antioxidant activity measurements

a polyphenolic finger print marker of pears, we could determine with this method if a food sample contains pear or not. Another polyphenolic finger print marker is phloridzin (for apples) but it was not possible to detect it in any apple samples because it is in a very low concentration. For determining phloridzin, a pear peel sample was spiked with this compound (see Fig. 4B (c)). The added phloridzin (2) was detected and well-separated from (+)-catechin (3) and arbutin (1) peaks so it was able to determine simultaneously two finger prints (phloridzin and arbutin) in a real sample. In summary, the developed method could distinguish between pear-composed and apple-composed foodstuffs. Thirdly, Fig. 5 shows the analysis of pulp and peel from apple (Granny Smith variety) and pear (Conference variety) towards the detection of finger print antioxidants of each matrix. Rutin is only present in peel fruits so its identification is an unequivocal probe about peel origin of any sample. In the analysis of both fruits, apple (Fig. 5A) and pear (Fig. 5B), rutin (peak 4) were detected in the peel (Fig. 5A, B (b)) but not in the pulp (Fig. 5A, B (a)) as it was expected. Moreover, the intensity of peaks is lower in pulp than in peel because the polyphenolic content in fruits is always higher in peel than in pulp.³⁹ It is clearly demonstrated that this method can also discriminate between pulp and peel in both qualitative and quantitative composition.

MWCNTs films also showed a high stability during the analysis of the extracts where several analytes were systematically separated and oxidized at these surfaces. Migration time repeatability (RSDs \leq 3%) and reproducibility inter-electrodes (RSDs \leq 6%) were very acceptable and peak area repeatability (RSDs \leq 10%) and reproducibility inter-electrodes (RSD ranged between 12–26%) also indicated a very acceptable reproducibility. External calibration protocol was performed and Table 5 lists the figures of merit obtained for each antioxidant studied. A well defined concentration dependence with good correlation coefficients was obtained in all cases. In addition, different sensitivities and suitable LODs for quantitation were obtained for the different antioxidants assayed.

Although, accuracy was not essential since the levels of these antioxidants are very different and no reference values are available, recoveries were very acceptable with values ranging between 70 to 120% for all antioxidants.

Conclusion

Table 6 summarizes the analytical features and merits of the standard electrokinetic microfluidic platform integrating nanotechnology such as multi-walled carbon nanotube disposable detectors. The data presented in this work is very promising since it demonstrates the analytical reliability of these new nano-detectors and as a consequence of overall electrokinetic microfluidic platforms in both analytical formats in real domains: flow injection and separation systems. This data obtained was highly necessary and opened new frontiers towards the real use of these microsystems in labs.

New visions become clear: the analytical suitability for building a new generation of simple lab-on-a-chip for analytics based on a dual use of the single-channel microfluidics with multi-walled nanotubes at the end as detectors has been demonstrated. A further extension of this investigation on plastic materials for microfluidics, parallelization, integration of several

modified electrodes and total integration are the next steps in the construction of more sophisticated architectures for working in real domains in the near future.

References

- 1 A. Manz, N. Grabner and H. M. Widmer, *Sens. Actuators B Chem.*, 1990, **1**, 244–248.
- 2 D. Janasek, J. Frazke and A. Manz, *Nature*, 2006, **442**, 374–380.
- 3 A. Rios, A. Escarpa, M. C. Gonzalez and A. G. Crevillen, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 467–479.
- 4 A. Mello, *Nature*, 2006, **442**, 394–402.
- 5 A. Mello, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **372**, 12–13.
- 6 J. P. Kutter and O. Geschkes, in *Microsystems Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, ed. O. Geschke, H. Klank and P. Tellemann, Wiley-VCH, Weinheim, 2004, p. 213–249.
- 7 S. Haerberle and R. Zengerle, *Lab Chip*, 2007, **7**, 1094–1110.
- 8 R. E. Oosterbroek and A. van der Berg (Eds.), *Lab-on-a-chip*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- 9 M. A. Schwarz and P. C. Hauser, *Lab Chip*, 2001, **1**, 1–6.
- 10 K. Uchiyama, H. Nakajima and T. Hobo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 375–382.
- 11 M. E. Johnson and J. P. Landers, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 3513–3527.
- 12 C. Yi, Q. Zhang, C.-W. Li, J. Yang, J. Zhao and M. Yang, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 1259–1268.
- 13 S. Götz and U. Karst, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 183–192.
- 14 W. R. Vandaveer, S. A. Pasas, R. S. Martin and S. M. Lunte, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 3667–3677.
- 15 J. Wang, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 1133–1140.
- 16 M. Pumera, A. Merkoçi and S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 219–235.
- 17 A. J. Blasco and A. Escarpa, in *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, ed. M. L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2005, vol. XLV, pp. 703–758.
- 18 J. Wang, G. Chen, M. P. Chatrathi and M. Musameh, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 298–302.
- 19 X. Yao, H. Wu, J. Wang, S. Qu and G. Chen, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 846–853.
- 20 M. Trojanowicz, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 480–489.
- 21 J. Wang, *Analyst*, 2005, **130**, 421–426.
- 22 A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Pérez, M. del Valle and S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 826–838.
- 23 C. E. Banks and R. G. Compton, *Analyst*, 2006, **131**, 15–21.
- 24 P. M. Ajayan, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 1787–1799.
- 25 S. Iijima, *Nature*, 1991, **354**, 56–58.
- 26 A. Oberlin, M. Endo and T. Koyama, *J. Cryst. Growth*, 1976, **32**, 335–349.
- 27 S. Iijima and T. Ichihashi, *Nature*, 1993, **363**, 603–605.
- 28 A. G. Crevillén, M. Hervás, M. A. López, M. C. González and A. Escarpa, *Talanta*, 2007, **74**, 342–357.
- 29 A. G. Crevillén, M. Ávila, M. Pumera, M. C. González and A. Escarpa, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 7408–7415.
- 30 E. Rijke, P. Out, W. M. A. Niessen, F. Ariese, C. Gooijer and U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1112**, 31–63.
- 31 A. J. Blasco, A. G. Crevillén, M. C. Gonzalez and A. Escarpa, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 2275–2286.
- 32 J. Wang, B. Tian and E. Sahlin, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 5436–5440.
- 33 A. Escarpa and M. C. González, *J. Chromatogr. A*, 2000, **897**, 161–170.
- 34 A. J. Blasco, A. G. Crevillen, P. de la Fuente, M. C. Gonzalez and A. Escarpa, *Analyst*, 2007, **132**, 323–329.
- 35 M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino and M. P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1049**, 189–194.
- 36 J. Wang, R. Polsky, B. Tian and M. P. Chatrathi, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5285–5289.
- 37 J. L. Peñalvo, T. Nurmi and H. Adlercreutz, *Food Chem.*, 2004, **87**, 297–305.
- 38 M. Pumera, A. Merkoçi and S. Alegret, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 5068–5072.
- 39 A. Escarpa and M. C. González, *J. Chromatogr. A*, 1998, **823**, 331–337.

DOI: 10.1002/sml.200701047

Striped Alloy Nanowire Optical Reflectance Barcodes Prepared from a Single Plating Solution**

Andrea Bulbarello, Sirilak Sattayasamitsathit, Agustin G. Crevillen, Jared Burdick, Saverio Mannino, Proespichaya Kanatharana, Panote Thavarungkul, Alberto Escarpa, and Joseph Wang*

Nanowires have received considerable recent attention as tagging systems for a variety of product-tracking, identification, and protection applications.^[1,2] Such barcoded nanowire tags are commonly prepared by sequential electro-deposition of different metals within a porous template and display stripes of different metals (commonly silver and gold) that can be distinguished by optical reflectivity microscopy.^[3–6] While leading to high coding capacities such nanowires require a time-consuming synthesis involving multiple plating steps from different metal solutions.^[7] Recent efforts have demonstrated that encoded single-segment alloy nanowires can be synthesized by a single deposition step and encoded electrochemically^[8] or by X-ray fluorescence (XRF).^[9] However, such a greatly simplified preparation route is compromised by the corresponding destructive^[8] or expensive^[9] readout tools.

We demonstrate here that multisegment alloy nanowire barcodes with distinct optical-reflectance striping patterns and large coding capacity can be prepared by a template-assisted

electro-deposition from a single gold–silver plating solution mixture in connection to different potentials. The different reduction rates of silver and gold at different plating potentials over the -0.50 to -1.20 V range (versus Ag/AgCl)^[10] lead to alloy segments of different Au–Ag compositions and to 3–4 optically distinct, readily decoded alloy segments. Extremely large varieties of optical-reflectance striping patterns can thus be produced by plating these alloy segments in different orders and charges.

The new multisegment alloy nanowire preparation route greatly simplifies the code production when compared with the solution-changing sequential deposition of common bimetal nanowire barcodes.^[5,7] Scheme 1 illustrates the template-assisted electro-deposition of the multisegment alloy nanowires. The different deposition potentials are applied sequentially in a predetermined order and for different durations (A,B,C) to produce alloy segments of controlled length. This is followed by the template dissolution (D) and optical readout of the reflectance patterns (E). Compared to recently developed single-segment alloy nanowire electrochemical^[8] and XRF^[9] barcodes, the new striped alloy nanowires can be readily decoded on the basis of differences in optical reflectivity (which is a faster and cheaper diagnostic tool).

The ability to tune the optical properties by adjusting the deposition potential and to generate multisegment alloy nanowires with distinct optical reflectance barcode patterns from a single plating solution is illustrated in Figure 1. For example, Figure 1A displays an optical microscopy image, and the corresponding intensity profile, for a 5-segment nanowire involving four different alloy compositions. This nanowire was prepared from an 85/15 (v/v) Au/Ag plating solution by applying four different potentials in the following sequence: a) -1.20 , b) -0.73 , c) -0.96 , d) -0.50 , and e) -1.20 V versus Ag/AgCl. Such sequential deposition from the same solution results in four alloy segments that can be distinguished on the basis of the intensity of their reflectivity. As will be illustrated below, the four intensity levels reflect the stepwise increase of the gold content in the alloy upon increasing the deposition potential from -0.50 to -1.20 V.^[10] The corresponding intensity (line) profile (bottom of Figure 1A) clearly illustrates the ability to distinguish between the four segments of different alloy compositions. Each segment yields a characteristic intensity level, allowing convenient distinction of adjacent alloy stripes and of the four compositions. A large number of unique codes can thus be prepared by simply varying the deposition conditions while using the same plating solution. For example, Figure 1B–D shows reflectance images (top) and intensity lines (bottom) for three nanowires prepared by applying different potentials (-0.50 , -0.85 , and -1.20 V versus Ag/AgCl) using different preset orders and charges. Such change in the deposition conditions results in distinct striping patterns involving three visibly distinguishable reflectance intensity levels (bright, dark, and intermediate), corresponding to the individual alloy segments. Also shown in Figure 1C is an SEM image of the corresponding nanowire. The individual segments are clearly visible, and as expected,^[6] their intensities are the opposite of the corresponding optical-reflectance intensities.

[*] Prof. J. Wang, A. Bulbarello, S. Sattayasamitsathit, A. G. Crevillen, J. Burdick
Department of Chemical Engineering
Biodesign Institute at ASU
1001 S. McAllister Ave., P.O. Box 875801
Tempe, AZ 85287-5801 (USA)
E-mail: joseph.wang@asu.edu

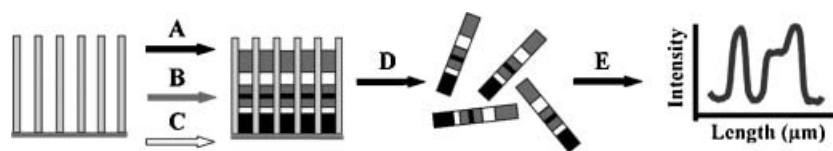
Prof. J. Wang, A. Bulbarello, S. Sattayasamitsathit, A. G. Crevillen, J. Burdick
Department of Chemistry and Biochemistry
Biodesign Institute at ASU
1001 S. McAllister Ave., P.O. Box 875801
Tempe, AZ 85287-5801 (USA)

A. Bulbarello, Prof. S. Mannino
Department of Food Science and Technology
Universita' degli studi di Milano
20133, Milano (Italy)

S. Sattayasamitsathit, Prof. P. Kanatharana, Prof. P. Thavarungkul
Faculty of Science, Prince of Songkla University
Hat Yai, Songkhla, 90112 (Thailand)

A. G. Crevillen, Prof. A. Escarpa
Department of Analytical Chemistry, Universidad de Alcalá
Alcalá de Henares, 28871 (Spain)

[**] This work was supported by the National Science Foundation (Grant number CHE 0506529). A.B., S.S., and A.G.C. acknowledge fellowships from Milan University, from the Thailand Research Fund and from the Spanish Ministry of Education and Science, respectively.



Scheme 1. Synthesis of multisegment alloy nanowire barcodes using one gold–silver mixture plating solution with electro-deposition of segments occurring at different potentials (A–C) in various preset orders and durations. (D) and (E) represent the template dissolution and optical reflectance (intensity profile) readout, respectively.

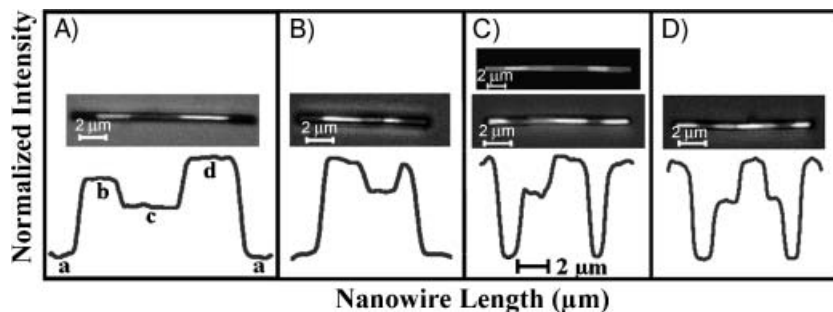


Figure 1. Reflectance images (top) and intensity lines (bottom) for different multisegment alloy nanowire barcodes prepared from an 85/15 (v/v) Au/Ag plating solution. The sequences of the deposition potentials for each nanowire image are (from left to right): A) -1.20 , -0.73 , -0.96 , -0.50 , and -1.20 V; B) -1.20 , -0.50 , -0.85 , -0.50 , and -1.20 V; C) -0.50 , -1.20 , -0.85 , -0.50 , -1.20 , and -0.50 V; D) -0.50 , -1.20 , -0.85 , -0.50 , -0.85 , -1.20 , and -0.50 V. The upper image (in C) shows the corresponding SEM image.

This concept can lead to a huge number of uniquely identifiable nanowires. Theoretically, varying the number of intensities, segment length and order can generate an unlimited number of codes. The coding capacity is effectively n^m where n is the number of intensity levels (i.e., alloy compositions) and m is the number of segments in the nanowire (assuming that the direction of the nanowire can be determined).^[7] In practice, however, given the current resolution, up to 5 intensity levels can be distinguished and up to 10 segments can be resolved within a typical $10\ \mu\text{m}$ long nanowire. This combination corresponds to 9,765,625 distinguishable nanowires. Such ability to generate 4–5 distinct alloy segments (and hence a huge coding capacity) using a single plating solution represents a major improvement over commonly used bimetal nanowire code ($n=2$) prepared by a solution-changing sequential deposition.^[5,7] The plating process can be computer-controlled for the simultaneous synthesis of multiple striping patterns in different membranes.

The multipotential templated deposition from a single plating solution results in distinct stepwise variation of the alloy composition along the length of the nanowires. Such tunable composition and optical properties are illustrated in Figure 2, which shows the dependence of the segment composition (A) and reflectance intensity (B) upon the deposition potential for a wire containing four different alloy segments, along with pure gold and silver segments (on both ends). These darkest (Au) and brightest (Ag) pure metal segments were added to normalize the intensity of the alloy segments and were assigned intensity values of 0.0 (Au) and 1.0 (Ag), respectively. An optical reflectance image of this nanowire, with the four alloy segments and the pure metal segments, is also shown in Figure

2. The silver content decreases in a nearly sigmoidal fashion from 92 to 53% upon raising the deposition potential from -0.50 to -1.20 V (A). This profile reflects the larger extent of gold co-deposition at more negative potentials associated with the different standard reduction potentials of the silver cyanide (-0.53 V) and gold cyanide (-0.82 V), major components of the silver and gold plating solutions. Searson's group^[10] illustrated that the deposition current of gold starts to increase around -0.9 V and reaches its potential-independent region

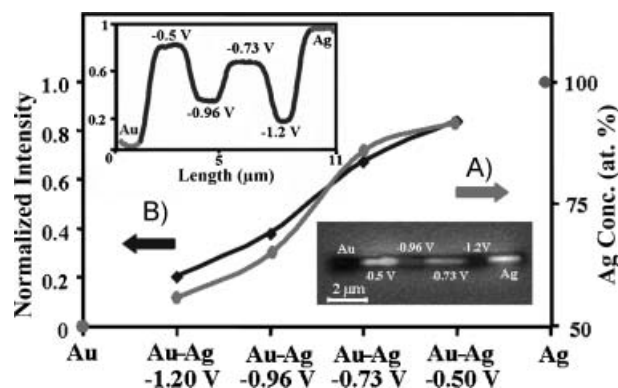


Figure 2. Dependence of the alloy composition (A) and the normalized reflectance intensity (B) upon the deposition potential. Insets show a reflectance microscopy image (bottom) and the intensity profile (top) of a multisegment nanowire containing four alloy compositions (deposited over the -0.50 to -1.20 V range) and pure gold and silver segments (at the ends, deposited at -0.90 V). The alloy composition was obtained by EDX analysis.

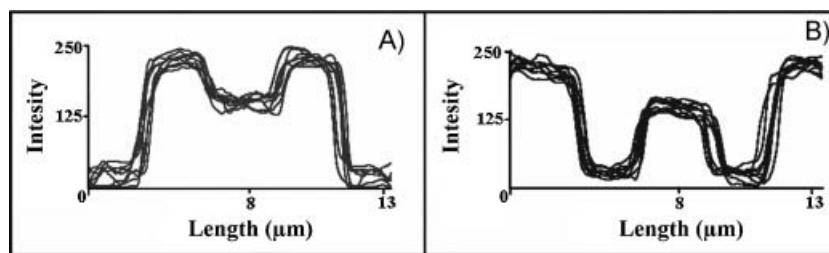


Figure 3. Reproducibility of the intensity profiles for multisegment alloy nanowire barcodes ($n = 10$ from two batches A and B). The alloy nanowire barcodes are composed of 5 segments (2 C charge each), deposited using the following sequence of plating potentials: A) -1.20 V, -0.50 V, -0.85 V, -0.50 V, -1.20 V. B) -0.50 V, -1.20 V, -0.85 V, -1.20 V, -0.50 V. Intensity is measured using an 8-bit grayscale.

above -1.20 V, while that of silver is already near its plateau and changes only slightly over the -0.7 to -1.20 V range. As indicated by Figure 2B, the optical intensity increases in a nearly linear fashion upon lowering the deposition potential from -1.20 to -0.50 V. The small difference in profiles A and B (with the larger curvature of the composition dependence) is attributed to the nonlinear correlation between the alloy silver content and the intensity of the reflected image.^[10]

The template preparation of multisegment alloy nanowires results in highly reproducible striping patterns. Figure 3 illustrates the reproducibility of two populations ($n = 10$) of nanowires based on different coding patterns (A, B). The relative standard deviation (RSD) for the respective intensity of each segment ranges from 3.8 to 13.7% for A and from 3.7 to 10.0% for B. The average lengths of the nanowires are $13.59 \mu\text{m}$ (A) and $13.32 \mu\text{m}$ (B) (RSD of 1.9 and 4.1%, respectively). The length of the respective individual segments had RSDs ranging from 4.9 to 7.4% (A) and from 4.1 to 7.6% (B).

In conclusion, we have demonstrated the template-assisted preparation of alloy nanowires with distinct optical reflectance coding patterns based on different alloy segments deposited from the same solution. The different reflectivity of adjacent alloy stripes enables convenient identification of the striping patterns by conventional light microscopy. The new multisegment alloy protocol combines a remarkably high coding capacity with a greatly simplified code production method as compared to that of commonly used bimetal nanowires, and hence holds great promise for different tagging applications.

Experimental Section

Sputtering of the alumina membrane was accomplished with a Denton Vacuum Desk III TSC (Moorestown, NJ). Electroplating was performed using a CHI 440 electrochemical analyzer (CH Instruments, Austin, TX). The sputtered gold was removed from the membrane using a standard 8-inch SEM sample polishing machine (Model 900 Grinder/Polisher, South Bay Technology Inc., San Clemente, CA) along with $1 \mu\text{m}$ alumina powder (Struers, Cleveland, OH). Optical images were acquired on a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) equipped with an X-Cite 120 fluorescence illumination system (EXFO, Mississauga, Ontario, Canada) as a light source and using a band-pass filter centered at 390 nm (with a bandwidth of 120 nm). Digital images

from the microscope were acquired with a Photometrics CoolSnap CF camera (Roper Scientific, Duluth, GA) and MetaMorph 7 software (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Scanning electron microscopy (SEM) images were obtained with an XL30 SEM instrument (FEI Co., Hillsboro, OR) using an acceleration potential of 30 kV . Energy dispersive X-ray analysis (EDX) of the segmented nanowires was performed with an EDAX acquisition system (Ametek Inc., Mahwah, NJ) installed on the XL30 SEM instrument.

The gold target used for the membrane sputtering ($99.9 + \%$ pure) was purchased from Denton Vacuum (Moorestown, NJ). The commercial gold and silver plating solutions (Orotemp 24 RTU RACK and 1025 RTU@4.5 Troy/Gallon) were obtained from Technic Inc. (Anaheim, CA). Sodium hydroxide was obtained from Sigma (St. Louis, MO). Anodisc 25 alumina membranes (25-mm diameter, 200-nm pore size and $60\text{-}\mu\text{m}$ thickness) were purchased from Whatman (Maidstone, U.K.) and used for all experiments. All solutions (except the commercial plating solutions) were prepared using nanopure deionized ($18 \text{ M}\Omega$) water (ELGA purelab-ultra model Ultra Scientific, High Wycombe, UK).

Alumina membranes were used as templates for the nanowire growth. Before use, a gold layer was sputtered on one side of the membrane (where the pores are branched) to serve as the working electrode during electrodeposition (in connection to an aluminum foil contact). Ag/AgCl and platinum wires were used as reference and counter electrodes, respectively. The sputtered membrane was placed in the bottom of a plating cell with the sputtered side contacting aluminum foil. The Au–Ag plating solution was introduced into the cell and the wires were deposited potentiostatically (as shown in Scheme 1). Three or four different potentials (-0.50 , -0.85 and -1.20 V or -0.50 , -0.73 , -0.96 and -1.20 V) were applied sequentially in a preselected order and charge to deposit the individual alloy segments. The length of each segment was controlled by the total deposition charge.

After completing the deposition, the membrane was removed from the growth cell and a polishing step was performed to remove the sputtered gold layer and the branched membrane section. The alumina membrane was then rinsed with distilled water and subsequently placed in a 3 M NaOH solution for 30 min until the membrane was dissolved. The resulting nanowire dispersion was washed using separation and dilution by centrifuging for 5 min at 6000 rpm , followed by removal of the supernatant and addition of distilled water. This process was repeated until a neutral pH was obtained. The wires used for obtaining the profiles of Figure 3 included also solid gold and silver segments

on the opposite ends of the nanowires. This was accomplished by changing solutions from the silver plating medium to the Au–Ag mixture alloy plating solution and finally to the gold solution. The solid gold and silver segments were both plated at a constant potential of -0.9 V (versus Ag/AgCl).

The optical images were acquired using the $100\times$ objective (LU Plan BD ELWD, Nikon Corp., Tokyo, Japan) on the Nikon 80i optical microscope, outfitted with the monochrome 12-bit dynamic range CoolSnap CF camera (previously mentioned). After the acquisition of the images, the optical pictures were processed using an internally developed protocol. First, using Photoshop CS2 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA) the central part (along the axis of the nanowire) of the alloy nanowire barcode was selected (width of 4 pixels vs. different lengths), pasted into a new 8-bit grayscale image and subsequently the autocontrast filter built into Photoshop was applied on the nanowire strip image. The processed image was then fed to a Matlab (The Mathworks Inc., Natick, MA) program which averaged the pixel intensity across the 4-pixel columns and graphed this profile versus length of the wires. Using different plotting modes it is possible to obtain quickly the raw data or the normalized plots. The reflectance intensity was normalized using the highest intensity value corresponding to a prevalently silver segment deposited at -0.50 V . Normalization was performed with respect to the highest intensity value along the nanowire barcode. In order to obtain the dependence between the deposition potential and the reflectance intensity (Figure 3B) the above procedure was slightly modified. The same amount of pixels from each segment was selected and averaged to estimate intensity value of the segment. This segment intensity value was then plotted versus the corresponding plating

potential. For normalizing the reflectance intensity, the brightest segment (pure silver) was assigned a value of 1.0, while the darkest segment (pure gold) was set to be 0.0. Every segment was measured 5 times.

Keywords:

alloys · barcodes · nanowires · reflectance

-
- [1] N. H. Finkel, X. Lou, C. Wang, L. He, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 352A.
 - [2] C. D. Keating, M. J. Natan, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 451.
 - [3] S. R. Nicewarner-Pena, R. G. Freeman, B. D. Reiss, L. He, D. J. Pena, I. D. Walton, R. Cromer, C. D. Keating, M. J. Natan, *Science* **2001**, *294*, 137.
 - [4] B. D. Reiss, R. G. Freeman, I. D. Walton, S. M. Norton, P. C. Smith, W. G. Stonas, C. D. Keating, M. J. Natan, *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *522*, 95.
 - [5] S. R. Nicewarner-Pena, A. J. Carado, K. E. Shale, C. D. Keating, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7360.
 - [6] R. L. Stoermer, K. B. Cederquist, S. K. McFarland, M. Y. Sha, S. G. Penn, C. D. Keating, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16892.
 - [7] I. D. Walton, S. M. Norton, A. Balasingham, L. He, D. F. Ovisio, D. Gupta, P. A. Raju, M. J. Natan, R. G. Freeman, *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2240.
 - [8] J. Wang, G. Liu, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 2461.
 - [9] S. Sattayasamitsathit, J. Burdick, R. Bash, P. Kanatharana, P. Thavarungkul, J. Wang, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7571.
 - [10] C. Ji, G. Oskam, Y. Oskam, Y. Ding, J. D. Erlebacher, A. J. Wagner, P. C. Searson, *J. Electrochem. Soc.* **2003**, *150*, C523.

Received: October 29, 2007

Revised: December 17, 2007

Published online: April 9, 2008

The preferential electrocatalytic behaviour of graphite and multiwalled carbon nanotubes on enediol groups and their analytical implications in real domains†

Agustin G. Crevillen,^a Martin Pumera,^b M. Cristina Gonzalez^a and Alberto Escarpa^{*a}

Received 12th December 2008, Accepted 10th February 2009

First published as an Advance Article on the web 3rd March 2009

DOI: 10.1039/b822334c

Carbon nanotubes (CNTs) possess preferential 'electrocatalytic' properties that affect the oxidation of enediol groups, establishing a relationship between electrocatalysis and chemical structure. Since this chemical structure occurs in analytes involved in high impact areas such as the pharmaceutical, cosmetic, and food safety industries, this preferential electrochemical behaviour was demonstrated using both standard and selected real-world samples. The oxygen-containing species present on the surface of CNTs and generated during acid treatment were responsible for an enhanced electron transfer reaction for these structures using a proton-assisted electron transfer mechanism, thus confirming their crucial role during the surface preparation process of electrocatalysis. The analytical benefits were that the inherent selectivity and sensitivity from these nanomaterials could be exploited for the direct detection of analytes in complex matrices, revealing their crucial role in the simplification of analytical processes.

1. Introduction

Since the discovery of carbon nanotubes (CNTs),¹ this nanomaterial has been exhaustively studied by the scientific community. Photoelectronic devices, conductive and high-strength composites, energy-storage and energy-conversion devices, hydrogen storage, biosensors, and electrochemical detectors were all developed thanks to their amazing properties that include catalysis, mechanical resistance, high conductivity, strong adsorption capacity, and tunable electrochemical properties.^{2–6} One of the most important properties of CNTs is their observed ability to lower overvoltage of the redox reaction, termed the 'electrocatalytic' effect, which has generated an important body of research in the area.

Although some controversy still exists as to the real origin of this electrocatalytic effect, the main basis for understanding the electrocatalytic effect of CNTs has been built. This behaviour is highly dependent on the purity and the defects of the carbon nanotube material, the route of the synthesis and the functionalized process to generate oxygen-containing species.^{7–9} The crucial role of oxygen-containing groups on electrochemical behaviour observed in CNTs is well-known. It has previously been demonstrated that, in this respect, the behaviour of CNTs as electrode materials is the same as that of other graphitic carbon materials.¹⁰ Also, there is currently a lot of agreement that defect and oxygen functionalities similar to those in EPPG

(edge plane pyrolytic graphite) are involved in CNT electrocatalysis.¹¹ Interesting literature has suggested as well that redox reaction takes place on the surface of the residual catalyst nanoparticles that remain after the purification process and not on CNTs.^{12–15}

From our point of view, the main analytical implications of CNT electrocatalysis still remain to be fully exploited and discussed. These nanomaterials could have a predominant role on the analytical process with respect to governing the selectivity and sensitivity of the analysis since they can potentially decrease the overpotential and offer higher voltammetric currents. This non-universal electrocatalytic effect of decreasing overvoltage in the redox reaction of biomolecules and biomarkers has been reported in high significance molecules such as amino acids,¹⁶ NADH,¹⁷ cytochrome c,¹⁸ carbohydrates,¹⁹ insulin,²⁰ thiol-containing biomolecules,²¹ homocysteine,²² morphine,²³ L-tyrosine,²⁴ 3,4-dihydroxyphenylacetic acid,²⁵ dopamine,^{26–29} epinephrine²⁷ and ascorbic acid.^{27,29} However, after careful study of these interesting reports, surprisingly, no one has pointed out that very different chemical structures were involved in the electrocatalysis of nanotubes, and no relationship between the chemical structure and the electrocatalytic effect has yet been proposed, which could potentially be very useful to the analytical community. In addition, the origin of the 'electrocatalysis' observed was not confirmed, which could be essential to prepare the surface for improved performance with reproducibility.

In this paper, in order to explore the role that CNTs have on governing the simplification of the analytical process towards the selectivity and sensitivity of the analysis, we have explored a wide range of different analytes with a high impact on the pharmaceuticals, cosmetics, and food industries. Our main objective was to find which analytes could be electrocatalyzed and which ones could not, looking for a more universal use of carbon nanotube detector. Preferential electrocatalytic behaviour in chemical structures containing enediol groups was found and the origin of their 'electrocatalysis' was investigated in order to control this

^aDepartment of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Chemistry University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. E-mail: alberto.escarpa@uah.es; Fax: +34-918854995

^bBiomaterials Center and International Center for Materials Nanoarchitectonics, National Institute for Materials Science, 1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki, Japan

† Electronic supplementary information (ESI) available: SEM images of the electrodes used, cyclic voltammograms of the compounds studied using metallic nanoparticles and functionalized and non-functionalized MWCNTs, tables containing the corresponding oxidation potentials, and X-ray photoelectronic data. See DOI: 10.1039/b822334c

effect. In addition, the analytical potency of CNTs is demonstrated in emerging applications.

2. Experimental

2.1. Materials and standards

Genistein, maltol, (+)-catechin, vanillin, folic acid, and pyridoxine hydrochloride were purchased from Sigma. Ascorbic acid from Fluka Chemie (Buchs, Switzerland). Vitamin supplements (*Vitafardi*[®], 1 g ascorbic acid per capsule; *Becozyme*[®], 200 mg ascorbic acid and 10 mg pyridoxine per capsule), pharmaceutical preparation (*Pigmentasa*[®], 4% hydroquinone), and green tea extract (*Bellsola*[®], containing catechins) were purchased in local shops (Madrid, Spain).

Multiwall carbon nanotubes MWCNT-A (length, 0.5–200 μm ; od, 30–50 nm; wall thickness, 12–18 nm; CVD method of production) and MWCNT-B (length 0.5–2 μm ; od, 20–30 nm; wall thickness, 1–2 nm; CVD method of production) were purchased from Aldrich. Graphite powder (particle size 2–10 μm) was obtained from BDH (UK). Further purification of carbon material was accomplished by stirring the CNTs and graphite in 6 M HNO_3 at 25 $^\circ\text{C}$ for 24 h. 1 mg of each carbon material was dispersed in 1 ml of *N,N*-dimethylformamide (DMF). Nickel(II) oxide nanopowder (particle size <50 nm) and iron(II,III) oxide nanopowder (particle size <50 nm) were purchased from Aldrich. 1 mg of nanopowder was dispersed in 1 ml of DMF.

2.2. Apparatus and electrodes

Micrographs of the screen-printed electrodes modified with the different carbon materials taken by SEM can be found in the ESI† (Fig. S-1).

Scanning micrographs were acquired using an SEM (Zeiss DSM 950) working at 25 kV (Germany). Energy dispersive X-ray (EDX) analysis was performed using a TEM-EDX (JEM 2100F) field emission transmission electron microscope (JEOL, Japan) working at 200 kV and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) data using a VG Escalab 200R (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Cyclic voltammetry (CV) and differential pulse voltammetry (DPV) measurements were performed using a potentiostat μ -Autolab type-II from Eco Chemie, an Ag/AgCl wire as reference electrode, a platinum wire as a counter electrode, and a carbon thick-film screen-printed electrode (SPE) (0.3 \times 2.5 mm) as a working electrode. These screen-printed electrodes were purchased from DropSens (Spain). CV experiments were performed at a scan rate of 100 mV/s and DPV at a scan rate of 20 mV/s, with a pulse of 50 mV and a modulation time of 0.04 s using supporting electrolyte (1 M KCl and 0.1 M phosphate buffer pH = 7.4).

The working electrodes were modified by casting 2 μl of DMF containing 1 mg/ml carbon material or metal oxide nanopowder and allowed to dry at room temperature for 12 h.

Electrochemically-activated SPEs were prepared by cyclic voltammetry performing 500 cycles between -0.5 V and $+1.5$ V at a scan rate of 5 V/s using supporting electrolyte (1 M KCl and 0.1 M phosphate buffer pH = 7.4).

2.3. Standards and sample preparation

Ten vitamin supplement tablets (*Vitafardi*[®] and *Becozyme*[®]) were pulverized and added to a flask. About 50 mg of this powder was introduced into a glass flask and 25 ml of supporting electrolyte (1 M potassium chloride and 0.1 M phosphate buffer pH = 7.4) was then added that had been previously bubbled with N_2 for 30 min. The sample totally dissolved and was used for CV.

Ten tablets of green tea extract (*Bellsola*[®]) were pulverized and added to a flask. About 400 mg of this powder was introduced into a glass flask and 10 ml of methanol/supporting electrolyte (1 : 1) was added. The sample was shaken for one hour, and later sonicated for 10 min. An aliquot of 0.2 ml was taken and subsequently diluted until 10 ml with supporting electrolyte and used for CV.

About 0.1 g of cream (*Pigmentasa*[®]) was placed into a flask and 10 ml of supporting electrolyte was added. The flask was then immersed in an ultrasonic bath for 10 min. The sample was centrifuged and the supernatant was taken for CV.

Working solutions for the studies were appropriately diluted in the supporting electrolyte, well protected from light, and used within 24 h after preparation.

