

APPLICATION OF SPECTROFLUORIMETRY TO THE ANALYSIS
OF DULCIN IN SOLUTION AND IN THE SOLID STATE

APLICACION DE LA ESPECTROFLUORIMETRIA EN DISOLUCION
Y EN FASE SOLIDA EN LA DETERMINACION DE DULCIN

F. GARCIA SANCHEZ, A. NAVAS DIAZ, M.C. RAMOS PEINADO

Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias.

Universidad de Málaga. 29071 Málaga (España).

ABSTRACT

The effect of experimental variables on the fluorescence (4-ethoxyphenyl)urea (dulcin) in solution is studied. The adequate excitation and emission slit-widths for a wide calibration linear range is determined. The excitation and emission and synchronous spectra of dulcin in 100% acetonitrile solution and that adsorbed onto filter paper are obtained. The data are compared. The direct readings are linear with the dulcin concentration in the range 10–300 ng/ml with a relative standard deviation (R.S.D.) of 3.19% and in the range 0.3–2 µg/ml with R.S.D. of 1.21%.

RESUMEN

Se estudia la influencia que ejercen distintas variables experimentales sobre la fluorescencia de (4-etoxifenil)urea (dulcin) en disolución y se determina la anchura de las rendijas de excitación y emisión más adecuada para cubrir un amplio rango de calibración lineal de dulcin. Se obtienen los espectros de excitación y emisión y sincrónicos de dulcin en 100% acetonitrilo y los que presenta adsorbido sobre papel de filtro. Se comparan los datos obtenidos en cada caso. La lectura instrumental directa es lineal con la concentración de dulcin en acetonitrilo en el rango 10–300 ng/ml con una desviación estándar relativa (D.E.R.) del 3.19% y en el rango 0.3–2 µg/ml con D.E.R. del 1.21%.

1. INTRODUCCION

Los sistemas de detección fotométrico y fluorimétrico se emplean ampliamente para la determinación cuantitativa de sustancias. La detección a longitudes de onda cortas (190–220 nm) aumenta la sensibilidad, debido a las mayores absorptividades molares que poseen las sustancias a estas longitudes de onda, y disminuye la selectividad, por ser mayor el número de sustancias que absorbe en esta región del espectro. Sin embargo, la fluorimetría ofrece mayor sensibilidad y selectividad que la fotometría, en toda la región espectral.

Para la determinación cuantitativa de edulcorantes artificiales como dulcín, (4-etoxifenil)urea, se emplea la cromatografía líquida con detección fotométrica a 200 nm (1). Otros métodos hacen uso de la espectrofotometría directa a 440 nm (2), volumetría de oxidación reducción (3) y fluorimetría (4). Este último método está basado en la reacción con nitrito sódico y medida de la fluorescencia a 446 nm del producto formado y extraído en CHCl_3 lo que permite establecer una curva de calibración lineal entre 1–8 µg/ml. Desafortunadamente el método es laborioso y precisa un tiempo de reacción y preparación de la muestra muy largo (más de 2 horas). En el trabajo que exponemos

aquí se mide directamente la fluorescencia, a 332 nm, de dulcín en acetonitrilo con lo cual el tiempo de análisis se reduce considerablemente y además es posible determinar concentraciones de dulcín tan bajas como 10 ng/ml.

La optimización de parámetros instrumentales y variables experimentales que permitan determinar el compuesto por fluorimetría directa se ha realizado en disolución y adsorbido en una superficie sólida. Para ello además de obtener los espectros de excitación y emisión convencionales se han explorado también las posibilidades que ofrecen los espectros sincrónicos y los que presenta al estar adsorbido sobre papel de filtro.

El espectro de fluorescencia sincrónico se obtiene mediante el desplazamiento simultáneo de los monocromadores de excitación y emisión de un fluorímetro mientras se mantiene constante la diferencia entre ambos. Los espectros resultantes son más simples y las bandas espectrales más estrechas (5,6).

Recientemente se han usado una serie de soportes sólidos (7–9) para estudiar el efecto de la adsorción sobre los estados electrónicos excitados de moléculas luminiscentes. Si el estudio está dirigido a una aplicación, fosforimétrica o cromatográfica en capa fina o en papel, los sustratos más usados (10) son gel de sílice, papel de filtro, acetato sódico y mezclas de α -ciclodextrina/NaCl. El papel de filtro es, con diferencia, la superficie sólida más usada para análisis orgánico (11).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Aparatos

Las medidas de fluorescencia se han realizado con un espectrofluorímetro Perkin–Elmer LS–50, equipado con una lámpara pulsante de xenón, monocromadores de tipo F/3 Monk–Gilleon y células de cuarzo de 1x1 cm de paso de luz. Un accesorio intercambiable permite al espectrómetro medir la fluorescencia sobre superficies. El espectrofluorímetro está conectado mediante una interfase RS232C a un ordenador PC–AT. Los parámetros instrumentales se controlan mediante un Perkin–Elmer FL Data Manager (FLDM) software. El registro gráfico se realiza mediante una impresora Laser NEC Silentwriter 2 S60P conectada al espectrofluorímetro.

