



ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

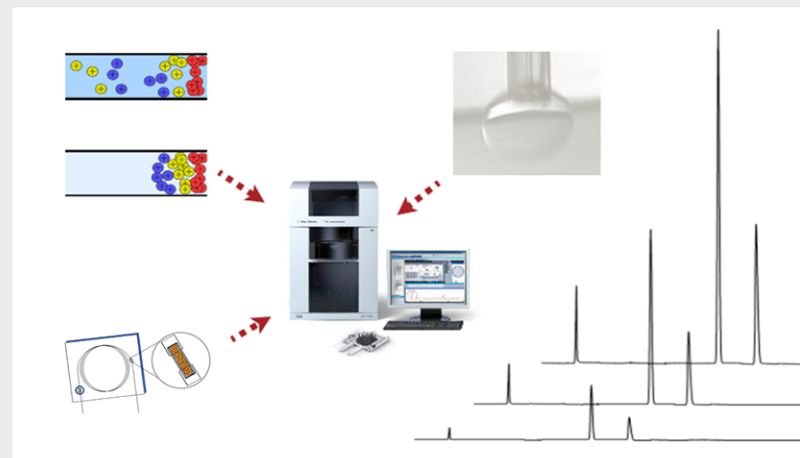
ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez



ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS *IN-LINE* CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

TESIS DOCTORAL

Supervisada por

Dra. Marta Calull y Dra. Carme Aguilar

Departamento de Química Analítica y Química Orgánica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2017

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA

La Dra. MARTA CALULL BLANCH, Professora Titular de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili, i

La Dra. CARME AGUILAR ANGUERA, Professora agregada del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de la Universitat Rovira i Virgili,

FEM CONSTAR

que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: “ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS *IN-LINE* CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR”, presentada per ALEJANDRO GARCÍA VÁZQUEZ per optar al grau de Doctor per la Universitat Rovira i Virgili, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentat doctorand.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 30 de juny de 2017.

Dra. Marta Calull Blanch

Dra. Carme Aguilar Anguera

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Agradezco a todas las personas que me han ayudado durante estos años. Al Dr. Francesc Borrull por darme la posibilidad de trabajar en su grupo de investigación, y a mis directoras las Dras. Marta Calull y Carme Aguilar, por su ayuda durante la realización de esta Tesis. También quiero dar las gracias a los compañeros del laboratorio por todo lo aprendido tanto académica como personalmente. Por último, y no por ello menos importante, a mis padres, por su apoyo incondicional.

Gracias.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	7
1.2. Filtros ultravioleta.....	13
1.3. Cationas sintéticas.....	19
1.4. Técnicas de microextracción combinadas <i>in-line</i> con la electroforesis capilar	25
1.4.1. Técnicas de microextracción en fase líquida	28
1.4.2. Técnicas de microextracción en fase sólida.....	41
1.5. Técnicas de preconcentración electroforética	55
1.6. Determinación de AINEs mediante electroforesis capilar	71
1.7. Determinación de filtros ultravioleta mediante electroforesis capilar	85
1.8. Determinación de cationas sintéticas mediante electroforesis capilar	93
1.9. Bibliografía.....	99
2. OBJETIVOS	121
3. PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIÓN	125

3.1. <i>Single-drop microextraction</i> (SDME) acoplada a la electroforesis capilar para la determinación de AINEs en muestras de orina	129
3.1.1. Materiales y métodos.....	132
3.1.2. Resultados y discusión.....	137
3.1.3. Bibliografía.....	146
3.2. <i>In-line</i> SPE como técnica de preconcentración para la determinación de catinonas mediante electroforesis capilar	149
3.2.1. Materiales y métodos.....	153
3.2.2. Resultados y discusión.....	157
3.2.3. Bibliografía.....	163
3.3. <i>Pressure-assisted electrokinetic injection</i> (PAEKI) como técnica de preconcentración para la determinación de filtros ultravioleta mediante electroforesis capilar.....	165
3.3.1. Materiales y métodos.....	168
3.3.2. Resultados y discusión.....	172
3.3.3. Bibliografía.....	183
4. CONCLUSIONES	185
Anexo I. Abreviaturas	189

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

RESUMEN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Los contaminantes orgánicos emergentes (EOCs) son un grupo de sustancias químicas que incluyen diferentes compuestos ampliamente utilizados en diversas actividades humanas e industriales. El alto consumo de fármacos, productos de cuidado e higiene personal (PCPs) y la aparición de nuevas drogas de abuso son algunas de las razones por las que ha aumentado la presencia de EOCs en muestras ambientales. Tras la exposición a este tipo de sustancias, éstas son asimiladas por el cuerpo y pueden ser detectadas en la orina, por lo que es de interés su determinación desde el punto de vista clínico, farmacológico y toxicológico. Por lo tanto, existe la necesidad de que se sigan desarrollando y mejorando los métodos analíticos para la determinación de este tipo de compuestos en diferentes matrices, tanto ambientales como biológicas.

Por otra parte, las principales tendencias en el campo de la química analítica son miniaturizar y automatizar los métodos analíticos mejorando también a su vez la robustez y la sensibilidad de una manera simple y eficiente. La electroforesis capilar (CE) es una técnica que en los últimos años se ha empleado satisfactoriamente para el análisis de una gran cantidad de sustancias en diferentes tipos de muestras, no obstante, la baja sensibilidad que presenta cuando se utiliza en combinación con un detector ultravioleta-visible (Uv/Vis) es una de sus principales limitaciones. Esta baja sensibilidad es debida en parte a las reducidas dimensiones de los capilares utilizados, haciendo que la cantidad de analito que se puede detectar sea muy baja, debido al pequeño paso óptico de la ventana de detección, y por otro lado otra contribución es la pequeña cantidad de muestra que se puede introducir en el capilar.

Con el objetivo de solventar esta problemática, se han desarrollado diferentes estrategias que pueden aumentar la cantidad de analito presente en el capilar, ya que en muestras biológicas y ambientales los analitos se encuentran normalmente a bajos niveles de concentración. Concretamente, se han evaluado algunas estrategias de preconcentración para la determinación de diferentes familias de

EOCs en las que nuestro grupo de investigación tiene experiencia, como son antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), filtros ultravioleta y cationas sintéticas. Estas estrategias se basan en la combinación *in-line* de la CE con técnicas de microextracción en fase líquida, como la *single-drop microextraction* (SDME), técnicas de microextracción en fase sólida, como la *in-line solid phase extraction* (SPE) y técnicas de preconcentración electroforética, concretamente *pressure-assisted electrokinetic injection* (PAEKI). En primer lugar, se desarrolló un método basado en SDME-CE para la determinación de AINEs en muestras de orina y se optimizaron los principales parámetros que afectan a la SDME, como pH y composición de la muestra, proceso de formación y tamaño de la gota, tiempo de extracción y tiempo de inyección de la muestra. Con el empleo de la SDME, además de solventar la problemática de la baja sensibilidad de la CE, se consiguió el lavado de la muestra y la extracción de los analitos de una manera simple y automatizada reduciendo el tiempo de manipulación de la muestra. El método desarrollado fue validado con muestras de orina y permitió el análisis de muestras de pacientes que estaban bajo tratamiento médico. En otro estudio, se desarrolló un método basado en *in-line* SPE-CE para la determinación de cationas en muestras de orina. Debido al carácter quiral de las cationas y teniendo en cuenta que los diferentes enantiómeros presentan propiedades diferentes, la primera etapa fue conseguir la enantiomérica de los compuestos. Posteriormente, se estudiaron diferentes parámetros de la técnica *in-line* SPE que influyen en el proceso de preconcentración como la cantidad de muestra introducida en el capilar y el volumen del solvente de elución. Con el método desarrollado se consiguió tanto la separación enantiomérica como la preconcentración de los compuestos estudiados, posibilitando la determinación de cationas sintéticas en muestras de orina. Finalmente, se desarrolló un método basado en la aplicación de una técnica de preconcentración electroforética, en concreto, PAEKI para el análisis de filtros ultravioleta en muestras de orina y muestras de crema solar. Se estudiaron los principales parámetros que afectan al proceso de preconcentración, como el pH de la muestra, la presión y voltaje aplicado durante la inyección y el

tiempo de carga de soluciones patrón. El método fue validado en soluciones patrón, obteniéndose elevados factores de preconcentración, lo que demuestra el potencial de PAEKI como técnica para mejorar la sensibilidad de la CE.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

1. INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

La utilización de compuestos orgánicos para uso industrial, médico y doméstico está ampliamente extendida debido a nuestro estilo de vida. Por este motivo, es necesario que se sigan desarrollando y mejorando los métodos analíticos para la determinación de este tipo de compuestos en muestras ambientales y biológicas. Uno de los principales objetivos que se pretenden es estudiar la posible presencia de estos compuestos en este tipo de muestras para poder evaluar de este modo las posibles consecuencias que pueden tener sobre la salud y el medio ambiente.

Algunos de estos compuestos se pueden clasificar dentro del grupo de los contaminantes orgánicos emergentes (*emerging organic contaminants* – EOCs), que se definen como compuestos de los cuales se sabe relativamente poco de su presencia e impacto, y que no están incluidos en las regulaciones existentes a pesar de ser amenazas potenciales para los ecosistemas y la salud. Dentro de este grupo se encuentran, entre otros, productos farmacéuticos y de cuidado e higiene personal (*pharmaceuticals and personal care products* – PPCPs), hormonas, surfactantes, compuestos perfluorados, retardantes de llama, aditivos industriales o drogas de abuso. Estos compuestos son muy utilizados en la actualidad, y por ello, se pueden encontrar fácilmente tanto en muestras ambientales como en muestras biológicas [1-10]. La ruta que siguen estos compuestos se puede explicar a partir de su ingesta por vía oral, son absorbidos en el aparato digestivo, posteriormente son metabolizados en el hígado y se excretan mediante la orina. Posteriormente, a través de la red de saneamiento llegan a las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR), desde donde algunos de estos compuestos, pueden ser finalmente liberados al medio acuático debido a la limitada capacidad de eliminación que presentan estas plantas de tratamiento para ciertos compuestos [5, 11-15]. Es importante señalar que la presencia de estos compuestos en el medio acuático está bajo investigación ya que pueden afectar directamente a los organismos acuáticos, y posteriormente al ser humano [2, 6, 16-18].

4 | Introducción

Para el análisis de muestras biológicas y ambientales es fundamental poder realizar la determinación de los diferentes compuestos a niveles bajos de concentración, ya que los analitos en estas matrices se encuentran normalmente a niveles de ng/L e incluso inferiores [3, 7, 8, 19].

En los últimos años, las principales tendencias en el campo de la química analítica han sido miniaturizar, automatizar y economizar los análisis mejorando también a su vez la robustez y la sensibilidad para obtener bajos niveles de concentración de una manera simple y eficiente.

Las técnicas analíticas empleadas mayoritariamente para la determinación de los contaminantes orgánicos emergentes son la cromatografía de gases (*gas chromatography* – GC), la cromatografía de líquidos (*liquid chromatography* – LC) y la electroforesis capilar (*capillary electrophoresis* – CE) [3, 4, 9, 10, 20-23].

La CE es una técnica que en los últimos años se ha empleado satisfactoriamente para el análisis de una gran cantidad de compuestos en diferentes muestras. Como ventajas de esta técnica podemos destacar la eficacia en la separación, la rapidez y la poca cantidad de muestra que requiere para llevar a cabo los análisis. Sin embargo, la baja sensibilidad que tiene, sobre todo cuando se utiliza un detector ultravioleta-visible (UV/Vis) es una de las principales limitaciones de la CE en comparación con la LC [24]. Esta baja sensibilidad es debida en parte a las reducidas dimensiones de los capilares que se utilizan, que generalmente tienen diámetros internos comprendidos entre 25-100 μm , haciendo que la cantidad de analito que se puede detectar sea muy baja ya que el paso óptico de la ventana de detección es muy pequeño, así como también a la pequeña cantidad de muestra que se puede introducir en el capilar (del orden de nL) para el análisis.

En los últimos años para solventar este problema se han desarrollado múltiples estrategias destinadas a aumentar la cantidad de analito

presente en el capilar. Concretamente se han aplicado técnicas de microextracción y técnicas de preconcentración electroforética en combinación con la CE [25-30]. Las técnicas de microextracción se basan principalmente en la preconcentración de los analitos mediante un sorbente (fase sólida) y la posterior elución de los mismos, o mediante la utilización de un líquido como extractante (fase líquida). En el caso de las técnicas de preconcentración electroforética, cabe señalar que existen una amplia variedad descritas en la bibliografía, pero la presente Tesis Doctoral se centrará en las técnicas de *stacking*, que se basan en la preconcentración de los analitos debido a las diferencias de movilidad de éstos entre la matriz de la muestra y el electrólito de separación (*background electrolyte* – BGE).

Para el desarrollo y aplicación de las técnicas de preconcentración utilizadas en esta tesis doctoral se han escogido diferentes familias de EOCs como analitos modelo. Concretamente se han seleccionado un grupo de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como productos farmacéuticos, un grupo de filtros ultravioleta como productos de cuidado e higiene personal y un grupo de catinonas sintéticas como drogas de abuso.

En los siguientes apartados se presentan en primer lugar los analitos estudiados, a continuación, en los apartados 1.4 y 1.5, se presentarán las diferentes técnicas de microextracción y preconcentración más empleadas en su combinación *in-line* con la CE. Por último, en los apartados 1.6, 1.7 y 1.8, se recogen los estudios bibliográficos centrados en la determinación mediante la CE de las distintas familias de compuestos incluidas en esta tesis y basados en el uso de CE.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

1.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un conjunto heterogéneo de compuestos químicos generalmente no relacionados entre sí, que comparten acciones terapéuticas para el control en diverso grado del dolor, la inflamación y la fiebre en animales y humanos. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa, una enzima que permite sintetizar prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Los AINEs se encuentran entre los medicamentos más prescritos y consumidos en todo el mundo [31]. Los beneficios que proporcionan estos fármacos sobre la salud son bien conocidos pero, sin embargo, pueden presentarse reacciones adversas, principalmente gastrointestinales [32] y cardiovasculares [33] debido a su uso.

Desde el punto de vista químico estos fármacos son no volátiles, polares y altamente solubles en medio acuoso. Se pueden clasificar como derivados del ácido salicílico (aspirina, salicilato sódico, diflunisal); derivados del ácido propiónico (ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, oxaprozina); derivados del ácido acético (indometacina); derivados del ácido enólico (piroxicam) y derivados de pirazonas (metamizol, propifenazona, fenilbutazona). Los derivados del ácido salicílico y los derivados del ácido propiónico son los AINEs más comunes y más consumidos ya que su mecanismo de acción es de amplio espectro (no son muy específicos y pueden ser empleados para múltiples afecciones). Los derivados del ácido acético, ácido enólico y pirazonas son utilizados para tratamientos más específicos o complementarios. En la presente Tesis Doctoral se han seleccionado concretamente un grupo de AINEs derivados del ácido propiónico. Estos se caracterizan por ser ácidos débiles debido a la presencia en su estructura de un grupo carboxílico (tienen unos valores de pK_a entre 3 y 7).

10 | Introducción

En la figura 1 se muestran las estructuras características de los AINEs derivados el ácido propiónico más ampliamente utilizados.

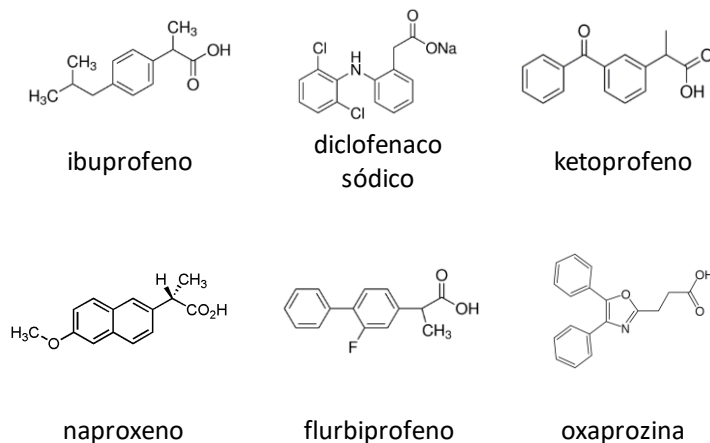


Figura 1. Estructura de algunos AINEs derivados del ácido propiónico.

A pesar del beneficio que aportan estos compuestos en el ámbito sanitario, los AINEs son considerados contaminantes orgánicos emergentes debido a su amplia presencia en el medio ambiente y sus propiedades ecotoxicológicas, por lo que es necesario su determinación para controlar su presencia, distribución e impacto, en muestras ambientales [5, 12, 14, 34-36], organismos acuáticos [35, 37-39] y en diferentes tipos de muestras biológicas como orina y sangre humana [21, 40, 41], fundamentalmente.

En cuanto a la legislación de estos compuestos, en la Unión Europea (UE) los AINEs son regulados por el Reglamento (CE) 726/2004 en el que se establecen los procedimientos para la autorización y supervisión de medicamentos de uso humano y veterinario. La Agencia de Medicamentos Europea (*“European Medicines Agency”* – EMA), es el organismo que establece el control centralizado en la UE para el procedimiento de autorización de medicamentos. Esto significa que hay una sola aplicación, una sola evaluación y una única autorización que permite el acceso directo al mercado de un

medicamento en la UE [42]. Los AINEs están regulados en el ámbito veterinario, y se recogen en el Reglamento (UE) 37/2010, relativo a sustancias farmacológicamente activas. En esta normativa se hace referencia a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, donde se especifican las cantidades máximas permitidas para diferentes antiinflamatorios en diversas especies animales [43].

En el ámbito ambiental, estos compuestos hasta la fecha aún no están incluidos en la lista de sustancias prioritarias que recoge la Directiva Marco del Agua (2000/60/EC) [44]. No obstante, el diclofenaco se recoge en la modificación de la Directiva Marco del Agua, Directiva 2013/39/UE, en la lista de observación, “para recabar datos de seguimiento con el fin de facilitar la determinación de medidas adecuadas para afrontar el riesgo que supone esta sustancia”[45].

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

1.2. Filtros ultravioleta

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Los filtros ultravioleta se consideran EOCs y se incluyen dentro del grupo de PPCPs. Los PPCPs comprenden diferentes grupos de compuestos que se utilizan como aditivos en productos de uso diario, como cosméticos, cremas faciales, productos para después del afeitado, barras de labios, champús, maquillajes, productos para el hogar y productos farmacéuticos [46].

Hoy en día, hay una gran conciencia de lo importante que es protegernos de la radiación ultravioleta para evitar quemaduras solares en la piel (fotodermatosis) o cáncer de piel [47, 48]. Es bien conocido que la excesiva exposición a la luz solar causa daños debido a que el ADN, el ARN, las proteínas, las membranas lipídicas y los orgánulos de las células presentes en dermis y epidermis absorben la radiación ultravioleta. Por esta razón, los filtros ultravioleta se incorporan en productos de protección solar con el objetivo de protegernos frente a la radiación solar.