3. Results and discussion

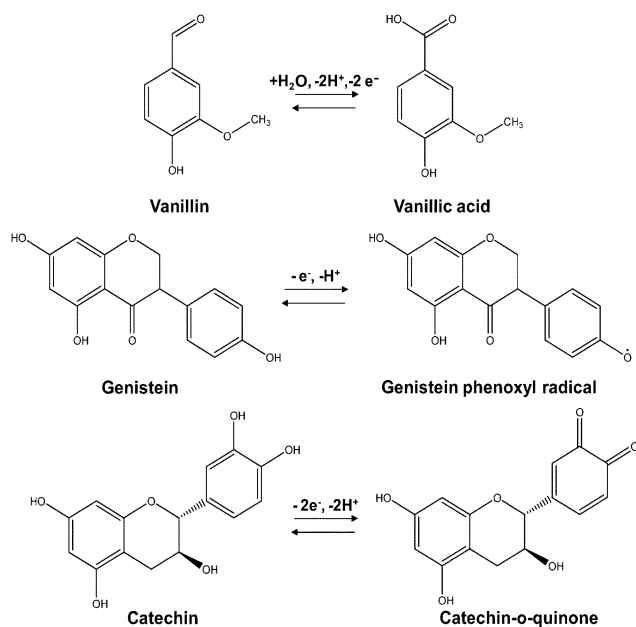
Selected analytes involved in areas with demonstrated significance such as the pharmaceutical, cosmetic, and food industries were chosen.³⁰ Because the behaviour of CNTs as electrode materials could be the same as that of other graphitic carbon materials, graphite was explored as a control. CV of the selected compounds was performed using unmodified carbon SPEs and SPEs modified with different carbon materials (carbon nanotubes and graphite). Table 1 shows a proposed classification based on the electroactive group and the oxidation peak potentials obtained for each compound. Using these results, it was observed that, regardless of the type of electrode used, no significant differences were obtained for the group containing a benzyl alcohol derivative consisting of pyridoxine and vanillin (with differences below 20 mV) or for the termed enol group which consisted of genistein, maltol, and folic acid with differences ranging from 30 mV to 100 mV. However, a different behaviour with an important decrease in overpotential was found for the third group with differences above 130 mV. It was interesting to notice that all of these compounds contained the enediol group as the electroactive group in their chemical structure. This termed enediol group consisted of not only ascorbic acid and hydroquinone but also (+)-catechin which showed this interesting effect, revealing a potential relationship between chemical structure and 'electrocatalytic effect.'

The structural formulas and their voltammetric profiles for the 'electrocatalyzed' analytes are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. The electrochemical behaviour of graphite, MWCNT-A, and MWCNT-B was identical regardless of the structure assayed. Although the electrocatalytic effect in ascorbic acid and hydroquinone was expected, the same effect was observed for (+)-catechin, a highly significant molecule for the food and antioxidant markets which potentially opens 'electrocatalysis' to other flavonoids and related molecules. In addition, it is important to stress that the common feature of

Table 1 Redox peak potentials (in V) of the compounds studied using different carbon materials

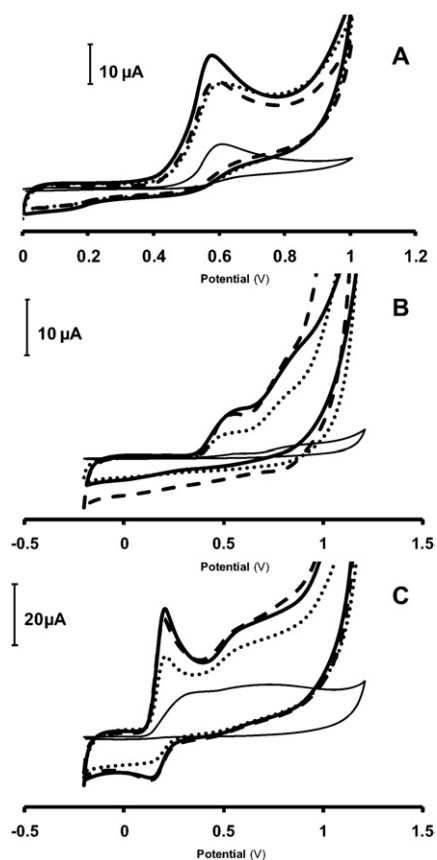
Electroactive group	Compounds	SPE	Graphite	MWCNT-B	MWCNT-A
Benzyl alcohol derivative	Vanillin	+0.60	+0.58	+0.58	+0.57
	Pyridoxine	+0.73	+0.73	+0.71	+0.72
Containing enol	Folic acid	+0.80	+0.70	+0.71	+0.71
	Maltol	+0.66	+0.63	+0.63	+0.62
Containing enediol	Genistein	+0.56	+0.49	+0.50	+0.51
	Ascorbic acid	+0.41	+0.09	+0.04	+0.03
	Hydroquinone	+0.31 ^a	+0.10 ^a	+0.09 ^a	+0.09 ^a
	(+)-Catechin	-0.07 ^b	+0.01 ^b	+0.01 ^b	+0.01 ^b
		+0.33 ^a	+0.20 ^a	+0.19 ^a	+0.20 ^a
		+0.04 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b

^a Anodic sweep. ^b Cathodic sweep.

**Fig. 1** Structural formulas and oxidation reactions for some of the compounds studied.

these molecules is the presence of enediols as an electroactive group, proposed here for the first time. However, hydroquinone and (+)-catechin contain both hydroxyl groups in the positions *para*- and *ortho*-, respectively. In order to check the *meta*-position, the resorcinol molecule was also investigated. Interestingly, the electrochemical behaviour was similar to the 'enol group' (the decrease of overpotential was about 70 mV for all materials compared with the bare SPE) due to the lack of conjugation between both hydroxyls, confirming the suitability of our proposed definition. In other words, the preferential electrocatalytic effect was related with the conjugated enediol configurations. In addition, and without exception, the highest voltammetric current was obtained using MWCNTs, making this surface ideal for the electrochemical sensing of the target enediols.

To be able to control the observed 'electrocatalysis' in enediols, the origin of their electrocatalysis has to be investigated. Since graphite and CNTs were observed to have identical behaviour, impurities such as metal oxide nanoparticles present

**Fig. 2** Cyclic voltammograms for standards of 1 mM vanillin (A), 0.1 mM genistein (B), and 1 mM (+)-catechin (C) using an SPE modified with different carbon materials: bare (thin solid curve) multiplied by 3 for (C); graphite (dotted curve); MWCNT-B (dashed curve) and MWCNT-A (thick solid curve). Conditions: scan rate 100 mV/s, step potential 0.01 V.

on CNTs should not be responsible for improving electron transfer because the electrochemical behaviour of SPE modified with graphite was similar to CNTs. To confirm this statement, CNTs were characterized by TEM-EDX and impurities of Ni and Fe for MWCNTs (MWCNT-A, 89% Ni and 11% Fe; MWCNT-B, 88% Ni and 12% Fe with respect to the total amount of metallic residues) were found. SPEs modified with Ni_2O_3 and Fe_3O_4 powder were prepared and used as working electrodes to perform cyclic voltammetry of ascorbic acid,

Table 2 XPS study of the assayed MWCNTs

Sample	Atomic bonding	C 1s (eV)	O 1s (eV)	O/C atom
Acid-treated MWCNT-A	C-C	284.8 (69) ^a		0.061
	C-O	286.3 (24) ^a	531.5 (36) ^a	
	C=O	288.6 (7) ^a	533.2 (64) ^a	
Untreated MWCNT-A	C-C	284.8 (70) ^a		0.045
	C-O	286.2 (24) ^a	531.5 (41) ^a	
	C=O	288.5 (6) ^a	533.2 (59) ^a	

^a Relative percentage of the peak areas for each type of atomic bonding.

hydroquinone, and (+)-catechin (ESI† Fig. S-2). Without exception, the redox peak potentials obtained with SPE-Ni₂O₃ and SPE-Fe₃O₄ were similar to the bare SPE. In addition, the overpotentials are clearly higher than those obtained with SPE-MWCNT-A (ESI† Table S-3), confirming that these metallic nanoparticles are not significantly involved in a faster electron transfer of CNTs for these compounds.

To confirm the crucial role on the observed electrocatalytic effect of oxygen-containing groups present on the carbon surface on enediols, O/C ratios on the surface of carbon materials either treated with nitric acid or untreated (as received from the supplier) were calculated using XPS (ESI† Fig. S-4). As Table 2 reveals, the nitric acid-treated MWCNT-A contained more oxygenated species on the surface (higher O/C ratio) and possessed a higher oxidation number (ketones, quinones, and carboxylic acids) than those that were untreated, thus confirming the role of these species during the lowering effect.³¹ Below, MWCNT-A will be referred to as either functionalized or non-functionalized. Secondly, SPEs modified with non-functionalized MWCNT-A were prepared and a bare SPE was electrochemically-activated (see Experimental section) to generate surface-oxygen species.³² Cyclic voltammetry for ascorbic acid, hydroquinone, and (+)-catechin was performed with these new electrodes and compared with bare SPE (non-activated) and functionalized SPE-MWCNT-A (see ESI† Fig. S-5).

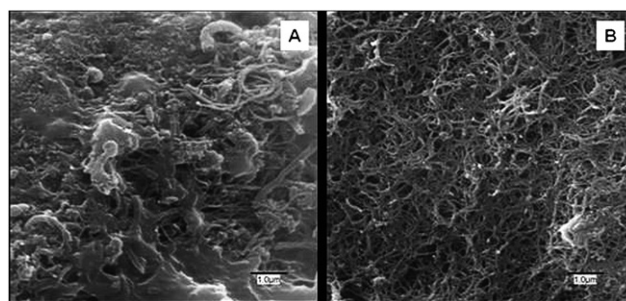
The overvoltage lowering is listed in Table 3. In all cases, the electron transfer (ET) rate for non-functionalized MWCNT-A was similar to the bare SPE. Moreover, the redox potentials obtained with the activated SPE were the same as those obtained with the functionalized MWCNT-A, confirming that the surface-oxygen species are responsible for a faster electron transfer for these compounds.

Although surface-oxygen species generated during the functionalization process were responsible for this electrocatalytic

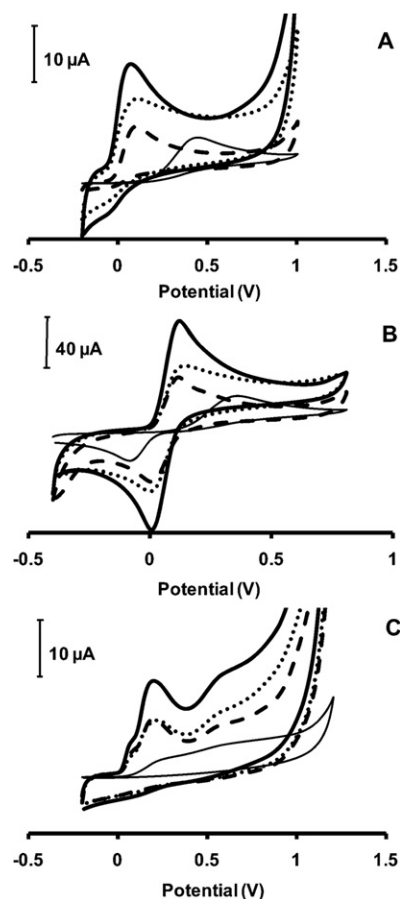
Table 3 Peak potentials (in V) obtained using SPE modified with acid-treated and untreated carbon materials

	SPE	Activated SPE	Treated MWCNT-A	Untreated MWCNT-A
Ascorbic acid	+0.41	+0.06	+0.03	+0.41
Hydroquinone	+0.31 ^a	+0.09 ^a	+0.09 ^a	+0.34 ^a
	-0.07 ^b	+0.03 ^b	+0.01 ^b	-0.08 ^b
Catechin	+0.33 ^a	+0.21 ^a	+0.20 ^a	+0.33 ^a
	+0.0 ^b	+0.15 ^b	+0.15 ^b	+0.11 ^b

^a Anodic sweep. ^b Cathodic sweep.

**Fig. 3** SEM micrographs of non-purified SPE-MWCNT-A (A) and purified SPE-MWCNT-A (B). Conditions: amplification 10⁴×, 25 kV.

effect, regardless of the carbon material used, functionalized MWCNTs were the ideal surface since they coupled this preferential behaviour with a significant current increase. In theory, the background current depends only on the active surface of the electrode, so it could be assumed that the background current would be similar for purified and non-purified SPE-MWCNT-A. To clarify this aspect, SEM images for each type of SPE-MWCNT-A (purified and non-purified) were taken (Fig. 3). It

**Fig. 4** Cyclic voltammograms for real samples of *Vitafardi*[®], containing ascorbic acid (A); *Pigmentasa*[®], containing hydroquinone (B); and the green tea extract *Bellsola*[®], containing catechin (C), using different SPEs: bare (thin solid curve) multiplied by 3 for (C); SPE-activated (dashed curve); SPE-graphite (dotted curve) and MWCNT-A (thick solid curve). Conditions: scan rate 100 mV/s, step potential 0.01 V.

can clearly be seen that the film of MWCNT-A on the SPE is more closely packed for the non-purified form (Fig. 3A) than for the purified one (Fig. 3B), meaning that there is a less accessible surface causing a lower amperometric signal and background current. This happens because CNTs are very hydrophobic, resulting in a spontaneous aggregation that increases the possibility of bundling and close packing,³³ but when CNTs are treated with nitric acid, oxygen-containing species appear which decrease this hydrophobic behaviour and, consequently, the packing.

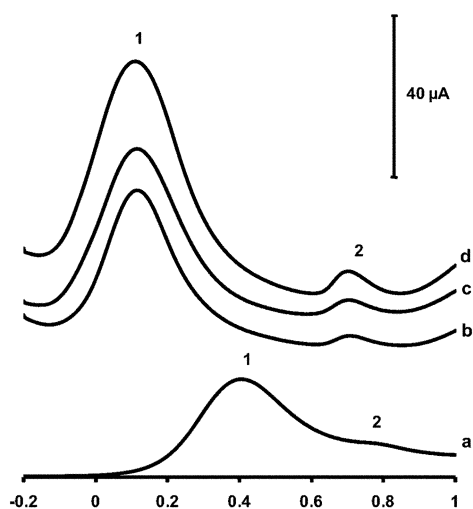


Fig. 5 DPV for real samples of *Becozyme*[®], containing ascorbic acid (1) and pyridoxine (2), using different SPEs: bare (a); SPE-activated (b); SPE-graphite (c); and SPE-MWCNT-A (d). Conditions: scan rate 20 mV/s, pulse 50 mV.

The analytical potency of MWCNTs on the electrochemical sensing of enediols, was also checked using selected samples with different degrees of complexity. Fig. 4 displays the cyclic voltammograms of (4A) *Vitafardi*[®] (a drug containing ascorbic acid), (4B) *Pigmentasa*[®] (a cosmetic cream containing hydroquinone), and (4C) *Bellsola*[®] (green tea capsules containing (+)-catechins). A reduction in overpotentials (between 80 mV and 380 mV) and an increase in amperometric current (from 3 to 20 times) when MWCNT-A is used with respect to the bare SPE was clearly observed. In addition, when MWCNTs were used, improved selectivity (higher separation of oxidation peaks) coupled with enhanced sensitivity was noticed, making a direct analysis of the real sample containing two compounds with very different concentration levels using DPV possible (see Fig. 5).

However, although mechanistic elucidation is obviously outside of the scope of this work, we could ask ourselves about the mechanism of the faster ET rate for enediol groups using CNTs. Since the chemical species involved in the electrochemical process of purified CNTs was equal to activated carbon SPEs, the mechanism should be the same for both. Cabaniss *et al.*³² demonstrated that oxygen-containing species present on activated glassy carbon electrodes electrocatalyze the heterogeneous charge transfer for catechol using a proton-assisted electron transfer mechanism. This was later extended to other enediol-containing compounds.^{10,34,35} This mechanism consists of the formation of a hydrogen bond between oxygen-containing species present on the surface and enediol groups, which explains the significant increase in the ET rate for the enediol-containing compounds studied (ascorbic acid, hydroquinone, and (+)-catechin) using CNTs and not for other compounds.

Lastly, Table 4 displays selected graphs that show a reduction in the overvoltage for the redox reaction of biomolecules and

Table 4 Bibliographic review of the compounds electrocatalyzed by CNTs

Compound	Electroactive group	CNT used	Functionalization process	Reduction in overpotential	Ref.
Amino acids	C α	SWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	The use of CNTs essential for determination	16
NADH	Nicotinamide	MWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	$\Delta E_p = 490$ mV	17
Cytochrome c	Fe ^{II} /Fe ^{III}	SWCNT	Electrochemical activation (oxygen species)	$\Delta E_p = 100$ mV	18
Carbohydrates	Aldehyde/ketone	SWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	The use of CNTs essential for determination	19
Insulin	Disulfide	MWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	$\Delta E_p = 200$ mV	20
Thiocytosine	Thiol	MWCNT	Abrasive immobilization (oxygen species)	The use of CNTs essential for determination	21
L-Cysteine					
Glutathione					
Homocysteine	Thiol	MWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	$\Delta E_p = 120$ mV	22
Morphine	Enol	MWCNT	Abrasive immobilization (oxygen species)	$\Delta E_p = 100$ mV	23
L-Tyrosine	Enol	MWCNT	HNO ₃ /HCl (oxygen species)	$\Delta E_p = 57$ mV	24
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)	Enediol	SWCNT	Hot air/HCl (oxygen species)	$\Delta E_p = 100$ mV	25
Dopamine and ascorbic acid	Enediol	CNT	—	No	26
Dopamine	Enediol	SWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	$\Delta E_p = 80$ mV	27
Epinephrine				$\Delta E_p = 70$ mV	
Ascorbic acid				$\Delta E_p = 80$ mV	
Dopamine	Enediol	MWCNT	HNO ₃ (oxygen species)	$\Delta E_p = 60$ mV	28
Serotonin	Enol			No	
Ascorbic acid	Enediol	MWCNT	HCl/abrasive immobilization (oxygen species)	Yes	29
Dopamine	Enediol			Yes	
Serotonin	Enol			No	

biomarkers mentioned in the introduction. There is a great diversity of electroactive groups involved that correspond to these compounds, but, in all cases (although it was not always confirmed by the authors), oxygen-containing species were introduced to the CNTs at some point during the modified electrode preparation (acid treatment for purification of CNTs, abrasive modification, electrochemical activation). Therefore, this means that these species may play a role in the electrochemical reaction. Only in the first application of CNTs as electrochemical detectors²⁶ was a decrease of overvoltage for dopamine and ascorbic acid (enediols) not reported, apparently contradicting our results. However, this happened because no procedure was included that introduced oxygen species onto the CNTs. As a result, we suggest some kind of control for the oxygen-containing species present on CNTs in order to be able to obtain reproducible or comparative results, especially when reporting a decreasing in the overpotential of electrochemical reactions. Moreover, the decrease in overpotential of some of the compounds described in Table 4 (NADH, enol, and enediol-containing biomolecules) can be explained on the basis of our proposal because the redox reaction of these compounds is governed by a proton-assisted electron transfer mechanism.³⁴ Speaking of the selectivity of CNTs, two interesting examples can be found in the bibliography.^{28,29} The decrease in overpotential was reported for dopamine and ascorbic acid but not for serotonin, and the authors did not explain this difference in behaviour. These results could be both understood and predictable considering a proton-coupled electron transfer mechanism as has been proposed in our study.

4. Conclusions

A relationship between enediols as chemical structures and 'electrocatalysis' in MWCNTs has been demonstrated. The unique analytical potency of multiwalled carbon nanotubes based on their electrocatalytic effect was clearly revealed, being the only material that perfectly joined both a decrease in overpotentials and an enhanced analytical signal selectively over enediol groups. Although oxygen species can be generated on every carbon surface, suggesting the uselessness of using CNTs, the increased voltammetric current obtained due to the enormous active surface of this material makes them an excellent alternative in electrochemical sensing. This fact could open up new perspectives in application domains since their inherent behaviour permits direct electrochemical sensing, simplifying the overall detection processes

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Technology CTQ2005-09079-C03-03 y CTQ2008-06730-C02-02/BQU (A. E.) and the fellowship received from the Spanish Ministry of Education and Science (A. G. C.) is acknowledged. This work was supported in part by World Premier International

Research Center (WPI) Initiative on Materials Nanoarchitectonics, MEXT, Japan (M. P.). We would like to thank the electronic microscopy service of the University of Alcalá and the X-ray photoelectronic spectroscopy service of the Institute of Catalysis and Petrochemistry (CSIC, Madrid, Spain).

References

- 1 S. Iijima, *Nature*, 1991, **354**, 56–58; D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. De Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez and R. Beyers, *Nature*, 1993, **363**, 605–607; S. Iijima and T. Ichihashi, *Nature*, 1993, **363**, 603–605.
- 2 R. H. Baughman, A. A. Zakhidov and W. A. de Heer, *Science*, 2002, **297**, 787–792.
- 3 P. M. Ajayan, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 1787–1799.
- 4 M. Trojanowicz, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 480–489.
- 5 J. Wang, *Analyst*, 2005, **130**, 421–426.
- 6 A. Merkoçi, M. Pumera, X. Llopis, B. Perez, M. del Valle and S. Alegret, *Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 826–838.
- 7 C. E. Banks, T. J. Davies, G. G. Wildgoose and R. G. Compton, *Chem. Commun.*, 2005, 829–841.
- 8 A. Chou, T. Böcking, N. K. Singh and J. J. Gooding, *Chem. Commun.*, 2005, 842–844.
- 9 K. Gong, S. Chakrabarti and L. Dai, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 5446–5450.
- 10 R. L. McCreery, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2646–2687.
- 11 C. E. Banks and R. G. Compton, *Analyst*, 2006, **131**, 15–21.
- 12 C. E. Banks, A. Crossley, C. Salter, S. J. Wilkins and R. G. Compton, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 2533–2537.
- 13 B. Sljukic, C. E. Banks and R. G. Compton, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 1556–1558.
- 14 M. Pumera, *Langmuir*, 2007, **23**, 6453–6458.
- 15 J. L. Lyon and K. J. Stevenson, *Langmuir*, 2007, **23**, 11311–11318.
- 16 R. P. Deo, N. S. Lawrence and J. Wang, *Analyst*, 2004, **129**, 1076–1081.
- 17 M. Musameh, J. Wang, A. Merkoçi and Y. Lin, *Electrochem. Commun.*, 2002, **4**, 743–746.
- 18 J. X. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li and Z. Gu, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 1993–1997.
- 19 R. P. Deo and J. Wang, *Electrochem. Commun.*, 2004, **6**, 284–287.
- 20 J. Wang and M. Musameh, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **511**, 33–36.
- 21 A. Salimi and R. Hallaj, *Talanta*, 2005, **66**, 967–975.
- 22 N. S. Lawrence, R. P. Deo and J. Wang, *Talanta*, 2004, **63**, 443–449.
- 23 A. Salimi, R. Hallaj and G. R. Khayatian, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 873–879.
- 24 Q. Xu and S. F. Wang, *Microchim. Acta*, 2005, **151**, 47–52.
- 25 J. X. Wang, M. X. Li, Z. J. Shi, N. Q. Li and Z. N. Gu, *Electrochim. Acta*, 2001, **47**, 651–657.
- 26 P. J. Britto, K. S. V. Santhanam and P. M. Ajayan, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1996, **41**, 121–125.
- 27 H. Luo, Z. Shi, N. Li, Z. Gu and Q. Zhuang, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 915–920.
- 28 K. Wu, J. Fei and S. Hu, *Anal. Biochem.*, 2003, **318**, 100–106.
- 29 Z. H. Wang, Q. L. Liang, Y. M. Wang and G. A. Luo, *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **540**, 129–134.
- 30 A. G. Crevillen, M. Avila, M. Pumera, M. C. Gonzalez and A. Escarpa, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 7408–7415.
- 31 M. Pumera, T. Sasaki and H. Iwai, *Chem. Asian J.*, 2008, **3**, 2046–2055.
- 32 G. E. Cabaniss, A. A. Diamantis, W. R. Murphy, Jr., R. W. Linton and T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 1845–1853.
- 33 M. Valcarcel, S. Cardenas and B. M. Simonet, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 4788–4797.
- 34 M. H. V. Huynh and T. J. Meyer, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 5004–5064.
- 35 S. H. DuVall and R. L. McCreery, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 6759–6764.

Challenges of analytical microsystems

Angel Ríos, Alberto Escarpa, María Cristina González, Agustín G. Crevillén

Miniaturization in analytical chemistry is a clear trend, and has been the subject of an important number of research works. In this article, we present a general overview of the potential of analytical microsystems. Although clear advantages can be pointed out, we offer a critical evaluation based on highlighting strengths and weaknesses. Thinking about the future use of the current analytical microsystems in routine and control analytical laboratories, we discuss the issues involved in the analytical process and the different steps involved in chemical analyses. We identify challenges in applying analytical microsystems to these uses.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Analytical microsystem; Lab-on-a-chip; Micro analysis; Microchip; Miniaturization

Angel Ríos*

Department of Analytical Chemistry and Food Technology, Faculty of Chemistry, University of Castilla - La Mancha, Av. Camilo Jose Cela, 10, E-13004 Ciudad Real, Spain

Alberto Escarpa,
María Cristina González,
Agustín G. Crevillén

Department of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, University of Alcalá, Spain

1. Introduction

There is a well-recognized trend towards simplification (“easy to implement or do”), automation (“electro-mechanically self-operation”), and miniaturization (“small scale”; “make to a very small scale”) of the analytical process. The interface between these three characteristics can be identified as an attractive area for interesting developments, defining the so-called (re)-evolution of analytical chemistry. However, high degrees of simplification and automation are intrinsic in miniaturized systems. The final objective of miniaturized systems in the analytical domain is represented by the micro total analysis system (μ -TAS), also called “lab-on-a-chip” [1]. The term “analytical microsystems” has also been used sometimes (closer in meaning to “miniaturized analysis systems”) [2]. However, miniaturization can affect the entire analytical process (hence, a real μ -TAS) or only part (or different steps) of the analytical process.

There are different approaches to miniaturization, depending on the analytical objectives being pursued, as Kutter and Geschkes reported [3]:

- (i) direct measurement of one or a few components with little or no sample preparation;
- (ii) measurement of one component or a few components requiring some treatment of sample;
- (iii) more complex samples (separation of the components).

Undoubtedly, these categories are clearly based on sample complexity and selectivity criteria. Accordingly, different analytical microsystems can be associated with each of them:

- (i) (bio)sensors (probe-type sensors, flow-through sensors, and microsensors, in a progressive scale of miniaturization) belong to the first group;
- (ii) flow-injection analysis (FIA) and microFIA (μ FIA) are the most relevant (micro)systems for the second group; and,
- (iii) micro high-performance liquid chromatography (μ -HPLC) and microcapillary electrophoresis (μ -CE) are ideal for performing microseparations.

Regarding miniaturization from the point of view of analysis, the micrototal analysis system (μ -TAS) is clearly one of the main objectives. Ideally, a TAS performs all the analytical steps (sample preparation, and analyte separation and detection) in an integrated instrument. The philosophy of TAS has been to enhance on-line and automated analysis; however, there are still significant drawbacks, which should be the subject of future work in this field (e.g., sample introduction and the successive analysis of a set of samples, slow sample transport, as well as the need to fabricate interfaces between the different components). The μ -TAS concept was developed from TAS by downsizing and integrating its analytical steps (sample preparation, and analyte

*Corresponding author.

Tel.: +34 926 295232;

Fax: +34 926 295318;

E-mail: angel.rios@uclm.es

separation and detection) onto single monolithic devices [1]. In essence, a μ -TAS is a device that improves the performance of an analysis by virtue of its reduced size. But not only analytical tasks can be performed in a miniaturized system. Other chemical functions, such as synthesis, can also be performed. For this reason, today the μ -TAS concept has been called "lab-on-a-chip". After more than a decade since the concept was introduced, now is a very exciting time for μ -TAS, because of the large number of advances, and challenges for this topic have been described [4].

2. Previous considerations

Taking into account the different steps and activities involved in chemical analysis, there are specific difficulties in miniaturization. Activities (e.g., sampling (and the corresponding sub-sampling), calibration and validation of the entire analytical process) and steps (e.g., sample introduction, treatment and conditioning, transportation to the detection point, measurement, and data acquisition and processing) present particular problems. Even the level of miniaturization is an important question. As Fig. 1 shows, three different levels can be established:

- (i) mini-, on the scale of several and using a sample size at the μ L level;
- (ii) micro-, between a few mm and 50- μ m scale and processing samples between a few μ L and 10 nL; and,
- (iii) nano-, below 50 μ m (even 1 μ m, in some cases) and with sample size below 10 nL (even pL and fL).

The incidence of these different levels of miniaturization in the sequential steps in the analytical process is also shown in Fig. 1. By considering the entire analytical process (fortunately, miniaturization implies reducing or eliminating some of the steps mentioned), the main problems for miniaturization affect the preliminary operations (sampling, and sample introduction and

treatment). By contrast, detection and signal transduction, as well as data acquisition and processing, can achieve a high degree of miniaturization.

There are guidelines for the whole approach to miniaturization, as follows.

- (i) Miniaturization implies a micro-size environment. In fact, it is very important to keep in mind that miniaturization not only decreases scale, but also means that other forces and phenomena are present in micro-size environments [5–7].
- (ii) Miniaturization requires technological facilities. Thus, to understand what the revolution of miniaturization in analytical chemistry means, it is necessary to consider the synergetic marriage (relationship) between some part of the technology and the objectives of modern analytical chemistry. In other words, in a fundamental sense, the objectives or demands of analytical chemistry should answer some questions relating to miniaturization, such as why, when and how miniaturization is performed. Obviously, the answer to the last question comes from the technological facilities that exist. Table 1 outlines the complementarity of miniaturization and analytical chemistry.

From an analytical point of view, traditionally, chemical analyses have been performed in central laboratories because they require skilled personnel and specialized analytical instrumentation. However, the trend is to move chemical analyses close to the "customer" or the bulk sample (in situ analysis). Miniaturization therefore plays a preeminent role in decentralizing chemical analysis. As a consequence, miniaturized analytical devices should be portable, easy to operate and reliable.

Automation of the entire chemical analysis is also involved in the practical implementation of μ -TAS in our laboratories. In fact, in the extreme case, analytical microsystems could be represented as a black box and the role of users basically comprises providing the samples and pushing the start button to perform the chemical analysis.

From a technological point of view, we can observe several potential benefits from analytical microsystems (see Table 1):

- knowledge about microfabrication techniques and the chemistry of materials is well established;
- there is the possibility of fabricating sophisticated microcircuits to meet analytical demands and objectives;
- they are highly compatible with mass production; and, in addition,
- there is the possibility of exploiting new opportunities in microfluidics, such as the presence of laminar flow.

However, one weakness of analytical microsystems derives from the present technology. Sometimes, complete miniaturization of all electronics and mechanical

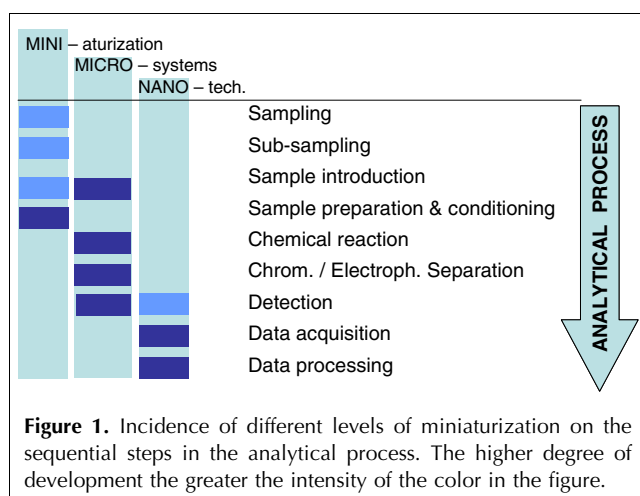


Table 1. Relationships between present analytical demands and technological developments for miniaturization**A) GOOD COMPLEMENTARITY**

Analytical chemistry demands

- Low requirements:
 - No skilled personnel
 - No specialized instrumentation
- Decentralization of analyses:
 - Real time
 - In situ or on-line
 - In vivo
- Samples:
 - Very low volumes
 - High throughput
- Reagents (low consumption)
- Automation

Technological tools

- Microelectronic developments
- Microfabrication techniques
- Microfluidics
- Chemistry of materials
- Clean-room facilities

B) BETTER TECHNOLOGICAL APPROACHES NEEDED

- Real world interfaces:
 - Sampling and sample introduction
 - Incomplete miniaturization
 - Sample change between analyses

parts of the system is not possible. Moreover, these elements are expensive and the required technology is not always available (e.g., clean-room facilities).

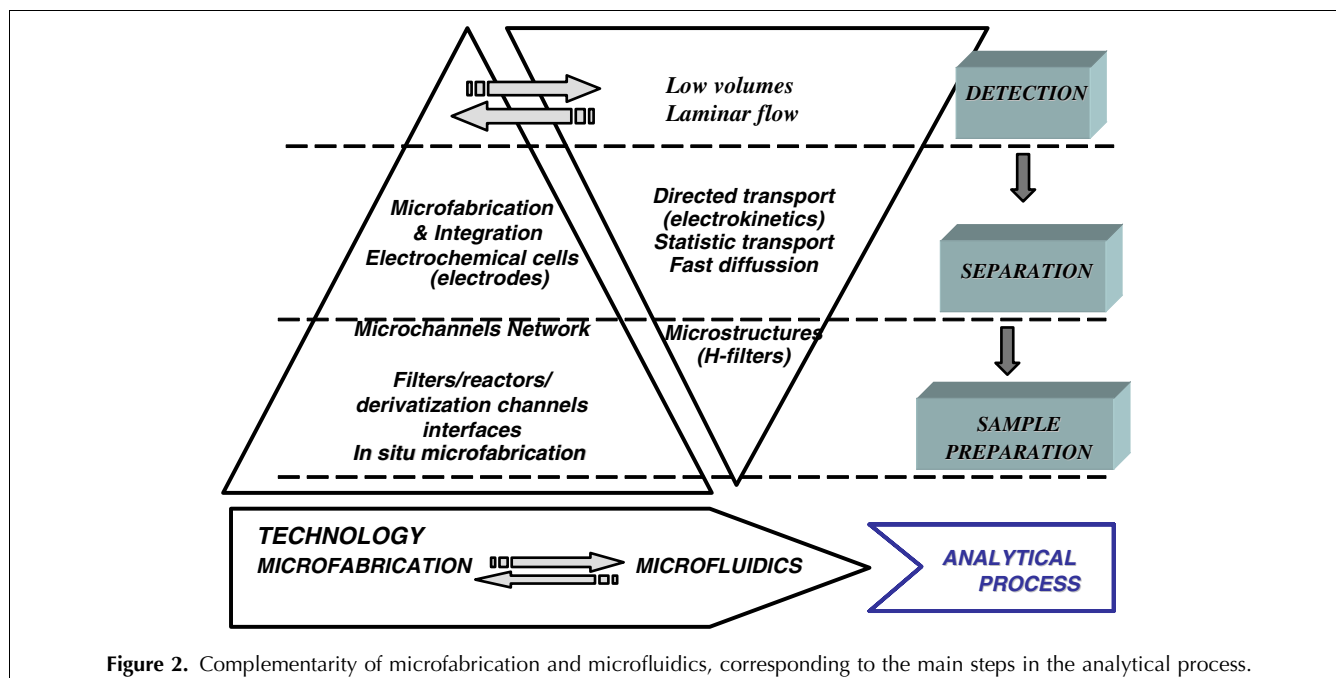
The microtechnology used in the miniaturized environments could also be understood as integrating the possibilities offered by microfabrication and microfluidics. Fig. 2 shows the complementarity between the microtechnology and each of the steps of the analytical process, including some representative examples. Both microfabrication (micromachining) and microfluidics are inversely related to the degree of complexity in the analytical chemistry process. Indeed, while microfabrication plays a preminent role in separation and detection

systems, physical control of the process has a prominent role in all steps of sample preparation. In addition, the microfabrication required in sample preparation is very sophisticated.

Two other intrinsic characteristics of analytical microsystems have clear connections to technological developments:

- the extremely low sample volumes used; and,
- the presence of laminar flows.

Small volumes of both sample and reagent (pL–nL) are representative of most miniaturized systems. This characteristic has clear advantages associated with cost and analytical throughput, but it also has disadvantages,

**Figure 2.** Complementarity of microfabrication and microfluidics, corresponding to the main steps in the analytical process.

such as the suitability of detection techniques. Consequently, much research effort has focused on developing miniaturized and sensitive detection units [8], and detection improvements are still one of the most important focuses of research [9]. As a consequence of the low volumes required, very precise sample handling is crucial in microanalytical systems and greatly depends on the surface properties of microchannel manifolds and interconnections and dead volumes [5]. Complex fluid manipulation at fL and nL scales is readily achieved without any mechanical valves or external pumps by using electrokinetic phenomena [10]. In this way, the focus has been centered on integrating functional components within monolithic systems using both lithography and micromolding technologies. Micropumps are other typical devices used to propel fluids in microchannels [11]. A more sophisticated approach was proposed by Anderson [12], who presented a combined atomic force microscope (AFM) and Raman spectrometer as a microfluidic device for pumping, sampling and trace-chemical analysis.