2.2. Reactivos

Se preparó disolución de dulcín 2.77×10^{-4} M disolviendo la cantidad adecuada del producto (Sigma Chemical Co.) en acetonitrilo. A partir de esta disolución se prepararon diariamente otras más diluidas.

Los disolventes y los restantes reactivos empleados fueron de calidad reactivo análisis. El papel de filtro (Whatman nº 1) usado para la adsorción fue de calidad cromatográfica. El agua utilizada fue destilada y desmineralizada.

2.3. Procedimiento General

Introducir en un matraz aforado de 10 ml una alícuota de disolución de dulcín tal que su concentración final esté comprendida entre 10 ng/ml y 2 μ g/ml. Diluir con acetonitrilo hasta enrasar. Medir la intensidad de fluorescencia relativa (I.F.R.) a $\lambda_{ex} = 240$ nm y $\lambda_{em} = 332$ nm, usando rendijas de anchura 2.5 nm, frente a un blanco reactivo y convertir el dato obtenido en unidades de concentración mediante la curva de calibración.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Influencia de variables experimentales sobre la fluorescencia

Se midió la IRF de dulcín en disolventes de distinta polaridad y capacidad formadora de puentes de hidrógeno como 1,4 dioxano, acetato de etilo, metanol, etanol y acetonitrilo, observándose que la mayor fluorescencia se alcanza en disolventes polares. El valor más alto lo presentan las disoluciones en acetonitrilo 100% disminuyendo linealmente al aumentar la proporción de agua en el medio. Para determinar la influencia del pH se realizó una valoración fluorimétrica de dulcín 1.1×10^{-6} M en 60% v/v acetonitrilo–agua, observándose que el pH no influye sobre la IRF. De lo cual se deduce que la mayor sensibilidad se presenta en medio acetonitrilo anhidro. La IRF de dulcín así preparado permanece constante pasada una hora desde su preparación.

Se observó una marcada influencia de las rendijas de excitación y emisión sobre la IRF, de entre las posibles se seleccionaron los valores 5/5 y 2.5/2.5 como adecuados para estudiar la influencia de la concentración de dulcín sobre la fluorescencia. En la Figura 1 se representan los valores obtenidos. Al emplear rendijas

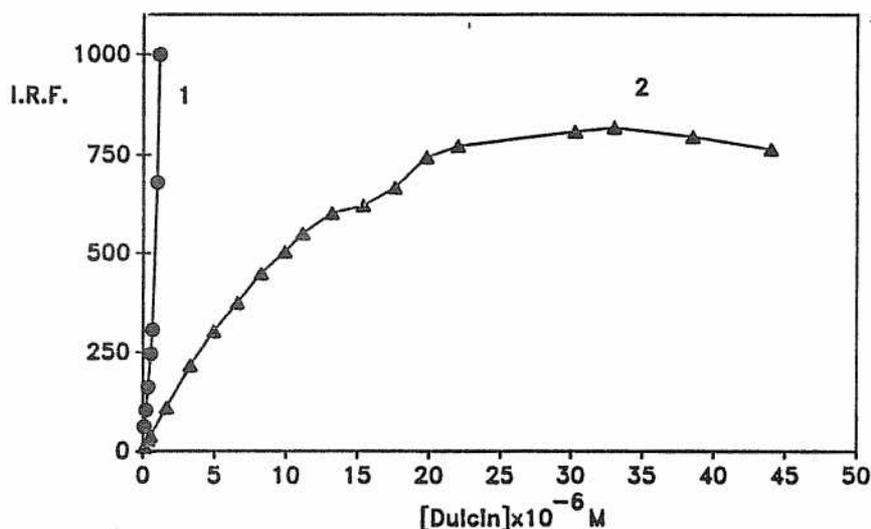


Fig. 1.— Influencia de la anchura de las rendijas de los monocromadores: (1) 5/5 nm y (2) 2,5/2,5 nm, sobre la I.R.F. de dulcin, $\lambda_{exc} = 240$ nm, $\lambda_{em} = 332$ nm.

2.5/2.5 no se observa atenuación de fluorescencia por autoabsorción al menos hasta una concentración de dulcin de 2.5×10^{-5} mientras que al emplear rendijas 5/5 la I.R.F. se satura para 1.1×10^{-6} M en dulcin. Se deduce que al emplear las rendijas menores el rango de concentraciones en los que la respuesta es lineal será mayor por lo que las seleccionadas fueron 2.5/2.5.