Los filtros ultravioleta se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su naturaleza. Los filtros ultravioleta inorgánicos, también llamados filtros ultravioleta físicos, tienen como función reflejar y dispersar la radiación ultravioleta, mientras que los filtros orgánicos, también llamados filtros químicos, absorben la luz. Los filtros físicos son generalmente óxidos metálicos que proporcionan una mayor protección que los químicos. Los filtros ultravioleta químicos son compuestos orgánicos que llevan anillos aromáticos en su estructura: dobles enlaces carbono-carbono y/o grupos funcionales carbonilo. A su vez, los filtros ultravioleta químicos se pueden clasificar en diferentes familias según su composición química: derivados de la benzofenona, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, cinamatos, alcanfor, triazinas, benzotriazoles, etc. [49].

A continuación, en la figura 2 se presentan las estructuras de algunos de los filtros ultravioleta más comunes.

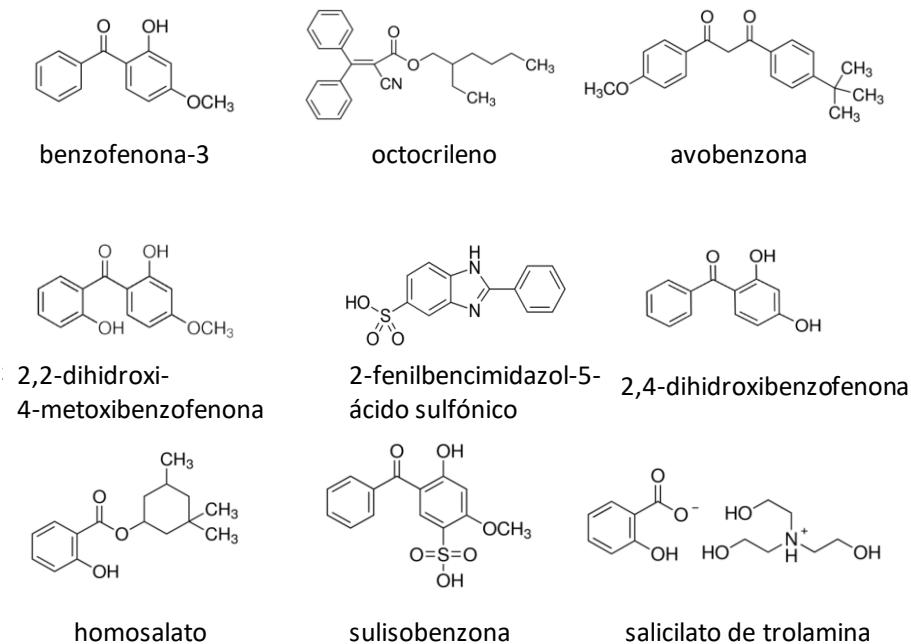


Figura 2. Estructura de algunos filtros ultravioleta.

Los filtros ultravioleta pueden ser absorbidos directamente por la piel, metabolizados y bioacumulados [48, 50]. Las principales vías a través de las que estos compuestos se introducen en el medio ambiente son las descargas de aguas residuales industriales, las actividades de baño, lavado de ropa y la excreción humana después de la aplicación en la piel. Cabe señalar que la presencia de estos contaminantes en el medio ambiente acuático es de gran preocupación debido al creciente uso que en los últimos años se está haciendo de ellos [48-51]. Además, cabe destacar que los filtros ultravioleta acaban en las aguas residuales y las plantas de tratamiento de este tipo de agua no son eficientes para su total eliminación [5, 13, 14, 52]. Tras su liberación a través del efluente de estas plantas, estos compuestos se distribuyen en el medio según su

solubilidad. Los compuestos más lipófilos tienden a absorberse en los lodos generando focos de contaminación, ya que los compuestos quedan retenidos en los sedimentos y a medida que pasa el tiempo éstos pueden formar productos de degradación y se pueden ir liberando lentamente al medio acuático. En cambio, los más hidrófilos terminan en las aguas superficiales contaminando la biota existente [53].

Los filtros ultravioleta del tipo benzofenona pueden presentar propiedades de disruptores endocrinos ("*Endocrine Disruptor Compounds*" – EDC) [54]. Los EDC están relacionados con diversas enfermedades endocrinas tales como algunos trastornos reproductivos, infertilidad, cáncer, obesidad, diabetes y trastornos del neurodesarrollo [55]. Algunos estudios también sugieren que estos compuestos pueden inducir riesgo ecotoxicológico para los seres humanos y la fauna acuática [56, 57].

El aumento del uso de cosméticos y, por lo tanto, la mayor aparición de estos compuestos en el agua, ha hecho que su estudio en diferentes compartimentos ambientales sea de gran interés y constituya un tema prioritario en muchos países. Para ello es necesario desarrollar métodos analíticos para su determinación tanto en muestras ambientales, fundamentalmente aguas y lodos, y en muestras biológicas: organismos acuáticos (peces, moluscos) y muestras humanas (principalmente sangre y orina).

En cuanto al marco legislativo, las leyes que regulan los cosméticos son diversas en diferentes partes del mundo y los ingredientes cosméticos pueden ser sometidos a diversos niveles de regulación. En el Reglamento Europeo de Productos Cosméticos (CE 1223/2009) [58] se especifica qué sustancias químicas están prohibidas, permitidas y como se deben cumplir los criterios normativos para ser utilizadas como ingredientes cosméticos y productos de higiene personal, concretamente, en el Anexo VI de este reglamento, se muestran los 27 filtros ultravioleta que están permitidos en

cosmética y las cantidades máximas en los que pueden estar presentes, que están dentro del rango entre el 3% y el 25%.

La legislación cosmética con frecuencia es actualizada, por lo que la metodología analítica debe ser constantemente revisada y mejorada para cumplir con los requisitos de la legislación. Un ejemplo de este hecho, es el estudio de Sobek y col. [59] en que se han puesto de manifiesto las incoherencias en la legislación de la UE en relación con los filtros UV, ya que casi el 50% de los filtros UV permitidos en la lista positiva podrían ser clasificados como peligrosos para el medio ambiente acuático de acuerdo al Reglamento de clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas ("*classification, labelling and packaging*" – CLP) [60]. Por lo tanto, no se puede descartar que la legislación relativa a estos productos químicos cambie en un corto plazo de tiempo.

Los filtros ultravioleta todavía no están incluidos en las legislaciones ambientales, pero el aumento de la presencia de estos compuestos en el medio ambiente y la baja eficacia de las EDAR convencionales para eliminarlos [5, 13, 14, 52], promueven la constante modificación del marco normativo para cubrir un mayor número de compuestos peligrosos para la salud y el medio ambiente.

1.3. Cationas sintéticas

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Las catinonas sintéticas son sustancias afines a la catinona, uno de los principios psicoactivos presentes en la planta *Catha edulis*, originaria de África y la península arábiga [61]. El grupo incluye varias sustancias que se han usado como ingredientes farmacéuticos activos de medicamentos como, por ejemplo, la anfepramona. Las catinonas sintéticas pertenecen a un grupo de drogas llamadas nuevas sustancias psicoactivas (*new psychoactive substances* – NPS). Las NPS son sustancias no reguladas que están disponibles en el mercado y tienen efectos similares a las drogas ilegales. Las catinonas sintéticas son β -ketoanfetaminas con similitud estructural a la dopamina, la metanfetamina, la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), y la pirovalerona [62]. En la figura 3 se muestran las estructuras de algunas de las catinonas más comunes.

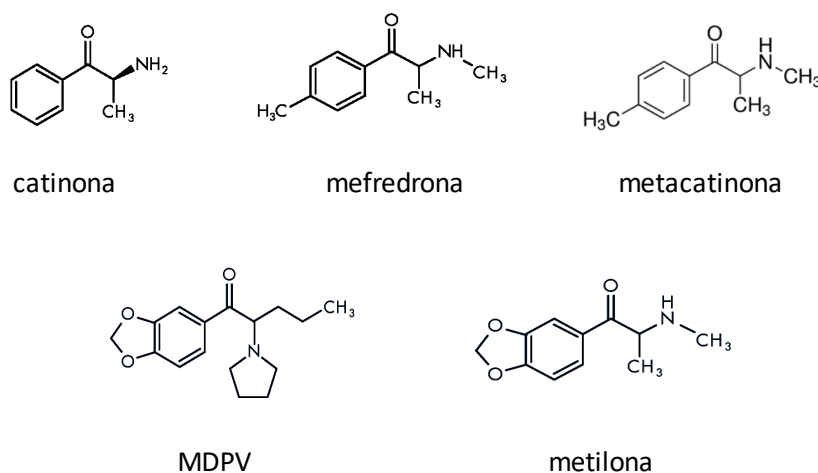


Figura 3. Estructura de algunas de las catinonas más comunes.

La semejanza estructural entre las catinonas sintéticas y otros estimulantes posibilita que éstas puedan desempeñar la misma función, como el aumento de la liberación de monoaminas y la inhibición de su recaptación en las neuronas [62]. Las catinonas sintéticas tienen efectos similares a los de la cocaína, anfetamina o MDMA, pero poco se sabe de su farmacología. Desde mediados de la década del 2000, han ido apareciendo este tipo de drogas en el

mercado ilegal, donde se comercializan y venden a través de internet mezclas de drogas de diseño denominadas como *legal highs*.

Las catinonas sintéticas constituyeron la categoría más grande de NPS identificadas por el observatorio europeo de droga y toxicomanías (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* – EMCDDA) en 2014, con un aumento de 60 veces entre 2008 y 2013. Las catinonas que se consumieron más desde que se sabe de su existencia hasta 2010 fueron la mefedrona y la metilona [63].

Los efectos adversos más frecuentes del consumo de catinonas sintéticas son: ansiedad, alucinaciones, paranoia, hipertensión, taquicardias, eventualmente fallo renal y/o hepático, e incluso la muerte. También se ha observado el desarrollo del síndrome de abstinencia, tolerancia y dependencia después de la retirada tras un consumo frecuente de mefedrona o MDPV [64].

Debido a que estas drogas son relativamente nuevas, se han publicado pocos estudios clínicos que hayan evaluado su farmacología, toxicología o sus efectos fisiológicos si comparamos con otras drogas de abuso. Además, cabe destacar que continuamente están apareciendo sustancias nuevas de este tipo, por lo que es necesario el desarrollo de métodos analíticos para su estudio. Por ejemplo, solo en 2014 se descubrieron 101 sustancias de este tipo.

Las catinonas sintéticas son moléculas quirales. Un enantiómero respecto al otro puede tener diferente actividad o intensidad de acción y a menudo solo es uno el que presenta la propiedad, puede tener alta toxicidad o presentar efectos secundarios [65], por lo que es de gran interés poder identificarlos y determinarlos por separado. Teniendo en cuenta la importancia de los compuestos quirales, la separación y el análisis de los enantiómeros es un tema que estimula a las comunidades científicas e industriales a desarrollar nuevos estudios, por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos

analíticos para poder determinar los diferentes enantiómeros de estos analitos por separado.

Estos compuestos son de especial importancia en química forense ya que se han reportado múltiples casos de muerte relacionados con la intoxicación aguda de estas drogas [66-68]. La mayoría de las determinaciones analíticas realizadas para estas drogas ha sido en muestras biológicas [69-71], aunque también cabe señalar que algunos trabajos se han centrado en el análisis de estas sustancias en aguas de EDAR [72-74].

En cuanto al marco legislativo, se propuso comenzar a tomar medidas de control para la mefedrona en la Unión Europea a partir de octubre de 2010 [75]. Posteriormente, se incluyeron en la legislación la MDPV en 2015 [76] y más recientemente en 2016 la α -pirrolidinovalerofenona (α -PVP) [77]. Tras la propuesta de la UE, cada estado miembro las incluye en las listas de sustancias controladas y se toman las medidas de control que establece cada país para este tipo de sustancias. En la legislación estadounidense, la mefedrona y la MDPV se clasificaron como drogas de la Lista I (mayor riesgo de abuso y de desarrollar dependencia física y psicológica) bajo la Ley de Prevención de Abuso de Drogas Sintéticas de 2012 [78].

La continua síntesis de nuevas catinonas en laboratorios clandestinos supera en velocidad a la legislación e investigación sobre estas nuevas sustancias de abuso y, aunque la evidencia sugiere que la producción y el consumo de mefedrona han disminuido tras su regulación [79], ya se están distribuyendo nuevos grupos de catinonas sintéticas que no están incluidas en las listas que están bajo observación.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

1.4. Técnicas de microextracción combinadas *in-line* con la electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

En el análisis de muestras complejas, la preparación y tratamiento de la muestra es una parte del proceso analítico de gran importancia para la obtención de resultados fiables y precisos. Esta etapa representa aproximadamente dos tercios del tiempo de todo el procedimiento analítico [80].

Las técnicas de tratamiento de muestra basadas en la extracción en fase sólida (*solid phase extraction* – SPE) o en la extracción líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* – LLE), son técnicas ampliamente utilizadas tanto para muestras ambientales como biológicas. Una característica común de todas estas técnicas es el consumo elevado de disolventes orgánicos tóxicos para el medio ambiente y la salud. Además, la preparación de la muestra fuera de línea (*off-line*) también es considerada como una fuente principal de errores analíticos que puede afectar significativamente al resultado final. La posibilidad de automatizar estas técnicas y poder realizarlas en línea (*in-line*) con la técnica de separación posterior es de gran interés, ya que minimiza la intervención humana, simplificando y reduciendo el tiempo empleado.

La llegada del concepto de Química Verde a principios de la década de los 90 hizo hincapié en la necesidad de utilizar técnicas analíticas amigables con el medio ambiente, promoviendo el uso de procedimientos de preparación de muestra ambientalmente sostenibles con el desarrollo de técnicas de extracción libres de solventes y/o miniaturizados [80-82]. Como resultado de esta tendencia surgen las técnicas de microextracción (*microextraction techniques* – MEs), que tienen varias ventajas, como el bajo consumo de solventes y que el volumen de muestra es reducido.

Las técnicas de microextracción se pueden clasificar en técnicas de microextracción en fase líquida (*liquid phase microextraction* – LPME) cuando el extractante se encuentra en fase líquida, y en técnicas de microextracción en fase sólida cuando el extractante es un sorbente sólido.

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de diferentes técnicas de microextracción combinadas *in-line* a la CE. En la siguiente figura se muestran las diferentes técnicas de microextracción comúnmente combinadas *in-line* con la CE.

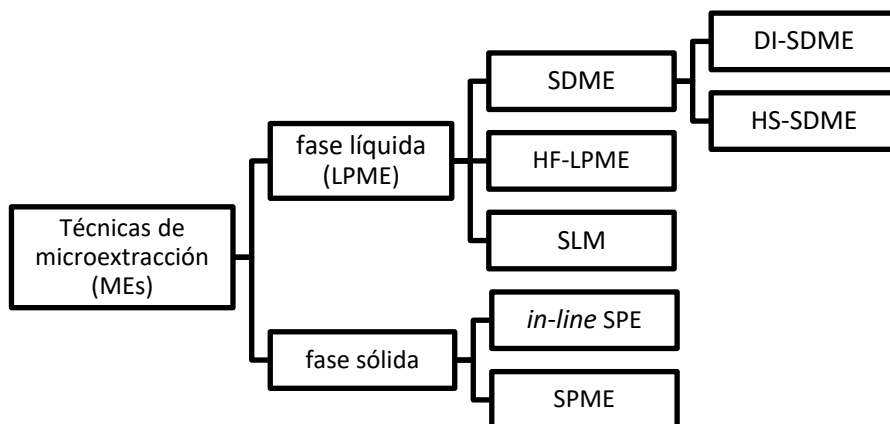


Figura 4. Clasificación de las principales técnicas de microextracción en fase líquida y en fase sólida combinadas *in-line* con CE.

En los siguientes apartados se comentarán las principales generalidades y algunos ejemplos de aplicación de las técnicas que derivan de la LPME, como la *single-drop microextraction* (SDME), *hollow-fiber liquid phase microextraction* (HF-LPME), *supported liquid membrane* (SLM) y las que derivan de las técnicas de extracción en fase sólida, concretamente *solid phase extraction* (SPE) y *solid phase microextraction* (SPME).

1.4.1 Técnicas de microextracción en fase líquida

En los últimos años, las técnicas de microextracción en fase líquida se han convertido en una alternativa simple y fácil para llevar a cabo el tratamiento de muestra para la determinación de contaminantes orgánicos en diferentes tipos de muestras [19, 83, 84].

En estas técnicas se utilizan los principios de la extracción líquido-líquido, que se basa en la diferente solubilidad de los analitos en diferentes solventes. La LLE consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente (fase dadora) a través de su transferencia a otro disolvente inmiscible, o parcialmente inmiscible (fase aceptora). Generalmente, una de las fases es acuosa y la otra orgánica, de forma que tanto la eficacia como la selectividad del proceso dependen de la naturaleza de ambas fases.

Se han desarrollado una gran variedad de estrategias para llevar a cabo la LPME dando lugar a diferentes técnicas, entre las que cabe destacar las basadas en la SDME, la HF-LPME y la SLM.

La SDME consiste en poner una gota (de un orden de volumen de nL- μ L) generalmente de un solvente orgánico, que actuará como fase aceptora suspendida en una aguja cromatográfica o un capilar sobre la fase dadora, normalmente acuosa, que contiene los analitos a determinar. Este proceso se puede realizar o bien por inmersión directa de la gota (*direct immersion single-drop microextraction* – DI-SDME) o por simple exposición en el espacio de cabeza (*headspace single-drop microextraction* – HS-SDME). De esta manera los analitos que presentan afinidad por la fase aceptora se concentrarán en la gota. Después de un tiempo de extracción, una pequeña cantidad de la fase aceptora será introducida en el instrumento analítico para su posterior análisis.

Las variables que afectan al proceso de extracción en la técnica de SDME son fundamentalmente la temperatura, el tipo de extractante, el volumen de la gota, fase dadora (muestra) y el tiempo de extracción [85-87]. Generalmente, el aumento de la temperatura favorece la extracción, ya que la agitación molecular debida al aumento de la temperatura favorece la transferencia de los analitos de una fase a otra. En HS-SDME, la temperatura es un parámetro que toma especial importancia debido a que es necesario que los analitos estén en estado gaseoso en el espacio de cabeza para que entren en contacto con la gota y se produzca la transferencia. En cuanto al tipo

de extractante es fundamental que éste sea inmiscible en la fase dadora, para que se posibilite la formación de la gota. El volumen de la gota también es una variable importante a optimizar, ya que la relación entre los volúmenes de la fase dadora y de la fase aceptora puede influir en el proceso de preconcentración, ya que según sea esta relación los factores de preconcentración pueden ser diferentes. Además, cabe destacar que un volumen de gota grande normalmente va ligado a un aumento de la inestabilidad de la gota. En cuanto al tiempo de extracción, a mayor exposición entre fases se favorece la transferencia de los analitos mientras la gota sea estable, por lo tanto, para este parámetro se debe llegar a un compromiso entre el tiempo de extracción y la estabilidad de la gota [85-89].

Las principales ventajas de la SDME son su simplicidad y el hecho de que puede ser completamente automatizada. Tanto la DI-SDME como la HS-SDME pueden ser acopladas *in-line* a la CE sin necesidad de requerimientos especiales, debido a que la gota se puede obtener directamente en un extremo del capilar de CE. En la figura 5 se muestra esquemáticamente como se pueden llevar a cabo las dos modalidades de SDME en combinación *in-line* con CE. Como se puede observar, en el caso de la modalidad DI-SDME existen dos posibles estrategias de operación, en 2 fases (figura 5a) o en 3 fases (figura 5b y figura 5c).