The miniaturization of valves for microfluidics [13] or setting up a miniaturized lab-on-valve system [14] constitute additional tools for fluid manipulation in microchips. The main examples of integrated processing within microfabricated devices have been directed at linking analytical principles (i.e. detection and separation, reactors, and microcircuit design).

As already mentioned, miniaturization is more than simply scaling down well-known systems. The relative importance of forces and processes changes with scale. Thus, as a consequence of their miniaturized scale, analytical microsystems also feature laminar flow (Reynolds numbers are typically very low), where viscous forces dominate inertial forces. It means that turbulence is often unattainable and the transport of molecules is only by diffusion, which has direct consequences for the design of this type of microsystem. It constitutes one of the most attractive features, since, in most analytical microsystems, the diffusion process is very fast, as diffusion effects are inversely proportional to the square of the length. As we will discuss later, this will be especially relevant during sample preparation. However, the ability to process raw samples efficiently (as in classical laboratory tests, directly from the body of a person or an animal, or in field tests), and subsequently to perform the required analytical operations "on-chip" will be a key aspect in the eventual success of microfluidic systems [15,16].

Whereas the above points are specific to μ -TAS, there are other general requirements, from an analytical point of view, for an approach to miniaturization to succeed:

- (i) The analytical microsystems developed must be close to real world demands (the objective is to solve analytical problems). Just one of the main challenges of analytical microsystems is dealing with the *real world interface*. That means to understand the information

needs of the client (identification of the problem and its translation to an analytical level), which is a general challenge of any analytical work. But, more important for microsystems, to assure the representativeness of the results through an appropriate sampling plan and suitable method of analysis at the particular miniaturized level. This includes, achieving the selective and sensitivity requirements through sample treatment and separation/detection.

In addition, analytical microsystems offer a significant decrease in costs, by dramatically reducing the volume of samples and reagents that are needed to perform a chemical analysis. This feature also opens up the possibility of processing samples in parallel, which is very useful when the same chemical analysis must be performed many times, as it is the case of routine laboratories. This approach is very useful when high throughput screening is needed. In conventional analyses, many times handling and processing of the sample is, at least in part, done manually and often in specialized laboratories. However, μ TAS allows bring the chemical analyses close to the place where they need to be performed, independently of both laboratory and laboratory personnel. Thus, these integrated analytical systems are very suitable for on line measurements.

- (ii) Performance of the analytical microsystems, must be reliable in order to be coherent with the present quality assurance requirements in analytical laboratories. In this respect, aspects related to the calibration and the validation of the methodologies carried out by the analytical microsystems must be taken into account. As the final objective will be the analysis of real samples, the rational approach for the validation of such a method has to be performed using real samples, for which the application of the method is intended.

3. Strengths and weaknesses

We have chosen the different steps in the analytical process as the basis for discussing the challenges of analytical microsystems, and for evaluating the main strengths (advantages) and weaknesses (disadvantages) at each step. Taking into account the natural development of μ -TAS, we will first discuss the main challenges in detection and separation, and then those involved in sample preparation. We will present a brief, critical overview of the role of the most relevant analytical applications, in order to end by proposing the main highlights for the future of μ -TASs. In the subsequent sections, we will also discuss the main achievements for each analytical step (laser-induced fluorescence (LIF)

and electrochemical detection (ED) in detection, capillary electrophoresis (CE) microchips in separation, and derivatization in sample preparation). We will include other recent advances that have had less development.

3.1. Detection techniques

Detection has been one of the main challenges for analytical microsystems, since very sensitive techniques are needed as a consequence of the ultra-small sample volumes used in micro environments. In principle, a wide variety of detection options can be used in microfluidic systems [17]. LIF was the original detection technique and it is the detection scheme used most in CE microchips because of its inherent sensitivity [8,9], resulting from the ease of focusing. This characteristic, together with the fact that molecules of biochemical relevance are fluorescent in many cases, is an important reason for the wide use of LIF in microfluidics. LIF is now a standard detection technique for microchip separation [9]. However, the high cost and the large size of the instrumental set-up of LIF are sometimes incompatible with the concept of μ -TAS. Also, tedious derivatization schemes are needed to use LIF with non-fluorescent compounds. The most important alternative to LIF is, without doubt, ED, which is very important because of its inherent miniaturization without loss of performance and high compatibility with microfabrication techniques. Other advantages include high sensitivity, response independent of optical path length or sample turbidity, and low power requirements. Confirmation of the preminent role of ED is publication of excellent reviews [18–21] and others papers [22–26].

The main challenge in coupling CE and ED has been the conflict between the high voltages used in the electrophoretic separation and the detection potential used. However, this drawback does not apply at the micro scale. Three strategies have been employed for ED: end-channel; in-channel; and, off-channel.

In end-channel ED, the electrode is placed just outside the separation channel; that involves alignment of the electrode. Separation voltage has minimal influence on the potential applied in the electrochemical detector because the most of the voltage drop is across the channel.

For in-channel ED, the electrode is placed directly in the separation channel, and that involves placing the working electrode directly within the separation channel using an isolated potentiostat.

Off-channel ED involves using a decoupler to ground the separation voltage before it reaches the detector. Electrode placement in off-channel detection is similar to that in in-channel detection, but the separation voltage is isolated from the amperometric current using a decoupler. Conceptually speaking, the decoupler effectively shunts the separation voltage to ground and a field-free region is created where analytes are pushed

past the electrode by the electroosmotic flow (EOF) generated prior to the decoupler. Since no decoupler is necessary, end-channel configurations offer the following advantages: simplicity; ruggedness; feasibility for electrode replacement; and, microfabrication facilities are not strictly required. However, the main drawbacks are alignment of the electrode with the outlet of the channel and the loss of separation efficiency, due to the distance between the end of the channel and the working electrode. This separation distance is also crucial for the signal-to-noise ratio obtained and can lead to a complete loss of the analytical current. In both in-channel and off-channel configurations, the analytes migrate over the electrode while they are still confined to the channel, thus eliminating the band broadening often observed with end-channel alignments. However, in these two configurations, microfabrication facilities are usually needed and, in addition, the nature of on-chip miniaturized electrodes limits the ability to modify the electrode surfaces and to clean their surfaces periodically.

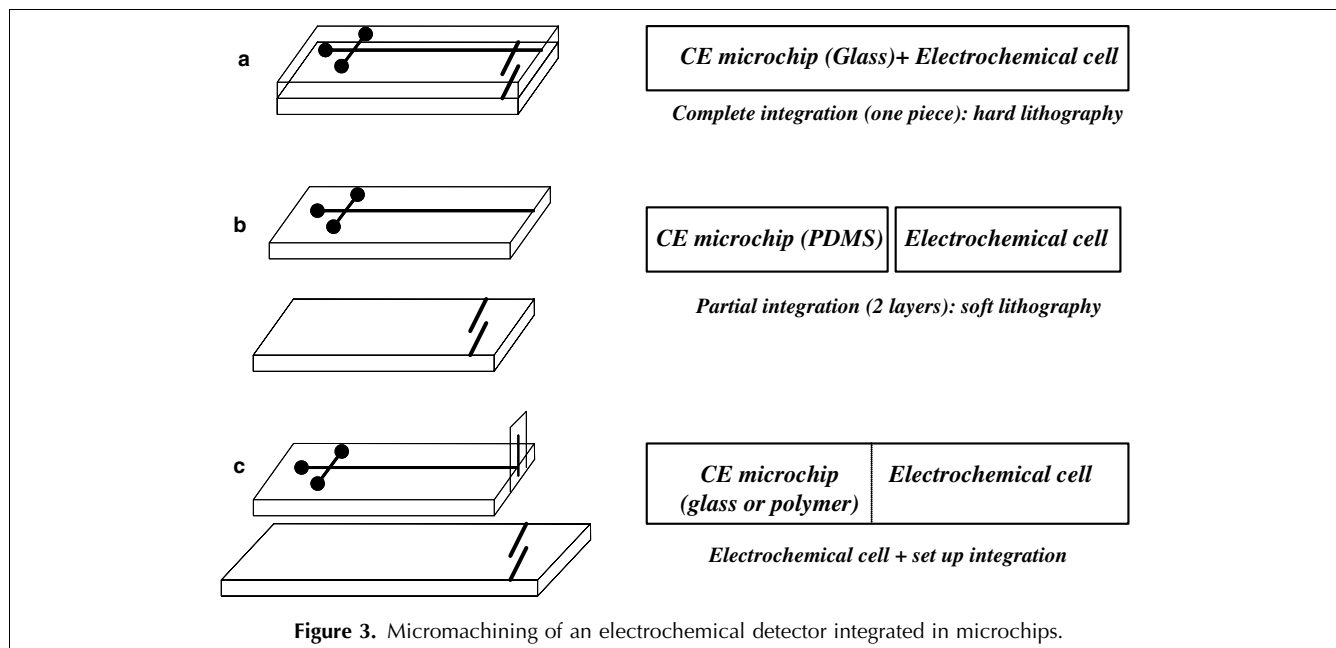
Conductimetric detection has been developed on microfabricated devices. It constitutes an important option for detection in analytical microsystems. In comparison to amperometry, conductimetric detection is less sensitive, but it is a universal detection technique that has been applied in CE microchips, either in the galvanic mode (with a pair of electrodes placed in the separation channel to measure liquid impedance) [27,28] or the contactless mode (no contact between the pair of electrodes and separation channel solution) [29–32].

Contactless conductimetric detection is preferred for three main reasons:

- (i) the electronic circuit is decoupled from the high voltage applied for separation (no direct DC coupling between the electronics and the liquid in the channel);
- (ii) it avoids the formation of glass bubbles at the metal electrodes; and,
- (iii) it prevents electrochemical modification or degradation of the electrode surface.

Both contact and contactless detectors, when integrated into a microchannel, require physical connection to read-out electronics placed inside or even outside the microdevice. Conductimetric designs are often very sophisticated and microfabrication facilities are required; however, simple, easy alternatives have also been proposed, involving the deposition of conducting electrodes on just the cover plate of microchips, thus avoiding the need for a clean-room laboratory infrastructure and showing significant advantages over the other approaches because of their simplicity [29].

As already mentioned, the inherent strength of ED is its compatibility with miniaturization (without loss of performance), with advantages in microtechnology requirements (microfabrication facilities). It also differs



from LIF, for which only one set-up is possible. Possibilities for implementing ED include (see Fig. 3):

- analytical configurations completely integrate the electrochemical cell in the separation system (hard lithography);
- partial integration, in which the separation system is microfabricated in one layer using soft lithography and ED was previously deposited in another layer; and,
- partial integration of the electrochemical cell (reference and auxiliary electrodes) with the separation system allows the working electrode to be replaced.

Apart from LIF and ED, there are other approaches to detection for analytical microsystems but, being realistic, they are developed to a lesser extent than those discussed above. All of them have been the focus of a very interesting investigation (e.g., integrated ultraviolet (UV) or visible-light-absorption detectors have also been attempted on microchips [33]).

Thermal lens microscopy (TLM) in combination with microchips has been demonstrated to have interesting analytical potential [34]. TLM is one of the most powerful absorption microspectrometries, and its sensitivity is comparable to LIF. TLM can be applied to both fluorescent and non-fluorescent analytes, thus extending its versatility. Typical applications of microchip-TLM include extraction, immunoassay, flow injection, enzymatic assay, in vitro bioanalysis and CE methods [34]. Complicated (bio)chemical processes can also be carried out by microchip-TLM [35]. Although the evolution of TLM microsystems has been impressive, the non-miniaturized environment, the sophistication and the cost of such instruments are their main disadvantages.

Relevant challenges in coupling detection techniques focus on the interfaces, since they might make the

microflows from microsystems compatible with the flow requirements of the detection unit. Mass spectrometry (MS) or inductively coupled plasma (ICP) are typical examples of these exciting approaches to detection systems in analytical microsystems. MS, as one of the most powerful detection and identification techniques, has been successfully interfaced with microdevices, really showing the possibilities of the corresponding microchips from a practical point of view [33].

Some attempts have also been made to devise an interface between a chip and electrospray ionization (ESI) [9].

Some reports have described efficient sample introduction into the mass spectrometer. However, the size and the price remain challenge for widespread use.

A very interesting new interface between microchip CE and ICP spectrometry for metal speciation has been reported [36,37], opening up new applications involving inorganic analytes.

3.2. Separation techniques

The potential benefits of miniaturization were quickly applied to separation techniques. with miniaturized separation systems currently divided into column and chip types [38]. The column type relates to miniaturization of chromatographic column systems, whereas, in chip types, the separation is performed in a channel of a chip device.

The column type includes micro-HPLC and nano-HPLC [39], whereas the chip type relates more to μ -TAS. As mentioned above, diffusion effects are very fast in micro environments and have a direct advantage in separation techniques, since the reduction of the size of

microchannels accelerates sample-stationary phase equilibria. In general, miniaturized separation techniques, such as chromatography, electrophoresis and electrochromatography have great advantages over those on a conventional scale. The decrease in scale provides very rapid separations, versatile channel designs, very small sample volumes and low reagent consumption. The greater molecular interaction also makes the chemical process highly efficient [33,40–42].

CE was one of the earliest examples of μ -TAS, and constitutes one of the most representative examples of analytical microsystems. Using CE microchips, analysis times can be reduced to seconds and extremely high separation efficiencies can be achieved. Over the past decade, the most active field (as judged by outputs in the form of publications) of analytical microsystem development has been in transferring from conventional separation techniques (macro scale) to planar chip formats. Therefore, without doubt, CE microchips have a preeminent role in all miniaturization fields. To understand the significance of micro-CE in miniaturized environments, we need to keep in mind the synergetic nature of the combination depicted in Table 2. As can be observed, it involves features derived from analytical performance:

- (a) the simultaneous assay of hundreds of samples in a matter of minutes or less;
- (b) rapid analysis combined with massively parallel analytical arrays, which should yield ultrahigh throughput;
- (c) the low volume of sample needed (pL), potentially prepared on-board for complete integration of sample preparation and analysis function (i.e., derivatization).

However, the synergetic combination conceptually involves those features derived from important aspects of miniaturization. That means it is easy to microfabricate a network of channels using materials whose chemistry is well known. These channels exhibit good EOF and make it possible to use electrokinetic phenomena to move fluids, namely valveless micro devices, and subse-

quently increase their analytical possibilities. Since electrokinetics is easily applied (just a pair of electrodes is needed), EOF-driven flow has been successfully implemented using different types of materials in channel manufacture, glass being the most commonly used. Microfabrication on polymers is faster and cheaper than on glass, so these materials have great possibilities for mass production. In contrast, the glass chip offers the best EOF and chemical modification on microchannel surfaces is better known and easier than on polymers. These features offer great versatility in chemical analysis. Of the two major polymers used on chip, PDMS and PMMA, both present good optical transparency and low EOFs. However, PDMS can be oxidized in a plasma discharge, which produces PDMS with EOFs similar to glass. Furthermore, as PDMS is an elastomer, the process of bonding substrate to the cover plate is easier, even though reversible or irreversible bonding (by oxidation in a plasma discharge) can be chosen. PDMS is now overtaking PMMA in use on microchips. Another important advantage is the possibility of obtaining disposable CE microchips [43]. In addition, micro-CE has shown distinct advantages compared to conventional CE, such as reduced analysis times and extremely high separation efficiencies. Indeed, theory indicates that analysis times can be reduced by reducing channel length or increasing separation voltage [42].

Many of the benefits of CE microchips already commented upon could be equally applied to downsized chromatographic techniques; however, the literature covers relatively few examples of chip-based chromatographic instruments compared with chip-based CE devices, even if the analytical instrumentation on chip was first a gas chromatograph [44] and later a liquid chromatograph [45]. However, this is not surprising because CE is almost perfectly suited to miniaturization. Also, the miniaturization of chromatographic systems involves some technical challenges, such as microfabrication of valves and pumps, which are not generally required in CE. However, early on-chip LC examples showed the potential advantages that miniaturization could provide [45]. These advantages included superior efficiency when compared to conventional LC, easy positioning of detection cells and low unit cost. In addition, the use of an open-tube system instead of a normal packed column was deemed advantageous due to the shorter analysis times and low pressure drops for a given performance. The common alternatives of using packed and tubular LC columns at the conventional scale have also been transferred to the micro scale. Although packed columns may be desirable, the introduction of the stationary phase material into microfabricated channels is not a trivial process. Frits must be fabricated within the channel structure to retain the packing, and a high-pressure interface must be applied between the chip and an external pump. In addition, due to the reduced

Table 2. Complementarity of CE analytical performance and miniaturization & technological developments as key reasons of dominance of CE microchips over chromatographic techniques

CE ANALYTICAL PERFORMANCE

- Rapid analysis
- High or very high sample throughput
- Very small volumes of samples
- Integration
- Separation efficiency remains or increases as the scale decreases

MINIATURIZATION AND TECHNOLOGICAL DEVELOPMENTS

- Easy fabrication of network microchannels (miniaturization)
- The chemistries of glass and polymers (PDMS and PMMA) are well known
- Existence of electroosmotic flow (EOF) (glass and polymers)
- Ease of use of electrokinetic phenomena (valveless)

size of the channel, the packing process is difficult to carry out, and can often lead to non-uniform particle density at channel walls, hence reducing separation efficiencies. Consequently, the majority of the first on-chip chromatographic methods employed a tubular approach [42]. The difficulties associated with packing microfabricated channels can be eliminated if the packed bed is replaced by a porous bed formed from organic monomers by in situ polymerization. Forming beds is easy, since a low-viscosity monomer solution can be introduced by vacuum or pressure into microfluidic channel prior to the start [46]. It is important to note that, this way, electrically-driven chromatographic separations are especially attractive within chip-based systems, due to a lack of pressure gradients and reduced fabrication complexity. Due to the fact that mobile phase is running by electroosmosis, the flat flow profile significantly reduces band-broadening compared to conventional LC methods.

Since, as stated above, one of primary advantages associated with micromachining analytical instrumentation is the ability to facilitate the processing or fabrication of structures that are extremely difficult or even impossible to create on the micro scale, the main trend is in this direction. The concept, which can be thought as in situ micromachining, involves creating micron-sized, particle-support structures on the surface of a planar wafer [47,48]. This line of research has started, and it opens up exciting new analytical possibilities.

3.3. Sample preparation

One of the first approaches to miniaturization in sample treatment can be identified as the use of micro devices of units for performing non-chromatographic or non-electrophoretic separation techniques in sample treatment [49] (e.g., the use of solvent micro-extraction, also known as liquid-phase micro-extraction (LPME), or solid-phase micro-extraction (SPME) procedures). This facet of the miniaturized sample treatment is not the subject of this article and will be only commented upon when integrated in μ -TASs.

As stated above, most advances have been made on separation and detection schemes. However, many of the necessary analytical steps (e.g., sampling and sample pre-treatment) are still performed outside the chip, so there have been significant efforts in this direction in the past few years. Thus, some excellent reviews have focused on this topic [50,51]. Although miniaturization of sampling and sample pre-treatment are less developed than for separation and detection, potentially it has a very exciting future. The combination of two important aspects underlines this statement: the possibility of designing complex lay-outs in the presence of fast diffusion (static transport) and simplicity in applying electrokinetics (directed transport). Table 3 lists the main strengths and weaknesses in integrating sample prepara-

Table 3. Strengths and weaknesses in integrating sample preparation in analytical microsystems

(A) MAIN TECHNOLOGICAL SUPPORTS
Microfabrication (lay-outs)
Microfluidics (fast diffusion and electrokinetics)
(B) MAIN STRENGTHS
Derivatization schemes successfully introduced (pre-column and post-column strategies/LIF and Electrochemical)
(C) MAIN WEAKNESSES (challenges)
Miniaturization of some components
Direct analysis of real samples
Representativeness of the portion of sample analyzed
Sampling and sample introduction into the microsystem
Changes in samples within a set of analysis

tion in analytical microsystems, and is the basis of the discussion in this section. Although microfabrication and microfluidics are very well adapted to many sample-preparation steps, several challenges remain, such as miniaturization of components, direct analysis of raw samples, sampling and sample introduction. However, good knowledge of microfluidics in connection with the possibility of creating sophisticated lay-outs can be drawn on as the main technological strengths. In addition, derivatization schemes in different formats, using the well-known types of detection (LIF and ED) have been introduced successfully [8,19,41].

3.3.1. Sample treatment. Filtration, extraction or pre-concentration (including clean-up in some cases) and derivatization are the most common analytical operations carried out in sample preparation. Prior sample filtration is probably the most essential step for analyses using microfluidic systems. Raw samples and other previously treated samples (in aqueous media) require basic filtration before analysis. Due to the small dimensions of typical microstructures, particulates can cause serious operational problems through blockage. The simplest solution is to filter reagents and samples before introducing them. It is therefore desirable to integrate a sample-filtration system on-chip before the analysis stage. For this, two approaches have been employed: structurally-based filters (controlled by manufacturing process); and, diffusion-based filtration (controlled with diffusion). Structurally-based or microfabricated filters have been proposed in common components, such as frits, pillar structures or flow restrictors within fluidic channels that mimic conventional filters [52], or H-filters (i.e. structures that have been used most in diffusion-based filtration [53]). Filtration can be induced by allowing the analytes of interest to migrate across a laminar boundary (between a sample stream and a solvent stream) while unwanted heavier particulates are retained in the original fluid stream (namely H-filter,

Fig. 2). It is very important to underline that both approaches derive essentially from miniaturization. The first does so because of the well-known technology integrating multiple micropieces into a single micro-device; whereas the second one, H-filter, does so because it works on the basis of laminar flow, which is an inherent property of microfluidics. However, the limit of structurally-based filters is the limit of resolution of the manufacturing process, while the great advantage of the H-filter is that all the process is controlled by physics, although very sophisticated technology is also required.

Liquid-liquid extraction (LLE) could play a preeminent role in miniaturized systems. The high surface-to-volume ratios and the short diffusion distances, typical of microfluidic environments, combined with laminar flow conditions, offer the possibility of performing LLE within micro channels without the need for agitation. The main challenge is to induce appropriate EOFs when common organic solvents are used. The few examples found in the literature have also employed H-filter strategies [53].

Two approaches to performing solid-phase extraction (SPE) in microfluidics have been proposed:

- coating channel walls with a high affinity stationary phase; and,
- packing the microchannels with the same material as the stationary phase [42,50,51].

The advantages and disadvantages of each are clearly defined in miniaturized environments. Coating-channel approaches depend on the available surface area for interaction and, consequently, in micron-sized channels, the contact surface is very small. A simpler way to increase the surface area is to pack the microchannels with stationary phase; however, the packing process is not easy, so it is often avoided.

A very attractive possibility, compatible with miniaturized dimensions, is to replace conventional stationary-phase materials by a continuous porous bed formed in situ by polymerizing organic monomers. The process of bed formation is easy, since a low-viscosity monomer solution can be introduced by vacuum or pressure into the microfluidic channel before starting [42,52]. An excellent paper has shown the power of integrating filtration, concentration, and separation on a microchip [54]. Filtration was performed in an array of seven thin channels (1 μm deep), which came together in one channel (5 μm deep). The input from the thin channels went into a sample reservoir and sample loading was carried out electrokinetically. Sample concentration was performed by SPE. The separation channel was coated with C18 particles (1.5–4 μm). Then, simply by increasing injection times, the analytes were retained and concentrated in the separation channel, being eluted with the appropriate solvent afterwards.

Field-amplified sample stacking is a common method for preconcentrating samples in electrophoretic systems.

However, its implementation in a chip platform is not easy. The initial difficulty associated with sample stacking in a microfluidic format is the control of the analyte zone during stacking and separation procedures. Often, relatively complex channel networks and voltage programs need to be used to stack the analyte zone [50,51].

Derivatization on microchip is well established in analytical microsystems. The rationale for this development could be traced to the traditional use of LIF as a sensitive detection system. Again, the role of microfabrication in the design of complex microcircuits offers an unique route in sample pre-treatment, especially in derivatization schemes, where the process is carried out before or after analyte separation and before analyte detection. In other words, the high degree of functional integration (reagent mixing, product separation and post-column labeling) provides an elegant example of the potential benefits of microfluidic systems. Derivatization schemes carried out prior to separation (pre-column) or immediately before detection (post-column) have been proposed using LIF and ED systems. Thus, derivatization in fluorescence has been well implemented in microchips for connecting with LIF detection [55]. Also, there have been reports of a number of works using an very attractive strategy based on the combination of ED with suitable pre-channel and post-channel lay-outs with bio-reagents, such as enzymes and antibodies [56,57]. Importantly, in some cases, they are truly “lab-on-a-chip” devices [58,59]. In fact, the generation of electroactive products using selective bio-reagents, such as specific enzymes, class enzymes and antibodies in suitable pre-column and post-column derivatization scheme, has revealed the potential of these strategies for simplifying treatments of complex samples. This approach can be used for developing other sophisticated lay-outs for sample treatments when real samples are analyzed in these microsystems.

3.3.2. Sampling and sample introduction. Sample introduction and the representativeness of the small size of the sample introduced in microfluidic systems are two decisive aspects. Most chip-based systems still adopt a discrete, often manual, approach to on-chip sample loading and changing samples. Such practice greatly reduces the overall throughput and counteracts the advantage of achieving fast separations. On-chip loading and changing series of samples has become a limiting factor in real-world applications. Efficient assays of real-world samples will require continuous sampling (from the external environment) or rapid sampling of multiple discrete samples. The ability continuously to introduce real samples into micro environments should make analytical microsystems compatible with real-life applications. Different devices, based on pressure-driven [60–62], hydrodynamic [63] and autonomous polymer-loading [64] techniques, have been reported for sample injection.

Finally, one of the most important aspects to which attention needs to be paid is the continuous introduction of samples that require an interface system between the macro environment (μL – mL scale) and the microchip (nL – pL scale) in order to achieve an efficient sample change with low carry-over. That requires a suitable interface design, similar to that needed for hyphenated detection techniques. Although the literature is poor in papers dealing with this subject, various approaches have been proposed in excellent works. For example, using a microfluidic matrix device, sample introduction was performed through a wide-bored microchannel by drilling an access hole through the sample reservoir [65]; and the use of a sharp sample-inlet tip has been reported [66]. An excellent report dealing with trends in different configurations for sample-introduction interfaces has been written by Fang, including a critical appraisal of the different strategies used by his research group [67]. This report shows that the trend is to separate the sample-introduction channel (SIC) (with hydrodynamic flow) from the separation channel (with electrokinetic flow), thus totally avoiding pressure-driven flows. It was achieved by introducing a sample-loading channel (SLC) between the SIC and the separation channel. The SIC acts as a flow-through sampling reservoir and the sample is electrokinetically loaded into the SLC from the SIC. The SLC is connected to the separation channel. Moreover, this split-flow strategy was improved by a flow-through sampling reservoir featuring a guided overflow design. This array avoids Poiseuille flows, maintaining equal liquid levels for the sample, the buffer and the waste reservoirs. Also, fast, simple sample introduction has been reported [64]. It uses a sharp sample-inlet tip placed alternately in sample and buffer vials. This tip was fabricated by sharpening with a diamond saw the inlet side of the chip. Reproducibility was good (100 repetitive flow injection measurements resulted in a response with an RSD of 3.7%). Huang and Lee proposed an interesting contribution comprising micro-autosamplers for discrete sample injection and dispensing in microchips [68]. It is a promising approach towards realizing the μ -TAS concept.

4. Analytical applications

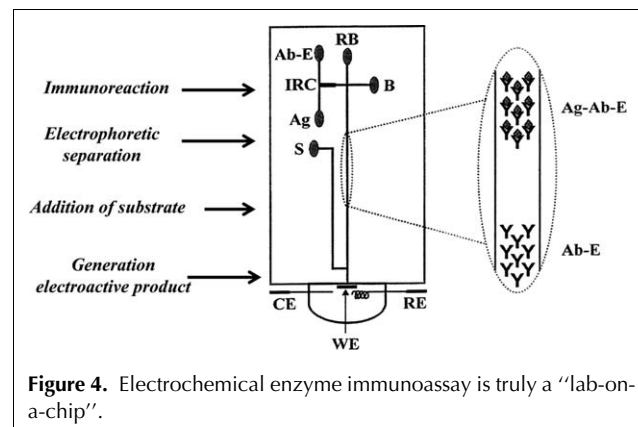
Good proof of the potential of analytical microsystems is given by the different applications reported in the literature. A complete summary of the most relevant recent applications can be found in the review of Manz and co-workers [4]. The majority of the analytical applications using microsystems involve CE, because of its well-recognized advantages, as mentioned above. In addition, since CE microchips involve the same principle as conventional CE, all applications proposed for conventional scale could in principle be potentially transferred to microchip format. An on-line keyword-specific search

involving microchip and relevant application for last five years resulted in more than 85% covering in bioanalytical and clinical, almost 10% on environmental and less than 5% on food/miscellaneous applications. We did not intend to cover all papers but rather tried to choose relevant examples of every distinct application.

Bioanalytical and clinical analyses have been the most popular fields of application of miniaturized systems [66,69–72]. Indeed, the birth of the μ -TAS of “lab-on-a-chip” concept is intimately linked to these areas because they are particularly suitable for use in decentralized analysis (“point-of-care-testing”). In addition, relevant molecules of clinical significance were compatible with the most suitable detection scheme (LIF), which has produced synergetic developments [8].

Microchips offer various possibilities for performing biochemical assays. The variety of analytes goes from biomolecules (in particular, proteins, peptides and nucleic acids) to small molecules, such as glucose. Also possible are additional assays, such as immobilized molecules, and integration of several analytical steps. ED has been shown to be a powerful tool for determining neurotransmitters, enzymes, antibodies, antigens, amino acids and glucose, among others [18,20].

Since selectivity and sensitivity could be a significant problem in real analysis, immunoassays and enzyme assays have a preminent role in bioanalytical microfluidics, as they cover a group of analytical methods with high analytical potential, due to the combination of their inherent selectivity (antigen-antibody reaction) with the high sensitivity of ED coupled with enzyme amplification. Thus, the literature shows some examples in which the real potential of the analytical microsystems can be corroborated. Fig. 4 shows a representative example. This “lab-on-a-chip” was the first electrochemical enzyme immunoassay using a microchip platform. It integrates immunoassay between antigen-antibody in the chamber, electrophoretic separation of the antigen-antibody complex from free antibody, addition of substrate using post-column derivatization and amperometric detection of the product [58]. All these analytical steps



are required to perform a conventional non-competitive immunoassay and were successfully transferred into microchip format. This example is also very representative, since it integrates the main strengths achieved by miniaturization: relevant bioanalytical/clinical application; biochemical reactions and derivatization (sample preparation); capillary electrophoresis (analyte separation); and, analyte detection (amperometry).

Taking into account demands of “green analytical chemistry”, environmental applications are one of the most significant analytical areas in which CE-ED microchips have a preeminent role. Since their wastes are inherently negligible, these microsystems are “environment friendly”. With them, chlorophenols, nerve agents, hydrazines, organic peroxides and explosives have been separated and detected using very fast protocols [19]. Very interesting analytical applications address the detection of a wide group of heterogeneous analytes, such carbohydrates, nerve agents, purines and phenolics, showing the potential of analytical microsystems [73–77].

There have been reports of good attempts at food analyses. A protocol for rapid measurements (within 5 min) of four phenolic acids by CE microchip on glass with amperometric detection was applied to wine samples [77], and fast, simultaneous detection of prominent natural antioxidants, involving flavonoid and ascorbic acid in a pear sample, has been reported [78]. Another work leading to determination of catechins on dietary

supplements (nutraceuticals) uses a PDMS microchip and pulsed amperometric detection (PAD). This detection technique is very interesting because it can overcome problems associated with electrode fouling, thus allowing a larger number of continuous measurements [79].

As mentioned above, most analytical applications have focused on CE microsystems, apart of the earliest examples involving GC and LC [44,45], mentioned above. However, some applications of non-CE microsystems have been reported. GC was developed on an integrated silicon-based separation microsystem for neuroblastoma diagnosis [80], as well as a multi-channel HPLC microsystem for high-throughput analysis of peptides, which achieved sensitivity 10 times greater than and throughput twice conventional HPLC [81].

5. Conclusions and trends

Analytical microsystems constitute an important trend within analytical chemistry. The great number of scientific contributions published in this field gives good grounds for imagining that one of the next objectives will be dealing with applications issues and extending their use to bench level in laboratories.

Miniaturization presents different difficulties and problems in the different steps of the analytical process. Fig. 5 shows future directions for analytical microsystems. Detection schemes, such as LIF and ED

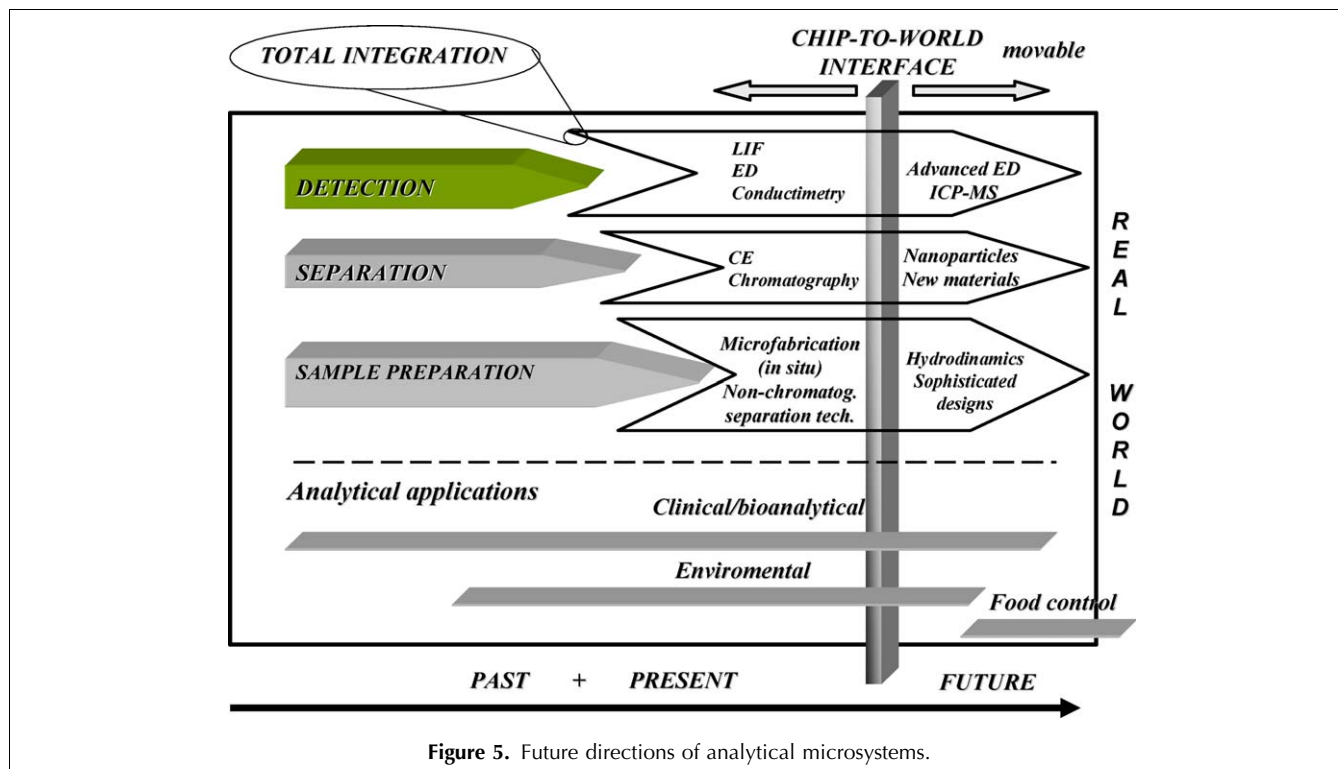


Figure 5. Future directions of analytical microsystems.

(amperometry), are well established in analytical microsystems; nevertheless, novel designs, especially in ED, are being developed.

Although MS was studied from the earliest times because it is a very powerful technique [82,83], its use in μ -TAS has not been widely proposed due to its size and price.