En la Figura 2 se representan los espectros de excitación y emisión de dulcin bajo condiciones experimentales óptimas. Para obtener los espectros de registro sincrónico se mantuvo constante la diferencia $\lambda_{em} - \lambda_{exc}$ ($D\lambda$); los espectros obtenidos, correspondientes a valores de $D\lambda$ desde 62 nm hasta 122 nm, se representan en la Figura 3 de donde se deduce que la mayor fluorescencia y menor anchura de pico a la mitad de la altura se obtiene usando un $D\lambda = 92$ nm, aunque la I.R.F. es similar a la obtenida por lectura instrumental directa.

Los espectros de fluorescencia de dulcin y acetonitrilo adsorbidos sobre papel de filtro y del propio substrato se representan en la Figura 4. El máximo de emisión de dulcin se presenta a 330 nm con excitación a 239 nm. La adsorción sobre superficies sólidas puede caracterizarse por cambios espectrales (7), los resultados para dulcin indican que la adsorción sobre papel de filtro produce solo un ligero desplazamiento de los máximos de excitación (1 nm) y emisión (2 nm) con respecto a los que presenta en disolventes polares y la I.R.F. no se afecta de forma significativa. Sin embargo, la señal de fondo originada desde el substrato sólido es mayor

debido a dispersión de radiación por éste. En base a consideraciones sobre la relación entre la señal y el ruido de fondo se deduce que esta relación será menor para las medidas en disolución que serán más precisas que las obtenidas en superficie sólida.

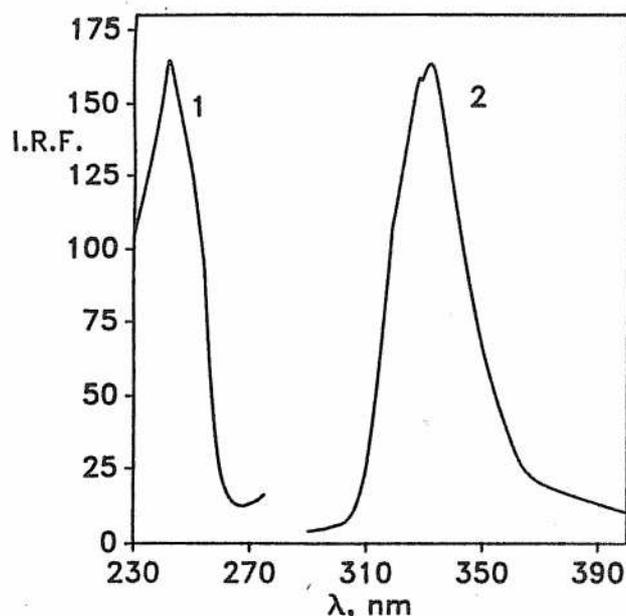


Fig. 2.— Espectros de excitación (1) y emisión (2) de dulcin, 3.3×10^{-7} M en 100% acetonitrilo, $\lambda_{exc} = 240$ nm, $\lambda_{em} = 332$ nm, rendijas 5/5 nm, velocidad de registro 480 nm/seg.

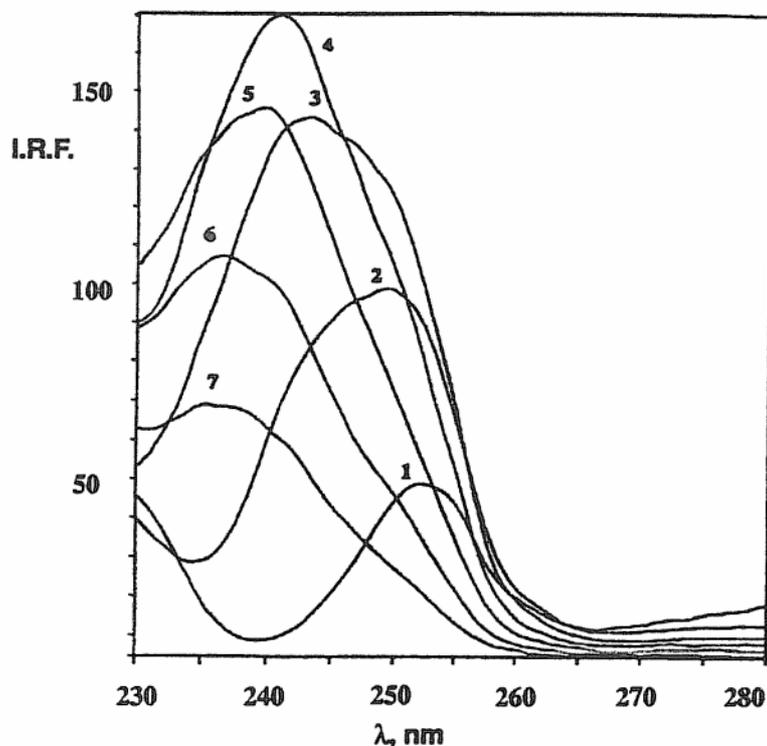


Fig. 3.— Espectros sincrónicos de dulcin a diferentes $\lambda_{exc} - \lambda_{em} = D\lambda$: (1) 62 nm; (2) 72 nm; (3) 82 nm; (4) 92 nm; (5) 102 nm; (6) 112 nm; (7) 122 nm. Otras condiciones como en la Fig. 2.