En el caso de DI-SDME, cuando se realiza en la modalidad de 2 fases (figura 5a) los analitos son extraídos normalmente desde la fase dadora que normalmente es la muestra (D) a una fase aceptora (A). En esta versión, se usa como fase aceptora una gota de un disolvente orgánico en el extremo del capilar. Esta fase aceptora se introduce en la muestra acuosa y tiene lugar la transferencia de los analitos a la gota por difusión pasiva.

En la modalidad DI-SDME en 3 fases (figuras 5b y 5c), los analitos pasan desde la solución acuosa de la muestra, que actúa como fase dadora (D), a una fase orgánica (O) y posteriormente se transfieren a una fase aceptora (A). Esta versión de SDME es considerada como

una extracción líquido-líquido-líquido (“*liquid-liquid-liquid extraction*” – LLLE).

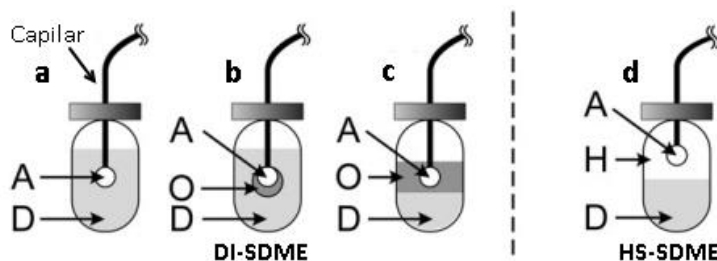


Figura 5. Esquemas de DI-SDME-CE en 2 fases (a), 3 fases con gota de doble capa (b) y 3 fases con fase orgánica sobre la fase dadora (muestra) (c) y HS-SDME (d).

Fase aceptora (A), fase orgánica (O), fase dadora (D) y espacio de cabeza (H).

Adaptado de [90].

Experimentalmente, esta modalidad se puede llevar a cabo de 2 maneras distintas. En la primera (Figura 5b) la gota se forma por la fase aceptora que está recubierta de fase orgánica, y ambas cuelgan del extremo del capilar. En la segunda, la fase orgánica se dispone como una capa por encima de la fase dadora (muestra) y constituye una separación entre la fase dadora y la aceptora. Esta última cuelga del extremo del capilar. En la figura 5d se muestra un esquema de HS-SDME donde se puede observar la posición de la gota que está en el espacio de cabeza.

Como ya se ha comentado anteriormente, en esta tesis nos centraremos en el acoplamiento *in-line* de la SDME con CE. Para llevar a cabo esta combinación cabe señalar que no se requiere de instrumentación adicional. A modo de ejemplo, en la figura 6, se representa el procedimiento correspondiente a esta combinación de técnicas en la modalidad de 3 fases y concretamente formando una gota de doble capa. El primer paso (A) consiste en llenar el capilar con el BGE, y a continuación el extremo del capilar (*inlet*) es introducido en un vial con un solvente orgánico y el otro extremo del capilar (*outlet*) se introduce en un vial que contiene el BGE. Seguidamente se inyecta hidrodinámicamente la fase orgánica en el capilar y a continuación se sustituye el vial *inlet* por el vial de la

muestra que constituye la fase dadora. El siguiente paso (B) consiste en la formación de la gota que se realiza aplicando presión sobre el *outlet*. De este modo en el extremo del capilar se forma una gota de doble capa recubierta con el solvente orgánico previamente inyectado y la fase aceptora que en este caso el BGE. Esta gota se muestra en la figura 7. Seguidamente se lleva a cabo la extracción (C) durante un determinado tiempo manteniendo la gota inmersa dentro de la muestra. Finalmente, se realiza la inyección (D) introduciendo una parte de la fase aceptora en el capilar para su posterior análisis.

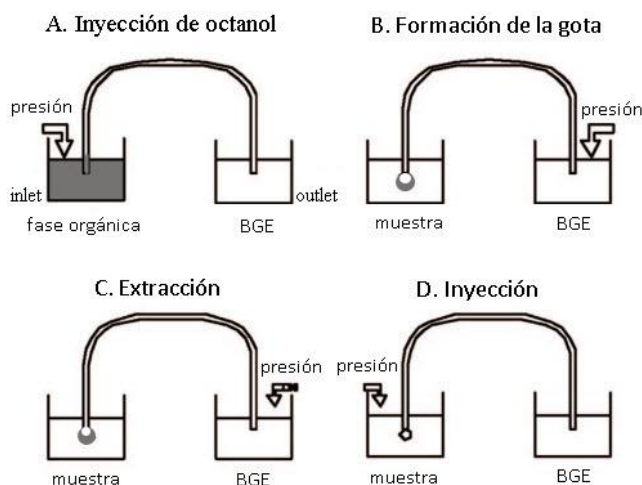


Figura 6. Esquema del procedimiento DI-SDME-CE en la modalidad de 3 fases con doble gota. (A) Inyección de fase orgánica, (B) formación de la gota, (C) extracción y inyección de la fase aceptora (D). Adaptado de [91].

El primer acoplamiento automatizado *in-line* SDME-CE se llevó a cabo por Choi y col. y data de 2009 [91]. En este trabajo se empleó este acoplamiento en la determinación de diclorofluoresceína, fluoresceinamina y fluoresceína en soluciones estándares, obteniéndose factores de preconcentración entre 190 y 2000. La ventaja frente a la versión *off-line*, es que se facilita el proceso de formación de la gota ya que se puede aplicar presión tanto en el vial *inlet* (presión positiva), como en el *oulet* (presión negativa), simplificando y automatizando el proceso. En este primer trabajo se

realizó una SDME en 3 fases con gota de doble capa, usando octanol como solvente orgánico y una fase aceptora acuosa constituida por borato de sodio a una concentración 20 mM (BGE). A continuación, en la figura 7 se muestra una imagen de una gota de doble capa suspendida en un capilar. En este caso el volumen aproximado de la gota era de 30 nL.

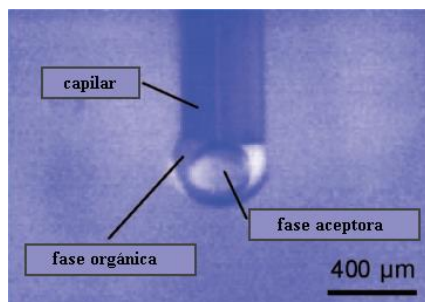


Figura 7. Imagen del extremo del un capilar de CE en la que se puede ver la gota de doble capa. Adaptado de [91].

En este trabajo de Choi y col. también es destacable el hecho de que se utilizó el octadeciltrimetoxilano (ODTS) para recubrir el extremo del capilar con el objetivo de hacerlo más hidrofóbico y de este modo poder incrementar la estabilidad de la gota. Gracias a esto, se pudieron llevar a cabo extracciones con tiempos de hasta 60 minutos y la gota se mantuvo estable. Además, en este estudio también fue posible la agitación de la muestra en el propio instrumento ya que se incorporó un agitador magnético incrementando de este modo la eficiencia en la extracción.

En general, en los distintos estudios que se han ido publicando en la bibliografía se utilizó octanol como solvente de extracción. No obstante, hay diferentes alternativas a este solvente que se han aplicado con éxito. Por ejemplo, se puede citar a Zhu y col. [92] que utilizaron el acetato de etilo como solvente, empleando una SDME-CE en 3 fases para la determinación de adenina en muestras de té. El acetato de etilo es totalmente compatible con esta técnica, y es un solvente menos tóxico que el octanol, por lo tanto, su uso es

medioambientalmente más sostenible. En este trabajo se consiguieron factores de preconcentración de entre 550 y 1030. Posteriormente, Wang y col. [93] introdujeron el uso de los líquidos iónicos como fase aceptora, utilizando una SDME-CE en 2 fases para la preconcentración de fenoles en agua de río y agua del grifo. Como hecho a destacar cabe mencionar que la elevada densidad de este tipo de sustancias favorece que las gotas que se forman sean más estables. No obstante, esta alta densidad también puede ser un inconveniente a la hora de introducirlos en el capilar, ya que pueden producirse problemas de obstrucción del capilar e interferir en el análisis. En este caso la gota tenía un volumen de 2.4 nL y se expuso durante 10 minutos en las muestras de agua para la extracción. En este caso los factores de preconcentración obtenidos fueron de entre 107 y 257.

En 2010, Xie y col. [94] realizaron por primera vez el acoplamiento *in-line* HS-SDME a CE, para el análisis de compuestos volátiles en aguas. La manera de operar es similar que en DI-SDME, a diferencia que en este caso la gota está en el espacio de cabeza. En este modo es de especial importancia que el vial de la muestra quede bien sellado para evitar la posible pérdida de los analitos. Con esta finalidad, para llevar a cabo este estudio se diseñó una cubierta de PTFE que contenía un tapón de silicona que sellaba totalmente el vial, y de este modo se consiguió evitar la pérdida de los analitos volátiles. En la figura 8, se muestra un esquema de la cubierta empleada en este diseño de HS-SDME.

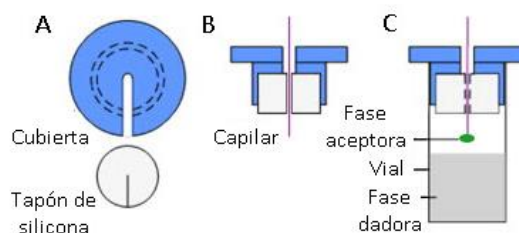


Figura 8. Esquemas de la cubierta PTFE utilizada en el acoplamiento *in-line* HS-SDME (A, B) y del vial para llevarlo a cabo (C). Adaptado de [89].

Otra de las técnicas de LPME que también se ha desarrollado con éxito es la HF-LPME. Esta estrategia surgió en parte para solventar la problemática que se produce habitualmente en SDME relacionada con la estabilidad de la gota. La HF-LPME consiste en impregnar los poros de una fibra hueca con un disolvente orgánico y fue desarrollada en 1999 por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen [95]. Esta técnica se puede realizar en modalidad de 2 ó 3 fases. En la HF-LPME de 2 fases los analitos se extraen desde la fase dadora (muestra) a la fase aceptora que es un solvente orgánico inmisible con la fase dadora y que está inmovilizado en los poros de la fibra hueca, mientras que el interior de la fibra se llena con otra porción del mismo disolvente orgánico (solución aceptora). La extracción se basa en la difusión pasiva de los analitos, y finalmente una porción del disolvente orgánico se inyecta en el instrumento. En la modalidad de 3 fases, la configuración es similar a la de 2 fases, pero en este caso la fase aceptora es una solución acuosa y la fase orgánica se dispone entre ésta y la fase dadora. En la figura 9, se muestra un esquema de la técnica en sus dos posibles modalidades, HF-LPME en 2 fases (A) y en 3 fases (B). En el caso de la modalidad en dos fases, en la figura 9A, se puede observar que la fase aceptora orgánica queda en el interior de la fibra, mientras que en la figura 9B, en el interior de la fibra se recoge la fase aceptora acuosa.

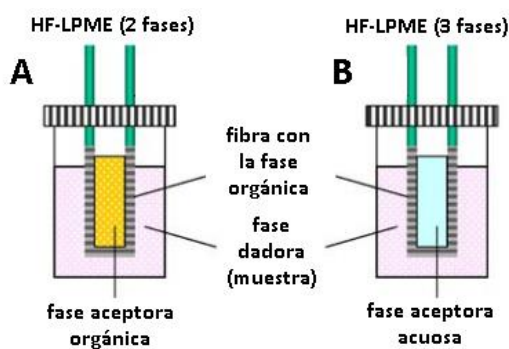


Figura 9. Esquemas de la HF-LPME en 2 fases (A) y en 3 fases (B). Adaptado de [19].

En 2007 Nozal y col. [96] realizaron el acoplamiento *in-line* de la HF-LPME a CE, usando una fibra hueca de polipropileno de 600 μm de diámetro interno y tamaño del poro de 0.2 μm como membrana del soporte líquido. En la figura 10A, se detalla el procedimiento de construcción del dispositivo. La primera etapa consiste en impregnar la fibra con un solvente orgánico. Después, se fijan dos capilares a un soporte rígido. Posteriormente, se introduce la fibra en el espacio entre los capilares y después se fijan los bordes de la fibra quemándolos mediante calor. Para no quemar la fibra, se utiliza un tubo de teflón para protegerla. Es muy importante fijar adecuadamente la fibra sin dañarla con el fin de obtener extracciones reproducibles. Una vez sellado el dispositivo en el capilar, se instala el capilar en el *cassette* y se puede comenzar el análisis. En la figura 10B se muestra la posición de la unidad de microextracción en el capilar y su ubicación dentro del instrumento de CE.

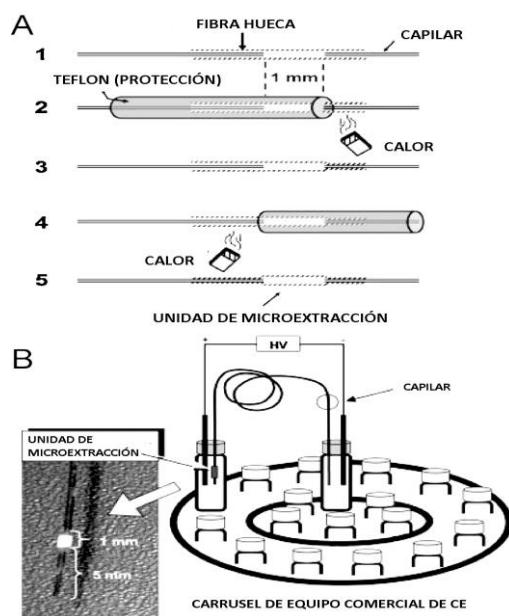


Figura 10. (A) Esquema de la construcción de la unidad de HF-LPME. Alineamiento de capilares e inserción en la fibra hueca (1), procedimiento de fijación mediante calor de los extremos de la fibra hueca usando una protección de teflón (2, 3 y 4) y unidad de microextracción integrada en el capilar (5). (B) Ubicación de la unidad de microextracción en el instrumento de CE. Adaptado de [96].

Con esta técnica se realizó la determinación de un grupo de AINEs en orina sin pretratamiento previo [97]. Para la extracción se seleccionó como fase aceptora una solución de MeOH y 30 mM NaOH (75:25 v/v), y como fase orgánica dihexil éter, debido a que en previos estudios se habían obtenido buenos resultados para la extracción de AINEs con este solvente. También, se estudió la influencia de la concentración de NaOH en la fase aceptora, con el objetivo de desplazar el equilibrio de la extracción de los analitos cargados y mejorar la eficiencia de la extracción. Se observó que trabajar a altas concentraciones de NaOH influía negativamente en el proceso, probablemente debido a la alta fuerza iónica de la solución aceptora que dió lugar a diferencias de conductividad entre la solución aceptora y el BGE, influyendo negativamente en el proceso de extracción.

Otra técnica de microextracción en fase líquida, que ha sido acoplada satisfactoriamente a la CE y ha ganado interés en los últimos años es la técnica de SLM.

La técnica de SLM se basa en la transferencia de los analitos a través de una membrana entre dos soluciones acuosas, una que actúa como solución dadora y otra como solución aceptora. Como membrana se utiliza un material poroso inerte que es impregnado por un solvente inmiscible en agua y hace de barrera selectiva entre dos soluciones acuosas a diferente pH. Debido a la rigidez del soporte inerte, las dos soluciones acuosas no se mezclan. La solución dadora contiene los analitos de interés, que normalmente están en forma neutra mientras que, en el lado opuesto, y separada por la membrana, se coloca la solución aceptora donde los analitos se encuentran en forma iónica. La elección correcta de la composición de la membrana líquida (polaridad, aditivos), de la fase aceptora y aceptora (composición, pH) es muy importante para que los analitos se transfieran desde la solución dadora a la solución aceptora. En la figura 11 se muestra un esquema de cómo tiene lugar la transferencia de los analitos. Concretamente, existen dos modalidades, la transferencia de los analitos a través de la SLM

mediante gradiente del pH (figura 11A) ó mediante gradiente de potencial (figura 11B). En la primera modalidad, los analitos neutros entran en contacto con la membrana líquida y en el lado opuesto se liberan como especies iónicas en la solución aceptora. Es importante que esta solución tenga un pH altamente ácido o básico, dependiendo de las características de los analitos, ya que se debe favorecer que éstos se encuentren en forma iónica con el objetivo de que se transfieran eficazmente a ésta fase aceptora. En la otra modalidad la trasferencia a través de la SLM se realiza mediante un gradiente de potencial eléctrico. En esta extracción electroasistida, la aplicación de voltaje facilita que los iones pasen por la membrana y sean extraídos al otro lado.

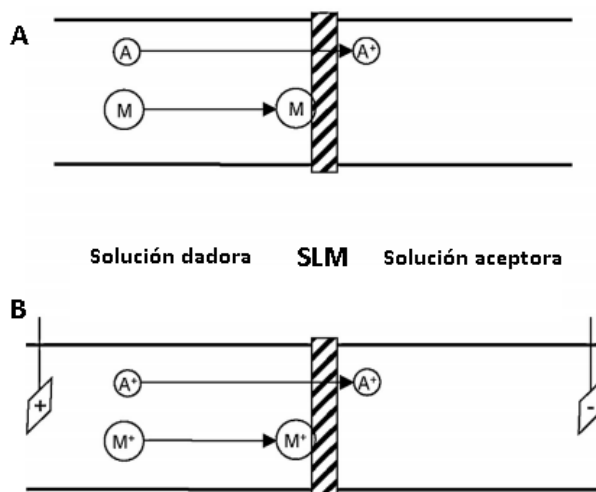


Figura 11. Esquema de la transferencia de analitos a través de la SLM mediante gradiente de pH (A) y mediante gradiente del potencial eléctrico (B). Analito (A), analito en forma iónica (A⁺), matriz (M), matriz en forma iónica (M⁺). Adaptado de [98].

La SLM también ha sido combinada *in-line* satisfactoriamente a la CE por Nozal y col. [99], para la determinación de nitroimidazoles en tejido de hígado de cerdo. En la figura 12, se presenta el dispositivo de SLM diseñado con este objetivo. Concretamente, como se puede observar el dispositivo consiste en la modificación de un vial tipo *Eppendorf* de 500 μ L y la posterior introducción de una membrana

de teflón enrollada sobre el vial. Este dispositivo presenta un soporte plástico flexible que posibilita el correcto sellado del vial de CE y que no se rompa la membrana cuando el vial es elevado para la inyección. En este trabajo la membrana se sumergió en isopropilbenceno durante 10 segundos para llenar los poros. Después de retirar el exceso de disolvente, se llenó el dispositivo de SLM con 200 μ l de ácido clorhídrico 0,1 M (solución aceptora) y se colocó en el vial CE que contenía la muestra.