With respect to detection capabilities, LIF and amperometry are not very suitable for small molecules, including inorganic species. Other detection schemes, such as conductivity, ICP-atomic emission spectrometry (AES) or ICP-MS, are necessary, so research on new detection systems for analytical microsystems is still going on. The use of TLM for detection and imaging studies with microchips will also open up interesting new possibilities.

Separation on chips has mainly developed using CE, which constitutes the most representative example of μ -TAS. In micro-separation, new tools will be developed, such as the design of new analysis schemes and strategies, including the use of nanoparticles, employment of specially designed polymers and new cover materials.

Sample preparation at the micro level has been developed less than both detection and separation. In general, some of the most relevant prospects for "lab-on-a-chip" devices, such as integration of all laboratory functions in order to get practical sample treatments, and commercialization of truly hand-held and easy to use devices, are coming, but are not yet a reality. However, the possibilities of using electrokinetics to direct fluid transport, and creating suitable lay-outs to tackle problems, as well as the newly developing possibilities arising from the laminar flow, allow one to foresee future developments that are fast becoming a reality.

Total integration and, especially, world-to-chip interfacing are considered the major challenges, particularly in high-throughput applications requiring frequent sample change, such as on-line continuous process monitoring. More specifically, various world-to-chip interfacing schemes are being developed to suit different requirements of samples and microfluidic chips, in terms of sampling rate, sample introduction, sample consumption, precision, stability and degree of automation. Two clear trends are the development of more integrated, rugged, portable and fully automated sample-introduction systems, and systems based on various hydrodynamic principles outside electrokinetics.

However, as can be seen in Fig. 5, a basic trend with respect to analytical applications is exploration of the possibilities of these microsystems in other important analytical areas, ranging from medical diagnosis and pharmaceutical screening to food and environmental control. This expansion in applications can be fulfilled only by versatile, highly sophisticated analytical devices. However, further integration of sample collection and sample preparation will be necessary to improve the

interface between the "lab-on-a-chip" and the world in order to reach the goal of "total integration".

In summary, the first "lab-on-a-chip" devices are working, and, in future, more sophisticated generations will become a new reality in analytical laboratories.

Acknowledgement

Financial supports from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2004-02362), Ministry of Science and Technology (BQU 2002-01116) and JC Castilla-La Mancha (PAC05-001-1) are gratefully acknowledged.

References

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 244.
- [2] S. Alegret, *Integrated Analytical Systems*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2003 Chapter 1.
- [3] J.P. Kutter, O. Geschkes, in: O. Geschkes, H. Klank, P. Telleman (Editors), *Microsystems Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004, p. 213.
- [4] T. Vilknér, D. Janásek, A. Manz, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3373.
- [5] P.A. Greenwood, G.M. Greenway, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 726.
- [6] B.H. Weigl, R.L. Bardell, C.R. Cabrera, *Adv. Drug Del. Rev.* 55 (2003) 349.
- [7] O. Geschke, H. Klank, P. Telleman (Editors), *Microsystems Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2004.
- [8] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *Lab Chip* 1 (2001) 1.
- [9] K. Uchiyama, H. Nakajima, T. Hobo, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 375.
- [10] L. Szekely, R. Freitag, *Electrophoresis* 26 (2005) 1928.
- [11] P. Woias, *Sens. Actuators, B* 105 (2005) 28.
- [12] M.S. Anderson, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2907.
- [13] D.B. Weibel, M. Kruithof, S. Potenta, S.K. Sia, A. Lee, G.M. Whitesides, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4726.
- [14] H. Erxleben, J. Ruzicka, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5124.
- [15] M.A. Burns, B.N. Johnson, S.N. Brahmasandra, K. Hanique, J.R. Webster, M. Krishnan, T.S. Sammarco, P.M. Man, D. Jones, D. Heldinger, C.H. Mastrangelo, D.T. Burke, *Science* (Washington, DC) 282 (1998) 484.
- [16] E.T. Lagally, I. Medintz, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 73 (2001) 565.
- [17] K.B. Mogensen, H. Klank, J.P. Kutter, *Electrophoresis* 25 (2004) 3498.
- [18] W.R. Vandaveer IV, S.A. Pasas, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 23 (2002) 3667.
- [19] J. Wang, *Talanta* 56 (2002) 223.
- [20] J. Tanyanyiwa, S. Leuthardt, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 23 (2002) 3659.
- [21] A.J. Blasco, A. Escarpa, in: M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Editors), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2005, p. 703.
- [22] R.S. Keynion, T.J. Roussel Jr., M.M. Crain, D.J. Jackson, D.B. Franco, J.F. Naber, K.M. Walsh, R.P. Baldwin, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 95.
- [23] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, *Anal. Chem.* 76 (2004) 298.
- [24] Y. Liu, J.A. Vickers, C.S. Henry, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1513.
- [25] N.A. Lacher, S.M. Lunte, R. Scott Martin, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2482.

- [26] P. Ertl, C.A. Emrich, P. Singhal, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3749.
- [27] R.M. Guijt, E. Baltussen, G. van der Steen, R.B.M. Schasfoort, S. Schlautmann, H.A.H. Billiet, J. Frank, G.W.K. van Dedem, A. van den Berg, *Electrophoresis* 22 (2001) 235.
- [28] M. Galloway, W. Stryjewski, A. Henry, S.M. Ford, S. Llopis, R.L. McCarley, S.A. Soper, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2407.
- [29] M. Pumera, J. Wang, F. Opekar, I. Jelinek, J. Feldman, H. Löwe, S. Hardt, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1968.
- [30] J. Wang, M. Pumera, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5919.
- [31] J. Wang, G. Chen, A. Muck Jr., *Anal. Chem.* 75 (2003) 4475.
- [32] X. Bai, Z. Wu, J. Josseland, H. Jensen, H. Schafer, H.H. Girault, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3126.
- [33] C.P. Palmer, V.T. Remcho, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 35.
- [34] T. Kitamori, M. Tokeshi, A. Hibara, K. Sato, *Anal. Chem.* 76 (2004) 52A.
- [35] M. Goto, K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, T. Kitamori, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2125.
- [36] Q.J. Song, G.M. Greenway, T. McCreedy, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1.
- [37] Q.J. Song, G.M. Greenway, T. McCreedy, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 883.
- [38] M. Szumski, B. Buszewski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 1.
- [39] J.P. Chervet, M. Ursem, J.P. Salzmann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1507.
- [40] V. Dolnik, S. Liu, S. Jovanovich, *Electrophoresis* 21 (2000) 41.
- [41] G.J.M. Bruin, *Electrophoresis* 21 (2000) 3931.
- [42] A. de Mello, *Lab Chip* 2 (2002) 48N.
- [43] S.A. Soper, S.M. Ford, S. Qi, R.L. McCarley, K. Kelly, M.C. Murphy, *Anal. Chem.* 72 (2000) 643A.
- [44] S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, *IEEE Trans. Electron Devices* 26 (1979) 1880.
- [45] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyage, K. Sato, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 249.
- [46] F. Svec, J.M.J. Frechet, *Anal. Chem.* 64 (1992) 820.
- [47] B. He, N. Tait, F. Reignier, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 925.
- [48] B. He, N. Tait, F. Reignier, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3790.
- [49] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119.
- [50] J. Lichtenberg, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, *Talanta* 56 (2002) 233.
- [51] A.J. de Mello, N. Beard, *Lab Chip* 3 (2003) 11N.
- [52] B. He, L. Tan, F. Reignier, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1464.
- [53] B.H. Weigl, P. Wager, *Science* (Washington, DC) 283 (1999) 346.
- [54] B.S. Broyles, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2761.
- [55] A.G. Hadd, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5206.
- [56] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5774.
- [57] J. Wang, M.P. Chatrathi, A. Ibáñez, A. Escarpa, *Electroanalysis* (NY) 14 (2002) 400.
- [58] J. Wang, A. Ibáñez, M.P. Chatrathi, A. Escarpa, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5323.
- [59] J. Wang, A. Ibáñez, M.P. Chatrathi, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8444.
- [60] M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaki, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 337.
- [61] D. Solignac, M.A.M. Gijs, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1652.
- [62] N.Y. Lee, M. Yamada, M. Seki, *Anal. Sci.* 20 (2004) 483.
- [63] U. Backofen, F.M. Matysik, C.E. Lunte, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4054.
- [64] T. Ito, A. Inoue, K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4759.
- [65] C. Lin, G. Lee, S. Chen, *Electrophoresis* 23 (2002) 3550.
- [66] G. Chen, *J. Wang, Analyst* (Cambridge, UK) 129 (2004) 507.
- [67] Q. Fang, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 49.
- [68] C.-W. Huang, G.-B. Lee, *Electrophoresis* 26 (2005) 1807.
- [69] Y. Liu, C.D. García, C.S. Henry, *Analyst* (Cambridge, UK) 128 (2003) 1002.
- [70] K. Huikko, R. Kostianen, T. Kotiaho, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 149.
- [71] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 556.
- [72] P.G. Righetti, *Electrophoresis* 25 (2004) 2111.
- [73] J. Wang, J. Zima, N.S. Lawrence, M.P. Chatrathi, A. Mulchandani, G.E. Collins, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4721.
- [74] J. Wang, G. Chen, A. Muck Jr., D. Shin, A. Fujishima, *J. Chromatogr., A* 1022 (2004) 207.
- [75] J. Wang, G. Chen, M. Wang, M.P. Chatrathi, *Analyst* (Cambridge, UK) 129 (2004) 512.
- [76] H. Lee, S. Chen, *Talanta* 64 (2004) 210.
- [77] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, *J. Chromatogr., A* 1049 (2004) 189.
- [78] A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, *Electrophoresis* 26 (2005) 4664.
- [79] R.W. Hompesch, C.D. García, D.J. Weiss, J.M. Vivanco, C.S. Henry, *Analyst* 130 (2005) 694.
- [80] L. Lorenzelli, A. Benvenuto, A. Adami, V. Guarnieri, B. Margesin, V. Mulloni, D. Vincenzi, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 1968.
- [81] Y. Shintani, K. Hirako, M. Motokawa, T. Iwano, X. Zhou, Y. Takano, M. Furuno, H. Minakuchi, M. Ueda, *J. Chromatogr., A* 1073 (2005) 17.
- [82] S. Benetton, J. Kameoka, A.M. Tan, T. Wachs, H. Craighead, J.D. Henion, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6430.
- [83] N. Sillon, R. Baptist, *Sens. Actuators, B* 83 (2002) 129.

Review

Real sample analysis on *microfluidic* devices[☆]

Agustin González Crevillén, Miriam Hervás, Miguel Angel López,
Maria Cristina González, Alberto Escarpa*

Department of Analytical Chemistry and Chemical Engineering, University of Alcalá,
E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received 28 June 2007; received in revised form 27 September 2007; accepted 1 October 2007

Available online 18 October 2007

Abstract

This review covers the state of the art of the analysis of real (or non-ideal) samples on *microfluidic* devices. A real sample analysis performed on *microfluidics* conceptually involves the complete integration of sample preparation, analyte separation, and detection on these platforms. Different “lab-on-a-chip” approaches have emerged in relevant application areas such as clinical, environmental, and food analysis which will be critically illustrated and discussed with respect to the strengths and weakness found. Likewise, the main challenges and perspectives will also be commented on.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Microfluidics*; Lab-on-a-chip; Real sample analysis; Clinical; Environmental; Food samples

Contents

1. Introduction	342
2. Real clinical sample analysis on <i>microfluidics</i>	344
3. Real environmental and related sample analysis on <i>microfluidics</i>	349
4. Real food sample analysis on <i>microfluidics</i>	351
5. Conclusion and future prospects	355
Congratulations	355
Acknowledgments	355
References	356

1. Introduction

The micro total analysis system (μ -TAS) concept, later called “lab-on-a-chip,” was developed from the modification of the total analysis system (TAS) approach by downsizing and integrating its multiple steps (injection, reaction, separation, and detection) onto a single device, yielding a sensor-like system with a fast response time, low sample consumption, on-site operation, and high stability [1].

Miniaturization is more than simply the scaling down of well-known systems since the relative importance of forces and processes changes with scale. One of the most relevant characteristics of analytical microsystems is the omnipresence of laminar flow (Reynold’s number are typically very low), in which viscous forces dominate over inertia. This means that turbulence is often unattainable and that molecule transportation only occurs through diffusion, which has direct consequences on the designs of this type of microsystem. The other relevant feature is the possibility of handling fluidics on the nanoliter and even picoliter scale, which has widened the scope of micro-TAS to now be called *microfluidics*. *Microfluidics* is the science and technology of systems that process or manipulate small amounts of fluidics (10^{-9} to 10^{-18} L), using channels measuring from tens to hundreds of micrometers [2,3]. For this reason,

[☆] Published in Honor of Professor Joseph Wang’s 60th Birthday.

* Corresponding author.

E-mail address: alberto.escarpa@uah.es (A. Escarpa).

the term *microfluidics* better covers the research and emphasizes the strong impact miniaturization and integration have on the fluidics and chemical engineering of analytical microsystems.

Microfluidics in analytical chemistry can be seen as different analytical microsystems developed according to the analytical objectives clearly based on sample complexity and selectivity criteria [4]: (i) the direct measurement of one or a few components with little or no sample preparation ((bio) sensors, probe-type sensors, flow-through sensors, and microsensors); (ii) the measurement of one or a few components which require some treatment of the sample (μ FIA); (iii) the analysis of more complex samples involving the separation of their components (μ -HPLC and μ -CE).

Parallely, and in connection with this development, it is important to point out that not all analytical steps and/or microsystems are equally incorporated and the incidence level of miniaturization is not homogeneous. In fact, the detection and separation steps are the ones most investigated, whereas sample preparation is notably the least developed [5]. From the beginning, detection has been one of the main challenges for analytical microsystems, since very sensitive techniques are needed as a consequence of the ultra-small sample volumes used in micron-sized environments. In principle, a wide variety of detection alternatives can be used in *microfluidic* systems, but laser-induced fluorescence (LIF) and electrochemical detection (ED), primarily, along with mass spectrometry (MS) are the routes most commonly used. LIF was the original detection technique and it is the most often used detection scheme in CE microchips because of its inherent sensitivity [6]. However, the high cost and the large size of the instrumental setup for LIF are sometimes incompatible with the concept of μ TAS. In addition, tedious derivatization schemes are needed to use LIF with non-fluorescent compounds. The principal alternative to LIF detection is, without a doubt, ED. ED is very important because of its inherent miniaturization without loss of performance and its high compatibility with microfabrication techniques. Likewise, it possesses high sensitivity, its responses are not dependent on the optical path length or sample turbidity, and it has low power supply requirements which are additional advantages. Proof of the predominant role of ED is the publication of several reviews [7–9]. Apart from LIF and ED, there are other detection approaches for analytical microsystems, but from a realistic point of view, they have been developed to a lesser extent. These unconventional detection routes have recently been revised and include, among others, infrared, Raman, NMR, surface plasmon resonance (SPR), absorbance, thermal lens, and chemiluminescence detectors [10].

With respect to separation techniques, micro-CE was one of the earliest examples of μ TAS, and it constitutes one of the most representative examples of analytical microsystems [11]. Using CE microchips, analysis times can be reduced to seconds and extremely high separation efficiencies can be achieved. The easy microfabrication of a network of channels using materials of well-known chemistry, which themselves have good electroosmotic flows, and the possibility of using the electrokinetic phenomena to move fluids are among the most important

factors to understand the relevance of CE microchips to miniaturization. Since electrokinetics is easy to apply (only a pair of electrodes are needed), electroosmotic-driven flow (EOF) has been successfully implemented using different types of materials to manufacture the channels, being glass the most commonly used. Microfabrication on polymers is faster and cheaper than on glass, so these materials have great potential for mass production. However, glass chips present the best EOF and the chemical modification on the surfaces of its microchannels is better known and easier compared to polymers. Many of the benefits already discussed for CE microchips could equally be applied to downsized chromatographic techniques; however, relatively few examples of chip-based chromatographic instruments are covered in the literature compared with chip-based CE devices. This fact is not surprising since CE is almost perfectly suited to miniaturization. Also, the miniaturization of chromatographic systems involves a number of technical challenges, such as the microfabrication of valves and pumps, which are generally not encountered in CE [5].

Sample preparation steps involving emerging technology for sample preparation/pre-treatment [12] and the macroworld to microworld interfaces [13,14] have been addressed. Because of its inherent complexity, the sample preparation step is less developed than those of separation and detection. However, a very exciting future in real analysis is conceivable because of (i) the inherent possibilities of microfabrication technology to create sophisticated designs (complex layouts according to sample requirements) and microstructures (filters) in connection with sample preparation requirements; (ii) the inherent possibilities offered by *microfluidics*: the presence of laminar flow and diffusion in action (H-filter example [15]); and (iii) the ease of using electrokinetic phenomena to move fluids into the network channels with accuracy (focusing on flow techniques).

In addition, other important general challenges still remain awaiting analytical solutions such as automation, sampling, sample introduction, and sample preparation (except derivatization schemes). Moreover, a breakthrough in the so-called *real world interface* is highly anticipated [5]. Along these lines, total integration and, especially, world-to-chip interfacing are considered the major challenges, particularly in high-throughput applications requiring frequent sample changes, such as continuous *on-line* process monitoring.

From an analytical point of view, the analysis of real samples is often the ultimate goal of a target study. Although the volume of research in this area is impressive, real sample analysis is still in its infancy and constitutes one of the major challenges of *microfluidics*. As a consequence, analyses of true real samples using analytical microsystems, *microfluidics*, or the microchip format are very scarce. This review provides in-depth coverage of the *state of the art* of *microfluidic* devices, focusing on the analysis of real samples as indicators of the grade of maturity of these microsystems. In this context, although every sample is a “real sample,” by the analysis of a real sample we mean the analysis performed directly on the matrix containing the analyte (or those spiked). In addition, we understand *microfluidic* devices to be those miniaturized systems for (total) (bio) chemical analysis. These systems are interconnected networks of channels and

reservoirs containing nano- and microliter volumes. An important subset/subclass of these *microfluidic* devices, namely CE microchips, are those made on glass or polymers using electrokinetic techniques for fluidic motivation and analyte separation. Given the large number of publications in the area, this review is constructed around clinical, environmental, and food analysis while other areas, such as molecular analysis (DNA and RNA) [16], forensics [17], and biodefense [18,19], are not covered in detail and readers are encouraged to read these excellent reviews. In sum, the main challenges found and the proposed approaches for clinical, environmental, and foods areas in the sample analysis domain using *microfluidic* devices will be critically discussed.

2. Real clinical sample analysis on *microfluidics*

Clinical and biochemical analysis have been the most extensive fields of application for lab-on-a-chip systems and currently they continue to grow [20–23]. The measurement of relevant analytes in physiological fluids for the diagnosis and prevention of diseases is a very exciting application, especially in point-of-care testing. The advantages (cited above) of downsizing from TAS to miniaturized devices are ideal in the case of near-patient clinical analysis. Smaller patient sample volume, which is particularly important in geriatric and pediatric patients; reduced reagent consumption; shortened analysis time; integrated multiple processes in a single device (portability); and enhanced reliability and sensitivity through automation are just some of the achievable benefits which make this technology an interesting approach.

Nevertheless, as was already mentioned, not all of the processes of an analytical procedure are equally incorporated into a miniaturized device (lab-on-a-chip). In clinical analysis, many reports have been published on the detection step in *microfluidic* systems, whereas the sample preparation step tends to be accomplished *off-chip* [24,25]. Often, the analyte of interest is accommodated within an extremely complex matrix (for example blood) which requires different sample pre-treatment techniques, making it difficult to incorporate into a microchip, this being the main obstacle in processing real samples, and to achieve a true micro-TAS device.

Working with real samples usually requires some degree of purification (isolation/clean-up) and preconcentration prior the measurement step. Sensitivity (only a few nanoliters reach the detector) and selectivity can pose a serious problem in the analysis of these raw samples. However, in the field of clinical miniaturized analysis, the use of enzymes, antibodies, and other biological reagents saves extensive sample pre-treatment. The sensitivity associated to the use of enzymes allows samples to be diluted to eliminate interference from other constituents of the matrix or adsorption problems of proteins to the capillary walls without lowering detection limits. Conversely, the use of antibodies, enzymes, or other affinity receptors are responsible for the selectivity required for these assays.

A wide variety of bioanalytical and clinically relevant analytes, such as peptides, amino acids, neurotransmitters, carbohydrates, and vitamins, have been determined in the microchip

format. However, references describing analysis in complex matrices are few, most of them being laboratory prepared samples.

This section of the review focuses on those analytes determined in true real or spiked samples. Selected examples will be described from different approaches such as the use of capillary electrophoresis, enzymes, and antibodies to provide selectivity to the assay. The most remarkable features and the type of pre-treatment accomplished are outlined.

Table 1 lists the most relevant information about the *microfluidic* approaches used in the analysis of clinical samples.

The majority of the existing miniaturized systems require highly predictable and homogenous samples. In the case of heterogeneous samples, such as human whole blood, cell-free samples such as serum or plasma are preferable over those with problems associated with flow-path blockage and cell lysis. In this case, whole blood filtration is accomplished *on-chip* for the subsequent analysis. Thorslund et al. [26] have developed a microsystem for *on-chip* sample preparation with which testosterone is measured in diluted whole blood. This system uses a hydrophilic polypropylene membrane filter incorporated onto a PDMS device to remove blood cells with minimal adsorption of proteins.

In clinical analysis, microchip capillary electrophoresis is the most common technique used in miniaturized analytical devices due to its special suitability for miniaturization [27–29]. Relevant analytes used to diagnose different diseases have been analyzed by microchip capillary electrophoresis. Lipoprotein analysis in serum samples was demonstrated by Verpoorte's group [30,31]. In their first approach [30], low density (LDL) and high density (HDL) lipoproteins were separated in a glass microchannel using a dynamic coating (methylglucamine) to prevent lipoprotein adsorption. NBD-ceramide was used as a label for laser induced fluorescence detection. In a later study [31], they demonstrate the analysis of different forms of clinically relevant LDL lipoproteins without the need for a permanent or dynamic coating of the glass microchannels. Adding SDS below the critical micelle concentration to the sample provided sufficient sample recovery to detect the lipoprotein at low concentrations. In both cases, ultracentrifugation of the serum and its subsequent dialysis was accomplished prior microchip analysis.

Neurotransmitters and their metabolites have been determined by microchip CE in biological fluids. Simultaneous amperometric and fluorescence detection is reported by Lapos et al. for the analysis of cerebrospinal fluid samples (CSF) [32]. The use of an orthogonal detection scheme allows LIF detection of NBD-arginine and NBD-phenylalanine, and electrochemical detection of dopamine and catechol, increasing the possibilities for the detection of analytes with different physical characteristics. The use of two detectors simultaneously reduces the run-to-run migration time irreproducibility for certain samples. CSF samples from patients with multiple sclerosis were centrifuged, diluted, and spiked with electroactive species *off-chip*. Johirul et al. [33] have developed a *microfluidic* chip based on CE coupled with a cellulose-ssDNA modified screen-printed electrode for the simultaneous analysis of dopamine (DA), norepinephrine (NE),

Table 1
Microfluidic approaches used in real clinical analysis

Sample	Analytes	Sample preparation	Microfluidic approach	Analytical characteristics	Remarks	Ref.
Whole blood (spiked)	Testosterona	Dilution <i>off-chip</i>	PDMS chip with membrane filter incorporated, RIA detection <i>off-chip</i>	Sample preparation microsystem	Sample preparation <i>On-chip</i> . Removing of blood cells with minimal adsorption of proteins.	[26]
Serum	Lipoproteins (LDL and HDL)	Ultracentrifugation and dialysis <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, LIF detection	Separation time: 28 s	Methylglucamine as dynamic coating	[30]
Serum	Lipoproteins (LDL types)	Ultracentrifugation and dialysis <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, LIF detection	Separation time: 21 s	Uncoated glass microchip	[31]
Cerebral spinal fluid (spiked)	Dopamine, catechol, NBD-arginine and NBD-phenylalanine	Centrifugation and dilution <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, LIF and EC detection	LOD dopamine: 448 nM, LOD catechol: 1.52 μ M, LOD NBD-argin.: 16 μ M, LOD NBD-phenyl: 28 μ M	Dual fluorescence and electrochemical detection	[32]
Serum	Neurotransmitters (dopamine and ascorbic acid)	No treatment	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 220 s, 1.3 (%RSD), LOD: 0.032 μ M	Cellulose-ssDNA modified SP electrode	[33]
Mouse brain and human urine	Catecholamines and their cationic metabolites	Dilution and filtration <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 150 s, LOD: sub μ M	Simultaneous determination. Carbon nanotubes (CNT) modified electrodes	[34]
Urine	Amino acids	Filtration and dilution <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, LIF detection	Separation time: 120 s, LOD: 32.9 μ M	Indirect fluorescence detection approach, 19 amino acids detected	[35]
Urine	Uric acid	Filtration and dilution <i>off-chip</i>	PDMS/Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 30 s, LOD: 1 μ M	50–75-Fold dilution avoid potential interferences	[36]
Urine	Creatine, creatinine, <i>p</i> -aminohippuric acid and uric acid	Dilution and filtration <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 340 s, LOD creatine: 20 μ M, LOD uric acid: 40 μ M, LOD <i>p</i> -aminohippuric acid: 20 μ M	Coupling of enzymatic bioassay and electrophoretic separation	[37]
Urine (spiked)	Creatine, creatinine and uric acid	Dilution <i>off-chip</i>	PDMS CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 200 s, LOD creatine: 250 μ M, LOD creatinine: 80 μ M, LOD uric acid: 270 μ M	Direct PAD detection	[38]
Serum and blood	Lactate and glucose	Dilution and filtration <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, post-column enzymatic reaction, electrochemical detection	LOD glucose: 30 μ M, LOD lactate: 45 μ M	100-Fold dilution avoid protein adsorption	[39]
Plasma	Glucose	Dilution and filtration <i>off-chip</i>	PDMS/glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time: 120 s, LOD: 6 μ M	–	[40]
Serum, plasma, urine and saliva (spiked)	Glucose	Dilution	Glass microchip, colorimetric enzymatic method	–	High degree of integration, electrowetting for microdroplet actuation	[41]
Serum (spiked)	Lactate	Dissolved	Integrated flow cell on silicon chip, chemiluminiscent enzymatic FIA system	Analysis time: 30 s, LOD: 0.5 mM	High degree of integration	[42]
Serum (spiked)	Ca ²⁺	No treatment	Glass/PDMS microchip, reflectance measurements	Analysis time: 30 s, LOD: 26.8 μ M	No significant interferences from other ions presented	[44]
Blood (spiked)	Hemoglobin	Dilution	Silicon microchip, photometric detection	Concentration range: 12–17 g/dL	Optical path extension with 45° mirrors at each end of the channel	[45]
Serum (spiked)	Tetanus antibody and tetanus toxin	No treatment	Glass microchip. PAGE gel CE immunoassay, LIF detection	Separation time: 3 min, LOD: 680 pM	Non-competitive and competitive immunoassay format, <i>off-chip</i> incubation	[47]
Saliva (spiked)	MMP-8	Centrifuged and diluted	Glass microchip. PAGE gel CE immunoassay, LIF detection	Analysis time: <10 min, LOD: 130 ng/mL	Pretreatment on chip (filtering, enrichment and mixing)	[48]
Tissue fluids	Neuropeptides	Ultramicrodialyzer, immunoextraction <i>on-chip</i>	Glass microchip, immunoaffinity CE, LIF detection	Separation time: 160 s, LOD: 0.6 pg/mL	12 neuropeptides are determined simultaneously	[49,50]
Live cells	Insulin	Conditioning and stimulation <i>On-chip</i>	Glass CE microchip, immunoassay, LIF detection	Assay time: 30 s, LOD: 3 nM	Competitive immunoassay format	[51]
Whole blood	Histamine	No treatment	PMMA microchip, electrochemical detection	Analysis time: 2 min, LOD: 200 ng/mL	Multichanneled matrix column coated with cation-exchange resin	[52]
Serum (spiked)	Carcinoembryonic antigen	No treatment	PMMA microchip, immunosorbent assay, thermal lens detection	Analysis time: 35 min, LOD: 0.03 ng/mL	Sandwich format on glass beads, antibody-colloidal gold conjugate	[53]
Serum (spiked)	Immunosuppressive acidic protein	Dilution	Quartz microchip, immunosorbent assay, chemiluminescence detection	Analysis time: 2 min, LOD: 0.1 μ M	Competitive format on glass beads, high degree of integration	[54]
Whole blood	Botulinum neurotoxin	Filtration <i>on-chip</i>	PDMS platform, immunosorbent assay, electrochemical detection	–	Sandwich format on agarose beads, high degree of integration	[55]
Serum	Human IgG	Filtration and dilution <i>off-chip</i>	Immunosorbent assay, LIF detection	Differentiation of normal from elevated IgG concentrations	Competitive format, biopassivated microchannels	[56]
Plasma (spiked)	Cardiac markers (CRP, Mb, cTnI and S100 α)	Dilution	PDMS microchip, immunosorbent assay, LIF detection	Analysis time: 10 min, LOD: 30 ng/mL	Sandwich format, micromosaic simultaneous determination	[57]
Serum (spiked)	B-type natriuretic peptide	Dilution	Glass/PDMS microchip, immunosorbent assay, SPR detection	Analysis time: 30 min, LOD: 5 pg/mL	Competitive format, <i>off-chip</i> incubation	[58]

3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA), ascorbic acid (AA), and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). The modification of the electrode with cellulose-ssDNA prevents surface passivation and amplifies electrocatalytic activity through the interaction of the analyte and ssDNA. Cellulose regulates the solubility of ssDNA in aqueous media and ssDNA acts as an efficient promoter of a direct electron transfer reaction and/or the concentration of analytes on the electrode surface by means of the electrostatic interaction. The applicability of the system to DA analysis in the presence of AA in serum samples without treatment was demonstrated.

Schwarz's group [34] has developed a sensitive and selective method for the simultaneous determination of catecholamines and their cationic metabolites, without mutual interference, in mouse brain homogenates and human urine. They used a novel combination of additives (sodium dodecyl sulphate micelles, dendrimers forming a second pseudo-stationary phase, and borate complexation) to achieve complete separation on the chip and a carbon nanotube modified electrode as a detector to enhance sensitivity. Sample pre-treatment, made *off-chip*, is necessary in both cases. For urine, sample dilution in 0.2 M HClO₄ containing 0.1% of Na₂EDTA to prevent the oxidation of the analytes and filtration is required. The brain tissue was homogenated, centrifuged, and diluted in running buffer prior to injection.

Landers et al. [35] have demonstrated the possibility of high-throughput screening for several amino acids in urine samples using CE on a microchip format. Indirect fluorescence detection has been adapted to the electrophoretic microchip to provide a fast analysis of amino acids. Although the detection limits for indirect detection are lower than those achievable using fluorescence labeled analytes, the lack of sample preparation and simplified electrophoretic profiles make this technique attractive for many types of analysis. The analysis of urine samples required filtration and dilution of the sample to avoid the high ionic values derived from the presence of NaCl and other inorganic ions. Despite the lower signal-to-noise ratio obtained when compared to conventional CE (significantly longer capillary), the method allowed the quantitative determination of various amino acids in abnormal urine specimens.

Microchip CE-ED to measure uric acid in physiological urine samples was reported by Fanguy et al. [36]. The sample preparation for and the analysis of uric acid, with a clinically accepted enzymatic reaction, can be tedious. However, the proposed microchip system using electrochemical detection is able to evaluate single-filtered diluted urine samples in the expected range of the concentration of the analyte. Due to the low detection limit of the method, uric acid determination is accomplished in 50–75-fold dilution of the urine, without potential interference from other organic compounds with similar potential oxidation in the sample.

The groups of Wang and Henry reported the simultaneous analysis of different renal markers in urine samples using microchip CE [37,38]. In the first paper [37], creatine, creatinine, *p*-aminohippuric acid, and uric acid are determined by the coupling of an *on-chip* enzymatic assay, electrophoretic separation, and electrochemical detection. Hydrogen peroxide from

the enzymatic reactions of creatinine and creatine *on-chip* is separated from *p*-aminohippuric and uric acids, and the three species are amperometrically detected at the end-column detector. Urine samples were filtered and diluted prior to analysis. Henry et al. [38] reported the separation of these renal markers (creatine, creatinine and uric acid) using 30 mM borate buffer (pH 9.4) plus 1 mM SDS and their direct detection using pulse amperometric detection. The three analytes were determined in diluted and spiked urine samples, and the creatinine results were validated using a commercially available assay kit based on the Jaffe reaction.

Heightened levels of carbohydrates in biological fluids, mainly glucose, are especially relevant in diagnosing metabolic disorders. With this in mind, different microchip systems have been developed to determine carbohydrates in urine or blood samples. Wang and his group [39] reported an electrophoretic microchip to determine lactate and glucose in blood samples. This procedure combines the selectivity and amplification features of enzymatic assays with capillary-electrophoretic separation efficiency. Specifically, this microchip integrates electrophoretic separation of lactate and glucose in the separation channel, their post column reaction with the corresponding oxidases, and amperometric detection of the hydrogen peroxide liberated in the two separated product zones, as is illustrated in Fig. 1. Electrophoretic separation avoids potential electroactive interference, enhancing the advantages of enzyme flow-injection assays. Analyzed samples (serum and blood samples) must be filtered, centrifuged, and diluted in the running buffer *off-chip*.

Du et al. reported the electrophoretic separation and direct electrochemical detection of glucose on a PDMS/glass microchip [40]. The device includes copper microelectrodes manufactured onto the electrode plate by selective electrodeless deposition. Plasma samples from healthy and diabetic patients were previously diluted and filtrated, and glucose was determined in 120 s with a detection limit of 6 μ M.

Lactate and glucose were also determined using colorimetric enzyme assays from a different total microanalysis system (μ TAS) approach. Srinivasan et al. [41] reported an impressive "lab-on-a-chip architecture" for the automated analysis of glucose in physiological fluids. The *microfluidic* system they used is shown in Fig. 2. This lab-on-a-chip, based on electrowetting for microdroplet actuation, integrates sample injection elements, reservoirs, droplet formation structures, fluidic pathways, mixing areas, and optical detection sites all on the same substrate. Detection based on the colorimetric enzyme-kinetic method (Trinder's reaction) allows glucose to be determined in spiked serum, plasma, urine, and saliva samples with good concurrence to the reference method. Additionally, Karube's group [42] fabricated a compactly integrated flow cell with a chemiluminescent FIA system for determining lactate concentration in serum. The cell was made by micromachining techniques and mainly consists of a reactor, a mixing cell, and a spiral groove. Lactate was determined using lactate oxidase and was catalyzed by pyruvate and hydrogen peroxide. Subsequently, the hydrogen peroxide reacted with the luminol-ferricyanide reagent and the resulting chemiluminescent product was detected. Lactate concentration

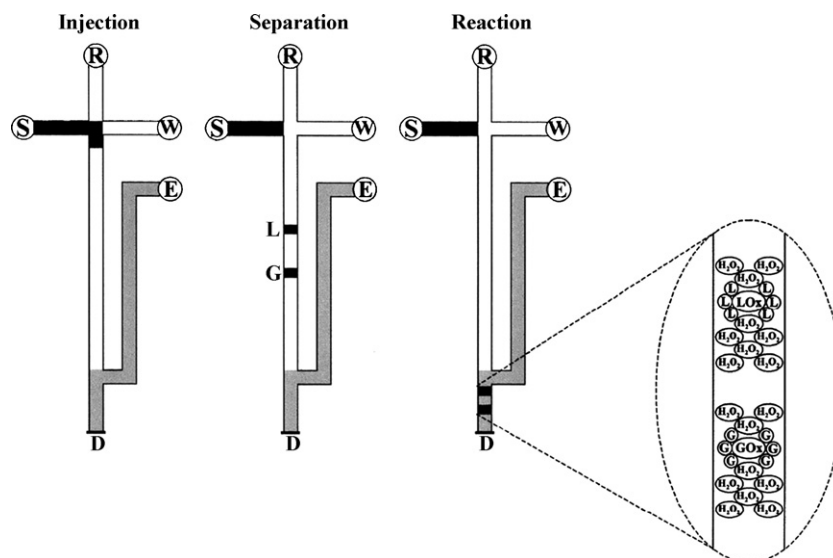


Fig. 1. Schematic of the CE-EC microchip, with the post-column enzymatic reaction, for the simultaneous measurement of glucose (G) and lactate (L). The individual analytical steps (injection, separation, reaction) are shown from left to right. Also shown (insert) is the post-column channel with the two hydrogen-peroxide zones. Reservoirs: (R) running buffer, (W) waste, (S) sample mixture, (E) 'reagent' (enzyme) solution containing glucose oxidase (GOx) and lactate oxidase (LOx); (D) the amperometric detector. The chip consisted of a sample (S), waste (W), and a running-buffer (R) reservoirs, connected through 5 mm long 'arms' to a four-way injection cross. A 77.7 mm-long separation channel followed the injection cross. An additional 77.2 mm-long channel (referred to as 'post-column') was joined the end of the separation channel, leaving a 10 mm channel for the enzymatic reaction before the detector. All channels were 50 μm wide and 20 μm deep (from reference [39], with permission).

was determined in undiluted spiked serum samples using this system.