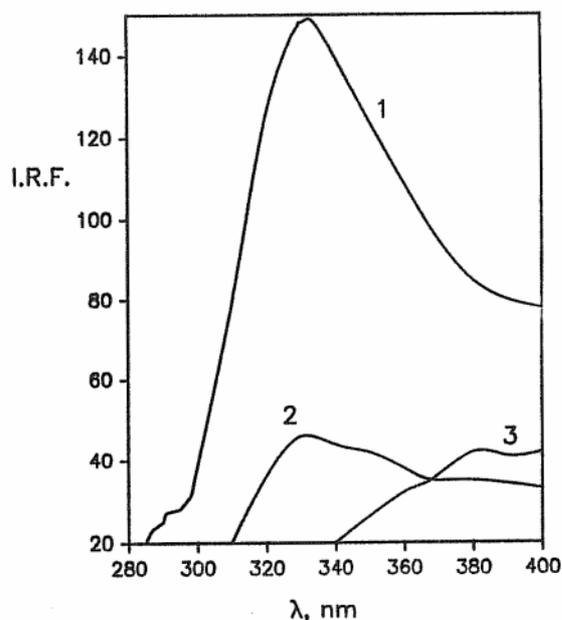


Fig. 4.— Espectros de fluorescencia de dulcin $1,4 \times 10^{-5}$ M (1) y acetonitrilo (2) adsorbidos y del papel de filtro (3), $\lambda_{exc} = 239$ nm, $\lambda_{em} = 330$ nm, rendijas 15/15 nm, velocidad de registro 1200 nm/seg.

De las anteriores observaciones se concluye que la IRF de dulcin es mayor al realizar medidas directas frente a las sincrónicas o al calcular la primera derivada del espectro sincrónico, y es comparable a las obtenidas en superficie sólida aunque en este último caso su determinación es más imprecisa.

3.2. Curvas de calibración, precisión y exactitud

Por medidas directas de intensidad de fluorescencia, usando rendijas de excitación y emisión de 2.5 nm, se pueden cubrir dos rangos de concentración de dulcin en los que las gráficas de calibración son lineales, correspondientes a 10–300 ng/ml y 0.3–2.00 μ g/ml descritos, respectivamente, por las ecuaciones $IRF = 0.94 + 0.33$ (Dulcin, ng/ml), $r = 1,000$ y $IRF = 38.1 + 236$ (Dulcin, μ g/ml), $r = 0.998$.

Para determinar la precisión y exactitud de las medidas se llevaron a cabo ensayos de reproducibilidad sobre muestras de 70.0 ng/ml y 0.80 μ g/ml. Se obtuvieron valores para la desviación estándar relativa del 3.19% y 1.21% respectivamente siendo la cantidad encontrada de 72.1 ng/ml y 0.82 μ g/ml respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Técnica (Proyecto PB89-0583).

BIBLIOGRAFIA

1. J.F. LAWRENCE y C.F. CHARBONNEAU: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 934 (1988).
2. M. VEERABHADRA RAO, O.P. KAPUR y C.S. PRAKASA SASTRY: *J. Food Sci. Technol.*, **21**, 148 (1984).
3. M.A. GARCIA MARQUEZ, R. GUILLEN SANS y M. GUZMAN CHOZAS: *Afinidad*, **45**, 119 (1988).
4. S. UCHIYAMA, T. KONDO e I. KAWASHIRO: *Yakugaku Zasshi*, **89**, 828 (1969).
5. J.B.F. LLOYD: *Nature*, **64**, 231 (1971).
6. J.B.F. LLOYD e I.W. EWETT: *Anal. Chem.*, **64**, 231 (1971).
7. C.H. NICHOLLS y P.A. LEERMAKERS: *Adv. Photochem.*, **8**, 315 (1971).
8. R.K. BAUER, P. de MAYO, W.R. WARE y K.C. WU: *J. Phys. Chem.*, **86**, 3781 (1982).
9. J. FAN, W. SHI, S. TISOE, T.C. STREKAS y H.D. GAFNEY: *J. Phys. Chem.*, **93**, 373 (1989).
10. R.J. HURTUBISE: "Luminescence from Solid Surfaces", en "Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications. Part II", S.J. Schulman, ed. (*John Wiley and Sons, Inc.*, New York, 1988).
11. T. VO-DINH: "Room-Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis" (*John Wiley and Sons, Inc.*, New York, 1984).

★ ★ ★