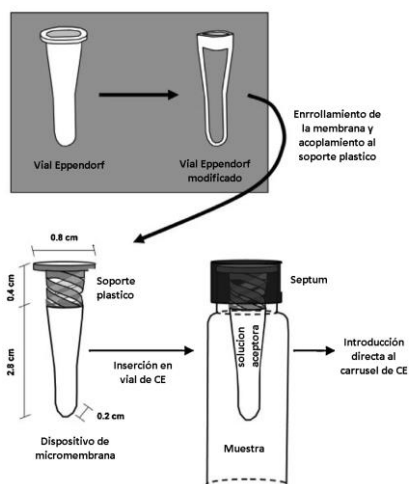


Figura 12. Fabricación de la SLM y su ubicación en el vial de CE diseñado por Nozal y col. [99]

Como resultado, se obtuvo un sistema trifásico consistente en 4 mL de una fase dadora acuosa (pH 6), el disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la membrana y una solución aceptora ácida. Como el disolvente orgánico de la membrana es inmiscible con agua, actúa de barrera entre las fases dadora y aceptora. La extracción se lleva a cabo en el vial de CE y posteriormente la solución aceptora es inyectada en el instrumento, por lo que el proceso es totalmente automatizado.

Posteriormente, este mismo dispositivo fue aplicado por Almeda y col. [100], para la determinación de clorofenoles en muestras de

aguas superficiales. En este caso, se utilizó dietiléter como solvente orgánico. Se estudió el pH de la fase aceptora entre 8 y 13, y los mejores resultados se consiguieron a pH 11. Por debajo de pH 10 no se observaron picos de los analitos, debido a que a este pH los analitos no están en forma cargada y en esas condiciones no se pueden separar los analitos. Como fase dadora (muestra de agua), se estudió la influencia del pH entre 2 y 6, y se obtuvieron mejores resultados en la eficiencia de la extracción a pH 2.

Pantůčková y col. más recientemente, han introducido en varios trabajos [101, 102] otro dispositivo de extracción de SLM acoplada *in-line* a la CE. El dispositivo de microextracción se construye con 2 trozos cortados de una punta de micropipeta y una membrana circular de polipropileno impregnada en un solvente orgánico. En la figura 13 se muestra este tipo de dispositivo de SLM insertado en un vial de CE (A) y la posición del vial durante la extracción e inyección de la muestra (B). Este dispositivo tiene la ventaja de que utiliza volúmenes muy pequeños en comparación con los empleados en el diseño de SLM, ya que en este caso se trabaja con volúmenes de las dos fases por debajo de 40 μL y en la otra modalidad los volúmenes solían estar entre 100 y 200 μL , por lo tanto, se ahorra en el consumo de muestra y solventes.

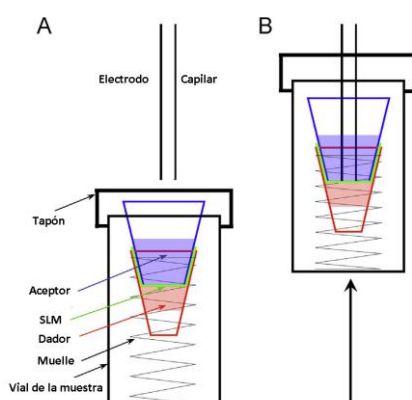


Figura 13. Dispositivo de SLM acoplado a CE. (A) Vial de muestra con el dispositivo de microextracción antes de la inyección, (B) Vial de muestra con el dispositivo de microextracción durante la inyección de la muestra. Adaptado de [101].

En el trabajo más reciente de Pantůčková y col. [102], la membrana se impregnó con el solvente orgánico 1-etil-2-nitrobenceno, se utilizaron como fases dadoras muestras de orina (pH 5.6) y muestras de suero sanguíneo (pH 7.4) y como fase aceptora agua destilada a pH 3.5. Además, cabe destacar que con este diseño se consiguió combinar por primera vez y de manera totalmente automatizada la SLM con la técnica de preconcentración *transient isotachopheresis* (tITP) y con la inyección electrocinética. Con esta combinación, se consiguió realizar inyecciones electrocinética prolongadas con el fin de aumentar la sensibilidad, además de realizar el lavado de la muestra. Para esta combinación, fue necesario optimizar tanto la fase dadora como la fase aceptora, ya que este parámetro es fundamental para obtener una buena eficiencia del proceso y además mejorar la reproducibilidad de la inyección electrocinética. Tanto la solución dadora como la solución aceptora se acidificaron con el fin de aumentar la conductividad y así hacerlas compatibles con el medio utilizado en tITP. Este sistema fue aplicado para la determinación de los fármacos nortriptilina, haloperidol y loperamida en muestras de suero y orina, minimizando el proceso de manejo de la muestra y obteniendo buenos resultados en términos de extracción, preconcentración y separación.

1.4.2 Técnicas de microextracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (*solid phase extraction* – SPE) es una de las técnicas más utilizadas para la limpieza, preconcentración y extracción selectiva de compuestos orgánicos en diferentes tipos de muestras [103]. En esta técnica, los analitos son extraídos de una fase líquida o gaseosa mediante una fase estacionaria sólida formada por pequeñas partículas por la que éstos presentan una gran afinidad. Una vez los analitos han sido retenidos en la fase estacionaria son eluidos mediante un solvente adecuado.

En los últimos años, se han desarrollado múltiples tipos de sorbentes que permiten la extracción de una gran variedad de analitos con

diferente polaridad y estructura química [103-106]. Los más empleados han sido los de fase reversa, no obstante, también se han empleado los de intercambio iónico. Las principales ventajas de la SPE convencional es que se puede automatizar fácilmente, pueden obtenerse elevadas recuperaciones y puede ser selectiva en relación a las interferencias de la matriz. Sin embargo, la SPE tiene algunas desventajas significativas como el alto consumo de disolventes. Con el objetivo de miniaturizar las técnicas de extracción y reducir el consumo de solventes se ha desarrollado la miniaturización de microextracción en fase sólida, como la *in-line* SPE o la microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction* – SPME) [19, 27, 107].

En el acoplamiento *in-line* SPE-CE, el sorbente de SPE se introduce en el capilar de separación próximo al extremo de introducción de la muestra. No es necesaria ninguna instrumentación especial y la carga de la muestra, el lavado, la elución y la separación puede ser llevada a cabo en el mismo capilar. El acoplamiento *in-line* entre la SPE y CE presenta grandes ventajas como que no se requiere la modificación del instrumento de CE, la minimización de la manipulación de la muestra, y la posibilidad de automatizar todo el proceso de separación y preconcentración, obteniendo factores de enriquecimiento elevados con poca cantidad de muestra y consumiendo una mínima cantidad de solvente. No obstante, también presenta algún inconveniente, como que es necesario construir los dispositivos de *in-line* SPE manualmente debido a que no se comercializan. Además, debido a que los componentes de la matriz de la muestra también pasan a través del capilar de separación, éstos pueden interferir en la separación electroforética o pueden adsorberse sobre la pared capilar y, por lo tanto, se puede ver afectada la separación [27, 107-110].

A lo largo de los años, se han desarrollado diferentes diseños de *in-line* SPE, dependiendo de cómo está construido el dispositivo de SPE. Este dispositivo puede estar construido (a) con un trozo de capilar recubierto de sorbente SPE, (b) con un lecho empaquetado de

sorbente en un trozo de capilar (*packed bed*), o (c) con un sorbente de SPE dispuesto en forma de membrana entre dos capilares [27, 107, 111]. Estos diseños se representan esquemáticamente en la figura 14.

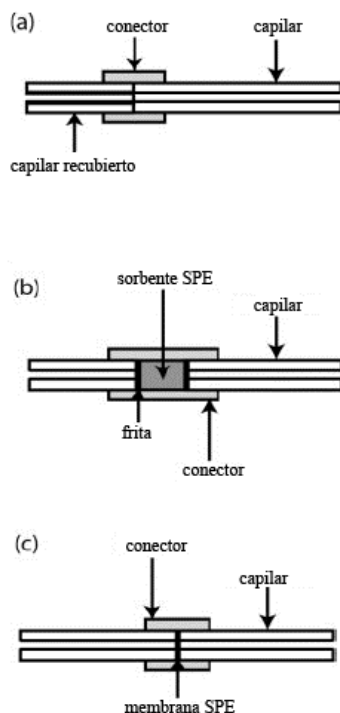


Figura 14. Diferentes diseños *in-line* SPE-CE. a) capilar recubierto con sorbente, b) lecho empacado con sorbente SPE y c) membrana de SPE entre dos capilares. Adaptado de [111].

En el diseño con capilar recubierto con material sorbente, se recubren las paredes de un trozo del capilar con partículas de sorbente. Este diseño es de fabricación relativamente sencilla y normalmente permite grandes volúmenes de carga de muestra (Figura 14a). Para su preparación, es necesario llevar a cabo una modificación de la pared del capilar con algunos reactivos previamente al recubrimiento con el material sorbente. No obstante, este sistema presenta la limitación de que tiene baja capacidad de

retención, debido a que la cantidad de sorbente que puede contener es pequeña, lo que conlleva una menor capacidad de retención de los analitos comparando con los demás diseños. Los diseños de lecho empaquetado con sorbente (Figura 14b) pueden ser fijados mediante fritas o sin ellas. Las fritas se utilizan para evitar que las partículas de sorbente de diámetro pequeño pasen al capilar de separación [112]. No obstante, éstas pueden presentar el problema de que aumentan la contrapresión dentro del capilar y pueden proporcionar mayor irreproducibilidad en el análisis [27]. En esta configuración, si las partículas de sorbente son de gran tamaño se puede construir el lecho empaquetado de SPE sin fritas, evitándonos así el problema comentado anteriormente. El diseño de lecho empaquetado tiene una mayor capacidad de retención que el diseño de capilar recubierto, debido a que pueden contener más cantidad de sorbente ya que todo el diámetro interno del capilar se llena con partículas de sorbente. En el diseño con el sorbente SPE en forma de membrana (Figura 14c), se dispone el sorbente SPE formando una membrana entre dos capilares. Esta modalidad ha sido poco empleada debido a la poca cantidad de material de sorbente que se puede utilizar, y por lo tanto tienen menor capacidad de retención comparando con demás diseños [27, 107-109, 111].

Entre estos diseños, el más empleado en los últimos años ha sido el de lecho empaquetado con sorbente, que se construye extrayendo las partículas de sorbente de un cartucho comercial de SPE e introduciéndolas en una zona del capilar al que denominamos concentrador de analito (AC). En este diseño, toma especial importancia el tamaño de las partículas de sorbente de SPE utilizado, que deben de ser de un tamaño más grande que el diámetro interno del capilar de separación, de este modo las partículas de sorbente no pueden escapar hacia el capilar de separación. En este sentido, Jooß y col. [113] realizaron un nuevo diseño de AC con un sorbente constituido con partículas con un tamaño de 90 μm que aporta una más fácil preparación del AC y mostro mejores resultados en términos de eficiencia de la separación y reproducibilidad. La principal ventaja de estos diseños de AC es que permite la

introducción de grandes volúmenes de muestra en el capilar. No obstante, presenta la desventaja de que el AC se debe de realizar manualmente.

El modo de operar con este diseño es relativamente simple. A continuación, en la figura 15, se detalla el procedimiento de *in-line* SPE con un diseño de lecho empaquetado con sorbente, usando un AC construido entre dos capilares sin fritas.

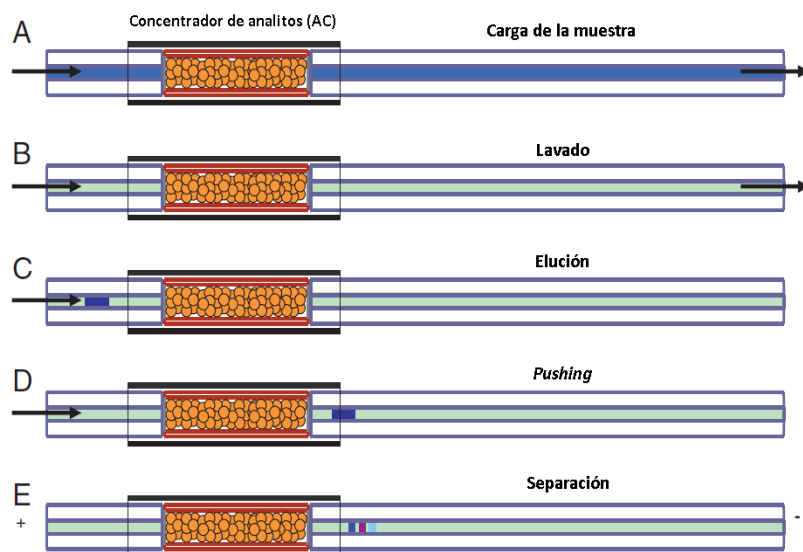


Figura 15. Representación esquemática del procedimiento *in-line* SPE-CE utilizando el diseño de lecho empaquetado con sorbente sin fritas. Carga de la muestra (A), lavado (B), elución (C), *pushing* (D) y separación (E). Adaptado de [114].

Inicialmente, se lleva a cabo la carga de la muestra, que debe de tener un pH determinado en función al sorbente utilizado, para favorecer que los analitos queden retenidos en el AC (A), a continuación, se realiza una etapa de lavado o *clean-up* para eliminar posibles interferencias (B). Posteriormente se realiza la etapa de elución introduciendo un *plug* de solvente (C) y seguidamente mediante la aplicación de presión durante un periodo de tiempo (D) se desplaza el solvente de elución a través del sorbente para realizar

la elución de los analitos que se han quedado retenidos en el AC. Esta etapa la denominamos *pushing*. Finalmente, se aplica un determinado voltaje y comienza la separación (E).

Las principales variables que afectan a la *in-line* SPE son el tipo de sorbente empleado, el pH de la muestra, la naturaleza y volumen del solvente de elución y el tiempo de inyección de la muestra. Los tipos de sorbentes más empleados para la construcción de los AC han sido los de base de sílice C₁₈ y los de base polimérica como el Oasis HLB. No obstante, en los últimos años hay algunos trabajos que utilizaron sorbentes de modo mixto, tales como el Oasis MCX. Este tipo de sorbente ofrece un aumento de la retención de los analitos mediante interacciones polares e hidrofóbicas. También en la bibliografía podemos encontrar algún ejemplo en el que se han utilizado *molecularly imprinted polymers* (MIPs) [115-119]. Los MIPs tienen la ventaja de que presentan una mayor especificidad con el analito, ya que se realizan específicamente en base a las características de los analito a estudiar. Cada tipo de sorbente tiene unas determinadas características, y por lo tanto se debe estudiar cual es el más apropiado para la extracción en función de las propiedades de los analitos de interés. Como ejemplo, el Oasis HLB es un sorbente polimérico con características hidrofílicas-lipofílicas que ofrece buenos resultados para extraer analitos con un amplio rango de propiedades físico-químicas en diferentes tipos de matrices. El pH de la muestra es importante para tener los analitos en forma cargada o neutra en función al tipo de sorbente que utilizamos para que éstos sean retenidos. La elección del solvente de elución es importante para obtener la mayor eficiencia en el proceso. Otro parámetro a optimizar es el volumen de inyección, ya que un aumento del volumen de inyección permite obtener unos límites de detección más bajos, si bien se tiene que llegar al compromiso de no llegar al volumen de ruptura [120].

La técnica *in-line* SPE, ha sido extensamente aplicada para la preconcentración y separación de diferentes familias de compuestos orgánicos, en diferentes tipos de matrices [108, 109, 116, 117, 119,

121-126]. Por ejemplo, Botello y col. [115] desarrollaron un método basado en el acoplamiento *in-line* SPE-CE para la determinación de barbitúricos en orina, usando un dispositivo de SPE de lecho empaquetado con sorbente Oasis HLB. Se evaluaron varios parámetros que afectan a la *in-line* SPE, como el pH de la muestra, naturaleza y volumen del solvente de elución y el tiempo de inyección de la muestra. Las condiciones óptimas se fijaron con un tiempo de carga de muestra de 60 minutos, con un pH de la muestra de 6 y MeOH como solvente de elución (50 mbar, 40 segundos). Maijó y col. [116] utilizaron un dispositivo de *in-line* SPE similar, y evaluaron diferentes tipos de sorbentes (Oasis HLB, Oasis MCX y Oasis MAX) para la determinación de filtros ultravioleta en aguas de río, ya que para el análisis de estos compuestos en matrices ambientales, éstos se encuentran a baja concentración y es necesario el empleo de una técnica de preconcentración. En este estudio, se observó que los mejores resultados se obtenían cuando se empleaba el sorbente Oasis MCX, debido a que se obtuvieron mejores recuperaciones comparado con los demás tipos de sorbentes empleados. Esto puede explicarse por el aumento de las retenciones hidrofóbicas y polares características del sorbente MCX que ofreció mayor selectividad en la extracción comparados con los demás sorbentes estudiados.

Como hemos comentado con anterioridad, una de las principales desventajas de la construcción de los AC, es que se tiene que realizar manualmente, lo que requiere un cierto tiempo además de que al ser un proceso manual puede conllevar cierta irreproducibilidad entre diferentes ACs. Para solventar esta problemática y debido a la posibilidad de magnetizar las partículas de SPE, una alternativa es el uso de partículas magnéticas funcionalizadas para llevar a cabo la preconcentración. Esta técnica se denominada (*magnetic solid-phase extraction* – MSPE). En este caso, debido a las propiedades magnéticas de las partículas que pueden ser adheridas al sorbente de extracción, éstas se pueden manejar fácilmente dentro del capilar con la simple colocación de dos imanes en el *cassette*, debido a que se puede introducir y quitar el sorbente del capilar

automáticamente, de esta manera posibilitando el proceso de extracción mediante *in-line* SPE de una manera más fácil y automatizada.

En la figura 16, se representan esquemáticamente las diferentes etapas del procedimiento mediante *in-line* MSPE-CE. Primeramente, se acondiciona el capilar (A), después se introduce el sorbente magnetizado mediante inyección hidrodinámica y éste queda retenido en el interior del capilar mediante los imanes (B), se produce la etapa de lavado de la muestra (C), y finalmente, se realiza la elución salida de los analitos (D). La Figura 16E, representa la configuración y posición de los imanes dentro del *cassette*.

En los últimos años, diferentes tipos de partículas magnéticas han sido estudiadas en la funcionalización del sorbente y aplicadas para el tratamiento de muestra. En este sentido, las más populares han sido las partículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) debido a su bajo coste y baja toxicidad [123]. La MSPE ha sido combinada con la CE recientemente por diversos autores [123, 124, 126, 127]. Tennico y col. [123] utilizaron el tipo de sorbente C_{18} funcionalizadas con partículas de Fe_3O_4 ($\text{C}_{18}\text{-FS-Fe}_3\text{O}_4$), para la extracción de varios parabenos y AINEs, obteniéndose valores de recuperación del proceso de extracción del 90%. Sin embargo, en este estudio sólo se ha conseguido la automatización parcial del proceso de extracción dentro del capilar de CE, ya que el MSPE se realizó fuera, es decir, las partículas magnéticas funcionalizadas se añadieron a la muestra, se mezclaron y luego se inyectaron para realizar la desorción de los analitos en el instrumento de CE.

La automatización total de la MSPE-CE la desarrollaron Gasilova y col. [124], y Morales-Cid y col. [127], que pusieron de manifiesto la aplicabilidad de *in-line* MSPE-CE utilizando procedimientos de purificación de inmunoafinidad y usando partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos inmovilizados dentro del capilar CE como inmunosuporte, para la extracción y aislamiento de proteínas.