In a similar fashion to ref. [41], Moon et al. [43] developed an integrated digital *microfluidic* chip for multiplexed proteomic sample preparation for MALDI-MS analysis. The system integrates the handling of solutions and reagents with electrowetting-on-dielectric (EWOD) actuation allowing the parallel processing of multiple sample droplets for high-throughput MALDI-MS. Processing four angiotensin peptide/urea samples demonstrated the suitability of the device for proteomic applications.

Spectrophotometric detection is not usually employed in *microfluidic* devices, mainly due to its low sensitivity; how-

ever, Caglar and co-workers [44] have developed a glass-PDMS microchip used to determine Ca^{2+} ions in serum samples taking reflectance measurements of arsenazo III immobilized on the surface of polymer beads. The beads were used at the detection point of the *microfluidic* sensor device with a fiber optic assembly for reflectance measurements. Despite potential interference from other ions, the microchip sensor allowed Ca^{2+} to be determined in untreated serum samples within the physiological range. In another approach, to overcome the usually low sensitivity associated with photometric microchips, Noda et al. [45] developed an optical path extension absorption-photometry microchip for highly sensitive hemoglobin measurements. In this device, the reflection in two 45° mirrors at each end of the

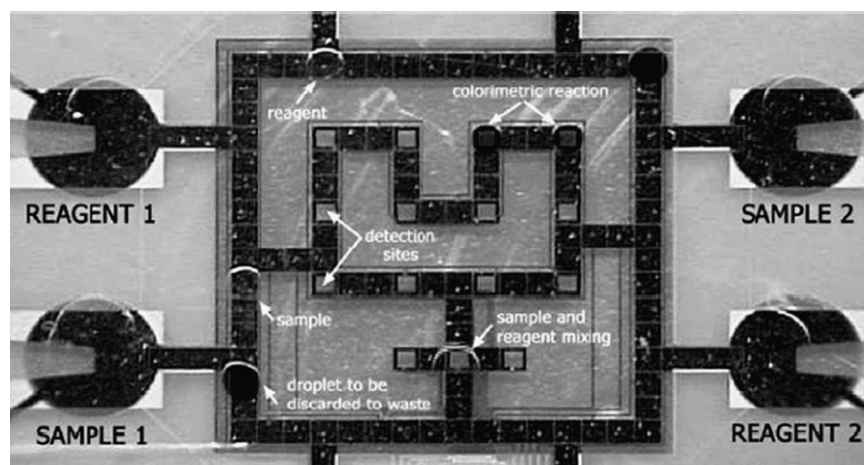


Fig. 2. Integrated digital microfluidic lab-on-a-chip for clinical diagnostics. This lab-on-chip, based on electrowetting for microdroplet actuation, integrates sample injection, on-chip reservoirs, droplet formation structures, fluidic pathways, mixing areas and optical detection sites, on the same substrate. Glucose is determined in spiked serum, plasma, urine and saliva as a proof of concept by colorimetric enzyme-kinetic method (Trinder's reaction) (from reference [41] with permission).

fluidic channel allows the propagation of light from the source to the detector along a longer optical path (5 mm). Blood samples that were previously diluted and to which the hemolysis chemical (cyanogen solution) were added were then photometrically measured allowing the determination of hemoglobin within the normal human concentration range (12–17 g/dl).

As is known, immunoanalytical systems have become one of the most widely used methods for detection and determination of a wide variety of analyte molecules in clinical diagnosis. Miniaturization of immunoassays onto microchip platforms combines the power of *microfluidic* devices with the high sensitivity and specificity of antigen–antibody interactions. The inherent reduction in diffusion distances for the species and the larger surface-area-to-volume ratio can increase the chances of the antigen and antibody of binding within the *microfluidic* channels. However, in a miniaturized immunoassay, particular points more important than in conventional systems can be considered. These include the effect of the capillary surface's chemical nature (non-specific binding), the methods of liquid transportation because of high flow resistance, special consideration for mixing procedures due to laminar flow, or specific detection principles because of the reduction in volume reaching the detector [23].

Taking into account the exceptional properties for miniaturizing CE together with the selectivity power of immunoassays, the coupling of both techniques (μ CEI) constitutes one of the most widely used approaches [46]. Herr et al. have developed *microfluidic* immunoassays based on gel electrophoretic separation and the quantization of bound and unbound species. In an earlier paper [47], direct immunoassay (non-competitive) and competitive formats were used in the detection of the tetanus antibody and the tetanus toxin, respectively, in spiked serum samples. *On-chip* photopatterned native PAGE gel was used for the electrophoretic separation of the fluorescently labeled C-fragment of the tetanus toxin with the specific antibody from its complex after an *off-chip* incubation step. Recently [48], the same researches improved their system by integrating sample pre-treatment *on-chip* (filtering, enrichment, mixing) with an electrophoretic immunoassay to determine the collagen-cleaving enzyme matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in saliva as a diagnostic fluid. Relevant clinical concentrations (LOD 130 ng/mL) are measured in less than 10 min. Samples must be centrifuged and previously diluted to 20 μ l before being loaded into the *microfluidic* system.

Exploiting the capability of CE to analyze multiple analytes in a single sample, Phillips and Wellner [49,50] designed an immunoaffinity CE to measure concentrations of up to 12 inflammatory neuropeptides and cytokines in muscle and cerebral spinal fluids. Using one reservoir of the microchip, Fab fragments from each of the specific antibodies were immobilized on their surface. After the incubation steps with sample and laser dye and the subsequent washing steps, the captured analytes were eluted and directed to the separation channel. In less than 160 s, 12 neuropeptides were resolved and determined in a 100 pL sample. Tissue fluid samples were previously passed through an ultra-micro dialyzer. In the same paper [50], an electrokinetic immunoassay was developed for the same analytes. However, 280 s were needed to resolve the immune complex of

the free-labeled antibody of 1 specific analyte, and higher LOD were obtained.

Kennedy et al. demonstrated the continuous monitoring of insulin secretion from live cells (islets of Langerhans) using a capillary electrophoresis competitive immunoassay [51]. Continuous sampling, on-line reaction, and electrophoretic separation of the fluorescein isothiocyanate-labeled insulin (FITC-insulin) and FITC-insulin-Ab-complex were accomplished in 30 s. A detection limit for insulin of 3 nM and continuous monitoring up to 30 min with no intervention were achieved.

Matsunaga's group [52] reported the use of a multichanneled matrix column coated with cation-exchange resin to separate immunocomplexes after a competitive binding event. Histamine is measured in 10 μ L of whole blood directly extracted from patients by an electrochemical flow immunoassay. Based on different isoelectric points of immunocomplexes, histamine-antibody and histamine-derivative-antibody, only the first is retained in the column. The conjugation of the specific antibody with ferrocene allows electrochemical detection of the immunocomplex in the eluent. Histamine concentration in the 200–2000 ng/mL range is measured in whole blood within 2 min.

The determination of cancer markers is crucial for an early diagnosis of the disease and immunoassay is considered an indispensable technique for determining small amounts of a tumor marker in serum. Different papers have reported using microchip-based immunoassays for cancer diagnosis [53,54,56]. Sometimes the electrophoretic separation of bound and unbound species is not suitable in the microchip format. An interesting alternative would be the integration of the widely used immunosorbent assay (ELISA), in which antigens or antibodies are fixed on a solid surface, onto a microchip known for its high sensitivity. Kitamori et al. [53] and Tsukagoshi et al. [54] have developed glass bead immunosorbent assays for the human carcinoembryonic antigen (CEA) and immunosuppressive acidic protein (IAP), respectively. In Kitamori's work, a sandwich immunoassay format together with thermal lens detection of colloidal gold-labeled antibodies is used. Serum samples from patients are assayed in 35 min with a determination limit of 0.03 ng/mL for CEA. Tsukagoshi uses chemiluminescence to detect unbound luminol-labeled analytes at the end of the microchannel where a microperoxidase catalyzes the hydrogen peroxide reaction. IAP spiked serum samples are determined in the relevant clinical range of concentrations within 2 min for each assay.

Also based on a sandwich ELISA format, where the specific antibody is immobilized on functionalized agarose gel beads, Moorthy et al. [55] developed a *microfluidic* platform for detecting botulinum neurotoxin directly from whole blood. Sample preparation by filtration, mixing and incubation with reagents were carried out on the device. Clinically relevant amounts of the toxin can be detected by measuring the color of an insoluble enzymatic product from the alkaline phosphatase reaction.

Elevated levels of monoclonal human IgG in serum may be linked to cancer. In this sense, Thormann's group [56] reported

a heterogeneous competitive human serum IgG immunoassay. Immunoglobulin G and Cy5-IgG, used as a tracer, compete in order to bind to a specific antibody immobilized on a biopassivated microchannel. Using Cy3-mouse IgG as an internal standard allows samples from patients with normal IgG serum levels (8–16 mg/mL) to be differentiated from patients with elevated IgG concentrations (>16 mg/mL).

A sophisticated approach is reported by Delamarche's group [57] in which different cardiac markers are simultaneously detected. They combine *microfluidic* networks, in which the flow of liquids is driven by capillary forces (self-regulating), and micromosaic immunoassays based on patterning lines to capture antibodies exposed to solutions of analytes. Using secondary fluorescently labeled antibodies, a micromosaic of fluorescent zones reveals the binding event in a single imaging step. In this case, four cardiac markers – C-reactive protein (CRP), myoglobin (Mb), cardiac troponin (cTnI), and S100 α – are simultaneously determined in spiked plasma samples (1 μ L volume) within 10 min.

Recently, Niwa et al. [58] reported a *microfluidic* device combined with a portable surface plasmon resonance sensor system (SPR) to determine the cardiac marker B-type natriuretic peptide (BNP) in spiked serum samples. After competitive immunoreaction takes place, the thiol compound generated by the enzymatic reaction with the trapped labeled antibody was accumulated on a thin gold film located in the microchannel. The extension of the chemisorption of thiol molecules can be monitored by the SPR angle shift and related to BNP concentration. A concentration range of 5 pg/mL to 100 ng/mL covers the usual levels of BNP in blood.

3. Real environmental and related sample analysis on *microfluidics*

The development of portable, robust, and accurate analytical systems to monitor environmental compounds such as contaminants, explosives, chemical warfare agents, inorganic and organic ions is a demand of modern society. Portability allows analyses to be carried out outside of the laboratory, preventing or minimizing the risk of contaminating the sample and leading to a faster response time at a lower cost. The ability to use portable equipment is an intrinsic characteristic of *microfluidic* systems, which is why they are an excellent response to this analytical demand.

Sample introduction, complexity of the sample matrix, and the low concentration of the chemical species in the environment are the possible challenges of using *microfluidic* devices for environmental analysis.

There are excellent bibliographic reviews in the literature about *microfluidic* devices for environmental analysis [59,60], but not reviews are found on the analysis of real samples and their particular challenges.

In this section, the most relevant papers in the literature that use *microfluidic* devices for environmental analysis have been classified and discussed according to the kind of analytes studied: warfare agents and explosives, and pollutants and ions of environmental interest.

Table 2 summarizes the most relevant information regarding the analysis of the main compounds of environmental significance in real samples using miniaturized devices.

Wang and co-workers have developed a method for determining thiol-containing degradation products of V-type nerve agents in water samples [61]. The detection of three of these compounds was achieved in only 4 min, though only in a water sample spiked with its corresponding standards. The microsystem consists of a glass capillary electrophoresis microchip with amperometric detection (screen-printed carbon ink electrode). A derivatization of the compounds with o-phthalaldehyde was necessary, which was developed both *on-* and *off-chip*. When the process was performed *on-chip*, the complete reaction between derivatization agent and compounds was not achieved, resulting in decreased sensibility. With the same microsystem [62], three organophosphate nerve agents were detected in 140 s from a river water sample spiked with those analytes. In both cases [61,62], the LODs were in micromolar range, but this seems to be insufficient for real applications. Better LODs were obtained by the same research group using contactless conductivity as its detection mode [63]. A detection limit within the nanomolar range was achieved for the determination of three organophosphate nerve agent degradation products from a river water sample (spiked with standards). In this paper, a disposable PMMA microchip with integrated electrodes was used with excellent results (analysis time 130 s).

Luong et al. were able to determine trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene in soil and groundwater samples by MEKC-EC on a glass microchip and using a gold wire as electrode [64]. The analysis time was 4 min and LODs were below the micromolar range. The accuracy of the method was validated by comparison with the LC procedure of the US EPA (method 8330). For the soil sample, an extraction step *off-chip* was necessary. In all papers, the water samples were filtered *off-chip*.

Wang and co-workers have also separated and detected three different groups of pollutants (nitrophenols, aromatic amines, and chlorophenols) by capillary electrophoresis on a glass microchip with amperometric detection using river and groundwater samples. In this case, the detected compounds were previously added. Five nitrophenol derivatives were detected in 120 s with a glassy carbon electrode [65], three aromatic amines (4-aminophenol, 2-aminonaphthalene, and o-aminobenzoic acid) in 150 s with a boron-doped diamond thin-film detector [66], and phenol and three chlorophenols in 120 s with a carbon SPE modified with gold [67]. In these papers, the LODs were within the micromolar range and accuracy was not evaluated. The samples were filtered before the analysis.

García et al. obtained good results in their analysis of environmental samples using a PDMS microchip with pulse amperometric detection (PAD). Levoglucosan (the largest single component of the water extractable organics in smoke particles) was determined in smoke particles in only 1 min [68]. The results obtained with this method are in accordance with those obtained with GC/MS. The aerosol particles were collected and extracted *off-chip* and *off-line*. The LOD achieved (17 μ M) was adequate for the analysis of smoke samples but insuffi-

Table 2
Microfluidics (capillary-electrophoresis microchip) in environmental analysis

Sample	Analytes	Sample treatment	Microfluidic system	Detection mode	LOD (μM)	Analysis time (s)	Accuracy evaluation	Ref.
Tap and river water (spiked)	2-(Dimethylamino) ethanethiol, 2-(diethylamino) ethanethiol, 2-mercaptoethanol	Derivatization agent (o-phthalaldehyde) in presence of Valina, <i>off- and on-chip</i>	Glass microchip, CZE	Amperometry carbon ink screen-printed electrode	6–11	240	–	[61]
River water (spiked)	Paraoxon methyl parathion, fenitrothion	Filtration, <i>off-chip</i>	Glass microchip, MEKC	Amperometry, carbon ink screen-printed electrode	0.9–3.8	140	–	[62]
River water (spiked)	Methylphosphonic acid, ethylphosphonic acid, isopropylphosphonic acid	Filtration, <i>off-chip</i>	PMMA microchip, CZE	Contactless conductivity	0.005–0.006	130	–	[63]
Soil and groundwater	Trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, 2,6-dinitrotoluene	Extraction, centrifugation and filtration, <i>off-chip</i>	Glass microchip, MEKC	Amperometry, gold electrode	0.48–0.88	240	Comparison with LC procedure (method 8330) US EPA	[64]
Groundwater (spiked)	2-Nitrophenol, 3-nitrophenol, 4-nitrophenol, 2,4-dinitrophenol, 2-methyl-4,6 dinitrophenol	Filtration, <i>off-chip</i>	Glass microchip, MEKC	Amperometry, glassy carbon electrode	7–30	120	–	[65]
River water (spiked)	4-Aminophenol, 2-aminonaphthalene, <i>o</i> -aminobenzoic acid	–	Glass microchip, CZE	Amperometry, boron-doped thin-film detector	1.3–2	150	–	[66]
River water (spiked)	Phenol, 2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,3-dichlorophenol	Filtration, <i>off-chip</i>	Glass microchip, CZE	Amperometry, carbon ink screen-printed electrode modified with gold	1–2	120	–	[67]
Smoke particles	Levoglucozan	Aerosol particles collection and extraction <i>off-chip</i>	PDMS microchip, CZE	Pulse amperometric detection Gold electrode	17	60	Comparison with GC/MS	[68]
City water (spiked), medicines	Phenol 4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol pentachlorophenol	–	PDMS microchip, CZE	Pulse amperometric detection, gold electrode	0.9–2.2	120	Respect declared content (label medicine)	[69]
River water	DOC (dissolved organic carbon)	Derivatization with isothiocyanate and filtration, <i>off-chip</i>	Glass microchip, CZE	LIF	–	120	–	[70]
Electroplating sludge reference material	Pb(II)	Extraction, centrifugation and filtration, <i>off-chip</i>	PDMS microchip, sensor	LIF	0.011	–	Respect reference material	[71]
Water mimetic solution	Cr(III)	EDTA to remove interferences, <i>off-chip</i>	PDMS-glass microchip, FIA (mixer/reactor system)	Chemo luminescence (luminol-H ₂ O ₂)	0.1	60	Recovery	[72]
River, pond and rain water	Sulfite, nitrite	Derivatization agent, <i>N</i> -(9-acridinyl) maleimide, 2,3-diamino naphthalene, <i>on-chip</i>	PDMS-glass microchip, FIA	LIF	0.4–1	900	Recovery	[73]
Plexiglas surface contaminated	Cd(II), Pb(II), Co(II), Ni(II)	Chelating agent 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(<i>N</i> -propyl- <i>N</i> -sulfo) propylaminophenol, C ₁₈ silica column, <i>off-chip off-line</i>	Glass microchip, non-aqueous CZE	Colorimetric	0.003–0.053	80	Recovery	[74]
River, tap, mineral water	Nitrite, fluoride, phosphate	Preconcentration and elimination of interferences, <i>on-chip on-line</i>	PMMA microchip, ITP-CZE column coupled	Conductivity	0.5–0.7	360	–	[75]

cient for atmospheric samples. In another paper [69], three of the most important pollutants (phenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol, and pentachlorophenol) were detected in a city water sample spiked with the corresponding standards. The LODs were within the micromolar range and accuracy was evaluated by determining phenol in two medicines with labeled content. Sample treatment was not necessary.

An original method was developed for evaluating the environmental index DOC (dissolved organic carbon) [70]. The microsystem consists of a glass capillary electrophoresis microchip with LIF as its detection mode. Derivatization with a labeling agent, fluorescein isothiocyanate, was needed (overnight). A sample of river water was analyzed, but the results were not compared with other methods.

Anions and cations of environmental interest have also been explored. Chang et al. fabricated a sensor to monitor Pb^{2+} in environmental samples [71]. This microdevice was made on PDMS and contained a network of *microfluidic* channels that were fluidically coupled via a nanocapillary array interconnect (NAI) and used LIF as its detection mode. This sensor's selectivity was achieved using a lead-specific DNAzyme constructed by the authors which possessed a fluorophore fragment. In the presence of Pb^{2+} , the substrate DNA was cleaved, resulting in the release of fragments and a concomitant increase in fluorescence, as is illustrated in Fig. 3. Accuracy was evaluated with an electroplating sludge reference material, but no further samples were analyzed. An excellent LOD was achieved (11 nM).

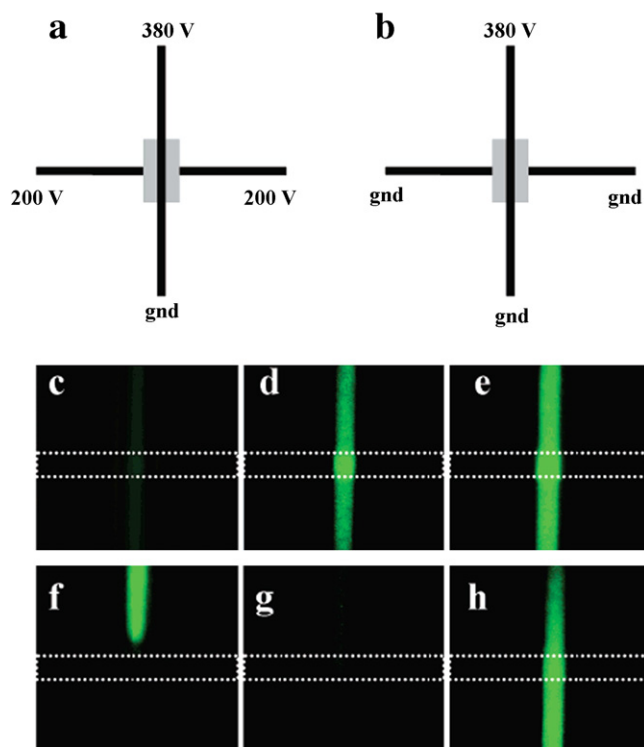


Fig. 3. Electrical bias configurations for fluidic control of lead and DNAzyme within an NAI/microfluidic device: (a) on state and (b) off state. Temporal sequence of fluorescence images at the intersection of the crossed microchannels (c–h) (from reference [71] with permission).

Two different research groups have used capillary electrophoresis microchips as FIA systems. In the first paper [72], Cr (III) was detected by chemiluminescence in a water mimetic solution in 1 min. The catalytic property of Cr (III), the result of the reaction between luminol and H_2O_2 , was taken advantage of to determine this cation. All parameters of the mixer/reactor microsystem were optimized and *off-chip* sample treatment with EDTA was needed to remove interferences (other metal cations). In the second paper [73], sulfite and nitrite were detected by FIA-LIF in different water samples, but the use of two derivatization agents was needed (*on-chip*). LODs within the micromolar range and a huge analysis time (15 min) were obtained. The accuracy of both methods was evaluated by recovering the standards added in the studied samples. Deng and Collins separated and detected four metallic cations (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) using a non-aqueous capillary electrophoresis microchip with colorimetric detection on a contaminated Plexiglas surface prepared by the authors [74]. Sample treatment was carried out *off-chip* and *off-line* and consisted of extraction with a chelating agent. The extract was then preconcentrated in a C_{18} silica microcolumn, and, finally, the sample was introduced onto the microchip achieving LODs within the nanomolar range.

Bodor et al. have determined three anions (NO_2^- , F^- , PO_4^{3-}) in river, tap, and mineral water on a PMMA column-coupling microchip with conductivity detection [75]. The illustration of the microdevice used is shown in Fig. 4. The microchip consists of two coupled columns: The first is used as an isotachopheresis (ITP) column and the second as a CZE column. In the ITP stage, the sample was preconcentrated and cleaned up and, in the CZE stage, the anions were separated. Minimal sample treatment *off-chip* was needed (filtration and degassing). LODs were within the micromolar range and the accuracy of the method was not evaluated.

4. Real food sample analysis on *microfluidics*

The state of the art of food analysis on CE microchip platforms has recently been revised [76]. In food analysis, sensitivity and selectivity are also the major drawbacks. In contrast to biochemical analysis where the very specific reagents (immunoassay/enzymes) are frequently used and dramatically improve the selectivity in the analysis, in food analysis, the use of bio-reagents is obviously less developed and sample preparation is always needed involving complex sample preparation protocols and analyte separation with advanced detection schemes.

In food analysis, *microfluidics* are also now emerging since, as was mentioned before, sample preparation integration is less developed due to its inherent complexity. The *microfluidics* used are mainly CE microchips applied to both liquid and solid samples. The first approaches focused on exploring fast separation and suitable detection routes for prominent analytes with food significance. In all cases, the sample preparation step is carried out *off-chip* and microchips are merely used as fast analytical separation systems. In consequence, the first “real samples” analyzed are still *easy*, such as nutraceuticals and dietary supplements.

Table 3
Microfluidics (capillary-electrophoresis microchip) in food analysis

Sample	Analytes detected in food sample	Sample preparation	Microfluidic approach	Analytical characteristics	Remarks	Ref.
Red wine (one)	Chlorogenic, vanillic	Dilution and filtration, <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection (SPE electrode)	Separation time (<300 s), good precision, less than 7% in peak areas, external calibration ($r > 0.99$), LOD = 10 μM	Use of red wine (high polyphenolic content), use of different oxidation potentials during wine analysis	[77]
Beverages	Inorganic cations (water, juices, beer and milk): ammonium, potassium, calcium, sodium, magnesium. Inorganic anions (water): chloride, nitrate, sulfate	Dilution and filtration, <i>off-chip</i>	PMMA microchip, contactless conductivity	Separation time (<40 s), LODs (90–150 $\mu\text{g/L}$)	High degree of integration, quantitative analysis is given for all analytes	[78]
Vitamin C tablets	Vitamin C	Power and filtration	PMMA	Separation time (<50 s)	Quantitative analysis is given for all analytes	[79]
Soft drinks	Preservatives, benzoate, sorbate	<i>Off-chip</i>	Simple cross, capacitively coupled contactless conductivity	Good precision (less than 4%), external calibration ($r > 0.99$), LODs 3–10 mg/L	Comparison with CE conventional	
Wine, beer	Tryptamine, tryptophan, tyramine	Filtration, <i>off-chip</i>	Miniaturized CE-ED, electrochemical detection (Cu electrode)	Separation time (<360 s), good precision (RSD 3.6%), LODs 0.6–1.5 μM	Home-made miniaturised CE system	[80]
Green tea extract (nutraceutical)	(+) Catechin, epigallocatechin gallate, (–)epicatechin, epicatechin gallate	Solid–liquid extraction and filtration, <i>off chip</i>	PDMS CE, microchip, electrochemical detection	Separation time (<300 s), good precision, less than 7% in peak areas, external calibration ($R^2 > 0.99$), LODs 8–10 μM	Use of suited real sample (high concentration), quantitative analysis is given for all analytes	[81]
Pear pulps and commercial juices	Arbutin, ascorbic acid	Juice filtration or solid–liquid extraction and filtration, <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time (<200 s), good precision, less than 7% in peak areas, external calibration ($R^2 > 0.99$)	Separation of target antioxidant couples	[82]
Formulations	Water-soluble vitamins: pyridoxine B6, vitamin C, folic acid	Solution and filtration, <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time (<130 s), high accuracy (errors less than 7%)	Calibration and determination in less than 350 s, quantitative analysis is given for all analytes	[83]
Vanilla pod and sugars	Vanillin, ethyl vanillin	Extraction and maceration, <i>off-chip</i>	Glass CE microchip, electrochemical detection	Separation time (<200 s), good precision less than 7% in peak heights	Detection of frauds	[84]
Green tea	Arg, The, Gly	Extraction and filtration and derivatization of aminoacids, <i>off-chip</i>	PMMA microchip with LIF detection	Separation time (120 s), precision chip-to-chip 3%	Derivatization is not selective to aminoacids, selectivity is improved by removing the high content of catechins in tea samples, validation of the method using HPLC	[85]
Natural extract	Total isoflavones	Extraction and filtration	Valveless microsystem	Analysis time (60 s)	Calibration integrated.	[86]
Dietary supplements		<i>Off-chip</i>			Accuracy is evaluated using a secondary standard (error less than 7%)	
Vegetables, fruits and meats	Nitrite	Extraction and 732-cation resin column and, filtration, <i>off-chip</i>	PMMA microchip (μFIA), chemiluminescence detection	Separation time (<120 s), good precision less than 4.1%, external calibration ($r > 0.99$), LOD = 4 $\mu\text{g/L}$ hydrodynamic flow	Validation respect AOAC official method (Griess method), interferents (Fe^{2+} , Ni^{2+} , V (V), Cu^{2+} , uric acid and vitamin C)	[87]
Milk (spiked)	Staphylococcus enterotoxin B	Filtration, <i>off-chip</i>	PDMS microchip, fluorescence detection	Sandwich-type immuno assay, fluorescently labelled antibody, LOD = 0.5 ng/ml, hydrodynamic flow	–	[88]
Baby powder, milk, sucrose (spiked)	Botulinum neurotoxin A	Filtration, <i>off-chip</i>	Polycarbonate ELISA-chip, colorimetric detection	Sandwich-type immuno assay, cross-flow immuno-chromatography, horseradish peroxidase, LOD = 2 ng/ml	Five-fold enhancing of LOD respect the kit commercially established	[89]
Infant formula	Folic acid	Filtration, <i>off-chip</i>	Commercial polyimide immuchip for ELISA, electrochemical detection (Gold electrode)	Competitive immuno assay, hydrodynamic flow, analysis time = 5 min, R.S.D. 7% alkaline phosphatase	Validation respect reference method (microbiological assay)	[90]

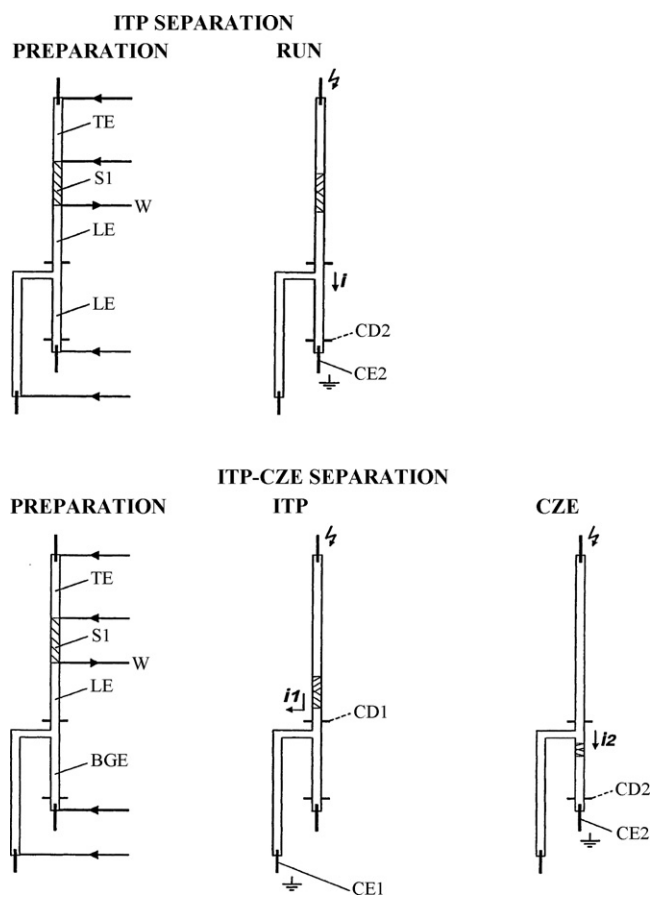


Fig. 4. Schemes of the ITP (the tandem-coupled separation channels) and ITP-CZE separation modes as employed in the separations of inorganic anions on the CC chip (from reference [75], with permission).

Table 3 lists the relevant information about food analysis on, primarily, CE-microchips and other *microfluidic* systems. Next, we are going to discuss the relevant keys to understanding the present role of *microfluidics* in food analysis.

Liquid samples, as opposed to solid samples, require minor sample preparation, and they have been studied by direct injection using both amperometry and conductimetry. This way, two single phenolic acids, vanillic and chlorogenic acid, were detected in red wine samples in less than 300 s using a CE microchip with amperometry detection [77]. The overall protocol involves simple sample preparation *off-chip* (filtration and dilution in an electrophoretic buffer), and the wine sample was directly injected onto the microchip. Selectivity and sensitivity was checked using different oxidation potentials as a strategy to obtain relevant information using the wine sample. As expected, lower potentials provided greater selectivity while higher ones led to increased sensitivity. Red wines are very complex and a lot of polyphenols are present since red wine is one of their most important sources. Probably, the detection of just acid structures was due to the fact that these compounds are prominent, while flavonoids did not show any interference because of the dilution performed.

The elegant approach, based on the use of a universal detector (*contactless* conductivity) coupled to a microchip in the analysis of liquid samples where selectivity is achieved by microchip

separation, is illustrated in the papers of Hauser's group [78]. These papers strategically combine the minor sample preparation requirements of this kind of samples (just dilution and filtration) with the inherent characteristics and advantages of (*contactless*) conductivity. Indeed, water, wine, beer, and fruit juice samples were simply diluted in electrolyte solution. Separations involving inorganic cations (ammonium, potassium, calcium, sodium, and magnesium), inorganic anions (chloride, nitrate, sulphate), and the simultaneous analysis of up to 12 inorganic and organic anions (oxalate, tartrate, malate, citrate, succinate, acetate, lactate) in less than 100 s were obtained. In addition, a detailed evaluation of the methods including reliable quantitative data was given indicating the power of these microdevices. The inherent advantages of miniaturization for food analysis using both liquid (beverages) and solid samples (vitamin C tablets) were also demonstrated illustrating the separation of commonly used preservatives such as benzoate and sorbate, and vitamin C using a PMMA microchip coupled with *contactless* conductivity [79].

Ye et al. [80] fabricated a miniaturized CE-ED system cutting a conventionally fused silica capillary and gluing it onto a Plexiglas plate. This system was used in the determination of three bioactive amines (tryptamine, tryptophan, and tyramine) in wine and beer. Good reproducibility (3.6%), analysis time (6 min), and LOD (μM range) were obtained.

Solid samples are very complex, and tedious *off-chip* extraction processes are always required before analysis. An analysis of five flavan-3-ols (catechins and derivatives) in commercially available green tea extract was performed using a PDMS microchip with MEKC and pulsed amperometric detection by Henry's group [81]. The detection of (+)-catechin, epigallocatechin gallate, (–)-epicatechin, and epicatechin gallate was achieved in less than 3 min in tea extracts (functional food). In addition, two more unidentified peaks were detected during analysis (probably attributable to other polyphenols). A quantitative analysis was performed and good accuracy was demonstrated. Sample preparation was still complex and *off-chip* (methanol–water, stirred extraction, and filtration), and the sample matrix was still “easy” since a nutraceutical was assayed containing high analyte concentrations; however, this paper was relevant since it clearly demonstrated the excellent analytical performance of these microsystems during sample quantitation.

Escarpa's group has proposed different strategies in the analysis of food samples involving natural antioxidants (polyphenols and vitamins) using single channel microchip electrochemistry platforms with electrochemical detection [82,83]. Polyphenolic analysis is very complex because many compounds could contribute to the complexity of the electropherogram obtained (as was also illustrated in Henry's papers). Although fast detection of prominent natural antioxidants including ascorbic acid and polyphenols was obtained in less than 200 s, the analysis of pear samples was very complex and only arbutin in some pulps and ascorbic acid in juice (where up to four peaks were observed) was really detected [82]. Recovery studies using blank samples were carefully performed for both analytes in order to confirm their provisional identification. The detection of phlorizdin (the *fingerprint* analyte of apples and

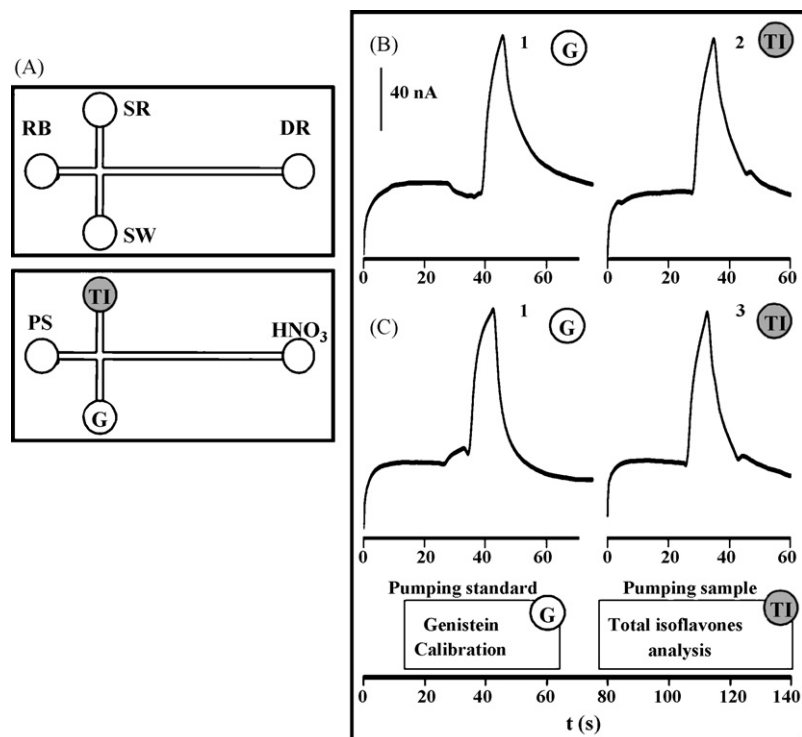


Fig. 5. Microchip layout used with classic and proposed terminology (A): genistein reservoir (G), total isoflavones reservoir (TI), pumping solution reservoir (PS). Calibration (using genistein G) and analysis signals obtained for total isoflavones (TI) in the reference material (B) and soy supplements (C) using the proposed integrated strategy. Conditions: 100 mM genistein peak (G, peak 1), total isoflavones peak [TI, peak 2 (reference material), peak 3 (dietary supplement)] (from reference [86], with permission).

unexpected in pears) in the presence of arbutin (the *finger-print* of pears) was also noticed, demonstrating the possibility of adulterations. Real detection and the quantitative analysis of water-soluble vitamins has been reported in several formulations containing one or more of the analyzed vitamins at different concentration levels in less than 130 s [83]. The amount of each vitamin declared by the manufacturer (per capsule) on the label closely matched the values obtained using the microchip protocol (relative error ranging from 2 to 9%). The well-known problems associated with the inherent features of electrokinetic injection (modification of ionic strength, compatibility between buffers and solvents/matrices) made quantitation more difficult than expected in those samples with high mineral salt content.