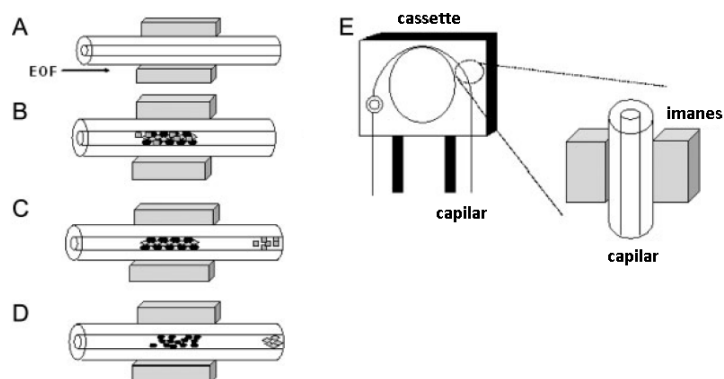


Figura 16. Representación esquemática del procedimiento *in-line* MSPE-CE. Acondicionamiento (A), carga del sorbente magnetizado hidrodinámicamente (B), lavado (C) y elución (D). Adaptado de Tennico y col. [123]

En el primer caso se realizó el acoplamiento a un detector de espectrometría de masas MALDI-TOF para el análisis de proteínas en muestras de leche, con el objetivo de aumentar la sensibilidad del método, obteniéndose LODs por debajo de 2.1 nM y valores de recuperaciones del 99%. En el trabajo de Morales-Cid y col. se determinaron glicoproteínas en muestras de suero sanguíneo con una precisión en términos de porcentaje de área de entre 0.5 y 11 % de RSD, y LODs por debajo de 2 nM.

En un trabajo reciente, Baciú y col. [126] con el fin de automatizar el proceso de fabricación de *in-line* SPE convencional y debido a la posibilidad de poder manipular las partículas magnéticas con un imán, utilizaron un sorbente funcionalizado con partículas de óxido de hierro para realizar la limpieza de la muestra y preconcentración de drogas de abuso en muestras de orina. Se optimizó el pH de la muestra, la inyección de las partículas magnéticas y la carga de la muestra. En este trabajo se obtuvieron recuperaciones relativas por encima del 75.9 %, valores de precisión por debajo del 20% de RSD y LODs en muestras de orina de 20-50 ng/mL.

Otra técnica de microextracción, es la microextracción en fase sólida (SPME), que fue introducida en 1990 por Arthur y Pawliszyn [128]. La SPME se basa en la partición de los analitos entre la muestra y la fase de extracción estacionaria, generalmente revestida sobre la superficie de una fibra o dentro de una microjeringa por un período de tiempo hasta que se alcanza el equilibrio [128, 129]. El revestimiento de la fibra es un parámetro clave en la SPME y el desarrollo de revestimientos ha sido muy importante en los últimos años. Los principales sorbentes comerciales utilizados son los de polidimetilsiloxano (PDMS) para compuestos no polares o volátiles, y poliácido (PA), PDMS-divinilbenceno (DVB-PDMS) y divinilbenceno carbowax (CW-DVB) para compuestos polares. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco de tal forma que ésta se puede retraer y sacar de su interior quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas. Inicialmente, la etapa de extracción, que se puede llevar a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de la muestra (*direct inmersión* - DI-SPME) o manteniéndola en el espacio de cabeza que está en equilibrio con la disolución (*headspace* - HS-SPME). Posteriormente, la etapa de desorción, que puede ser realizada mediante desorción térmica o mediante disolventes [129, 130].

El acoplamiento *in-line* SPME-CE puede llevarse a cabo en dos formatos principales: SPME en fibra [131-134], y SPME en tubo [135], seguida de la desorción de los analitos mediante el uso de un solvente adecuado. La escasa bibliografía sobre este acoplamiento es debido a las diferencias de las dimensiones entre las fibras y los capilares de separación, ya que normalmente las fibras tienen un diámetro más grande con el fin de extraer la máxima cantidad de muestra [136]. De esta manera, para poder conectar la fibra *in-line* con el extremo del capilar de CE es necesario el uso de un adaptador o de un interfaz. En este sentido, Nguyen y col. [132] en 1997, construyeron un adaptador que posibilitó el primer acoplamiento *in-line* de la SPME a la CE.

En la figura 17 se muestra el esquema de la estructura del adaptador empleado en este acoplamiento. El punto de inyección del capilar de separación está conectado con un segmento de capilar de diámetro más grande. Estos dos se unen mediante un tubo retráctil de teflón y la fibra se dispone en el interior del segmento de capilar con mayor diámetro.

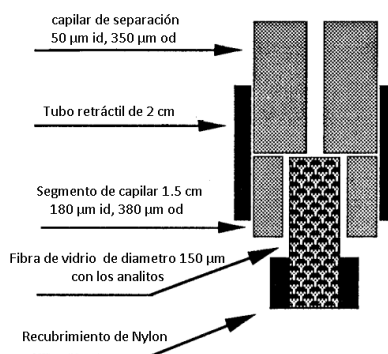


Figura 17. Esquema del adaptador *in-line* SPME-CE con fibra de Nguyen y col. Adaptado de [132].

Este sistema fue aplicado para el análisis de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos, empleando una fibra de polidimetilsiloxano. Después de la adsorción de los analitos en la fibra durante un tiempo de 2 horas, se realizó un lavado sumergiendo la fibra en agua durante 30 minutos. Seguidamente, la fibra se acopla al capilar de separación con el sistema que se muestra en la figura anterior y se inyecta una cantidad de MeOH durante 3 segundos. Tras 5 minutos de contacto de la fibra con el metanol, se aplica un determinado voltaje y se lleva a cabo la separación electroforética. Una ventaja de este sistema es que permite el uso de fibras de gran diámetro, por lo tanto, se puede aumentar la eficiencia en la extracción.

Whang y col. [131], en 1998 desarrollan otra configuración *in-line* SPME-CE en fibra. En este trabajo, se usó un interfaz con una fibra de poliácrilato conectada mediante un tubo de teflón directamente al capilar de separación para el análisis de fenoles en soluciones

estándar. En la Figura 18, se representa con más detalle el esquema de la configuración del interfaz utilizado. La principal ventaja de este interfaz es que posibilita el contacto entre la fibra SPME y el capilar de separación de una manera simple. La desorción de los analitos se produce con una cantidad mínima de un disolvente sin causar el ensanchamiento de los picos.

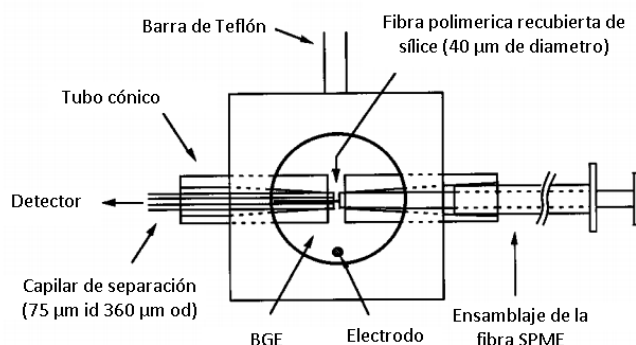


Figura 18. Esquema del interfaz *in-line* SPME-CE con fibra de Wang y col. Adaptado de [131]

En esta configuración, al inicio se acondiciona el capilar con el BGE y después se inyecta durante 5 segundos una solución 0.2 M de NaOH que actúa como solvente de desorción. Después se lleva a cabo la adsorción de los analitos en la fibra durante un tiempo de 40 minutos y seguidamente ésta se inserta en el interior del capilar de separación. Posteriormente, se aplica la diferencia de potencial y se lleva a cabo la separación. En este caso, la fibra se mantiene durante todo el análisis dentro del capilar. No obstante, esta configuración presenta el inconveniente en la dificultad de insertar la fibra dentro de un capilar con un diámetro interno tan pequeño (75 µm).

Para solventar este problema, Santos y col. [134], propusieron otra configuración *in-line* SPME-CE en fibra, en este caso, realizaron el acoplamiento de *in-line* SPME-CE a MS diseñando un adaptador que tiene un canal cerrado que permite la introducción de la fibra justo en la región de entrada del capilar de separación, permitiendo la

introducción de la fibra SPME de una forma más fácil. Este sistema, fue desarrollado para la determinación de antibióticos en muestras de suelo, obteniéndose LODs entre 2.9 y 3.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en muestra de suelo enriquecida con los analitos estudiados.

En la figura 19, se detalla la configuración de este adaptador. La fibra se introduce por el lateral a través del séptum en un canal vertical cerrado, exponiéndose justo en el extremo del capilar y el electrodo de una manera mucho más simple y fácil que el diseño anterior.

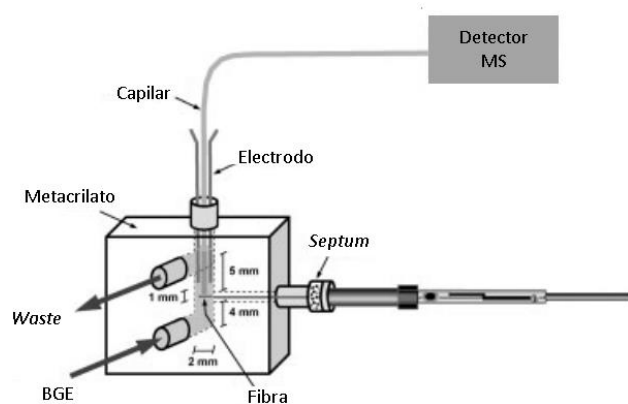


Figura 19. Esquema del adaptador *in-line* SPME a CE-MS. Adaptado de [134].

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

1.5. Técnicas de preconcentración electroforética

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Las técnicas de preconcentración electroforética son estrategias muy utilizadas en CE [25, 30], donde un gran volumen de muestra es introducido en el capilar o bien por inyección hidrodinámica o electrocinética, y los analitos son concentrados en el extremo del capilar antes de su separación electroforética. El principio de la mayoría de estas técnicas de preconcentración se basa en la diferencia de movilidad de los analitos entre la zona de la muestra y la zona del BGE, por ejemplo, causado por los cambios en las propiedades entre la muestra y el BGE, como la conductividad o el pH, entre otras.

Las principales técnicas de preconcentración electroforética basadas en los cambios de velocidad de migración de los analitos entre la zona de muestra y la zona de BGE son: las técnicas de *field-amplified stacking*, *transient isotacophoresis* (tITP), *pH-mediated stacking* y *sweeping techniques* [26]. La presente tesis se centrará en las técnicas de *field-amplified stacking*, por lo que en este apartado nos centraremos en este tipo de técnicas.

Las técnicas de *field-amplified stacking*, o simplemente técnicas de *stacking*, son aquellas en las que el mecanismo de preconcentración se basa en una diferencia de conductividad y, por lo tanto, de las velocidades electroforéticas de los analitos entre la zona de la muestra donde el campo eléctrico es elevado y la zona del BGE donde el campo eléctrico es bajo. Durante el proceso de *stacking* tras la inyección, los analitos pasan de estar ocupando gran parte del capilar a baja concentración, a estar concentrados en una pequeña zona del capilar (*stack*) para su posterior separación y detección.

En la bibliografía, se pueden encontrar diferentes estrategias para la preconcentración de analitos que operan bajo estos principios, como la *field-amplified sample stacking* (FASS), *field-amplified sample injection* (FASI), *large volume sample stacking* (LVSS), *large volume sample stacking with matrix removal by an EOF pump* (LVSEP) y *pressure-assisted electrokinetic injection* (PAEKI) [25, 26, 30].

A continuación, en la figura 20 se muestra la clasificación de las principales técnicas de *stacking*.

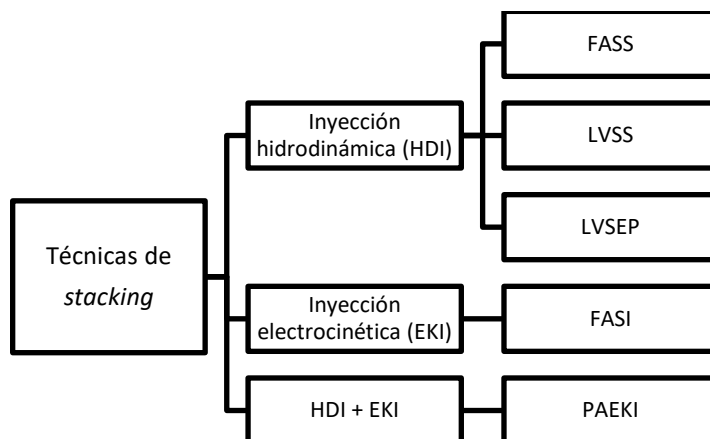


Figura 20. Clasificación de las principales técnicas de *stacking* en CE.

La técnica de *field-amplified sample stacking (FASS)*, es la técnica de preconcentración más simple y común en CE para mejorar la sensibilidad. Esta técnica fue desarrollada por primera vez por Mikkers y col. [137], y se inyecta hidrodinámicamente un volumen de muestra de baja conductividad dentro del capilar previamente lleno con un BGE de alta conductividad. Un requisito es que la conductividad de la muestra debe de ser al menos 10 veces menor que la del BGE. En estas condiciones, al aplicar el voltaje de separación, los analitos en la zona de la muestra experimentan una alta intensidad de campo eléctrico lo que provoca que éstos se muevan rápidamente. Cuando los analitos llegan a la zona de la interfase entre la muestra y el BGE, debido a la baja intensidad de campo eléctrico de la zona de BGE, la movilidad de los analitos disminuye drásticamente y se produce el *stacking*. Esta acumulación o "apilamiento" aumenta la concentración de los analitos de la muestra. El aumento de la sensibilidad en la detección es normalmente 10-20 veces mayor comparado con una inyección hidrodinámica habitual en CE [138].

En la figura 21, se muestra un esquema del mecanismo de preconcentración de FASS para analitos cargados negativamente en el cual se representa el capilar de separación y la solución que contiene el vial *inlet* y el *outlet*. Al inicio, se acondiciona el capilar con BGE (A). Posteriormente, se inyecta la muestra hidrodinámicamente en un medio de menor conductividad que el BGE (B). Cuando se aplica el voltaje negativo los aniones se van apilando en la zona de la interfase entre la muestra y el BGE (C). Los analitos se separarán a medida que se produce la migración hacia el detector (D). Los vectores de la figura representan el sentido del EOF y de las velocidades electroforéticas de los analitos (μ_e).

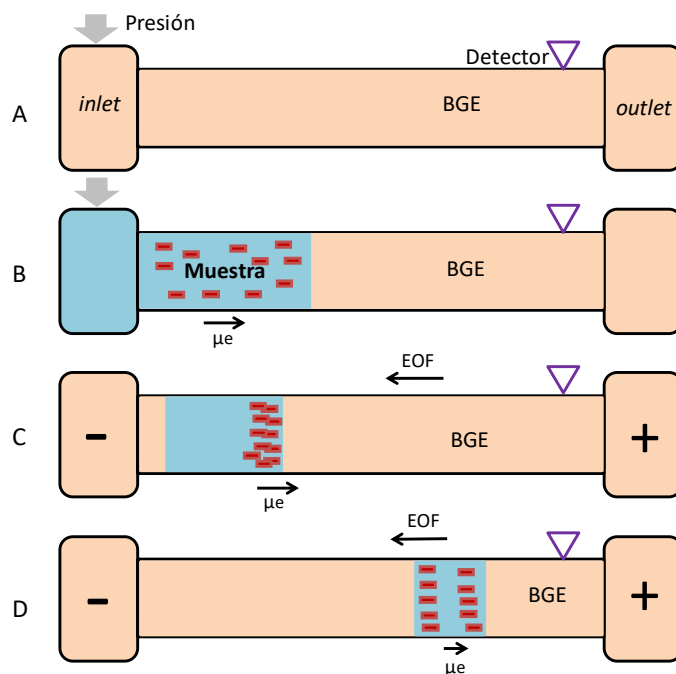


Figura 21. Esquema del mecanismo de preconcentración de *field-amplified sample stacking* (FASS) para aniones. Acondicionamiento con BGE (A), inyección hidrodinámica de la muestra (B), los analitos se apilan en la interfase entre la muestra y el BGE (C), separación (D).

No obstante, esta técnica presenta inconvenientes, como que generalmente, sólo puede ser aplicada para muestras de baja

conductividad y que el volumen de la muestra que puede ser inyectado es relativamente pequeño, alrededor del 5% del total de volumen del capilar [139]. La inyección de volúmenes más grandes produce el ensanchamiento de los picos. Además, si se inyecta mucha cantidad de muestra, la longitud del capilar que queda disponible es insuficiente para que se realice correctamente la separación. Por estos hechos, con esta técnica generalmente no se obtienen factores de preconcentración muy elevados [25]. No obstante, esta técnica ha sido empleada por diversos autores durante los últimos años, obteniéndose buenos resultados en términos de preconcentración en diferentes tipos de muestras biológicas [138, 140-144], muestras ambientales [145] y muestras de alimentos [144, 146].

Para solventar la problemática de la poca cantidad de muestra que se puede introducir en el capilar en la técnica FASS, Dziomba y col. [142] desarrollaron un método para la determinación de compuestos catiónicos en orina basado en esta técnica de preconcentración pero con una modificación. Estos autores realizaron varias inyecciones hidrodinámicas de la muestra repetidamente a 0.6 psi, durante 53 segundos y después de cada inyección aplican voltaje y una contrapresión (-1 psi, 2kV, 0.65 min) repitiendo el proceso 4 veces, con el fin de eliminar la matriz de la muestra y retener los analitos en el capilar. Con esta estrategia se consiguió introducir un volumen de muestra en el capilar del 27% del total y factores de preconcentración de 15-35.

A pesar del inconveniente principal de la técnica FASS en su modalidad más habitual, esta técnica tiene la ventaja que puede ser utilizada para el análisis simultáneo de cationes y aniones. Hsieh y col. [140], en su trabajo para la determinación de neuroquímicos catiónicos y aniónicos en orina, añadieron al BGE óxido de polietileno y glicerol con la finalidad de separar simultáneamente los analitos con diferentes cargas. Los cationes tienen afinidad por el óxido de polietileno y los aniones por el glicerol. Este hecho se explica por las interacciones entre los enlaces hidrógeno entre los grupos hidroxilo

del glicerol y los grupos amino e hidroxilo de los compuestos, por lo tanto, durante el análisis éstos se separan en función de la zona en el capilar donde se encuentra el óxido de polietileno o el glicerol. Además, mediante esta técnica se puede introducir mayor cantidad de muestra comparado con FASS convencional debido a que se inyecta en sentido a favor del EOF. Con esta estrategia se consiguió una correcta separación y factores de preconcentración de 116-282.

La técnica FASS puede ser fácilmente combinada con técnicas de extracción *off-line* como SPE [143, 145], MSPE [144] y *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME) [146, 147], con el fin de mejorar la sensibilidad en la determinación de distintos analitos. Un ejemplo de ello es el trabajo de Tu y col. [147], en que utilizaron la técnica DLLME en modo *off-line* y a continuación la técnica de *stacking* FASS para la determinación de 4 fenotiazinas en orina y plasma. La DLLME es una técnica de microextracción en fase líquida que básicamente consiste en la formación de una solución turbia con la adición de una mezcla de solventes extractivos y dispersivos a una solución acuosa [148]. Para demostrar la viabilidad de la combinación DLLME-FASS, se determinaron las conductividades del BGE (0.01 ms/cm) y muestra (2.3 ms/cm) y se estudió el volumen de inyección entre 5 y 120 μL . Se seleccionó el volumen de 120 μL debido a que se obtenían áreas de picos más grandes y no se veía afectada la resolución. Con esta combinación de técnicas se consiguieron factores de preconcentración de 2500.

Las técnicas de *stacking* también pueden llevarse a cabo realizando la inyección electrocinética de la muestra. La inyección electrocinética consiste en introducir los analitos en el capilar mediante la aplicación de una diferencia de potencial durante un determinado tiempo. Por ejemplo, en el caso de analitos cargados negativamente, esta diferencia de potencial debe de ser negativa. En este sentido, para poder introducir los analitos de este modo en el capilar es indispensable que éstos estén en forma iónica. Este tipo de inyección permite introducir mayor cantidad de analitos de forma selectivamente en el capilar comparando con los que se pueden

introducir hidrodinámicamente, especialmente cuando los analitos tienen una movilidad electroforética elevada [149]. No obstante, la inyección electrocinética es menos reproducible, y su eficacia depende en gran medida de la matriz de la muestra y de la movilidad electroforética de los analitos.

La técnica de *field-amplified sample injection* (FASI), opera de manera similar a la técnica de FASS, pero difiere de ésta en el modo de inyección empleado. Cuando se lleva a cabo la técnica de FASI, se introduce en el capilar un *plug* de baja conductividad (*solvent plug*) antes de inyectar electrocinéticamente la muestra, normalmente agua o algún solvente orgánico con una conductividad menor que la matriz de la muestra. El empleo del *plug* favorece la entrada de mayor cantidad de analitos en el capilar desde el inicio debido a que proporciona una intensidad de campo elevada desde el inicio de la inyección y los analitos se mueven más rápidamente de manera que quedan acumulados [149, 150].

En la figura 22, se muestra un esquema del mecanismo de preconcentración de FASI para analitos cargados positivamente. Primeramente, se inyecta el "*solvent plug*" que se utiliza para aumentar la intensidad de campo y facilitar el proceso de entrada de los analitos en el capilar (A). Posteriormente se inyecta la muestra electrocinéticamente en un medio de menor conductividad que el BGE (B). Cuando se aplica el voltaje negativo, la matriz de la muestra se va eliminando del capilar por acción del EOF y los aniones se van apilando en la zona de la interfase entre la muestra y el BGE (C). Finalmente, se aplica un potencial eléctrico de sentido opuesto y los analitos se separarán a medida que se produce la migración hacia el detector (D).

Una desventaja de FASI es que no puede ser aplicado para la preconcentración simultánea de aniones y cationes, debido a que la inyección electrocinética es selectiva para cada tipo de iones. Esta técnica también tiene las mismas limitaciones que FASS en relación a

la poca cantidad de muestra que puede ser inyectada y el requerimiento de que la muestra debe ser de baja conductividad.

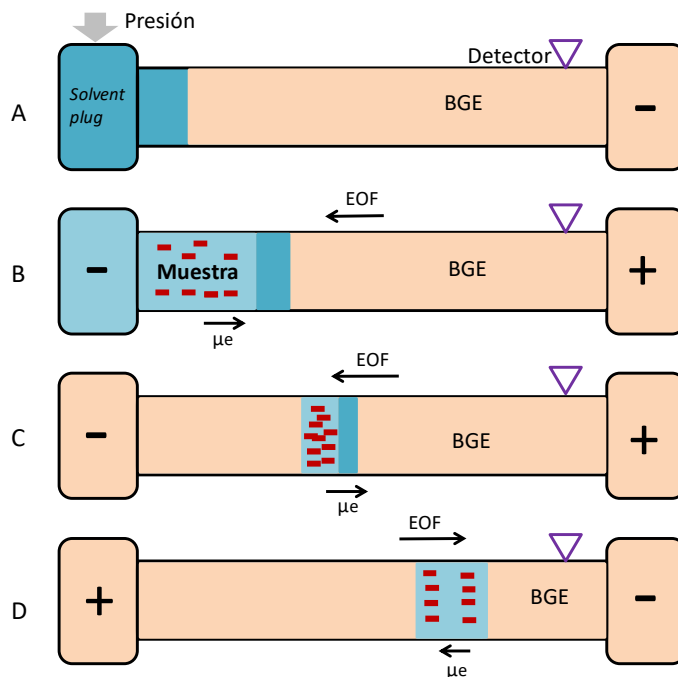


Figura 22. Esquema del mecanismo de preconcentración de *field-amplified sample injection* (FASI) para aniones. Inyección hidrodinámica del *solvent plug* (A), inyección electrocinética de la muestra en un medio de menor conductividad que el BGE (B), los analitos se apilan en la interfase entre la muestra y el BGE (C), cambio de polaridad del voltaje y separación (D).

Otra desventaja es que debido a que los iones en la muestra presentan diferentes movilidades, cuando aplicamos la inyección electrocinética, entrarán en el capilar con mucha más facilidad los que tengan mayor movilidad. No obstante, FASI puede proporcionar mayores factores de preconcentración, en torno a 1000 veces comparado con una inyección convencional [25].

Lau y col. [151] utilizaron FASI para la preconcentración de 4 iones metálicos en muestras de agua utilizando un detector de conductividad. Se estudió en profundidad la composición y el tiempo

de inyección del *solvent plug*. Entre varias mezclas de solventes evaluados se seleccionó una mezcla de agua:ACN (55:45) como *solvent plug* y se estudió el tiempo de inyección de éste que fue fijado 40 segundos debido que se obtenían los factores de preconcentración más elevados, que fueron de entre 292 para el Cr^{3+} y 91800 para el Pb^{2+} sin poner en compromiso la resolución.

FASI también puede ser combinada con técnicas de extracción *off-line* como DLLME [152] y SPE [153]. Us y col. [152] utilizaron FASI posterior a DLLME, para la determinación de β -antagonistas en muestras de orina. Para mejorar la eficacia de FASI se introdujo en el capilar un *solvent plug* de agua y se estudió la composición del BGE. Se estudió la adición del surfactante aniónico (SDS) al BGE a diferentes concentraciones entre 0-20 mM con el objetivo de aumentar la resolución. Se observó que la resolución mejoraba hasta la concentración de 10 mM, por lo tanto, está fue seleccionada. En este trabajo se consiguieron factores de preconcentración de 41-1046. B. Claude y col. [153] utilizaron *off-line* SPE utilizando MIPs como sorbente para la extracción selectiva de diferentes neurotransmisores y posteriormente aplicaron la técnica FASI para el análisis de éstos en orina. Además de estudiar los diferentes parámetros que afectan a FASI, como la composición de BGE, solvente de muestra y *solvent plug*, utilizaron una pequeña cantidad de un agente de protonación de la muestra (ácido fosfórico 100 $\mu\text{m/L}$) para protonar las aminas primarias de los analitos y así favorecer la inyección electrocinética.

Otra técnica empleada habitualmente es la técnica *large volume sample stacking* (LVSS). El principio de ésta estrategia es similar a FASS, pero la diferencia es que en LVSS se introduce un gran volumen de muestra y se cambia la polaridad en contra del EOF para que se elimine la matriz de la muestra, y los analitos se concentran al inicio del capilar. Después los analitos se van separando a medida que se mueven hacia el extremo donde se encuentra el detector. En LVSS, el cambio de polaridad es el paso más importante para la preconcentración de los analitos. Para cambiar la polaridad es

necesario monitorizar la corriente para cuando el total del capilar esté lleno de BGE poder invertir el voltaje. Esto se puede realizar fácilmente, ya que cuando se alcanza el 95-99% de total de la corriente nos indica que el capilar está lleno de BGE. Una vez realizado el cambio de polaridad, se lleva a cabo la separación de los analitos en la muestra [154-156].

En la figura 23, se muestra esquemáticamente los diferentes pasos que la técnica incluye para el caso de la preconcentración de aniones. Al inicio, se inyecta hidrodinámicamente una gran cantidad de muestra llenando el capilar (A). Después, se cambia el vial de la muestra por el vial del BGE y se aplica una diferencia de potencial negativa para invertir el sentido del EOF (B). La matriz de la muestra se va eliminando y los analitos se preconcentran (C), y después, cuando se llena el capilar de BGE (aproximadamente 95 % de la corriente total), se invierte el sentido del EOF aplicando un voltaje positivo sobre el vial *inlet*, para que posteriormente se lleve a cabo la separación electroforética (D). Los analitos migran a favor del EOF, ya que la magnitud de éste es más grande que sus movilidades electroforéticas (μ_e).

En LVSS existen 3 parámetros fundamentales: el solvente de la muestra que debe de ser de baja conductividad, el volumen de muestra introducido en el capilar y el voltaje aplicado [154-156]. Fan y col. [155] en su estudio utilizaron la técnica LVSS para la determinación de barbitúricos en muestras de plasma sanguíneo y estudiaron el tiempo óptimo para cambiar la polaridad monitorizando la corriente. Si éste tiempo es muy largo, muchos analitos salen del capilar y por lo tanto no pueden ser apilados, en cambio si el tiempo es demasiado corto, parte de la matriz de la muestra no puede ser eliminada y, por lo tanto, se vería afectado el *stacking*. En este estudio se obtuvieron factores de preconcentración entre 169-202. Quesada-Molina y col. [156] utilizan la *off-line* SPE con el fin de realizar el lavado de la muestra previa a LVSS, para la determinación 5 cefalosporinas en muestras de aguas de río.

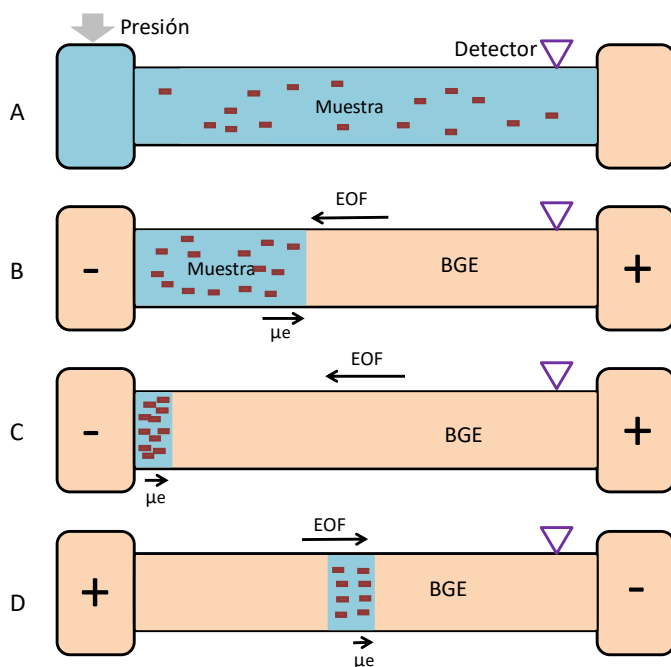


Figura 23. Esquema del procedimiento LVSS: inyección hidrodinámica de la muestra (A). La matriz de la muestra se va eliminando por acción del EOF (B), se produce el *stacking* en el extremo del capilar cercano al vial *inlet* y se invierte la polaridad del voltaje (C). Finalmente, se produce la separación (D).

Se evaluaron diferentes tipos de sorbentes y finalmente se seleccionó el Oasis HLB debido a que ofrecía el mejor lavado de la muestra y las mejores recuperaciones en la extracción. Se estudió la adición de diferentes solventes a la muestra para modificar la conductividad, ya que se observó que al realizar los análisis directamente en las muestras de agua algunos de los analitos con mayor movilidad se perdían. Finalmente, se seleccionó ACN al 40%, porque aportaba baja movilidad para los analitos y alta estabilidad de la corriente. También se estudió el tiempo de inyección de la muestra y el voltaje aplicado durante el *stacking*. En este trabajo se consiguieron factores de preconcentración entre 742-1583.

Existe otra modalidad de LVSS, pero en este caso no se cambia la polaridad y la denominación es *large volumen stacking with matrix removal by an EOF pump* (LVSEP).

En esta técnica, se inyecta un gran volumen de muestra en el capilar mientras la matriz de la muestra se elimina mediante la supresión del EOF. El modo de operar es muy similar a LVSS, pero en este caso no es necesario monitorizar la corriente, ya que las movilidades de los analitos y el EOF se compensan tras la eliminación de la matriz de la muestra en el capilar, por lo que no es necesario invertir la polaridad manualmente. Un requisito fundamental para poder aplicar esta técnica para el análisis de aniones es que las movilidades electroforéticas de los analitos tienen que ser mayores que las del EOF.

En LVSEP es necesaria la supresión del EOF para que se lleve a cabo el proceso de *stacking*. Existen diferentes modos de realizar la supresión de EOF y las principales estrategias que han sido empleadas con ésta finalidad han sido la utilización de recubrimientos en los capilares, la utilización de BGEs no acuosos y el empleo de BGEs ácidos [157-159]. De esta manera, se cambian las propiedades del interior del capilar y la acción del EOF puede ser eliminada.

La técnica LVSEP también puede ser acoplada con técnicas de extracción como SPE [160] y HS-SDME [161], entre otras. Un ejemplo es el trabajo desarrollado de Kawai y col. [160] que utilizaron la técnica LVSEP posteriormente a SPE con C₁₈ para el análisis de fármacos en orina. Con la SPE se reduce la concentración de sales de la muestra y no hay necesidad de diluirla para cumplir el requerimiento de baja conductividad. En este caso, se utilizó un recubrimiento del capilar de acetato de polivinilo (PVA) para la supresión del EOF y se consiguieron factores de preconcentración de 500-1300.

Park y col. [161] en un proceso totalmente automatizado, acoplaron HS-SDME con LVSEP, para la determinación de compuestos fenólicos en muestras de vino. Se estudió el volumen y el pH necesario de fase aceptora, para optimizar el acoplamiento HS-SDME con LVSEP. La muestra fue diluida en BGE como requerimiento de LVSEP de tener la

muestra en baja conductividad. Para la supresión del EOF, se utilizó un capilar recubierto de polímeros de fluorocarbono y se comprobó que las movilidades electroforéticas de los analitos eran más bajas que las del EOF, posibilitando la aplicación de LVSEP y obteniendo factores de preconcentración de 1900-3400.

En 2006, Feng y col. [162] desarrollan una nueva técnica de *stacking* con el objetivo de contrarrestar la acción del EOF durante la aplicación de FASI, que denominan *pressure-assisted electrokinetic injection* (PAEKI). En esta técnica la preconcentración se lleva a cabo utilizando los principios de la inyección electrocinética y de *stacking*. Como la dirección del EOF generada al aplicar la diferencia de potencial es en sentido opuesto a la de la inyección y además su magnitud, generalmente, es más grande que la magnitud de la movilidad electroforética de los analitos, por lo que aplicando solo una inyección electrocinética los analitos nunca podrían entrar en el capilar. Teniendo en cuenta esto, es necesario realizar un contrabalance del EOF para posibilitar la entrada de los analitos. Para solventar este problema, mediante la inyección PAEKI, el EOF es compensado mediante una inyección hidrodinámica constante en sentido contrario al de EOF combinada con la inyección electrocinética. El apilamiento de los analitos se produce en la zona del capilar entre la muestra y el BGE de un modo similar que en FASI, pero en este caso la presión aplicada compensa al EOF, que lo hace inmóvil y posibilita que se pueda inyectar más cantidad de muestra manteniendo el espacio del capilar para que se realice la separación de los analitos. La capacidad de la técnica para mantener la muestra en una zona del capilar durante un largo tiempo para que se produzca el *stacking* es resultado de la formación de una zona de alto intercambio entre la muestra y el BGE, ya que cuando los analitos llegan a esta zona, su movilidad electroforética decrece rápidamente posibilitando que éstos se apilen. La técnica PAEKI ha sido aplicada para analitos cargados negativamente, como nucleótidos [162, 163], arsénico, selenio y bromo [164], monoftalatos [165], fármacos [166] y posteriormente, para analitos cargados positivamente, concretamente aminoácidos [167].

En la Figura 24 se muestra el procedimiento del PAEKI. El primer paso es llenar el capilar con el BGE (A), después se inyecta la muestra en el capilar mediante inyección electrocinética mientras se aplica simultáneamente una presión constante sobre el vial *Inlet* que contrarresta la acción del EOF posibilitando una inyección durante un tiempo más prolongado (B). En la zona límite entre la muestra y el BGE, es el lugar donde se produce el apilamiento debido a que en esa zona la movilidad de los analitos se ve reducida (C). Finalmente, se aplica el voltaje para la separación (D).

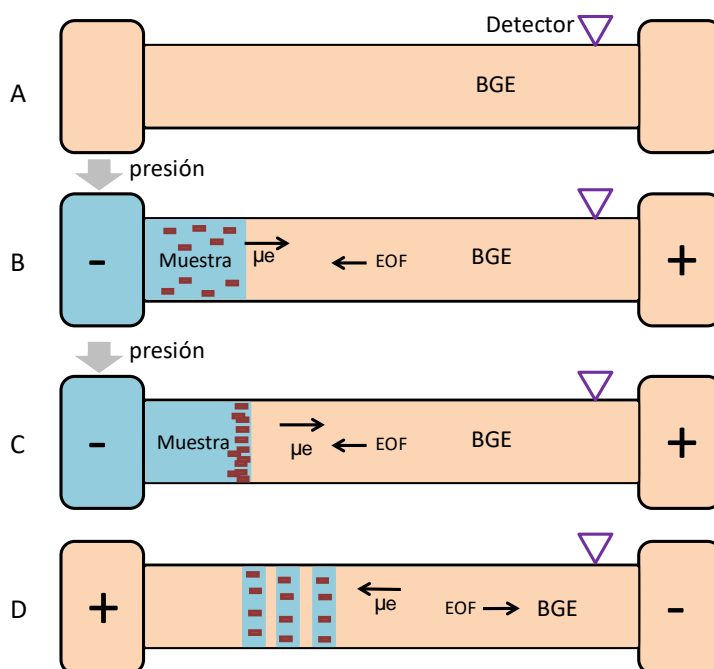


Figura 24. Esquema del procedimiento *pressure-assisted electrokinetic injection* (PAEKI) para el análisis de aniones. Introducción del BGE en el capilar (A), aplicación simultánea de una inyección electrocinética e hidrodinámica sobre el vial *inlet* (B), apilamiento de los analitos en la zona entre la muestra y el BGE (C), y separación de los analitos (D).

Xu y col. [166] utilizaron por primera vez PAEKI para la determinación enantiomérica de analitos cargados negativamente, en este caso, verteprofinas en orina.

Se estudió en detalle la velocidad del EOF en función a la presión y voltaje aplicado durante el *stacking*. Con unas condiciones de presión de 0.8 psi y un voltaje de -10.3 kV, se observaron los mejores resultados en términos de área de los picos. También se estudió el tiempo de inyección entre 1 y 5 min. Se observó que a inyecciones mayores de 2 minutos el aumento de la señal observada no era significativo y además se veía afectada la reproducibilidad del método. Con estas condiciones se obtuvieron factores de preconcentración de 116.