Very recently, an approach for detecting fraud in vanilla samples based on the analysis of ethyl vanillin and vanillin was proposed [84]. Vanillin was really detected in vanilla beans (*Vanilla planifolia* and *Vanilla tahitensis*), being this compound the prominent compound in vanilla extracts and which confirms their authenticity. In addition, ethyl vanillin was really detected in certain vanilla sugars indicating the non-natural origin of the vanilla flavor used since the presence of ethyl vanillin is unambiguous proof of fraud. On the contrary, vanillin was really detected in the other sugar samples which did not necessarily indicate a natural vanilla origin because, in and of itself, the presence of vanillin is not unambiguous proof of the natural origin. A detailed quantitative analysis is given and important differences in the quantitative levels of vanillin were found between

natural and adulterated samples revealing the possibilities of the method in control analysis.

Three prominent green tea amino acids (theanine (The), arginine (Arg), and glycine (Gly)), previously extracted and derivatized *off-chip*, were separated onto a PMMA microchip format using LIF detection in less than 2 min [85]. While sensitivity was not a challenge because of the detection route used, the selectivity of the analysis was improved by removing catechins, since the derivatization scheme involved both kind of compounds, amino acids and catechins.

Recently, methodological calibration and analysis on board a planar *microfluidic* device to determine *total* isoflavones in soy samples was proposed [86]. The strategy, in connection with microchip layout, is shown in Fig. 5. Accuracy (systematic error below 6%) is demonstrated for the first time using these microsystems with a secondary standard from the Drug Master File (SW/1211/03) as *reference* material. Ultra-fast calibration and analysis of total isoflavones in soy samples was successfully integrated, taking only 60 s each, notably enhancing the analytical performance of these microdevices with an important decrease in overall analysis times (less than 120 s) and with an increase in accuracy by a factor of 3. In addition, the method was applied to the analysis of soy tablets with acceptable accuracy.

He et al. [87] have developed a method to determine nitrite in different food samples (vegetables, fruits, and meats) using a PMMA chip as a μ FIA system with chemiluminescence detection (luminol-ferricyanide system). Exhaustive extraction and sample treatment (732-cation resin column) was needed per ana-

lyzed solid sample. Good analytical performance was achieved with a reproducibility of 4.1%, a detection limit of 4 $\mu\text{g/l}$, and an analysis time under 2 min. An interference study was performed discovering that Fe^{2+} , Ni^{2+} , V (V), Cu^{2+} , uric acid, and vitamin C interfered with the analysis. Nevertheless, the method was compared with the AOAC official method (Griess method) with excellent results.

To improve selectivity and sensitivity, some immunoassays have been developed on *microfluidic* devices for food analysis as an alternative strategy. Cheng et al. [88] determined staphylococcal enterotoxin B in spiked dry milk using a PDMS chip with fluorescence detection. Sandwich-type immunoassays were developed utilizing the chip as a chamber reaction. In the first step, the chip surface was functionalized with biotinylated antibodies. In the second step, the sample was hydrodynamically introduced onto the chip and, then, the fluorescently labeled secondary antibodies were added. Finally, the chip was imaged and quantified on a fluorescence scanner. An excellent LOD was achieved with this method (0.5 ng/ml).

Botulinum neurotoxin A [89] was detected in spiked food samples (infant formula, milk, sucrose) on a polycarbonate ELISA-chip with colorimetric detection. A cross-flow immunochromatographic assay was developed in which a sandwich-type immunoassay with an enzyme-linked antibody was performed vertically, and a flow of the enzyme substrate revealed the presence of Botulinum neurotoxin A horizontally. An excellent LOD (2.0 ng/ml) was achieved, enhancing five-fold the LOD established by the commercial kit.

Another interesting ELISA on *microfluidic* devices was performed to determine folic acid in infant formula [90]. A commercial polyimide Immuchip ELISA with eight channels and hydrodynamic flow was used. In this case, a competitive assay between free antigens (sample analyte) and fixed antigens on the surface of the chip was performed and the product of the enzyme reaction was monitored by electrochemical detection ($E = 250 \text{ mV}$). Excellent analytical performance (reproducibility 7%, LOQ 2 ng/ml, and analysis time 5 min) was obtained. The method was validated with the reference method (microbiological assay).

5. Conclusion and future prospects

Nowadays, and strictly speaking, there are few papers that deal with the analysis of real samples using *microfluidic* devices regardless of the application area. It clearly shows the enormous difficulties that the analysis of real samples presents on a microscale. Sensitivity and selectivity are the main challenges to developing a true “lab-on-a-chip,” with their improvement in terms of the use of ultra-sensitive detectors and the integration of sample treatments on the *microfluidic* devices being the main requirements. Moreover, additional efforts have to be made towards the validation of the methods to demonstrate the reliability of *microfluidic* systems. In spite of these drawbacks, incredible analysis times, low sample and reagent consumptions, and interesting applications involving clinical, environmental, and food analysis have been published.

No doubt exists that performing sample preparation *on-chip*, discovering novel ultra-sensitive detection routes, and systematically using *smart* bioreactives and nanotechnology are the keys to defining the success and incorporation of *microfluidic* devices in our laboratories.

Congratulations

I had the privilege of knowing Dr. Wang in 2001 during my *post-doc* position at NMSU and I was highly impressed by the quality of this person. I soon realized that not only was he an extraordinary scientist but a unique, talented human being. I firmly believe that we have before us a scientist with enormous creativity and a novel vision. I will never find the right words to say thanks!

Thank you very much, Dr. Wang!

What can we expect from words?

At times, they hardly sing.

But today they are here to tell us

That in your intelligence you are great

That you belong to that group of great men,

Different men, who live awake because they have a dream.

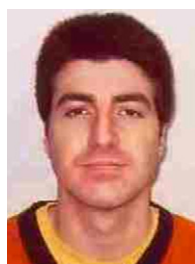
Mentor of mine,

My heart sings something about you

I find you in my memory

Like a friend that I have loved.

(Poem written by Alberto Escarpa for Dr. Wang in his 60th birthday)



Agustín González



Alberto Escarpa

Acknowledgments

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Technology CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. AGC acknowledges the fellowship received from the Spanish Ministry of Education and Science.

References

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators B* 1 (1990) 244.
- [2] G.W. Whitesides, *Nature* 442 (2006) 368.
- [3] D. Janasek, J. Franzke, A. Manz, *Nature* 442 (2006) 374.
- [4] O. Geschke, H. Klank, P. Tellesmann (Eds.), *Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip Devices*, WILEY-VCH Verlag & Co., KgaA, Weinheim, 2004.
- [5] A. Rios, A. Escarpa, M.C. Gonzalez, A.G. Crevillén, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 467.
- [6] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *Lab Chip* 1 (2001) 1.
- [7] W.R. Vandaveer, S.A. Pasas, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 23 (2002) 3667.
- [8] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 1133.
- [9] M. Pumera, A. Merkoçi, S. Alegret, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 219.
- [10] P.J. Viskari, J.P. Landers, *Electrophoresis* 27 (2006) 1797.
- [11] A. van der Berg, P. Bergveld, *Lab-on-a-Chip* 6 (2006) 1266.
- [12] J. Lichtenber, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, *Talanta* 56 (2002) 233.
- [13] S.K. Mohanty, D. Kim, D.J. Beebe, *Electrophoresis* 27 (2006) 3772.
- [14] C.K. Fredrickson, Z.H. Fan, *Lab Chip* 4 (2004) 526.
- [15] G.T.A. Kovacs, *Micromachined Transducers Sourcebook*, McGraw Hill, New York, 1998.
- [16] R.H. Liu, J. Yang, R. Lenigk, J. Bonanno, P. Grodzinski, *Anal. Chem.* 1 (2004) 1824.
- [17] K.M. Horsman, J.M. Bienvenue, K.R. Blasler, J.P. Landers, *J. Forens. Sci.* 52 (2007) 784.
- [18] J.A. Fruetel, R.F. Renzi, V.A. Vandernoot, J. Stamps, B.A. Horn, J.A. West, S. Ferko, R. Crocker, C.G. Bailey, D. Arnold, B. Wiedenman, W.Y. Choi, D. Yee, I. Shokair, E. Hasselbrink, P. Paul, D. Rakestraw, D. Padgen, *Electrophoresis* 26 (2005) 1144.
- [19] P.N. Floriano, N. Christodoulides, D. Romanovicz, B. Bernard, G.W. Simmons, M. Cavell, J.T. McDevitt, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2079.
- [20] L.J. Kricka, P. Fortina, *Clin. Chem.* 48 (2002) 1620.
- [21] A.J. Tudos, G.A.J. Besselink, R.B.M. Schasfoort, *Lab Chip* 1 (2001) 83.
- [22] E. Verpoorte, *Electrophoresis* 23 (2002) 677.
- [23] U. Bilitewski, M. Genrich, S. Kadow, G. Mersal, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 556.
- [24] D.D. Cunningham, *Anal. Chim. Acta* 429 (2001) 1–18.
- [25] A.J. de Mello, N. Beard, *Lab Chip* 3 (2003) 11N.
- [26] S. Thorslund, O. Klett, F. Nikolajeff, K. Markides, J. Bergquist, *Biomed. Microdev.* 8 (2006) 73.
- [27] S.F.Y. Li, L.J. Kricka, *Clin. Chem.* 5 (2006) 37.
- [28] B. Baena, A. Cifuentes, C. Barbas, *Electrophoresis* 26 (2005) 2622.
- [29] W.R. Vandaveer, S. Pasas-Farmer, D.J. Fischer, C.N. Frankenfeld, S.M. Lunte, *Electrophoresis* 25 (2004) 3528.
- [30] B.H. Weiller, L. Ceriotti, T. Shibata, D. Rein, M.A. Roberts, J. Lichtenberg, J.B. German, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1702.
- [31] L. Ceriotti, T. Shibata, B. Folmer, B. Weiller, M.A. Roberts, N.F. de Rooij, E. Verpoorte, *Electrophoresis* 23 (2002) 3615.
- [32] J.A. Lapos, D.P. Manica, A.G. Ewing, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3348.
- [33] M. Johirul, A. Shiddiky, R. Kim, Y. Shim, *Electrophoresis* 26 (2005) 3043.
- [34] M. Vlckova, M.A. Schwarz, *J. Chromatogr. A* 1142 (2007) 214.
- [35] N.J. Munro, Z. Huang, D.N. Finegold, J.P. Landers, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2765.
- [36] J.C. Fanguy, C.S. Henry, *Electrophoresis* 23 (2002) 767.
- [37] J. Wang, M.P. Chatrathi, *Anal. Chem.* 75 (2003) 525.
- [38] C.D. Garcia, C.S. Henry, *Analyst* 129 (2004) 579.
- [39] J. Wang, M.P. Chatrathi, G.E. Collins, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 11.
- [40] Y. Du, J.L. Yan, W.Z. Zhou, X.Y. Yang, E.K. Wang, *Electrophoresis* 25 (2004) 3853.
- [41] V. Srinivasan, V.K. Pamula, R.B. Fair, *Lab Chip* 4 (2004) 310.
- [42] H. Nakamura, Y. Murakami, E. Tamiya, I. Karube, *Anal. Chem.* 73 (2001) 373.
- [43] H. Moon, A.R. Wheeler, R.L. Garrell, J.A. Loo, C.J. Kim, *Lab Chip* 6 (2006) 1213.
- [44] P. Caglar, S.A. Tuncel, N. Malcik, J.P. Landers, J.P. Ferrance, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1303.
- [45] T. Noda, H. Takao, K. Yoshioka, N. Oku, M. Ashiki, K. Sawada, K. Matsumoto, M. Ishida, *Sens. Actuators B* 119 (2006) 245.
- [46] W.S.B. Yeung, G.A. Luo, Q.G. Wang, J.P. Ou, *J. Chromatogr. B* 797 (2003) 217.
- [47] A.E. Herr, D.J. Throckmorton, A.A. Davenport, A.K. Singh, *Anal. Chem.* 77 (2005) 585.
- [48] A.E. Herr, A.V. Hatch, D.J. Throckmorton, H.M. Tran, J.S. Brennan, W.V. Giannobile, A.K. Singh, *PNAS* 104 (2007) 5268.
- [49] T.M. Phillips, *Electrophoresis* 25 (2004) 1652.
- [50] T.M. Phillips, E. Wellner, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 106.
- [51] M.G. Roper, J.G. Shackman, G.M. Kahlgren, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4711.
- [52] T. Lim, H. Ohta, T. Matsunaga, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3316.
- [53] K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Anal. Chem.* 73 (2001) 213.
- [54] K. Tsukagoshi, N. Jinno, R. Nakajima, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1684.
- [55] J. Moorthy, G.A. Mensing, D. Kim, S. Mohanty, D.T. Eddington, W.H. Tepp, E.A. Johnson, D.J. Beebe, *Electrophoresis* 25 (2004) 1705.
- [56] V. Linder, E. Verpoorte, N.F. De Rooij, H. Sigris, W. Thormann, *Electrophoresis* 23 (2002) 740.
- [57] M. Wolf, D. Juncker, B. Michel, P. Hunziker, E. Delamarque, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1193.
- [58] R. Kurita, Y. Yokota, Y. Sato, F. Mizutani, O. Niwa, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5525.
- [59] G. Chen, Y.H. Lin, J. Wang, *Talanta* 68 (2006) 497.
- [60] L. Marle, G.M. Greenway, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 795.
- [61] J. Wang, J. Zima, N.S. Lawrence, M.P. Chatrathi, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4721.
- [62] J. Wang, M.P. Chatrathi, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1804.
- [63] J. Wang, M. Pumera, G.E. Collins, A. Mulchandani, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6121.
- [64] A. Hilmi, J.T. Luong, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 3046.
- [65] J. Fischer, J. Barek, J. Wang, *Electroanalysis* 18 (2006) 195.
- [66] D. Shin, D.A. Tryk, A. Fujishima, A. Muck Jr., G. Chen, J. Wang, *Electrophoresis* 25 (2004) 3017.
- [67] J. Wang, M.P. Chatrathi, B. Tian, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 9.
- [68] C.D. Garcia, G. Engling, P. Herckes, J.L. Collett Jr., C. Henry, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 618.
- [69] Y. Ding, C.D. Garcia, *Analyst* 131 (2006) 208.
- [70] S. Wakida, A. Chiba, T. Matsuda, K. Fukushi, H. Nakanishi, X. Wu, H. Nagai, S. Kurosawa, S. Takeda, *Electrophoresis* 22 (2001) 3505.
- [71] I. Chang, J.J. Tulock, J. Liu, W. Kim, D.M. Cannon Jr., Y. Lu, P.W. Bohn, J.V. Sweedler, D.M. Crokek, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3756.
- [72] Y. Xu, F.G. Bessoth, J.C.T. Eijkel, A. Manz, *Analyst* 125 (2000) 677.
- [73] S. Fujii, T. Tokuyama, M. Abo, A. Okubo, *Anal. Sci.* 20 (2004) 209.
- [74] G. Deng, G.E. Collins, *J. Chromatogr. A* 989 (2003) 311.
- [75] R. Bodor, V. Madajova, D. Kaniansky, M. Masar, M. Johnck, B. Stanislawski, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 155.
- [76] A. Escarpa, M.C. Gonzalez, A.G. Crevillén, A.J. Blasco, *Electrophoresis* 28 (2007) 1002.
- [77] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 189.
- [78] P. Kuban, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 26 (2005) 3169.
- [79] W.S. Law, P. Kuban, J.H. Zhao, F.Y. Li, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 26 (2005) 4648.
- [80] Q. Chu, Y. Guan, C. Geng, J. Ye, *Anal. Lett.* 39 (2006) 729.
- [81] R.W. Hompesch, C.D. Garcia, D.J. Weiss, J.M. Vivanco, C.S. Henry, *Analyst* 5 (2005) 694.
- [82] A.J. Blasco, I. BARRIGAS, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Electrophoresis* 26 (2005) 4664.
- [83] A.G. Crevillén, A.J. Blasco, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Electrophoresis* 27 (2006) 5110.
- [84] M. Avila, M.C. Gonzalez, M. Zougagh, A. Escarpa, A. Rios, *Electrophoresis* 28 (2007) 4233.
- [85] M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, *J. Chromatogr. A* 1013 (2003) 183.

- [86] A.J. Blasco, A.G. Crevillén, P. de la Fuente, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Analyst* 132 (2007) 323.
- [87] D. He, Z. Zhang, Y. Huang, Y. Hu, *Food Chem.* 101 (2007) 667.
- [88] Y. Dong, K.S. Phillips, Q. Cheng, *Lab Chip* 6 (2006) 675.
- [89] S. Han, J.H. Chob, I.H. Choa, E.H. Paek, H.B. Ohc, B.S. Kim, C. Ryu, K. Lee, Y.K. Kim, S.H. Paek, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 1.
- [90] D. Hoegger, P. Morier, C. Vollet, D. Heini, F. Reymond, J.S. Rossier, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 267.

Alberto Escarpa
María Cristina González
Agustín González Crevillén
Antonio Javier Blasco

Departamento Química
Analítica e Ingeniería Química,
Universidad de Alcalá,
Madrid, Spain

Received July 5, 2006
Revised September 6, 2006
Accepted September 25, 2006

Review

CE microchips: An opened gate to food analysis

CE microchips are the first generation of micrototal analysis systems (μ -TAS) emerging in the miniaturization scene of food analysis. CE microchips for food analysis are fabricated in both glass and polymer materials, such as PDMS and poly(methyl methacrylate) (PMMA), and use simple layouts of simple and double T crosses. Nowadays, the detection route preferred is electrochemical in both, amperometry and conductivity modes, using end-channel and contactless configurations, respectively. Food applications using CE microchips are now emerging since food samples present complex matrices, the selectivity being a very important challenge because the total integration of analytical steps into microchip format is very difficult. As a consequence, the first contributions that have recently appeared in the relevant literature are based primarily on fast separations of analytes of high food significance. These protocols are combined with different strategies to achieve selectivity using a suitable nonextensive sample preparation and/or strategically choosing detection routes. Polyphenolic compounds, amino acids, preservatives, and organic and inorganic ions have been studied using CE microchips. Thus, new and exciting future expectations arise in the domain of food analysis. However, several drawbacks could easily be found and assumed within the miniaturization map.

Keywords:

Food analysis / "Food lab-on-a-chip" / Microchip CE DOI 10.1002/elps.200600412

1 Introduction

The micrototal analysis system (μ -TAS) concept was developed from the modification of the TAS approach by downsizing and integrating its multiple steps (injection, reaction, separation, and detection) onto a single device, yielding a sensor-like system with fast response, low sample consumption, on-site operation, and high stability [1, 2].

Nowadays, not all the analytical steps are equally incorporated and the incidence level of miniaturization is not homogeneous. In fact, detection and separation are the most investigated [3], whereas the sample preparation is notably the less developed. In addition, important general challenges still remain awaiting an analytical solution, such as automation, sampling, and sample introduction. Moreover, a breaking process of the so-called real-world interface is highly expected [4].

The well-known microfabrication techniques, used to create a network of etched channels using substrate materials (glass, polymers) that exhibit by themselves a good electroosmotic flow in connection with the possibility to apply the electrokinetic phenomena easily in order to move fluids in these platforms, are the main means used to understand the prominent role of valveless microsystems *versus* analytical microsystems that use a hydrodynamic flow. In addition, the use of CE in microchip format offers important advantages such as the reduction in the analysis time to seconds, low volume of sample, extremely low waste volumes, and the possibility of a complete integration of sample preparation and analysis function (*i.e.*, derivatization) [5–8].

Detection has been one of the main challenges of CE microchips since very sensitive techniques are needed as a consequence of the use of ultrasmall sample volumes. LIF was the original detection technique applied. It is the detection scheme that is mostly used because of its inherent sensitivity and easy focus [9, 10], and it is nowadays the standard detection technique used for microchip separation. Electrochemical detection constitutes the most attractive alternative because of its inherent sensitivity and miniaturization without loss of performance and high compatibility with the microfabrication techniques used in CE microchips' fabrication. High sensitivity and responses not dependent on the optical path length or sample turbidity are additionally very

Correspondence: Professor Alberto Escarpa, Departamento Química Analítica e Ingeniería Química, Universidad de Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain

E-mail: alberto.escarpa@uah.es

Fax: +34-918854971

Abbreviations: HP- β -CD, hydroxypropyl- β -CD; PMMA, poly(methyl methacrylate); TAS, total analysis system

attractive features [11–15]. Although amperometry is the most common mode used, conductimetric detection on microfabricated devices is recently being developed. In comparison to amperometry, conductimetric detection is less sensitive, but it is a universal detection technique that has been applied as a detection mode in CE microchips, either in the galvanic mode (a pair of electrodes is placed in the separation channel for liquid impedance measurement) [16, 17] or the noncontact mode (there is no contact between the pair of electrodes and the separation channel solution) [18–21]. Noncontact conductimetric detection is preferred for three main reasons: (i) the electronic circuit is decoupled from the high-voltage applied for separation (there is no direct DC coupling between the electronics and the liquid in the channel), (ii) the formation of glass bubbles on the metal electrodes is avoided, and (iii) electrochemical modification or degradation of the electrode surface is prevented.

As we have already mentioned, most of the advances have been made on the separation and detection schemes. However, many of the necessary analytical steps (such as sampling and sample treatment) are still performed outside the chip. As a consequence, an important effort has been made in the last few years in this direction [22, 23].

In this way, total integration and, specially, world-to-chip interfacing are considered as the major challenges, particularly in high-throughput applications requiring frequent sample change such as online continuous process monitoring. In a more specific way, various world-to-chip interfacing schemes are being developed to suit different requirements of sample and microfluidic chip in terms of sampling rate, sample introduction, sample consumption, precision, stability, and degree of automation [4].

Bioanalytical and clinical analyses have been the preferred fields of application of miniaturized CE [24–28]. Indeed, the birth of the μ -TAS “lab-on-a-chip” concept is intimately linked to these areas because of the unique suitability in the decentralization of analysis (“point-of-care-testing”). In addition, relevant molecules of clinical significance were compatible with the most suitable detection schemes (LIF), which have produced synergic developments since their early times [8]. The variety of analytes ranges from biomolecules (in particular proteins, peptides, and nucleic acids) to small molecules such as glucose. Since selectivity and sensitivity could constitute an important problem in real analysis, immunoassays and enzyme assays have a predominant role in bioanalytical microfluidics. They cover a group of analytical methods with high analytical potential, due to the combination of their inherent selectivity (enzyme/immunoassay reaction) with high sensitivity due to the enzyme amplification phenomena [29, 30]. Environmental applications are also other important areas in which CE microchips play a predominant role due to their inherent negligible wastes. These microsystems are termed as “environmental friendly” [31–33], including the concept of disposable “lab-on-a-chip” [34]. Recently, the relevant role of microfluidic devices for environmental monitoring has been revised [35].

However, in the context of the state of the art of miniaturization, food applications are now emerging using the most representative μ -TAS, a CE microchip, which in itself constitutes a clear trend in the “lab-on-a-chip” scene. The aim of this review is to give a critical overview of the present role of CE microchips and their realistic perspectives in the food scene. To the best of our knowledge, this is the first review on CE microchips in food environments, although some advances have been included in the last review of CE and food analysis [36].

2 Understanding the role of CE microchips in food environments

CE microchips present important challenges. Despite being a field that is practically new, it offers a very promising future in food environments. To understand the role of CE microchips in food environments, we should keep in mind the following general idea.

In spite of the inherent disadvantages of CE microchips in comparison to conventional scales such as reduced selectivity and sensitivity, these microsystems are potentially very attractive in food environments because of their possible advantages such as cheap, portable, and fully automatized integrated systems used on-site by anyone.

Since the complexity of food matrices as well as the peak capacity and sensitivity could be common drawbacks, both, selectivity and sensitivity, should be enhanced during the sample preparation. Selectivity and sensitivity requirements often involve complex sample preparation protocols and analyte separation with advanced detection schemes as well as tedious and time-consuming protocols. In contrast with biochemical analysis where the very specific reagents (immunoassay/enzymes) used frequently and dramatically improve the selective analysis, in food analysis the use of bioreagents are obviously less developed and sample preparation is always needed.

Although the sample preparation step is less developed than the separation and detection steps, it has a very exciting future in food analysis because of (i) its inherent possibilities offered by microfabrication technology to create sophisticated designs (layouts, electrochemical cell example) and microstructures (filters) in connection with the sample preparation requirements; (ii) the inherent possibilities offered from the presence of laminar flow and diffusion in action (H-filter example); and (iii) the easy-to-use electrokinetic phenomena to move fluidics into the network channels with accuracy (focusing on flow techniques). Also, derivatization schemes in different formats, using the well-implanted detection systems (LIF and electrochemical detection (ED)) that have already been successfully introduced in bioanalysis could subsequently be extended into food analysis.

In addition, since a very important group of analytes of food significance can be analyzed by CE (amino acids, proteins and peptides, polyphenolic compounds, vitamins, car-

bohydrates, small organic and inorganic ions, pesticides, and residues) and CE microchips are based on the same principle of conventional CE, a promising result could be expected in the near future using well-designed analytical strategies involving LIF and mainly ED detection (since these analytes exhibit inherent and marked electroactivity).

Therefore, a prominent role for CE microchips in food applications is also anticipated in the future and, subsequently, the concept of lab-on-a-chip could be naturally extrapolated to food environments to reach the “food lab-on-a-chip” concept. The target objectives previously drawn in other areas such as “point of care testing” should be suitably redefined in food areas such as monitoring nutrients and controlling quality in food production in the near future. Figure 1 shows a realistic position of CE microchips in food analysis based on the statements discussed above.

3 State-of-the-art of CE microchips in food analysis

Figures 2A–D show representative and relevant examples of CE microchip designs used in food environments. Simple layouts and geometries (simple and double T) in both, glass and polymer (PDMS, poly(methyl methacrylate) (PMMA) materials coupled mainly to electrochemical detection, are giving their first results.

Nowadays, due to the increasing interest in natural antioxidants (vitamins and mainly polyphenolic compounds) on

account of their important role in human health, studies of these compounds have recently been made in CE microchip format. Figure 3 shows representative chemical structures of polyphenols studied in microchip format.

The main natural antioxidants are polyphenols and ascorbic acid, which are present in several plant foods. Polyphenolic compounds are a complex group of organic substances which can be classified into single phenolic acids and complex flavonoids. Miniaturized electrochemical detectors such as screen-printed electrodes (SPEs) have allowed a fast detection of food-related phenolic acids including chlorogenic, genistic, ferulic, and vanillic acids [37]; being, on the other hand, the first contribution in the food scene. The analytes were separated by CZE because of the different extent of ionization of the phenolics under a borate buffer (pH 9.5). The use of 1 M nitric acid in the detector compartment dramatically improved the sensitivity of phenolics. The protocol used less than 300 s and an application to commercial wines without sample preparation was performed with promising results. Although the recovery of the phenolic acids analyzed was very good and it demonstrated the suitability of the method, only two of them (vanillic and chlorogenic) were really detected. In addition, the selectivity was improved using different oxidation potentials in order to obtain more “clear electropherograms.” Apparently, the dilution carried out also avoided the interference of other phenolic compounds such as flavonoids because wine samples are very complex and the direct detection of all the polyphenols required the use of sophisticated HPLC gradient routes.

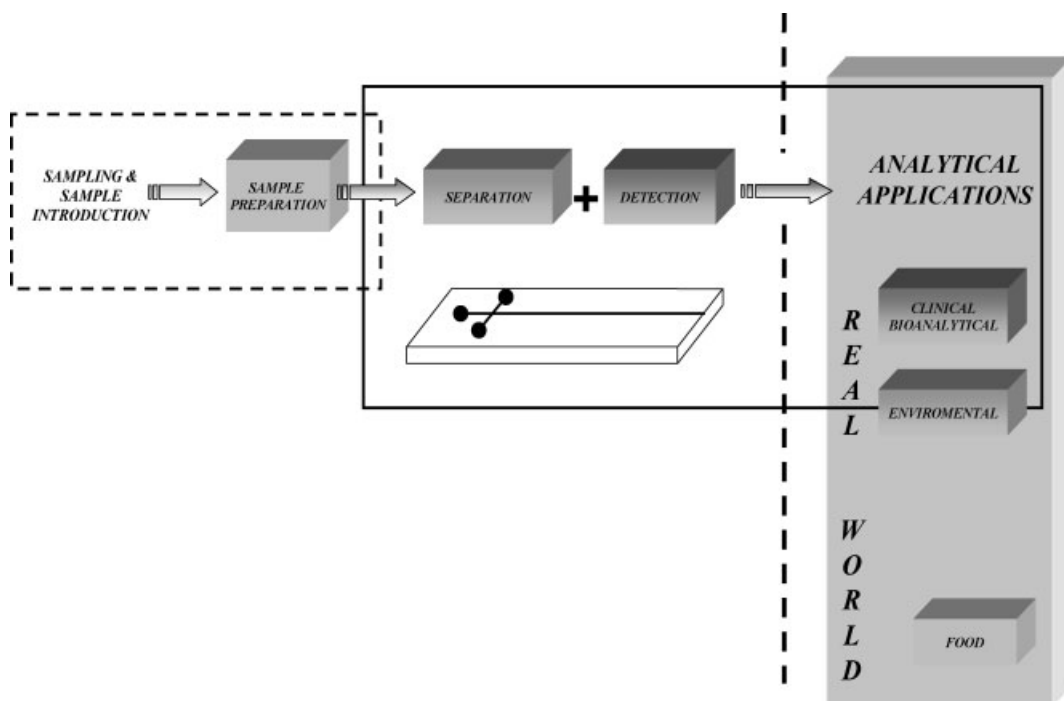


Figure 1. Placing for CE microchips in food analysis (the strength of the grey color is indicative of the degree of maturity).

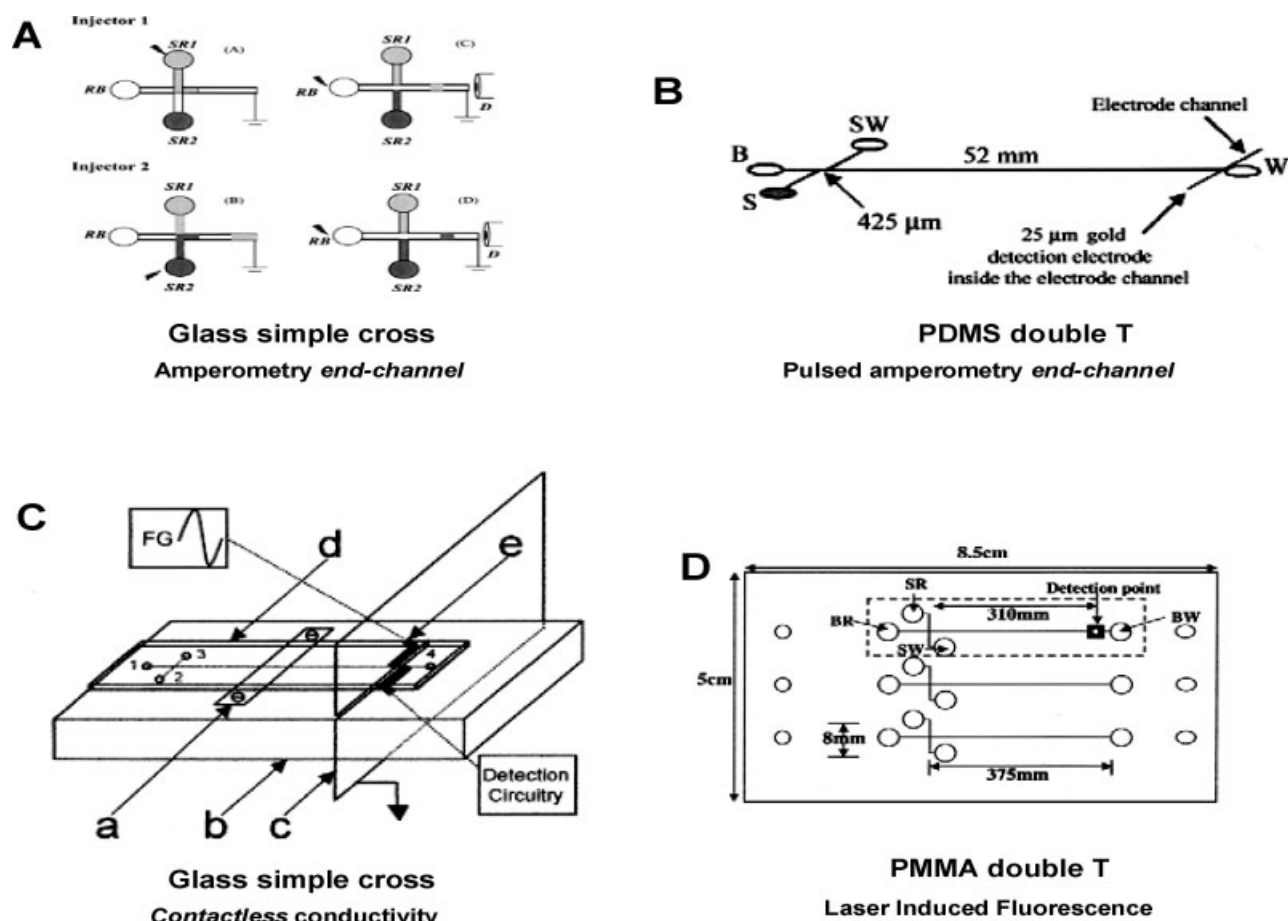


Figure 2. Microchip design and detection mode used in food analysis. (A) Glass simple cross-microchip using both injectors (electrokinetic protocol) sequentially. RB: running buffer reservoir, SR1 and SR2 sample reservoirs. (B) PDMS double-T microchip-CE with PAD. (C) Glass simple cross-microchip with contactless conductivity. (D) PMMA double-T microchip with LIF. All the figures were reprinted with permission from the authors of ref. [38], [40], [43], and [45], respectively.

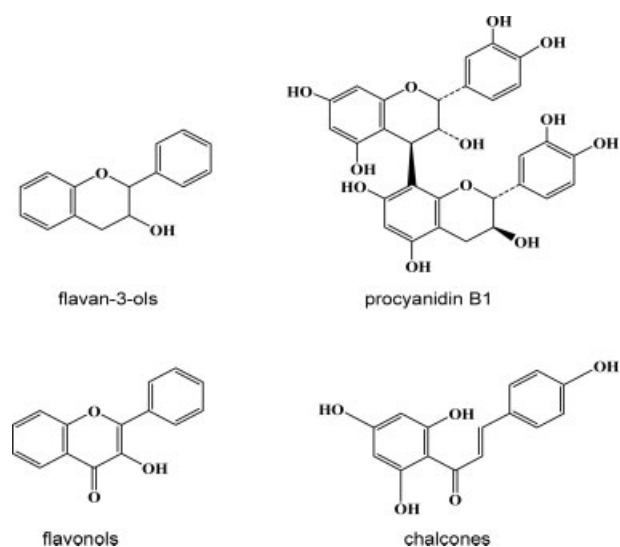


Figure 3. Representative polyphenol structures studied using CE microchips.