Recientemente, D'Ulivo y col. [167] en su trabajo aplicaron PAEKI para la determinación de analitos cargados positivamente, concretamente aminoácidos en soluciones estándar con el propósito de expandir la aplicabilidad de esta técnica para cationes. En este caso, para llevar a cabo el proceso de *stacking*, se invierte el sentido de la presión y del voltaje aplicado para compensar el EOF. En este caso la presión constante aplicada será de sentido negativo y el voltaje positivo. Manteniendo la presión constante a -50 mbar, se estudió el voltaje aplicado entre +2 y +24 kV. Se seleccionó +14 kV debido a que se observaron picos con mayor área. Esta técnica es compatible con la detección por MS debido a que no es necesario el empleo de sustancias que puedan contaminar la fuente de ionización. En este caso fue acoplada mediante la ionización de electrospray (ESI), consiguiéndose factores de preconcentración de 3000.

1.6. Determinación de AINEs mediante electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Desde los años 90, se han publicado múltiples trabajos sobre la separación y determinación de los AINEs mediante electroforesis capilar en diferentes tipos de matrices, principalmente en formulaciones farmacéuticas, muestras biológicas y aguas ambientales [168-170]. Concretamente en este apartado se realizará una discusión de los diferentes estudios que han ido surgiendo en la bibliografía en los últimos años, concretamente dentro del periodo comprendido entre 2007-2017, haciendo especial énfasis al modo de separación y condiciones electroforéticas, tipo de muestra, tratamiento de muestra, LODs que se han obtenido y el empleo de técnicas de preconcentración combinadas *in-line* con CE. En la tabla 1 se recogen los trabajos más relevantes de este período.

La electroforesis capilar por zonas (CZE) ha sido el modo de separación más utilizado para el análisis de AINEs debido a su simplicidad [24]. La tendencia actual para la mayoría de las aplicaciones cuando se utiliza este modo de separación es el uso de diferentes mecanismos de preconcentración ya sean técnicas de microextracción o técnicas de preconcentración electroforética. Estas estrategias se han aplicado principalmente para el análisis de diferentes tipos de matrices complejas, fundamentalmente muestras de aguas ambientales, muestras biológicas, como plasma y orina, y muestras de alimentos. La utilización de técnicas de microextracción tanto en fase líquida, como en fase sólida ha sido una estrategia comúnmente empleada para la determinación de estos compuestos. Por ejemplo, Rahim y col. [173] utilizaron la *stir-bar sorptive extraction* (SBSE) para la determinación de AINEs en muestras de orina. Esta técnica de extracción básicamente consiste en extraer los analitos mediante un imán recubierto de un material con la capacidad de retener los analitos. Cabe destacar que en este caso se sintetizó un material híbrido constituido con metiltrimetoxisilano (MTMOS) y cianopropiltrióxosilano (CNPrTEOS), ofreciendo la posibilidad de extraer AINEs tanto de carácter polar como apolar, y una mayor eficiencia en la extracción respecto a otros materiales comerciales sin pretratamiento de muestra previo (solo dilución).

Tabla 1. Estudio bibliográfico para el análisis de AINEs mediante CE (2007-2017).

Analitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
ibuprofeno	CZE Capilar: 35.5 cm x 50 µm i.d.; 10 kV, 25°C BGE: 30 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.0)	-	-	<i>in-line</i> MSPE	[123]
etodolaco, naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, diclofenaco	CZE Capilar: 38.5 cm x 75 µm i.d.; 25kV, 25°C BGE: 30 mM C ₂ H ₇ NO ₂ + 5% ACN (pH 4.0)	3-13.1 µg/kg ^a	Productos lácteos	Homogeneización Centrifugación DLLME-FASS	[146]
ácido salicílico, ácido mefenámico, diclofenaco, naproxeno	CZE Capilar: 52.1 cm x 75 µm i.d.; -20 kV, 20°C BGE: 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ en MeOH (pH 9.5)	0.3 µg/mL ^b	Aguas ambientales Orina	Filtración (agua y orina) Hidrolisis (orina) BAµE	[171]
ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno	CZE Capilar: 60 cm x 50 µm i.d.; 20 kV, 25°C BGE: 40 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.2)	1.0-2.5 µg/mL ^a	Orina	LLE SDME	[172]
diclofenaco, naproxeno, ketoprofeno	CZE Capilar: 64.5 cm x 50 µm i.d.; 27 kV, 25°C BGE: 30 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7)	35-41 µg/mL ^b	Orina	Dilución SBSE	[173]

Tabla 1. Continuación.

Analitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
ibuprofeno, naproxeno	CZE Capilar: 60 cm × 50 µm i.d.; 20kV, 25°C BGE: 100 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 10)	1–1.5 ng/mL ^b	Plasma Orina Leche materna Aguas residuales	Dilución (todas las muestras) CNT-SLM	[174]
ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ketorolaco, aceclofenaco, ácido salicílico	CZE Capilar: 50 cm × 75 µm i.d.; 25kV, 20°C BGE: 30 mM C ₂ H ₇ NO ₂ (pH 4)	0.25–0.86 ng/mL ^b	Orina	Dilución HF-LPME	[175]
ketoprofeno, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico	CZE Capilar: 83.5 cm × 75 µm i.d.; 30 kV, 25°C BGE: 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇	0.46–1.28 ng/mL ^a	Aguas residuales	<i>off-line</i> SPE (Oasis HLB)	[176]
naproxeno	CZE Capilar: 36 cm × 75 µm i.d.; –20 kV, 25°C BGE: 20 mM C ₂ H ₇ NO ₂ en MeOH/agua (70:30) (pH 7.5)	10 ng/mL ^a 0.2 ng/mL ^b	Agua de consumo	Dilución <i>in-line</i> SPE(C ₁₈)	[120]

Tabla 1. Continuación.

Análisis	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
naproxeno, fenoprofeno, diclofenaco, ketoprofeno, piroxicam	CZE Capilar: 85.5 cm × 50 µm i.d.; -30 kV, 25°C BGE: 100 mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 10% MeOH (pH 9.4)	0.08-0.10 ng/mL ^b 2-8 ng/mL (plasma) ^a 0.9-1.5 ng/mL (agua de río) ^a	Plasma Agua de río	Acidificación Desproteínezación Centrifugación, Evaporación Reconstitución (plasma) Filtración Dilución Centrifugación Evaporación Reconstitución (agua)	[177]
naproxeno, fenoprofeno, diclofenaco, ketoprofeno, piroxicam	CZE Capilar: 88.5 cm × 50 µm i.d.; -30kV, 25°C BGE: 10mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 50mM NaCl (LE) + 50mM CHES (TE) + 10% MeOH (pH 9.4)	0.07-0.15 ng/mL ^b 0.16-0.3 ng/mL (plasma) ^a 0.32-0.75 ng/mL (orina) ^a	Plasma Orina	EKS Acidificación, Desproteínezación Centrifugación Evaporación Reconstitución (plasma y orina) tIIP	[178]
diclofenaco, diflunsal, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, naproxeno	CZE Capilar: 85 cm × 75 µm i.d.; -28 kV, 25°C BGE: 15 mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 10% MeOH + 0.1% HDMB (pH 9.2)	0.6-2.14 ng/mL (FASI) ^a 50-180 pg/mL (EKS) ^a	Aguas residuales	Filtración FASI EKS	[179]

Tabla 1. Continuación.

Análisis	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
diclofenaco, diflusal, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, naproxeno	CZE Capilar: 85 cm x 75 µm i.d.; -28 kV, 25°C BGE: 15 mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 10% MeOH + 0.1% HDMB (pH 9.2)	10.7-47.0 pg/mL ^b	Agua de consumo Aguas residuales	Filtración LLE CF-EKS	[180]
fenoprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, diflusal, naproxeno	CZE Capilar: 80 cm x 50 µm i.d.; 28 kV, 25°C BGE: 50 mM (NH) ₄ HCO ₃ + 10% MeOH (pH 9.2)	6.7-18.7 pg/mL ^b	-	PA-EKS	[181]
suprofenno, naproxeno, ketoprofeno, fenoprofeno, indoprofeno, flurbiprofeno	CZE Capilar: 70 cm x 50 µm i.d.; -15 kV, 25°C BGE: 75 mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 0.02 mg/mL F-MWCNTs + 5% MeOH (v/v) (pH 10)	-	-	CNT EKS	[182]
ibuprofeno, suprofenno, indometacina, diclofenaco	NACE Capilar: 100 cm x 50 µm i.d.; 30 kV, 25°C BGE: 5 mM C ₂ H ₇ NO ₂ + ACN- MeOH 60:40 (v/v) (pH 8.5)	1-50 ng/mL ^b 500 ng/mL ^a (NACE-ESI-MS)	Orina	Filtración	[183]

Tabla 1. Continuación.

Analitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
diclofenaco, ibuprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, naproxeno	MEKC Capilar: 60 cm × 50 μm i.d.; -27 kV, 25°C BGE: 20 mM NaH ₂ PO ₄ + 30% ACN + 50 mM SDS (pH 2.5)	29-58 ng/mL ^a	Agua de río	Acidificación Filtración Dilución ASEI-Sweeping	[184]
ketoprofeno, fenbufeno, indometacina	MEKC Capilar: 60.2 cm × 75 μm i.d.; 20 kV, 25°C BGE: 20 mM Na ₂ HPO ₄ + 50 mM SDS (pH 9)	0.1 ng/mL ^b 1 ng/mL ^a	Saliva	Centrifugación Filtración <i>off-line</i> SPE (C ₁₈)-LVSS	[185]
fenbufeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno	MEKC Capilar: 40 cm × 75 μm i.d.; 15 kV, 25°C 50 mM C ₂ H ₇ NO ₂ + 1.25 mg/ grafeno (pH 4.0)	0.29-1.18 μg/mL ^b	-	-	[186]
diflunsal, naproxeno, ketoprofeno, indoprofeno, indometacina	MEKC Capilar: 50 cm × 50 μm I.D.; 18 kV, 20°C BGE: 10 mM NH ₄ HCO ₃ + 10 mM CTAB (pH 9.7)	0.05-0.55 ng/mL ^b	Aguas residuales	LLE-Sweeping-MSS	[187]
diclofenaco, ketoprofeno, indometacina, ibuprofeno, flurbiprofeno	MEEKC Capilar: 48.5 cm × 75 μm i.d.; -15 kV, 30°C BGE: 72.07 % 50 mM NaH ₂ PO ₄ + 3.31% SDS + 1.01% propilenglicol diacetato + 8.61% propanol + 15% ACN (pH 2)	0.03-0.3 ng/mL ^b 60-223 ng/mL ^a	Aguas ambientales	Filtración Acidificación SPE (C ₁₈)-FASI	[188]

Tabla 1. Continuación.

Análitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, carprofeno, indoprofeno, naproxeno, fenoprofeno	<i>Chiral</i> CZE Capilar: 57.2 cm x 50 µm i.d.; 30 kV, 20°C BGE: 5 mM CH ₃ COONa/CH ₃ COOH + β-CD + L-AlaC ₄ Lac (pH 5.0)	-	-	-	[189]
naproxeno, carprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, pranoprofeno	<i>Chiral</i> CZE Capilar: 33 cm x 50 µm i.d.; 20 kV, 25°C 50 mM NaH ₂ PO ₄ (20% (v/v) MeOH) + 2 mM vancomicina + 15 mM IL (pH 7.0)	-	-	-	[190]

a. Muestra real

b. Solución estándar

Con esta estrategia se consiguieron recuperaciones del 83.5-98.9% y LODs de entre 35-41 $\mu\text{g/L}$ en soluciones estándar.

Hasheminasab y col. [174] para la determinación de ibuprofeno y naproxeno en plasma, orina, leche materna y aguas residuales utilizaron la técnica SLM por gradiente de potencial eléctrico usando como novedad una membrana constituida por nanotubos de carbono (CNTs). Los CNTs presentan la ventaja que es un material con un área superficial grande y tiene gran capacidad de absorber diferentes tipos de analitos. Se obtuvieron LODs en muestras estándar de 1-5 ng/mL. Los diferentes tipos de muestra, leche materna, orina, plasma y aguas residuales, fueron tratadas con una simple dilución y posteriormente se aplicó el método para el análisis de los AINEs estudiados.

Villar Navarro y col. [175] realizaron un estudio para la determinación de varios AINEs en muestras de orina usando la HF-LPME, obteniéndose LODs en el rango de 0.25-0.86 ng/mL en soluciones estándar. Macià y col. [120] estudiaron el acoplamiento *in-line* de la SPE a la CE para la preconcentración de naproxeno en agua del grifo. Con esta estrategia se obtuvieron factores de preconcentración de 1820 veces y LODs de 0.2 ng/mL en muestras estándar. Posteriormente, el método desarrollado se aplicó a muestras de agua de grifo y previo tratamiento previo de la muestra mediante una *in-line* SPE utilizando un sorbente del tipo C_{18} , se obtuvieron unos LODs de 10 ng/mL en muestra real.

Para la determinación de AINEs también han sido desarrollados métodos basados en diferentes técnicas de preconcentración electroforética y en la bibliografía podemos encontrar varios trabajos, como ejemplo, Botello y col. [178] aplicaron la *transient pseudoisotachophoresis* (tITP) para la determinación de AINEs en muestras biológicas, concretamente plasma humano y orina. La tITP es una técnica de preconcentración electroforética en la que se usa una mezcla de sales y un solvente orgánico en el BGE. La diferencia de movilidad de los analitos entre la muestra y el BGE posibilita que

se produzca el *stacking*. En este trabajo, previamente se llevó a cabo una LLE como pretratamiento de muestras, logrando LODs de 0.16-0.26 mg/mL y 0.32-0.75 mg/mL, respectivamente para plasma y orina.

Dawod y col. [179] desarrollaron un método de preconcentración denominado *electrokinetic supercharging* (EKS) para el análisis de siete AINEs en aguas residuales. EKS es la combinación de la inyección EKI con la tITP. Bajo las condiciones óptimas, se obtuvieron factores de preconcentración de 2400 y se lograron LODs entre 50 pg/mL y 180 pg/mL en muestra de aguas residuales sin la necesidad de un pretratamiento previo de muestra.

Botello y col. [177] también exploraron la aplicabilidad de la técnica de preconcentración de EKS para determinar AINEs en diferentes tipos de muestras, en particular muestras ambientales y biológicas. Con esta estrategia se consiguieron factores de preconcentración de 2000 en muestras estándar, y se obtuvieron LODs entre 0.9-1.1 ng/mL y 2-9 ng/mL para muestras de agua de ríos y plasma, respectivamente.

Dawod y col. [180] desarrollaron una modificación para el sistema EKS, denominada EKS de contraflujo (CF-EKS). Esta novedad fue aplicada para la separación y la preconcentración de AINEs en muestras de agua. En CF-EKS, se aplica un contraflujo hidrodinámico durante la inyección electrocinética de los analitos dentro del sistema EKS con el objetivo de realizar inyecciones de la muestra a mayor voltaje y durante un período de tiempo más prolongado, introduciendo más cantidad de analito en el capilar sin producirse inestabilidad de la corriente. Con el sistema CF-EKS se obtuvieron factores de preconcentración de 11800 y LOD de 10.7-47.0 pg/mL en muestras estándares.

Posteriormente, Meighan y col. [181] combinó EKS con una presión positiva durante la inyección (PA-EKS) para mejorar la preconcentración debido a que con este sistema también se puede

introducir más cantidad de muestra en el capilar. En este sistema, a diferencia con el caso anterior, no se aplica contrapresión, por lo que tiene la ventaja que es compatible con la detección por MS. En este caso, se obtuvieron límites de detección en el rango de 6.7-18.7 pg/mL y factores de preconcentración de casi 50000.

Alshana y col. [146] utilizaron la combinación de una técnica de microextracción en fase líquida (DLLME) con la técnica de preconcentración electroforética FASS para la determinación de 5 antiinflamatorios en muestras de alimentos, concretamente productos lácteos. Con esta estrategia se consiguieron factores de preconcentración de 229 y LODs en el rango de 3.0-13.1 µg/kg.

La electroforesis capilar no acuosa (NACE) también ha sido empleada para la determinación de AINEs usando un detector MS. Debido a las corrientes de baja intensidad generadas al emplear solventes no acuosos permite el uso de altas intensidades de campo eléctrico y capilares de mayor diámetro, permitiendo a su vez introducir una mayor cantidad de muestra en el capilar. Por este motivo, también esta modalidad de CE está particularmente bien adaptada a MS, facilitando la combinación NACE-MS debido a que se emplean solventes orgánicos en el BGE que favorecen la evaporación en el proceso de ionización y al no emplear sales en el BGE que puedan precipitar, se evita la contaminación de la fuente de ionización [183]. En este sentido, Bonvin y col. [183] desarrollaron un método de determinación de AINEs, obteniéndose factores de preconcentración de 100 y LODs de 1-20 ng/mL en muestras estándares.

En la bibliografía también se han descrito diferentes metodologías de cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) y cromatografía capilar electrocinética por microemulsión (MEEKC) para la determinación de AINEs en diferentes tipos de muestras. En estos casos también es habitual la combinación con técnicas de preconcentración electroforética, principalmente con técnicas de *stacking*. Por ejemplo, Maijó y col. [184] emplearon la técnica MEKC como modo de separación y como técnica de preconcentración

utilizando una combinación de 2 técnicas, concretamente la técnica de *stacking* FASI y la técnica de *sweeping* denominada *anion selective exhaustive injection-sweeping* (ASEI-*sweeping*). En la técnica *sweeping* se emplea un BGE constituido por micelas compatible con MEKC y mediante FASI se realiza una inyección de la muestra electrocinéticamente que favorece el apilamiento de los analitos. En este estudio, empleando esta combinación de técnicas se obtuvieron factores de preconcentración de hasta 260 y LODs 29-58 ng/mL en agua de río sin necesidad de pretratamiento de muestra previo.

Almeda y col. [185] aplicaron una combinación de una *off-line* SPE usando C_{18} como sorbente y una técnica de *stacking* (LVSS) con cambio de polaridad en MEKC para la determinación de AINEs en la saliva. El método SPE-LVSS-MEKC desarrollado proporcionó factores de preconcentración de 500 y LODs de 0.1 ng/mL, permitiendo la determinación a las concentraciones que se suelen encontrar los compuestos estudiados en la saliva.

Benítez-Martínez y col. [186] utilizaron nanopartículas de grafeno como fase pseudoestacionaria en MEKC en el análisis de AINEs. Estas nanopartículas debido a sus propiedades y su estructura ofrecen la posibilidad de crear una solución estable que se usa como BGE sin la necesidad de añadir ningún surfactante, obteniéndose buenos resultados en la resolución de los AINEs estudiados. Con esta estrategia se consiguieron LODs de 0.29-1.18 $\mu\text{g/mL}$ en la determinación de muestras estándar.