Due to the variety of health benefits, there are a large number of nutritional supplements derived from plant extracts that contain catechins (nutraceutical). Analysis of catechins and derivatives in commercially available green tea extract has been performed using a PDMS microchip with MEKC with pulsed amperometric detection (PAD) [38]. The detection of (+)-catechin, epigallocatechin gallate, and (-)-epicatechin and epicatechin gallates was achieved in less than 3 min, notably improving the time employed using an HPLC system (25 min). In the present work, three important issues, previously used in other kinds of applications, were demonstrated to be useful in foods: (i) the use of PAD to overcome problems associated with electrode fouling due to the adsorption of oxidation products, (ii) the suitable use of PDMS microchips, and (iii) the use of MEKC to separate catechins. In addition, one important contribution of this paper was the good agreement found between the quantitative data obtained *versus* those declared by manufacturer and those obtained using an HPLC method. However, sample preparation was still complex and off-chip (methanol-water,

stirred extraction and filtration) and sample matrix was still “easy” since a nutraceutical was assayed.

Fast and simultaneous detection of prominent natural antioxidants including ascorbic acid and flavonoids have recently been reported in less than 200 s in pear samples [39]. Polyphenolic analysis is very complex because many compounds could contribute to the complexity of the electropherogram obtained. To help in the electropherogram interpretation, an analytical strategy involving the electrophoretic separation of “analyte couples” with provisional identification purposes was also proposed. The selected analyte couples were made on the basis of their presence (positive identification proof) or absence (negative identification proof). In this way, the separation of two prominent antioxidants, (+)-catechin (phenolic nature) and ascorbic acid (nonphenolic nature), the separation of two prominent flavonoids confined to different parts of fruits, (+)-catechin and rutin (typical of the external parts of the fruits) and the separation of two finger print phenolics, arbutin (typical of pears) and phlorizidin (typical of apples), were strategically reported. Real samples including solid–liquid extraction and filtration such as pear pulp and pear juices were analyzed and tentative quantitative results were provided. However,

pear samples were very complex and only prominent polyphenolic compounds were really detected and quantified. Nevertheless, this work also opened up expectations on food authenticity analysis.

Figure 4 shows relevant electropherograms of the natural antioxidants studied and discussed above. As can be observed, a very fast analysis of five flavanols was obtained when a nutraceutical was analyzed (Fig. 4B) in contrast with the two phenolic acids detected in wines (Fig. 4A) or the fast detection of arbutin or ascorbic acid in pear samples (Fig. 4C).

In addition, since sample introduction is still done manually in most of the cases, the use of both microchip reservoirs was alternatively proposed [40]. The suitability of the concept has been successfully demonstrated during the analytical determination of arbutin in nutraceutical samples. The extraction of arbutin was carried out off-chip quantitatively and the arbutin content was then evaluated using both simple cross injectors with excellent analytical performance, allowing the duplication of the number of runs without sample changing. The power of microchips for CE is also revealed as a useful technique to monitor extraction processes which are very common in food analysis.

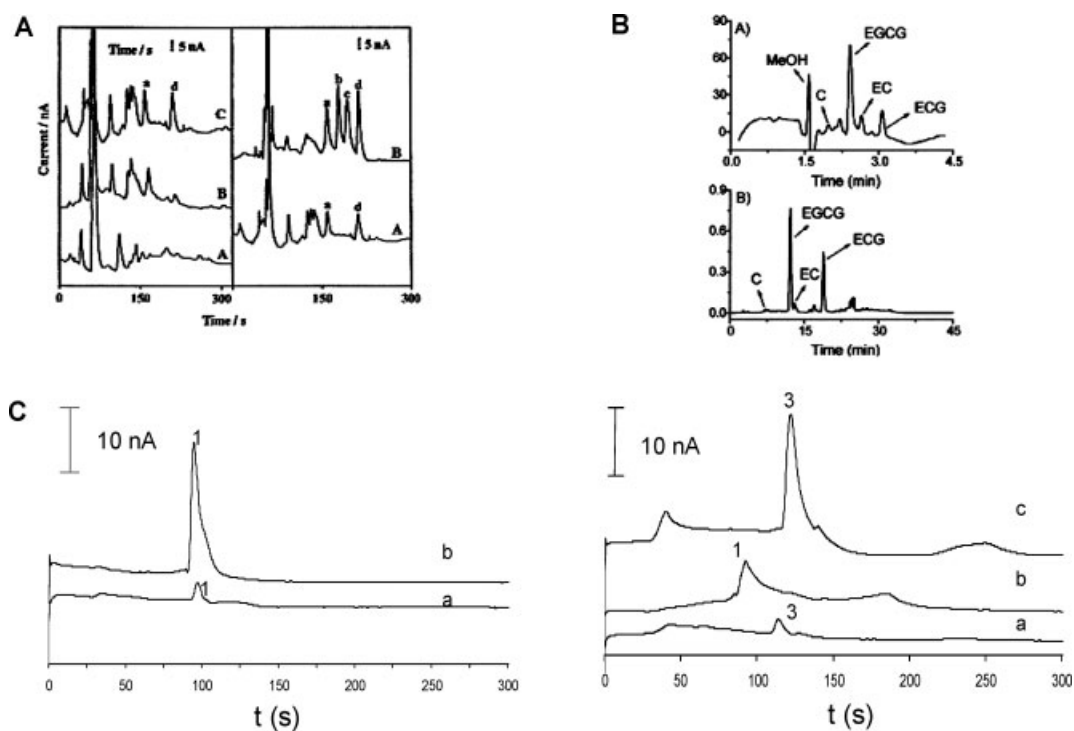


Figure 4. Analysis of natural antioxidants. (A) Electropherogram of Californian red wine sample at various detection potentials (left). (A) 0.8 V (B) 0.9 V (C) 1.0 V. Analysis of the same wine sample before (A) and after (B) addition of 200 μ M of the same phenolic acids (right). Peaks: (a) chlorogenic acid; (b) gentisic acid; (c) ferulic acid; (d) vanillic acid. (B) (A) Electropherogram of a tea extract sample showing the presence of catechin (C), epigallocatechin gallate (EGCC), epicatechin (EC) and epicatechin gallate (ECG). (B) Chromatograms (HPLC-UV) of a green tea extract sample. (C) Pear pulp extract containing arbutin (a), pulp extract fortified in arbutin (b) (left). Commercial pear juice (a), commercial pear juice fortified in arbutin (b) and fortified in ascorbic acid (c) (right). All the figures were reprinted with permission from the authors of ref. [37–39], respectively.

Vitamins are also a group of analytes with high significance in foods. They are essential compounds and a lot of dietary supplements are consumed in our culture. Very recently, water-soluble vitamins (B-group and C) have been separated in less than 130 s using single channel microchip electrochemistry platforms, which are one of the latest advances reported in food applications [41]. The electrochemical detection route was carefully optimized and the use of 1 M nitric acid in the detector compartment to detect folic acid was also crucial. In addition, a methodological innovation integrating calibration and analysis of water-soluble vitamins on board of the chip was also proposed. The strategy consisted in using both reservoirs (termed calibration and analysis reservoirs) as well as a calibration factor (defined as signal/concentration analyte) sequentially. The analytical route consumed 350 s in the overall protocol (employing 130 s in calibration plus 130 s in analysis) improving the analysis times in both, microchip and conventional protocols. Accuracy was clearly demonstrated for all the vitamins studied; however, when different dilutions are needed for the analysis of all the vitamins, the analysis becomes more complex.

Analysis of metal biomolecules is essential in bioavailability studies and their significance in food analysis could also be very important. Selenium speciation is mainly relevant in food environments. Electrochemistry has become easy and fast for the analysis of these biomolecules with food significance. In this way, an interesting CE microchip protocol using electrochemical detection has recently been reported for the analysis of related food amino acids including Se-methionine, Se-ethionine, and Se-methyl cysteine [42]. The amino acids were also derivatized off-chip. Analytes were separated in a borate buffer within 300 s. Although the work carried out was only confined to standards, it opened the possibility to use CE microchips in the analysis of metal biomolecules. Figure 5 shows the excellent separation of an amino acid standard mixture using miniaturized electrochemical detectors.

The separation of commonly used preservatives such as benzoate and sorbate and vitamin C with capacity coupled contactless conductivity using conventional CE and PMMA microchip has also been reported [43, 44]. The transference of the adopted buffer from conventional to microchip format gave a poor resolution mainly due to the short effective length of the microchip compared to conventional capillary and other conditions which were optimized. A buffer composition of CDs hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD) and CTAB was needed to achieve suitable separation. These studies demonstrate that the transference from conventional to microchip format is not only a decrease in scale but also an additional investigation should be carried out. A method validation and quantitative data were also included. This interesting report shows the strengths and weaknesses in the analysis of these analytes using both conventional and microchip format. In fact, in this paper, the inherent advantages and disadvantages of the microchip format in comparison to the full size instrument were observed (there were very fast analysis times but the sensitivity, the peak capacity,

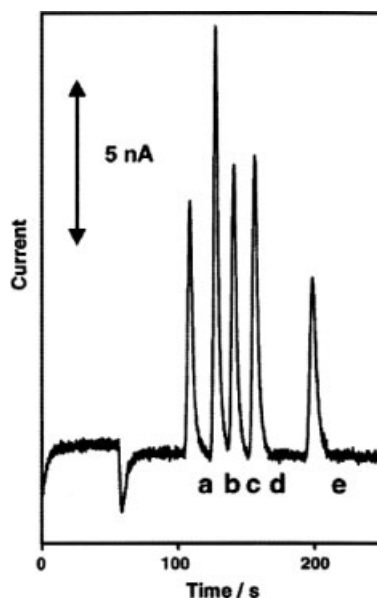


Figure 5. Electropherogram for a mixture containing 200 μ M of Met (b), Se-Met (c), Se-Eth (d), and Se-Cys (e) detected at the screen-printed carbon electrode. Peak (a) corresponds to the unreacted derivatizing agent (reprinted with permission from the authors of ref. [42]).

and a peak resolution were slightly reduced). In addition, the same group has reported an impressive application for the analysis of up to 12 inorganic and organic anions in less than 100 s using the same detection route employing different electrolyte solutions. Ammonium, potassium, calcium, sodium, and magnesium as inorganic anions, as well as chloride, sulfate, oxalate, tartrate, malate, citrate, succinate, acetate, lactate, and inorganic phosphates, plus organic anions, were determined in several beverages including water, red wine, beer, and milk. This excellent work clearly reveals the relevant role of conductimetric detection in food routine analysis (see Fig. 6) [43].

Tea is one of the most important beverages in the world and it contains a complex group of substances. A very rapid analysis of five amino acids (120 s) has been developed using a plastic microchip (PMMA) with LIF detection and it constitutes, nowadays, the first food report using LIF detection in microchip platforms [45]. The amino acids were previously derivatized off-chip and then separated in the microchip format in less than 2 min using a phosphate buffer in the presence of SDS to avoid the absorption of amino acids in the capillary walls. Quantitative data for the three main green tea amino acids (theanine, arginine, and Gln) gave a good agreement with those obtained by using HPLC. In this case, selectivity was achieved after derivatization of just the target amino acids. Figure 7 shows the separation of both, standard mixture and tea sample, revealing the analytical power of the microchip-LIF detection (separation of five amino acid standards with good resolution and real detection of three of them with acceptable resolution in complex tea samples).

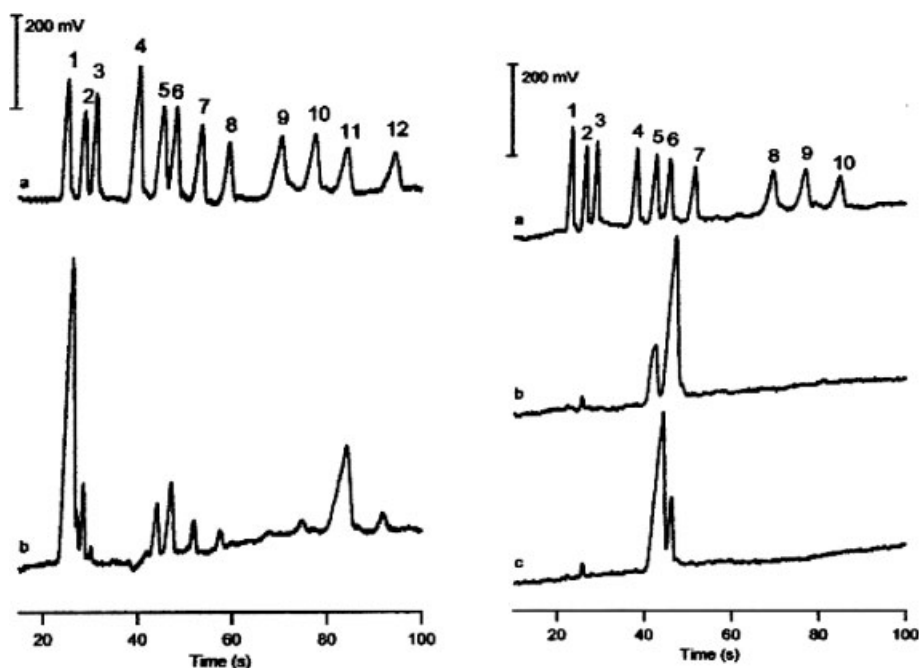


Figure 6. Determination of inorganic and organic anions in beer. (a) Standard solution, peaks: 1, Cl^- ; 2, SO_4^{2-} ; 3, oxalate; 4, formate; 5, malate; 6, citrate; 7, succinate; 8, pyruvate; 9, acetate; 10, lactate; 11, phosphate; 12, pyroglutamate. (b) Beer, dilution 1:5 (left). Determination of inorganic and organic anions in fruit juices. (a) Standard solution, peaks: 1, Cl^- ; 2, SO_4^{2-} ; 3, oxalate; 4, tartrate; 5, malate; 6, citrate; 7, succinate; 8, acetate; 9, lactate; 10, phosphate. (b) Orange juice, (c) apple juice; dilution 1:50 (right). Both figures were reprinted with permission from the authors of [43].

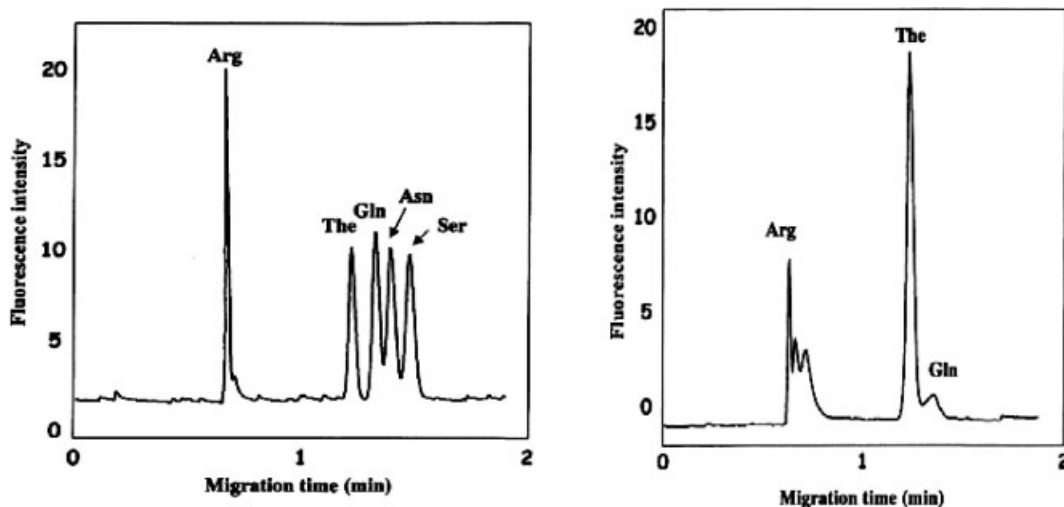


Figure 7. Electropherogram for mixture of amino acids (left). Electropherogram of Japanese green tea (right). Both figures were reprinted with permission from the authors of ref. [45].

On the other hand, analytical performance should be a very important issue to address the development of reliable methodologies using microchip format in outline analysis in the future. Indeed, after this first generation of microdevices, the reliability of the methods using microchip format should be carefully addressed. However, the absence of these data is very apparent nowadays. Table 1 summarizes the most relevant analytical information discussed above.

The most impressive results obtained are related to the separation time involving either seconds or a few minutes. While precision data were reported in many studies, accu-

racy studies were rarely reported, recovery experiments being the strategy mostly used to test accuracy. Very good recoveries have been demonstrated in several cases indicating the power of these microsystems. LODs have also merited attention in microchip formats, being in all the cases under micromolar range and, in a general sense, always suitable to detect the analytes in the samples studied. In addition, some works have focused especial attention on the enhancement of the analytical performance of these microsystems exploring the possibilities of using both reservoirs as sample reservoirs [39, 40] or in the integration of both, calibration

Table 1. CE microchip in food analysis

Sample	Analytes	Microchip features	Electrophoretic protocol	Detection route	Analytical performance	Analysis route	Ref.
Wine	Phenolic acids: Chlorogenic Gentisic Ferulic Vanillic	Glass Simple cross	CZE borate buffer (pH 9.5, 15 mM)	End channel SPE Amperometry (+1.0V) Nitric acid 0.1 M	Separation time (<300 s) Good precision Less than 7% in peak areas External calibration ($r > 0.99$) LOD 10 μ M	Wine filtration and direct separation/detection Real detection of chlorogenic/ vanillic Spiked detection of all of them No quantitative data	[37]
Green tea extract (nutraceutical)	Catechins Catechin Epigallocatechin gallate Epicatechin Epicatechin gallate	PDMS Double T Electrode channel perpendicular to separation channel	MEKC Phosphate buffer (pH 7, 50 mM) 30 mM SDS	End-in-channel Gold working electrode (25 μ m) Pulsed amperometry	Separation time (<300 s) Good precision Less than 7% in peak areas External calibration ($R^2 > 0.99$) LODs 8–10 μ M	Solid–liquid extrac- tion and filtration Real detection of four catechins Quantitative data Validation of the method using HPLC	[38]
Pear pulps and commercial juices	Natural antioxi- dants Arbutin (+)-Catechin Ascorbic acid Phlorizdin/rutin	Glass Simple cross	CZE Borate (pH 9, 50 mM) Two sample reservoirs used	End channel Disc glassy carbon Amperometry (+1.0 V)	Separation time (<200 s) Good precision Less than 7% in peak areas External calibration ($R^2 > 0.99$)	Juice filtration or solid–liquid extraction and filtration Real detection of arbutin and ascorbic acid Tentative quantita- tive results	[39]
Nutraceuticals	Water-soluble vitamins	Glass Simple cross	CZE Phosphate (pH 6, 10 mM)	End channel Disc glassy carbon Amperometry (+1.2 V)	Separation time (<130 s) Calibration + analysis (<350 s)	Solution and filtration Accuracy (9%)	[41]
Not reported	Seleno amino acids Se-methionine Se-ethionine Se-methyl cysteine	Glass Simple cross	MEKC Borate (pH 9.2, 30 mM) 31 mM SDS	End channel SPE Amperometry (+0.9 V)	Separation time (<250 s) Good precision Less than 5% in peak areas External calibration ($r > 0.99$) LOD = 10 μ M Optimization of the method using RSM	Derivatization of amino acids off-chip No reported analysis in sample	[42]
Vitamin C tablets Soft drinks	Vitamin C Preservatives Benzoate Sorbate	PMMA Simple cross	Tar-His (pH 6.5; 0.06 HP- β -CD, 0.125 mM CTAB)	Capacitively coupled contactless conductivity	Separation time (<50 s) Good precision (less than 4%) External calibration ($r > 0.99$) LODs 3–10 mg/L Comparison with CE conventional	Power and filtration Quantitative data are provided Validation of the method using CE	[44]

Table 1. Continued

Sample	Analytes	Microchip features	Electrophoretic protocol	Detection route	Analytical performance	Analysis route	Ref.
Green tea	Amino acids Arg, The, Gln, Asn, Ser	PMMA Double-T	MEKC Phosphate buffer (pH 5.5, 50 mM) 30 mM SDS	LIF	Separation time (120 s) Precision chip- to-chip 3%	Extraction and filtration and derivatization of amino acids off-chip Quantitative data Validation of the method using HPLC	[45]

and analysis protocols to improve the overall analysis times [41]. This interesting strategy is illustrated in Fig. 8. Indeed, calibration was performed after the injection of a previously designed standard mixture and analysis was carried out after sequential injection of the target sample. This protocol enabled the reduction of the overall analysis times using microchip format.

Finally, it is important to emphasize that quantitative data in food environments are very scarce and they have been reported tentatively and rarely with reliability.

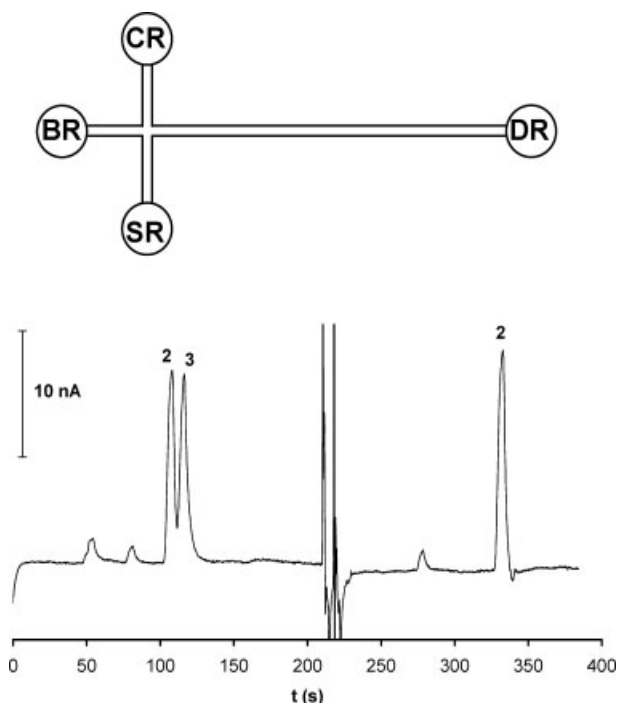


Figure 8. Scheme of the chip with reservoirs labeled as BR (buffer reservoir), CR (calibration reservoir), SR (sample reservoir) and DR (detection reservoir) (up). Calibration (of ascorbic and folic acids) and analysis (of ascorbic acid) using, sequentially, both injectors (down) (reprinted with permission from the authors of [41]).

In addition, chemometrics should be very important in the design, prediction, and attainment of relevant analytical information. However, chemometric tools (experimental design and multivariate approach) have been used in a few cases [42].

4 Conclusions

A new gate is being opened in food environments: CE microchips are emerging in food applications and their analytical power will be demonstrated. Food analysis diverges dramatically from the clinical and bioanalytical analyses on how to reach the selectivity required in complex samples. The presence of bioreagents is common in clinical selectivity, but in food analysis it is obtained through complex sample preparation steps. Since sample preparation on chip is less developed due to its inherent complexity, food applications have not been reported until now, but they are emerging now. The first approaches are focused on the exploration of fast separations and suitable detection routes of prominent analytes with food significance where no extensive sample preparation is required. In consequence, the first “real samples” analyzed are still easy, such as nutraceuticals and dietary supplements.

Simple microchip geometries and layouts using both, glass and PDMS, are giving suitable results in the analysis of several analytes with food significance such as antioxidants, amino acids, and preservatives. The detection route preferred has been electrochemical in both amperometry (end-channel configuration) and conductivity (contactless) formats. In addition, initial effort toward method validation and use of chemometric tools are entering the food analysis scene. Other areas such as food authenticity and residues in foods are expected in the near future.

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. Alberto Escarpa wishes to acknowledge Dr. Wang from

Arizona State University who introduced him to the exciting world of microchips. A. G. Crevillén acknowledges the fellowship received from Spanish Ministry of Education and Science.

5 References

- [1] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244–248.
- [2] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887–3908.
- [3] Pumera, M., Merkoçi, A., Alegret, S., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 219–235.
- [4] Ríos, A., Escarpa, A., González, M. C., Crevillén, A. G., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 467–479.
- [5] Colyer, C. L., Tang, T., Chiem, N., Harrison, D. J., *Electrophoresis* 1997, 28, 1733–1741.
- [6] Dolnik, V., Liu, S., Jovanovich, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 41–54.
- [7] Bruin, G. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3931–3951.
- [8] Blasco, A. J., Escarpa, A., in: Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M. (Eds.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 2005, Vol. XLV, pp. 703–758.
- [9] Schwarz, M. A., Hauser, P. C., *Lab Chip* 2001, 1, 1–6.
- [10] Uchiyama, K., Nakajima, H., Hobo, T., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 379, 375–382.
- [11] Yi, C., Zhang, Q., Li, C-W., Yang, J. *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 1259–1268.
- [12] Nyholm, L., *Analyst* 2005, 130, 599–605.
- [13] Vandaveer, W. R., Pasas, S. A., Martín, R. S., Lunte, S. M., *Electrophoresis* 2002, 23, 3667–3677.
- [14] Tanyanyiwa, J., Leuthardt, S., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2002, 23, 3659–3666.
- [15] Wang, J., *Talanta* 2002, 56, 223–231.
- [16] Guijt, R. M., Baltussen, E., van der Steen, G., Schasfoort, R. B.M. *et al.*, *Electrophoresis* 2001, 22, 235–241.
- [17] Galloway, M., Stryjewski, W., Henry, A., Ford, S. M. *et al.*, *Anal. Chem.* 2002, 74, 2407–2415.
- [18] Pumera, M., Wang, J., Opekar, F., Jelinek, I. *et al.*, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1968–1971.
- [19] Wang, J., Pumera, M., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5919–5923.
- [20] Wang, J., Chen, G., Muck, A., Jr., *Anal. Chem.* 2003, 75, 4475–4479.
- [21] Bai, X., Wu, Z., Josserand, J., Jensen, H. *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, 76, 3126–3131.
- [22] Lichtenberg, J., de Rooij, N. F., Verpoorte, E., *Talanta* 2002, 56, 233–266.
- [23] de Mello, A. J., Beard, N., *Lab Chip* 2003, 3, 11N–20N.
- [24] Chen, G., Wang, J., *Analyst* 2004, 129, 507–511.
- [25] Liu, Y., García, C. D., Henry, C. S., *Analyst* 2003, 128, 1002–1008.
- [26] Huikko, K., Kostianen, R., Kotiaho, V., *Eur. J. Pharm. Sci.* 2003, 20, 149–171.
- [27] Bilitewski, U., Genrich, M., Kadow, S., Mersal, G., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 556–569.
- [28] Righetti, P. G., *Electrophoresis* 2004, 25, 2111–2127.
- [29] Wang, J., Ibáñez, A., Chatrathi, M. P., Escarpa, A., *Anal. Chem.* 2001, 73, 5323–5327.
- [30] Wang, J., Chatrathi, M. P., Ibáñez, A., Escarpa, A., *Electroanalysis* 2002, 14, 400–404.
- [31] Wang, J., Pumera, M., Chatrathi, M. P., Escarpa, A. *et al.*, *Anal. Chem.* 2002, 74, 1187–1191.
- [32] Wang, J., Escarpa, A., Pumera, M., Feldman, J., *J. Chromatogr. A* 2002, 952, 249–254.
- [33] Wang, J., Siangproh, W., Blasco, A. J., Chailapakul, O., Escarpa, A., *Anal. Chim. Acta* 2006, 556, 301–305.
- [34] Wang, J., Pumera, M., Chatrathi, M. P., Escarpa, A. *et al.*, *Electrophoresis* 2002, 23, 596–601.
- [35] Marle, L., Greenway, G. M., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 795–802.
- [36] Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 283–302.
- [37] Scampicchio, M., Wang, J., Mannino, S., Chatrathi, M. P., *J. Chromatogr. A* 2004, 1049, 189–194.
- [38] Hompesch, R. W., García, C. D., Weiss, D. J., Vivanco, J. M., Henry, C. S., *Analyst* 2005, 5, 694–700.
- [39] Blasco, A. J., Barrigas, I., González, M. C., Escarpa, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 4664–4673.
- [40] Crevillén, A. G., Barrigas, I., Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A., *Anal. Chim. Acta* 2006, 562, 137–144.
- [41] Crevillén, A. G., Blasco, A. J., González, M. C., Escarpa, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 5110–5118.
- [42] Wang, J., Manino, S., Cámara, C., Chatrathi, M. P. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2005, 1091, 177–182.
- [43] Kuban, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 3169–3178.
- [44] Law, W. S., Kubán, P., Zhao, J. H., Li, F. Y., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 4648–4655.
- [45] Kato, M., Gyoten, Y., Sakai-Kato, K., Toyo'oka, T., *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 183–189.

Alberto Escarpa
María Cristina González
Miguel Angel López Gil
Agustín G. Crevillén
Miriam Hervás
Miguel García

Department of Analytical
Chemistry and Chemical
Engineering, Faculty of
Chemistry, University of Alcalá,
Madrid, Spain

Received June 3, 2008
Revised June 24, 2008
Accepted June 24, 2008

Review

Microchips for CE: Breakthroughs in real-world food analysis

The well-known complexity of food matrices is approached using CE microchips with different strategies to improve the selectivity and sensitivity of the analysis by avoiding and/or making the sample preparation as simple as possible: (i) enhancing the peak capacity in order to perform direct injection, (ii) using the microchip platform to measure one target analyte/group of analytes with or without separating other related interferences, (iii) integrating sample preparation steps on the microchip platform, and (iv) integrating new analytical tools from nanotechnology in the detection stage. New analyte separations of food significance involving DNA probes, biogenic amines, vanilla flavors, and dyes have been reported as successfully breaking new barriers in areas of high impact in the market, such as transgenic food analysis, as well as the detection of frauds and toxins. Simple microchip layouts are still the most common designs used, though sophisticated new ones are emerging. In contrast to other application areas, electrochemical detection continues to be the most common detection route, followed by LIF, though non-conventional detection routes are also emerging, such as chemiluminescence or UV. In terms of analytical performance, the integration of calibration and quality control on a microchip platform, and remarkable accuracy and precision are being obtained using creative analytical methodologies that enhance the analytical potency of microfluidic chips for their future commercialization. This review critically states the most important advances derived from work done in the field over the past 2–3 years.

Keywords:

Food analysis / Food “lab-on-a-chip” / Microchip CE

DOI 10.1002/elps.200800346

1 Introduction

Excellent literature [1–3] clearly states the significance of analytical miniaturization almost two decades after the μ -TAS concept was introduced. One of the most important conclusions is that the field is in its early adolescence because it still lacks essential component integration requirements, its use by non-experts is far off, and the exploration of its application in real-world samples is highly needed. These papers have stated that what the research community really needs is easy-to-operate validated microfluidic platforms that are producible using standardized cost-efficient technology.

The miniaturization of CE (CE microchips) was one of the earliest examples of μ -TAS systems [4]. This technology

emerged as an important new analytical technique in the early 1990s with the introduction of the μ -TAS concept [4] and the seminal work of Manz *et al.* on CE [5]. This new technique was the result of marrying the ability of conventional CE to analyze ultra-small volumes (nL) with microfabrication techniques. CE microchips employ channels etched into a planar substrate based on microfabrication techniques developed in the semiconductor industry. Early applications of CE microchips used glass or quartz for chip substrates because they are optically transparent and exhibit EOF properties similar to those of fused silica, though a number of other materials including polymer/plastics have been investigated since then [6–8].

It is well-known that EOF benefits “lab-on-a-chip” devices in three ways [9]. First, EOF generates an essential flat velocity profile, compared with the parabolic profile of pressure-driven flow. This results in less band broadening and hence an increase in separation efficiency. Second, the flow in multiple channels on a microchip can easily be controlled with a few electrodes. This further simplifies the apparatus by eliminating valves and pumps (dead volumes are zero and band broadening is reduced, yielding better pumping and separation efficiency). Third, scaling down the size of electrophoresis channels yields both a reduction in

Correspondence: Professor Alberto Escarpa, Department of Analytical Chemistry, University of Alcalá, E-28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain
E-mail: alberto.escarpa@uah.es
Fax: +34-91-885-49-71

Abbreviations: CCD, contactless conductivity detection; CNTs, carbon nanotubes; MFA, monofluoroacetate

analysis time and an increase in separation efficiency. But the question is, how can these advantages be used in real-world domains with creativity?

The *microfluidic* literature is vast and rapidly expanding with emerging applications to real samples [10]. Extracting examples of real sample analysis from the body of work in this area is a demanding task. In addition, the development of applications for a new technology confirms, without a doubt, that the technology is maturing. The ability to efficiently process raw samples (from the laboratory, the body, or the field) and subsequently perform the required analytical operations “on chip” are *key* in defining the eventual success and the applicability of a *microfluidic* system. Although the volume of research in this area is sizeable, real sample analysis is still in its infancy and constitutes one of the major challenges to *microfluidics* in general, and to CE microchips in particular. In addition, an interesting review about the current limitations and problem-solving strategies in quantitative analysis performed by CE microchips has recently appeared indicating the increase of significance of these micro devices in the real domains [11].

The state of the art of food analysis on CE microchip platforms was revised for the first time by our research group [12], finding sensitivity and selectivity to be the major drawbacks. Those approaches only focused on the exploration of new fast separations of prominent analytes with food significance using the well-established detection routes. Sample preparation was always carried out “off chip” and microchips were used as mere fast analytical separation systems. In addition, except on rare occasions, the first “real samples” that were analyzed were *simple*, such as nutraceuticals and dietary supplements.

However, in the last 2–3 years, a number of interesting approaches using different analytical strategies those reported in previous ones dealing with real food samples have emerged. These approaches are outlined here because of their significance and future impact in the development of the research in the field. In consequence, the aim of this review is not only to detail the state of the art of the role of CE microchip use on food analysis but, conceptually speaking, to try to understand the potency of CE microchips in the field of real-world samples (and, by extension, other fields).

In the following sections, for the selected works and with the help of illustrative figures, we will briefly introduce the analytical demands, we will try to answer why and how CE microchip is used for the target application, and will be pointed out the best features describing their analytical performance.

2 State of the art of CE microchips in food analysis

2.1 Novel analyte separations

DNA analysis is obviously outside the scope of this review, but it is discussed regarding the direct impact it has on transgenic foods. An interesting new approach examined the potential of microchips with LIF detection using a programmed field-strength gradient on a conventional glass double T microchip for the ultra-fast detection and simultaneous analysis of genetically modified maize [13] (see Fig. 1). Separation efficiency and sensitivity of various sieving gels was investigated. The effectiveness of the

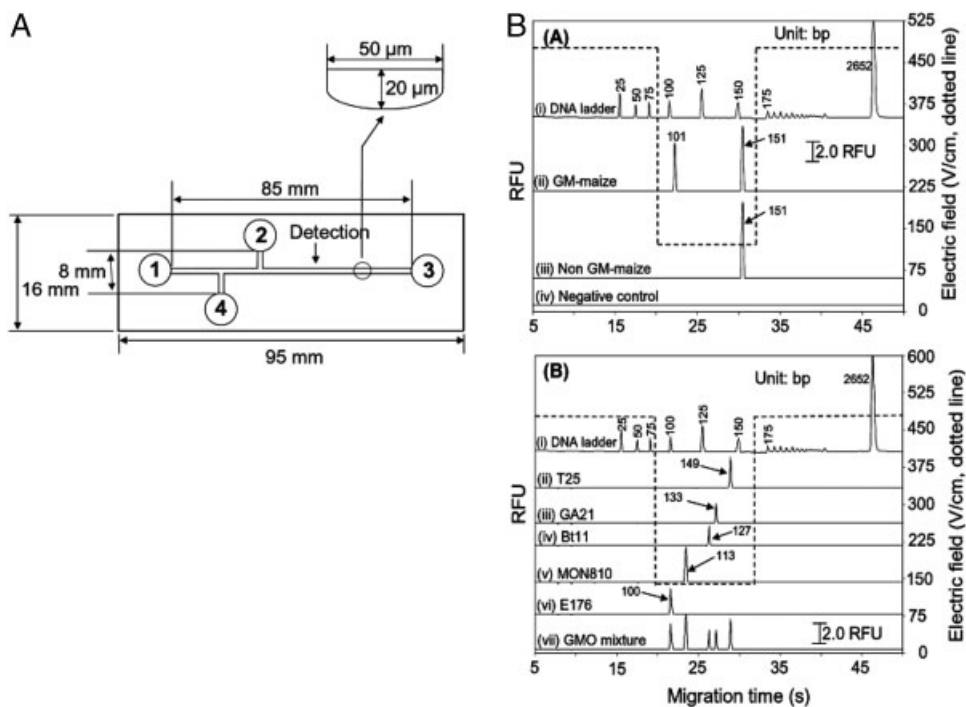


Figure 1. Novel applications of CE microchips in food environments (I): microchip layout (A) and ultra-rapid analysis of genetically modified maize I (DNA analysis) (B) (with permission [13]).

proposed CE-LIF microchip using a field-strength gradient for the ultra-rapid analysis of genetically modified maize has been demonstrated. The PCR method performed before injection on the microchip for maize samples was performed in the impress time of 30 s (Fig. 1B) (improving the times obtained using other conventional alternatives in 60 times). The electrophoretic profiles obtained made it possible to discriminate between genetically modified and non-modified samples.

The recent innovations in protein separations on microchips by electrophoretic methods have recently been revised [14]. In this excellent review, the contributions that dealt directly with protein analysis in food environments were also reported. The effect of aquaculture on chemical and biochemical differences in fish muscle, which may have an impact on food quality, was demonstrated by profiling proteins from edible tissue samples using Bioanalyzer technology [15]. The separation and quantization of 13 different proteins was obtained in 60 s showing alterations in protein expression. The same technology was applied to the identification of wheat varieties and in predicting wheat quality [16]. The analysis of ten samples, including the extraction of polypeptides, centrifugation, and electrophoresis “on chip” was obtained in less than 1 h where distinction among wheat varieties was observed. Unlabeled proteins (lysozyme, conalbumin, and ovalbumin) from diluted real samples of chicken egg whites [17] were also separated in less than 2 min by microchip electrophoresis using fused silica chips and UV-fluorescence detection.

Tyramine and histamine, produced by the decarboxylation of thyroxine and histidine, are among the most harmful biogenic amines found in fermented beverages. Mathies' group reported an impress analysis of neuroactive amines in fermented beverages using a portable and versatile microfabricated CE microchip system (Mars Organic Analyzer) that has been used in the identification of biomarkers such as amino acids, amines, amino sugars, and nucleobases in other fields [18]. The biogenic amines were labeled on their primary amino groups with fluorescamine in a 10-min reaction. The samples were then directly analyzed, producing a detailed electrophoregram in only 120 s. The analysis of wine samples revealed that histamine and tyramine are produced during yeast and malolactic fermentation, respectively. Both the microfabricated CE microchip system and an illustrative example of a complex electrophoretic profile obtained for red wine are shown in Fig. 2.

A homemade miniaturized CE-ED (Cu working electrode) system created by cutting a conventional fused silica capillary and gluing it onto a Plexiglas plate has also been proposed for the fast determination of bioactive amines [19]. Because their formation and metabolism widely occur in living organisms, they are also present in a variety of different foods, primarily as a consequence of microbial amino-acid decarboxylation. The proposed method allowed three bioactive amines (tryptamine, tryptophan, and tyra-

mine) to be separated in an unimpressive time of about 6 min, indicating the successful application of wine and beer samples.

The fast and reliable detection of frauds in the quality control of flavors for food significance is another potential possibility of the CE microchip approach. Vanilla flavor, obtained from *Vanilla planifolia* extracts, is a very unique fragrance and one of the most popular flavors used in the food industry. Vanillin is a basic fragrance compound of the vanilla aroma, whereas ethyl vanillin does not exist in nature. Replacing vanillin with ethyl vanillin inevitably results in products being labeled as artificial because this compound is unambiguous proof of their non-natural origin. In this way, CE microchip offers an attractive alternative for fast detection of frauds. Up to five vanilla-related flavors of food significance: vanillic alcohol, ethyl maltol, maltol, ethyl vanillin, and vanillin were separated in less than 250 s with excellent control of EOF ($RSD_{\text{migration times}} < 3\%$) [20]. Vanillin was detected in *V. planifolia* pods, being the prominent compound in vanilla extracts and confirming, in addition, their authenticity. In contrast, ethyl vanillin was especially detected in some vanilla sugars, thus indicating the non-natural origin of the vanilla flavor used. The levels of vanillin found in natural vanilla were up to ten times higher than those found in adulterated samples which also served as indicators of the suitability of the method for quantitative purposes. The extraction of vanilla-related compounds is very complex and was performed “off chip.” However, the microchip approach demonstrated excellent analytical behavior in both the qualitative and quantitative domains.

Other compounds of food significance that have recently been the focus of attention using microchip approach are dyes. Artificial dyes are commonly added to foodstuffs with the purpose of enhancing their attractiveness. Because almost all of these additives are prepared by chemical synthesis, their presence in foods is the cause of extensive consumer mistrust because they may lead to adverse health effects and because their consumption is regulated by the law. A rapid analysis of azo-dyes in food by CE microchip with electrochemical detection has been published [21]. Five different azo-dyes (Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, New Coccine, and Amaranth) were separated in less than 300 s. The suitability of the microchips was tested using real samples such as soft drinks (liquid sample) and candies (solid sample), both with minimal sample preparation but still performed “off chip.” One of the important features of this analysis was the selectivity showed by an electrochemical detector compared with UV/Vis detection for these compounds because an absence of other peaks in the samples was observed.

2.2 Unconventional detection approaches

A new in-channel configuration for the amperometric detection of synthetic dyes in food has been published

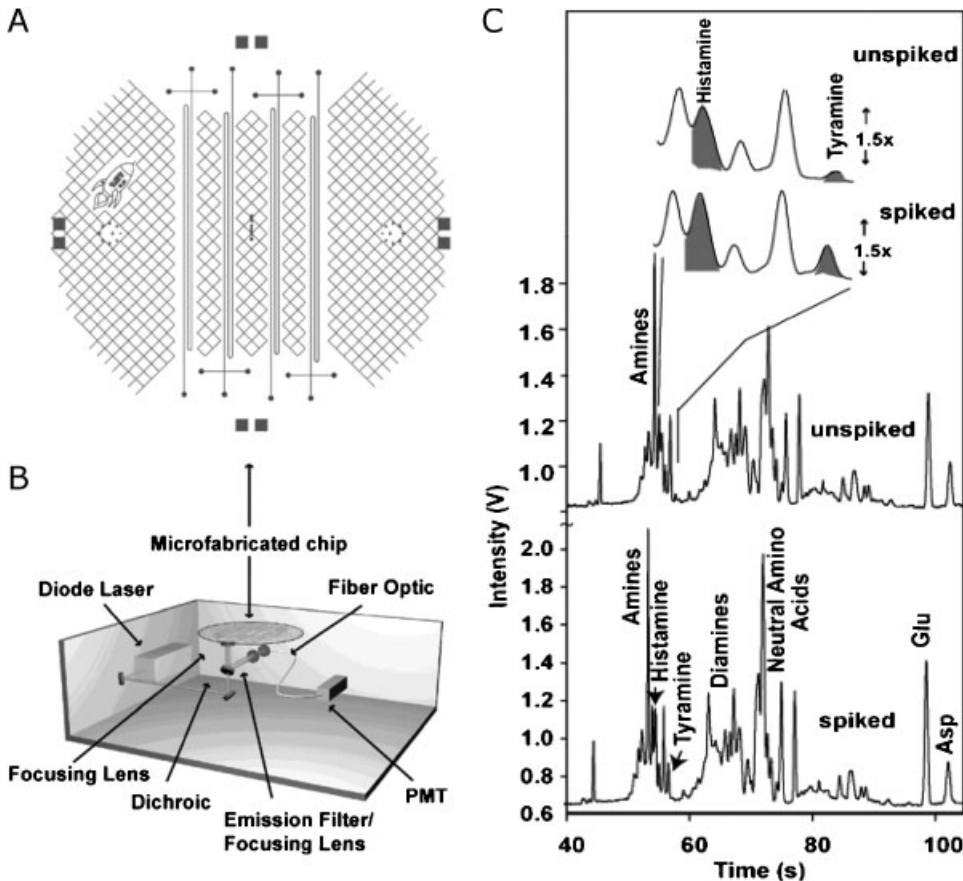


Figure 2. Novel applications of CE microchips in food environments (II): microfabricated CE microchip system (A) and complex electrophoretic profile obtained in fermented red wine of neuroactive amines (B) (with permission [18]).

[22]. The well-known advantages *versus* end-channel configuration such as allowing better peak resolution and higher sensitivity owing to the prevention of the dispersion of the analyte band were successfully demonstrated. The suitability of the new design was demonstrated using only a couple of dyes (patent Blue and Green S), but by first time using real samples. Fast separation of the target dyes and their presence in a few real food samples (soft drinks, syrup, and candy) was performed in less than 200 s.

Alkaloids are naturally occurring plant products that have numerous applications in human medicine, but which are typically toxic in large doses. A microchip device integrating a well-designed non-conventional detection route, such as UV-absorbance spectra detection (Fig. 3A) for the detection of four toxic alkaloids (colchicines, aconitine, strychnine, and nicotine), has been proposed [23]. A quartz microchip containing a simple cross geometry was used to perform the separation (less than 200 s), and a miniature fiber-optic spectrometer was coupled to the microchip for detection. Sensitive UV-absorbance detection was achieved *via* the application of on-line preconcentration techniques in combination with the quartz microchip substrate that contained an etched bubble-cell to increase path length. Toxins in spiked water, milk, and apple juice were also determined (one example is depicted in Fig. 3B).

2.3 Novel strategies: measuring one target analyte or analyte group

The adaptation of CE microchips to “fitness-to-purpose” is a clever strategy to enhance the potency of these microdevices in order to solve analytical problems. Indeed, the use of CE microchips as EOF injection analysis system is a very attractive alternative to solve analytical demands where only one analyte or “group of analytes” is required. Along these lines, in the determination of isoflavones, the differentiation of their possible forms seems to be at times irrelevant because only aglycones are absorbed in the human gastrointestinal tract. Therefore, the total amount of isoflavone aglycones could provide sufficient information for the food-drug quality control of market production. In connection with this demand, very recently, the methodological calibration and analysis on board a planar *microfluidics* to determine the total amount of isoflavones in soy samples was proposed [24]. The accuracy (systematic error less than 6%) of these microsystems was demonstrated for the first time using a secondary standard from the Drug Master File (SW/1211/03) as *reference* material. The ultra-fast calibration and analysis of total isoflavones in soy samples was successfully integrated taking 60 s each. Here, the analytical performance of these microdevices was enhanced with

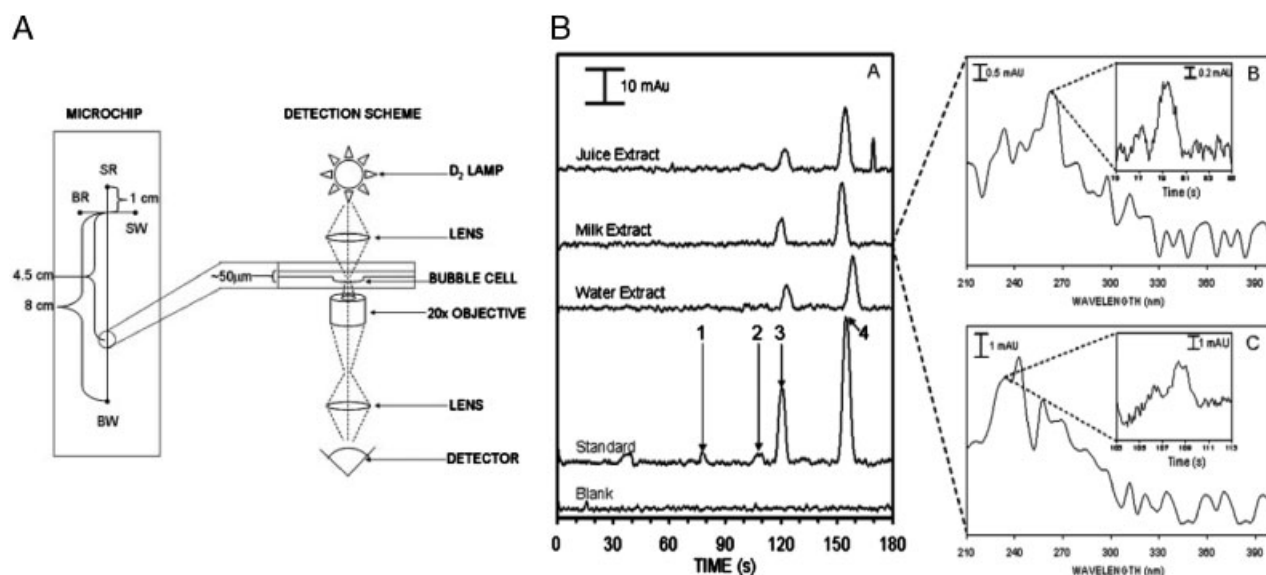


Figure 3. Novel detection approaches in food environments. Microchip device integrating UV-absorbance spectra detection (A) and alkaloid toxins in spiked water, milk, and apple juice (B) (with permission [23]).

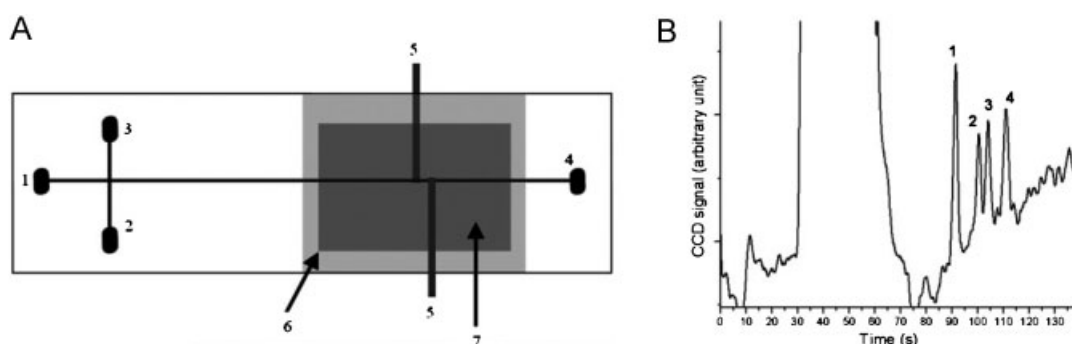


Figure 4. Analyzing one target compound in presence of interferences. Microchip layout with CCD (A) and fast detection of MFA in presence of other compounds in apple juices (B) (with permission [27]).

a significant decrease in overall analysis times (less than 120 s) and with an increase in accuracy by a factor of 3 in the analysis of real soy samples.

Some of the advantages associated with the contactless conductivity detection (CCD) approach include low cost, easy electrode alignment, simplified detector fabrication, absence of electrode fouling, improved isolation of the detector from the separation field, and the potential for portability [25, 26]. The power of CCD in microchips for food applications was demonstrated by Kuban and Hauser [26] as we have already reviewed before [12]. In this way, monofluoroacetate (MFA) is an extremely toxic toxin and CCD is potentially well suited for its detection. The rapid and quantitative determination of MFA in fruit juices and tap water has been proposed using CE microchips with CCD [27]. The main feature of this interesting paper was the direct determination (with very little sample preparation) of MFA in a complex matrix of fruit juices containing several interferences such as

organic acids and small inorganic anions, as well as high sugar content. Direct injection without dilution was not possible because the channel walls of the microchip become coated with sugar molecules after several runs causing irreproducible results. This challenge was solved by dilution of sample because sensitivity was good. The interference of other related ions in the samples was avoided because they offered different conductivity according to their mass and charge. By working directly with diluted fruit juices, the total analysis time was only 5 min, as is shown in Fig. 4.

2.4 Total integration approaches

An integration of preconcentration, separation, and electrochemical detection using an uncommon microchip layout has been proposed for the analysis of dyes in several food samples in an effort to build a food “lab-on-a-chip” [28].

The microchip was comprised of three parallel channels. The first two were for the field-amplified sample stacking and the subsequent field-amplified sample injection steps, while the third was reserved for the micellar EKC with electrochemical detection. The microchip layout, the preconcentration steps, and the electropherogram obtained

are shown in Fig. 5. The preconcentration method was used to analyze the food dyes in real samples such as juice, traditional Korean alcohol, fish, noodles, and red pepper powders. The recoveries obtained were very acceptable, although wide variations in the current response and migration times and an unstable baseline were obtained,

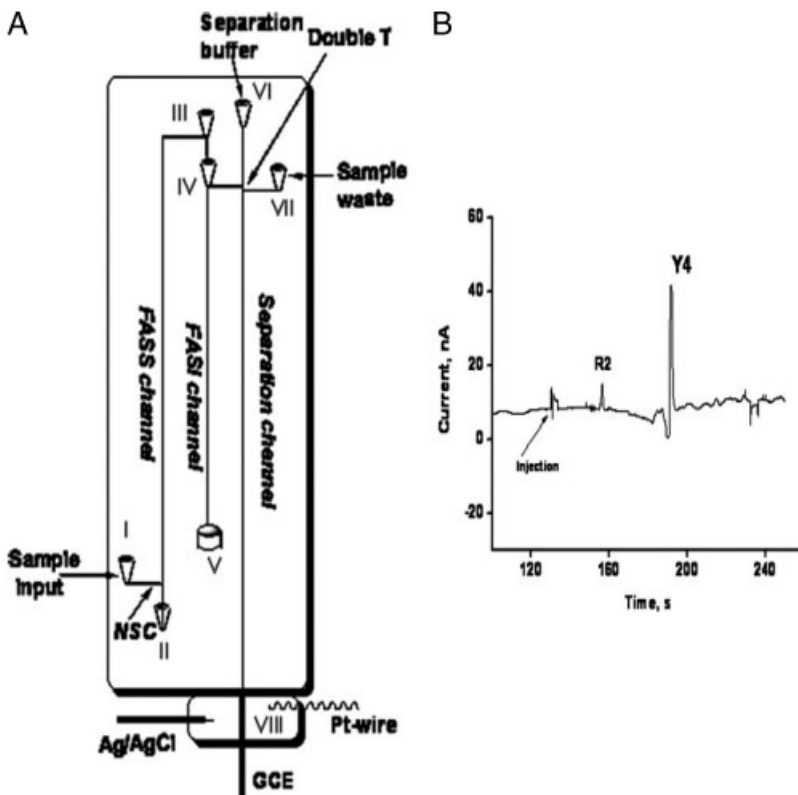


Figure 5. Sample preparation integrated on CE microchip in food environments. Microchip layout (A) and detection of typical dyes (B) (with permission [28]).

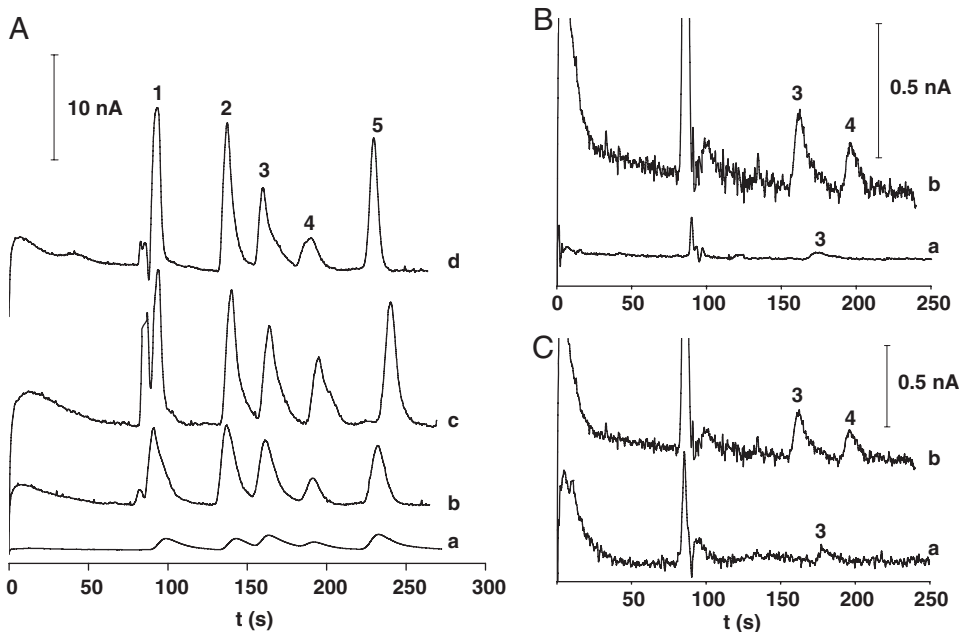


Figure 6. Analytical nanotechnology integrated on CE microchips in food environments. (A) Microchip electropherograms corresponding to a mixture of antioxidant standards with electrode materials studied: (a) without nanotubes and (b–d) using different nanotube materials. (B) Electropherograms corresponding to apple peels: (a) without CNTs and (b) with CNTs. (C) Analysis of apple extract with SPE-multi-walled nanotubes: (a) pulp and (b) peel. Peaks: (1) arbutin, (2) phloridzin, (3) catechin, (4) rutin, and (5) ascorbic acid (with permission [32]).

possibly due to the presence of unknown salts and organic and inorganic acids in real samples.

2.5 Novel approaches: nanotechnology integrating into CE microchips

Nanotechnology, without a doubt, offers valuable tools for miniaturized analytical devices. Indeed, analytical nanotechnology is a very attractive alternative to be able to identify real-world challenges such as selectivity (peak capacity) and sensitivity. An excellent example of this is carbon nanotubes (CNTs). CNTs are a new group of nanomaterial with unique geometrical, mechanical, electronic, and chemical properties that offer notably exciting possibilities including a large active surface for electrodes of small dimensions, the enhancement of electronic transfer, and strong sorption capacity. These properties clearly influence analytical sensitivity, which is enhanced by the use of these nanomaterials. There are two main types of CNTs:

single-walled nanotubes that consist of a single graphite sheet seamlessly wrapped into a cylindrical tube, and multi-walled nanotubes that are made up of an array of concentrically nested nanotubes that look like the rings of a tree trunk [29, 30]. The potency of these nanomaterials as electrochemical detectors in CE microchip have recently been reported [31].

One of the most attractive recently reported strategies was the use of nanotechnology tools in CE microchips for food analysis. CE microchips using different CNT materials (single- and multi-walled) to analyze a wide group of analytes of food significance, such as dietary antioxidants, water-soluble vitamins, vanilla flavors, and isoflavones involved in representative food samples, were reported for the first time [32]. Ultra-fast separations resulted in well-defined and resolved peaks with enhanced voltammetric current when compared with those obtained from unmodified screen-printed electrodes, thus making CNTs an ideal material for electrochemical sensing in food analysis. Peak efficiency and, in consequence, resolution were dramatically

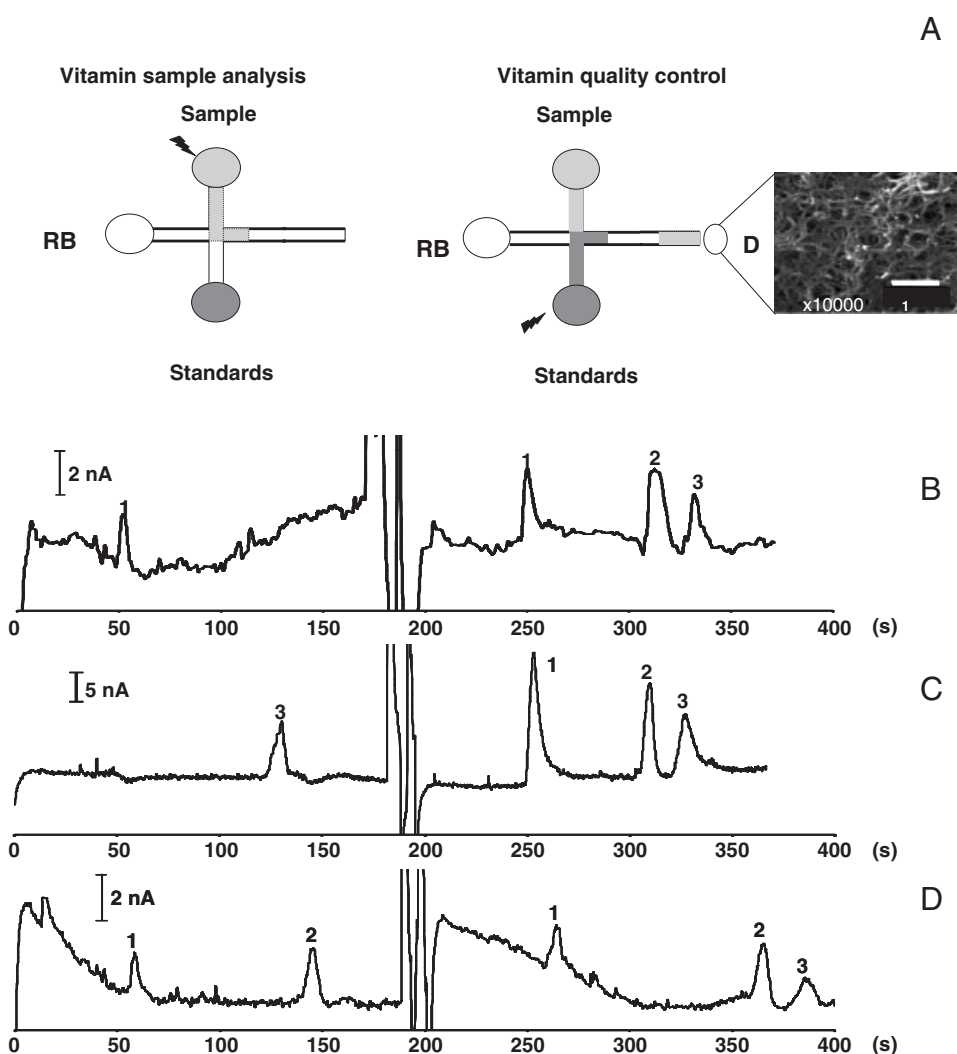


Figure 7. Integration of both analysis and calibration for some pharmaceuticals: design of strategy with photograph of multi-walled nanotubes as detectors ($\times 10\,000$) (A). Analysis of supplements: Hidrosil[®] (B), Aspol[®] (C), and Becozyme[®] (D). Peaks: (1) pyridoxine, (2) ascorbic acid, and (3) folic acid (with permission [33]).

Table 1. CE microchip in food analysis

Sample	Analytes	Microchip features and mode	Detection route	Analytical performance	Remarks	Reference
Maize genetically modified	DNA	Glass double T Gel electro phoresis	LIF	Separation time (<30 s)	<i>New analyte separation</i> Differentiation of genetically modified and non-genetically modified maize	[13]
Fermented beverages	Biogenic amines (tyramine and histamine)	Sophisticated microchip layout (portable organic analyzer) CZE	LIF	Separation time (<100 s)	<i>New analyte separation</i> Electrophoretic profiles of tyramine and histamine detected in samples	[18]
Wine, beer	Tryptamine, tryptophan, tyramine	Miniaturized electrophoretic system CZE	Electrochemical detection (<i>end-channel</i> electrode Cu)	Separation time (<360 s) LOD 10^{-7} M	Home-made miniaturized CE system	[19]
Vanilla pod and sugars	Vanillin Ethyl vanillin	Glass simple-cross CZE	Electrochemical detection (<i>end-channel</i>)	Separation time (<200 s) LOD 0.1–0.3 mM	<i>New analyte separation</i> Fast detection of frauds vanillin or ethyl vanillin really detected in samples	[20]
Soft drink, syrup, candies	Artificial dyes (Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, New Coccine, Amaranth)	Glass simple-cross CZE	Electrochemical detection (<i>end-channel</i>)	Separation time (<300 s) LOD 3–15 μ M	High selectivity during real analysis (cleaner electrophoregrams) based on electrochemical detection <i>versus</i> UV/Vis Only Sunset Yellow really detected in samples	[21]
Soft drink, syrup, candies	Artificial dyes (Patent blue Green S)	PDMS simple-cross CZE	Electrochemical detection (<i>in-channel</i>)	Separation time (<250 s) LOD 10–17 μ M	<i>New detection approaches</i> Novel electrochemical design (<i>in-channel</i>) in food analysis Both dyes really detected in samples	[22]
Water, milk, apple juice (spiked)	Alkaloids (colchicine, aconitine, strychnine, nicotine)	Quartz simple-cross CZE	Miniature fiber optic UV absorbance	Separation time (<200 s) LOQ 20–100 μ M	<i>New detection approaches</i> UV for detection of alkaloids	[23]
Natural extract	Total isoflavones	Glass simple-cross	Electrochemical detection (<i>end-channel</i>)	Analysis time (60 s) LOD 5–8 μ M	Spiked samples only Calibration integrated	[24]
Dietary soy supplements		No analyte separation (flow injection system)			High accuracy (error less than 7%) Real detection of “total isoflavones” in soy samples	
Fruit juices	MFA	Glass simple-cross CZE	Capacitively coupled contactless conductivity	Separation time (<120 s) 138–173 μ g/L	<i>Improvement of selectivity in real sample analysis</i> Analytical strategy to avoid interferences Real detection of MFA in suitable diluted samples	[27]

Table 1. Cont.

Sample	Analytes	Microchip features and mode	Detection route	Analytical performance	Remarks	Reference
Beverages (juice, alcohol, fish, noodles)	Dyes	Glass sophisticated layout MECK	Electrochemical detection (<i>end-channel</i>)	Separation time (<240 s) LOD 1–5 nM	<i>Total integration approach</i> Sophisticated microchip layout integrating several steps Two dyes were really detected in samples	[28]
Fruits, vitamin supplements, vanilla foods	Natural antioxidants, vitamin A, flavors, isoflavones	Glass simple-cross CZE	Electrochemical detection (<i>end-channel</i>)	Separation time (less than 300 s) LOD 1–12 μ M	<i>Nanotechnology approach</i> Using of carbon nanotubes as new detectors in CE microchips in food samples Real detection of some natural antioxidants and vitamins in samples	[32, 33]

increased enhancing, as a result, the peak capacity of these microchips. In addition, the excellent improvement of these nanomaterials have on electron transfer allowed sensitivity to be dramatically enhanced. Figure 6 shows the separation of five natural antioxidant standards using bare electrode and different CNT materials (A) and the antioxidant detection in apple samples using bare and the best CNT material (B), where the enhanced sensitivity obtained when CNTs were used is clearly observable in both cases. In both, qualitative and quantitative domains, this impressive performance by CNTs integrated on microfluidics allowed specific challenges in food environments to be solved, such as the direct detection of analytes without the need for integrating complex preconcentration steps for these microdevices.

Monitoring food quality is a critical task in analytical chemistry and an important way to preserve human health. Quality control is a very useful methodological route in several laboratories and is mandatory by law. The performance of CNTs as detectors in microchips in this exciting domain has been seriously evaluated, integrating vitamin sample analysis controls for quality control purposes [33]. Special attention was paid to the disposability of the detectors as well as the reliability of the microchip during the quality control check. Figure 7 shows the integration concept on a microchip layout (A), as well as the electrophoregrams (analysis plus calibration) obtained for three formulations (B–D) containing pyridoxine, folic acid, and a mixture of pyridoxine and vitamin C. All analyses were performed in less than 400 s. Excellent reliability in the quality control analysis was obtained with excellent accuracy

in terms of real recoveries (low systematic error ranging between 3 and 9%).

Table 1 summarizes the relevant information discussed before including the LODs obtained in the different applications.

3 Conclusion

The last 2–3 years have been fruitful regarding the role of CE microchips in the analysis of food samples, though this branch is still in its infancy. CE microchips are showing their analytical potency in real-world samples where several strategies, designs, and detection systems are being used. Their use has also dramatically opened the door for important applications such as transgenic foods and the detection of frauds and toxins involving new target analyte detection. In addition, because the imminent role of miniaturized systems in our laboratories depends greatly on their performance, an effort to evaluate the suitability of microchips in real domains has also developed and has a promising future as well. The use of nanotechnology is also going to dramatically change the landscape of our labs. Personally, we are witnessing the birth of the second generation of microfluidic chips that will cleverly integrate both “lab-on-a-chip” and nanotechnologies in the near future.

Financial support from the Ministry of Science and Technology (Spain) CTQ2005-09079-C03-03 is gratefully acknowledged. A. G. C. acknowledges the fellowship received from Spanish Ministry of Education and Science.

The authors have declared no conflict of interest.

4 References

- [1] Whitesides, G. M., *Nature* 2006, 442, 368–373.
- [2] Janasek, D., Franzke, J., Manz, A., *Nature* 2006, 442, 374–380.
- [3] Haeberle, S., Zengerle, R., *Lab Chip* 2007, 7, 1094–1110.
- [4] Manz, A., Graber, N., Widmer, H. M., *Sens. Actuators B* 1990, 1, 244–248.
- [5] Manz, A., Harrison, D. J., Verpoorte, E. M. J., Fettinger, J. C. et al., *J. Chromatogr. A* 1992, 593, 253–258.
- [6] Dolnik, V., Liu, S., Jovanovich, S., *Electrophoresis* 2000, 21, 41–54.
- [7] Bruin, G. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 3931–3951.
- [8] Dittrich, P. S., Tachikawa, K., Manz, A., *Anal. Chem.* 2006, 78, 3887–3908.
- [9] Oosterbroek, R. E., van der Berg, A. (Eds.), *Lab-on-a-Chip: Miniaturized Systems for (bio)Chemical Analysis and Synthesis*. Elsevier, Amsterdam 2003.
- [10] Crevillén, A. G., Hervás, M., López Gil, M. A., González, M. C., Escarpa, A., *Talanta* 2007, 74, 342–357.
- [11] Reverman, T., Götz, S., Künneneyer, J., Karst, U., *Analyst* 2008, 133, 167–174.
- [12] Escarpa, A., González, M. C., Crevillén, A. G., Blasco, A. J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1002–1011.
- [13] Kumar, K. S., Kang, S. H., *Electrophoresis* 2007, 28, 4247–4254.
- [14] Peng, Y., Pallandre, A., Tran, N. T., Taverna, M., *Electrophoresis* 2008, 29, 157–178.
- [15] Monti, G., Napoli, L.-D., Mainolfi, P., Barone, R. et al., *Anal. Chem.* 2005, 77, 2587–2594.
- [16] Uthayakumaran, S., Batey, I. L., Wrigley, C. W., *J. Cereal Sci.* 2005, 41, 371–374.
- [17] Schulze, P., Ludwing, M., Kohler, F., Belder, D., *Anal. Chem.* 2005, 77, 1325–1329.
- [18] Jayarajah, C. N., Skelley, A. M., Fortner, A. D., Mathies, R. A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 8162–8169.
- [19] Chu, Q., Guan, Y., Geng, C., Ye, J., *Anal. Lett.* 2006, 39, 729–740.
- [20] Avila, M., Gonzalez, M. C., Zougagh, M., Escarpa, A., Rios, A., *Electrophoresis* 2007, 28, 4233–4239.
- [21] Dossi, N., Piccin, E., Bontempelli, G., Carrillo, E., Wang, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 4240–4246.
- [22] Dossi, N., Toniolo, R., Pizzariello, A., Susmel, S. et al., *J. Electroanal. Chem.* 2007, 601, 1–7.
- [23] Newman, C. I. D., Giordano, B. C., Copper, C. L., Collins, G. E., *Electrophoresis* 2008, 29, 803–810.
- [24] Blasco, A. J., Crevillén, A. G., Fuente, P., González, M. C., Escarpa, A., *Analyst* 2007, 132, 323–329.
- [25] Pumera, M., Wang, J., Opekar, F., Jelínek, I. et al., *Anal. Chem.* 2002, 74, 1968–1971.
- [26] Kuban, P., Hauser, P. C., *Electrophoresis* 2005, 26, 3169–3178.
- [27] Lu, Q., Wu, P., Collins, G. E., *Electrophoresis* 2007, 28, 3485–3491.
- [28] Lee, K.-S., Shiddiky, M. J. A., Park, S.-H., Park, D.-S., Shim, Y. B., *Electrophoresis* 2008, 29, 1910–1917.
- [29] Iijima, S., *Nature* 1991, 354, 56–58.
- [30] Trojanowicz, M., *Trends Anal. Chem.* 2006, 25, 480–489.
- [31] Chen, G., *Talanta* 2007, 74, 326–332.
- [32] Crevillén, A. G., Ávila, M., Pumera, M., González, M. C., Escarpa, A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 7408–7415.
- [33] Crevillén, A. G., Pumera, M., González, M. C., Escarpa, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 2997–3004.