Kuo et al. [188] emplearon MEEKC en combinación con FASI para la determinación de AINEs en varias muestras de agua (río y agua subterránea). El método proporcionó factores de preconcentración de 1400 y 6100, respectivamente. Los LODs que se obtuvieron estaban en el rango de 0.03-0.3 ng/mL para las muestras estándar. En la aplicación a muestras reales de agua de río y aguas subterráneas fue necesaria una etapa previa de tratamiento de muestra mediante *off-line* SPE (C_{18}) antes de la aplicación de método FASI-MEEKC. En este caso, fue determinada la concentración de

ibuprofeno en las muestras de agua de río y muestras de agua subterránea obteniéndose valores de 223 ng/mL y 60 ng/mL, respectivamente.

Algunos AINEs tienen propiedades quirales, por lo que también es de interés el desarrollo de métodos para su determinación enantiomérica, debido a que los enantiómeros de una misma especie pueden presentar diferentes propiedades farmacológicas y toxicológicas [170]. En la bibliografía también se han encontrado trabajos en los cuales se utiliza la CZE para realizar la separación quiral de los AINEs, de los cuales se puede destacar el trabajo de Mavroudi y col. [189], en el que se han utilizado CDs (β -CD) y líquidos iónicos basados en aminoácidos (AAILs) como aditivos en el BGE encaminados a conseguir la separación enantiomérica de los AINEs incluidos en este estudio. Se ha observado que añadiendo AAILs al BGE junto con el empleo de CDs, se han aumentado significativamente la resolución, demostrando un efecto sinérgico, cuando se añaden conjuntamente estos dos tipos de selectores quirales se mejora notablemente la separación enantiomérica. En este sentido, se puede citar el estudio llevado a cabo por Zhang y col. [190] en el que también se ve la mejora que tiene la adición de AAILs en el BGE, en este caso conjuntamente con el glucopéptido vancomicina que actúa como selector quiral.

1.7. Determinación de filtros ultravioleta mediante electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

El objetivo principal de este apartado, es llevar a cabo una revisión bibliográfica de las publicaciones referentes al análisis de los filtros ultravioleta mediante CE, tomando especial atención al modo de separación, técnicas de microextracción, técnicas de preconcentración electroforética empleadas y sus respectivas aplicaciones en muestras.

En la tabla 2, se muestra una recopilación de los estudios más relevantes que se han publicado en la bibliografía desde 2002 hasta 2017 [116, 191-197], para la determinación de filtros ultravioleta. Las aplicaciones basadas en CE publicadas se basan en CZE [116,191] MEKC [193-196] y MEEKC [196,197].

Tal como se puede observar en la tabla, la mayoría de las aplicaciones que aparecen en ésta son para productos cosméticos. En cuanto al tratamiento de muestra empleado en este tipo de matrices, ha sido fundamentalmente una DLLME [192] y dilución con disolvente orgánico [193,195-197]. En las aplicaciones centradas en la determinación de estos compuestos en muestras en aguas se utilizó principalmente la *off-line* SPE, con diferentes sorbentes, como Oasis MCX [116] y Strata X [191].

Maijó y col. [116] desarrollaron un método para la determinación de filtros ultravioleta en muestras de aguas ambientales, basado en el acoplamiento *in-line* SPE-CE con detección MS empleando la ionización por electrospray (ESI). Como modo de separación fue empleada la CZE. En este trabajo se evaluaron comparativamente distintos sorbentes poliméricos en el acoplamiento *in-line* SPE-CE, concretamente Oasis HLB, Oasis MCX y Oasis MAX. El sorbente que mostró el mejor rendimiento y se utilizó para validar la metodología *in-line* SPE-CE-ESI-MS fue Oasis MCX, ya que este sorbente presentó las mejores recuperaciones en la extracción para los compuestos estudiados. Este hecho se puede explicar debido a que la retención polar e hidrofóbica se vió aumentada para éste comparado con los demás sorbentes evaluados.

Tabla 2. Estudio bibliográfico para el análisis de filtros ultravioleta mediante CE.

Analitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
benzofenona-3, 2,2-dihidroxí-4-metoxibenzofenona, 2,4-dihidroxibenzofenona, 2-fenilbencimidazol-5-ácido sulfónico	CZE Capilar: 75 cm x 50 µm i.d.; +20 kV, 25°C BGE: 20 mM (NH ₄) ₂ CO ₃ + 3% NH ₄ OH (pH 9.5)	0.91-2.26 µg/mL ^a	Agua de río	<i>off-line</i> SPE (Oasis MCX) <i>in-line</i> SPE (Oasis MCX)	[116]
4-hidroxibenzofenona, 2,4-dihidroxibenzofenona, 4,4'-dihidroxibenzofenona, 2,3,4-trihidroxibenzofenona, 2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona, 2-hidroxí-4-metoxibenzofenona, 2,2'-dihidroxí-4,4'-dimetoxibenzofenona	CZE Capilar: 50 cm x 75 µm i.d.; +25 kV, 25°C BGE: 35 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.2)	0.06-06 µg/L (río) ^a	Agua de río Agua de grifo Agua mineral	<i>off-line</i> SPE (Strata X) FASI	[191]
benzofenona, 4-hidroxibenzofenona, 2,4-dihidroxibenzofenona, 2-hidroxí-4-metoxibenzofenona	MEKC Capilar: 60 cm x 75 µm i.d.; +25 kV, 25°C BGE: 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ + 30 mM SDS (pH 9.3)	3.9-6.7 ng/mL ^a	Crema solar	DDA-DLLME solvente de extracción: [C ₆ MIM][PF ₆] solvente de dispersión: ACN-Triton X-114	[192]
benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-3	MEKC Capilar: 51 cm x 75 µm i.d.; 20 kV, 25°C 25 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 30 mM SDS (pH 9.25)	14.6-94.2 ng/mL ^a	Crema solar	Dilución, Sonicación Filtración CPE Triton X-114	[193]

Tabla 2. Continuación.

Análitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
benzofenona-3, benzofenona-4	MEKC Capilar: 64.5 cm x 50 µm i.d.; 30 kV, 25°C 18 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 60 mM SDS, 10% v/v MeOH (pH 9.4)	0.29-0.74 µg/mL ^a	Cosméticos	Sonicación Filtración Sweeping	[194]
benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-6, benzofenona-8, avobenzona, octinoxato, octocileno	MEKC Capilar: 30.2 cm x 50 µm i.d.; 25 kV, 25°C 10 mM Tris buffer + 60 mM SDS + 7 mM γ-CD + 20% v/v EtOH	0.024- 0.44 µg/mL ^a	Cosméticos	Dilución Agitación Centrifugación Sweeping (AFMC)	[195]
benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-5, benzofenona-6, benzofenona-7, benzofenona-8, benzofenona-9, benzofenona-10	Capilar: 48.5 cm x 50 µm i.d.; -11/-25 kV, 25-40°C MEKC 0.9% w/v SDS + 2% w/v EtOH + 97.1% v/v Tris buffer (pH 9.0) MEEKC 0.6% w/v SDS + 0.5% w/v EA + 2% w/v butanol + 5% w/v EtOH + 92.7% v/v Tris buffer (pH 9.0)	0.34-0.73 µg/mL ^a	Cosméticos	Dilución Sonicación Centrifugación Filtración Dilución Sweeping	[196]

Tabla 2. Continuación.

Análitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
Eurolex 4360, Eurolex 6300, Eurolex OCR, Eurolex 2292, Eurolex 9020, Eurolex HMS, Eurolex OS, Eurolex 232	MEEKC Capilar: 60 cm x 50 µm i.d.; 30 kV, 25 °C BGE: 2.25 g SDS + 0.75 g Brij 35 + 6.6 g butanol + 0.8 g octano + 17.5 g propanol + 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ (pH 9.2)	0.8-6.00 µg/mL ^a	Cosméticos	Dilución Filtración <i>Sweeping</i>	[197]

a. Muestra real

b. Solución estándar

Habitualmente estos analitos se encuentran a bajos niveles de concentración en muestras ambientales, por lo tanto, para su determinación, las muestras fueron tratadas previamente mediante una *off-line* SPE. Los LODs alcanzados para las muestras estándar estaban en el rango entre 0.01-0.05 ng/mL con buenos valores en la reproducibilidad y se obtuvieron factores de preconcentración entre 3400 y 34000.

Purrà y col. [191] también utilizan el modo de separación CZE para la determinación de filtros ultravioleta en muestras de agua de río, agua del grifo y agua mineral. En este caso, se empleó también previamente una *off-line* SPE con un sorbente de tipo polimérico Strata X consiguiendo de esta manera eliminar el exceso de sales que pueden estar disueltas en la muestra, ya que para el empleo de la técnica FASI es necesario tener las muestras con una baja conductividad y, por lo tanto, es un hándicap importante a tener en cuenta. Con esta metodología se obtuvieron factores de preconcentración de hasta 6500 y LODs de 0.06-0.6 ng/mL en muestras de río.

El modo de separación MEKC ha sido también ampliamente utilizado [196-200] y las técnicas de preconcentración electroforéticas empleadas han sido las de *sweeping* [194-197], *analyte focusing by micelle collapse*-MEKC (AFMC-MEKC) [195] y FASI [191].

Ma y col. [192] utilizaron el modo de separación MEKC usando por primera vez la DLLME con dos tipos de disolvente dispersante diferentes (ACN y tritón x-114) conjuntamente con el líquido iónico 1-butil-3-metilimidazol hexafluorofosfato para el análisis de filtros ultravioleta en muestras de crema solar. Los resultados experimentales indicaron que usando los dos tipos de disolventes dispersantes conjuntamente (disolvente orgánico y tensioactivo no iónico) se obtuvo una mayor eficiencia de extracción comparando si los utilizamos por separado. Los factores de preconcentración en este caso fueron de 25.3-40.5 y los LODs de 3.9-6.7 µg/mL.

Wu y col. [193] también para el análisis de filtros ultravioleta de cremas solares combinaron por primera vez MEKC con la técnica *cloud point extraction* (CPE), usando el surfactante triton x-114. Esta técnica consiste en la adición de un tensioactivo a una solución acuosa para que se vuelva turbia, de tal manera que se formen dos fases separadas. Con esta estrategia se obtuvieron recuperaciones de entre 89.5 y 102.5%, y factores de enriquecimiento de 20.

El modo de separación MEEKC también ha sido utilizado para el análisis de los filtros ultravioleta [196,197]. Como bien es conocido, el empleo de SDS como surfactante es una práctica habitual en esta modalidad de separación. También se usaron solventes orgánicos añadidos al BGE para mejorar la separación en MEEKC, como acetato de etilo (EA) y 1-butanol [196], y n-octano, 2-propanol y 1-butanol [197].

1.8. Determinación de cationas sintéticas mediante electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Hasta la fecha no existe mucha información disponible en la bibliografía de la determinación de catinonas mediante la CE, ya que este tipo de compuestos son sustancias que han aparecido recientemente. Además, tal como se ha comentado en el apartado 1.3, comparado con otras drogas de abuso, todavía son pocos los estudios clínicos que se han llevado a cabo. No obstante, se han publicado algunos trabajos sobre la separación y determinación de las catinonas sintéticas mediante CE, principalmente en estándares. En este apartado se realizará una discusión de los diferentes estudios que se pueden encontrar en la bibliografía, haciendo especial énfasis al modo de separación y condiciones electroforéticas, tipo de muestra, tratamiento de muestra y LODs que se han obtenido. En la tabla 3 se recogen los trabajos más relevantes centrados en estos compuestos [117, 198-203]. En los últimos años, la mayoría de las aplicaciones publicadas para la determinación de catinonas sintéticas, se han basado en el uso de CZE como modo de separación [117, 198-202], aunque también hay alguna publicación en la que se ha utilizado MEKC [203].

La separación quiral para estos compuestos es importante, debido a que una misma sustancia puede poseer dos diferentes especies enantioméricas, y cada una de ellas puede tener propiedades diferentes. En este sentido, una especie enantiomérica puede contener el principio activo de la sustancia y la otra especie ser totalmente inocua. Para la realización de la separación quiral de estos compuestos, las CDs han sido ampliamente empleadas proporcionando una mejora en la separación cuando son añadidas al BGE [117, 198-203]. En los diferentes trabajos publicados se han utilizados diferentes tipos de CDs, como la β -CD [117, 200], HP- β -CD [198], HS- γ -CD [199, 200] y S- β -CD [201, 202]. Las CDs son moléculas de elevado peso molecular que debido a su estructura facilitan que se forme el complejo CD-enantiómero, posibilitando la separación quiral. Las diferencias entre los diferentes tipos de ciclodextrinas son básicamente el diámetro del orificio en su estructura, que es precisamente donde se produce el acoplamiento CD-enantiómero.

Tabla 3. Estudio bibliográfico para el análisis de catinonas sintéticas mediante CE.

Análitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
R, S-mefedrona, R, S-4-metilefedrina, R,S-MDPV	<i>Chiral</i> CZE Capilar: 80.1 cm x 50 µm i. d.; 30 kV, 25 °C BGE: 80 mM Na ₂ HPO ₄ + 12 mg/mL β-CD (pH 2.5)	0.02-0.1 ng/mg ^a	Cabello	ASE <i>in-line</i> SPE (Oasis HLB)	[117]
24 catinonas	<i>Chiral</i> CZE Capilar: 64.5 cm x 75 µm i. d.; 25 kV, 15 °C BGE: <i>Celixir Reagent B</i> + 80 mM HP-β-CD (pH 2.5)	5 µg/mL ^b	-	-	[198]
(±)-3-fluorometacatinona, (±)-4-fluorometacatinona, pentadrona, (±)-4-metiletilcatinona, metilona, pentilona	<i>Chiral</i> CZE Capilar: 90 cm x 20 µm i. d.; 25 kV, 15 °C BGE: 15 mM (+)-18-C-6-TCA + HS-γ-CD	-	-	-	[199]
12 catinonas	<i>Chiral</i> CZE 57.5 cm x 50 µm i. d.; 25 kV 25 °C BGE (UV): 100 mM fosfato + 5 mg/mL β-CD (pH 2.5) BGE (MS): 50 mM fosfato + 0.6% v/v HS-γ-CD (pH 2.5)	4.2-7 µg/mL (UV) ^b 1.0-11 ng/mL (MS) ^b	-	-	[200]

Tabla 3. Continuación.

Analitos	Condiciones CE	LODs	Muestra	Tratamiento de muestra	Ref.
tiotinona, metedrona, 4F- α -PVP, 4-metoxi- α -PVP, 3-metoximetacatinona	Chiral CZE 78.5 cm \times 75 μ m i.d.; 20kV 40°C BGE: 50 mM acetato de amonio + 16 mM S- β -CD + 10% ACN (pH 4.5)	-	-	-	[201]
19 catinonas	Chiral CZE 78 cm \times 50 μ m i.d.; 20 kV 40°C BGE: 50 mM acetato de amonio + 20 mg/mL S- β -CD + 10% ACN (pH 4.5)	-	-	-	[202]
16 catinonas	MEKC 48 cm \times 50 μ m i.d.; 12 kV 25°C BGE: 200 mM NH ₄ OH/100 mM PFOA + 2.5% (v/v) IPA	10-78 ng/mL ^a	Orina	SPE	[203]

a. Muestra real

b. Solución estándar

En la tabla mostrada anteriormente, se puede observar que la mayoría de las aplicaciones en CE para el análisis de cationas sintéticas fue realizada en estándares [198-202], aunque en algunos casos las metodologías han sido aplicadas para el análisis de matrices biológicas [117, 203], concretamente cabello [117] y orina [203].

Recientemente, Baciu y col. [117] desarrollaron un método para la determinación enantiomérica de cationas sintéticas en muestras de cabello, utilizando la CZE como modo de separación. Se estudiaron diferentes tipos de CDs y finalmente se seleccionó la β -CD ya que proporcionó una mejor resolución enantiomérica entre todos los analitos. Como estrategia de preconcentración se utilizó la *in-line* SPE con Oasis HLB como sorbente de extracción. En este trabajo, debido a la complejidad de la muestra y como alternativa a la digestión ácida, se empleó la técnica de extracción de líquidos presurizados (PLE) para el pretratamiento de la muestra. Con esta metodología se obtuvieron LODs de 0.02-0.10 ng/mL.

Merola y col. [200] desarrollan un método de separación quiral para 12 cationas sintéticas mediante detección UV/Vis y MS. En el primer caso se utilizó un BGE que contenía β -CD en una solución de fosfato mientras que para la detección por MS se empleó HS- γ -CD debido a que había presentado en estudios anteriores buena compatibilidad con la detección MS, minimizando la contaminación de la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Con esta estrategia se consiguieron LODs de 1.0-11 ng/mL.

Švidrnoch y col. [203] emplearon el modo de separación MEKC utilizando ácido perfluorooctánico (PFOA) añadido a un BGE de hidróxido de amonio, además de los modificadores orgánicos (ACN, MeOH, 1-propanol, 2-propanol) para mejorar la separación. Se aplicó esta metodología para la determinación de 16 cationas previo pretratamiento mediante *off-line* SPE en muestras de orina, obteniéndose LODs entre 10-78 ng/mL.

1.9. Bibliografía

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

- [1] D.J. Lapworth, N. Baran, M.E. Stuart, R.S. Ward, *Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence*, Environ. Pollut., 163 (2012) 287-303.
- [2] M. Llorca, M. Farré, E. Eljarrat, S. Díaz-Cruz, S. Rodríguez-Mozaz, D. Wunderlin, D. Barcelo, *Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002–2016*, Environ. Toxicol. Chem., 9999 (2016) 1-12.
- [3] A.C. Dirtu, N. Van Den Eede, G. Malarvannan, A.C. Ionas, A. Covaci, *Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices-A review*, Anal. Bioanal. Chem., 404 (2012) 2555-2581.
- [4] V. Yusa, X. Ye, A.M. Calafat, *Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens*, Trend Anal. Chem., 38 (2012) 129-142.
- [5] Y. Yang, Y.S. Ok, K.H. Kim, E.E. Kwon, Y.F. Tsang, *Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review*, Sci. Total Environ., 596-597 (2017) 303-320.
- [6] S. González, R. López-Roldán, J.L. Cortina, *Presence and biological effects of emerging contaminants in Llobregat River basin: A review*, Environ. Pollut., 161 (2012) 83-92.
- [7] R. Pal, M. Megharaj, K.P. Kirkbride, R. Naidu, *Illicit drugs and the environment - A review*, Sci. Total Environ., 463-464 (2013) 1079-1092.
- [8] D. Montes-Grajales, M. Fennix-Agudelo, W. Miranda-Castro, *Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review*, Sci. Total Environ., 595 (2017) 601-614.
- [9] I.I. Hamdan, *Capillary electrophoresis in the analysis of pharmaceuticals in environmental water: A critical review*, J. Liq. Chromatogr Relat. Technol., 40 (2017) 111-125.
- [10] V. Matamoros, Y. Rodríguez, J. Albaigés, *A comparative assessment of intensive and extensive wastewater treatment technologies for removing emerging contaminants in small communities*, Water Res., 88 (2016) 777-785.

- [11] H.L. Osachoff, M. Mohammadali, R.C. Skirrow, E.R. Hall, L.L.Y. Brown, G.C. van Aggelen, C.J. Kennedy, C.C. Helbing, *Evaluating the treatment of a synthetic wastewater containing a pharmaceutical and personal care product chemical cocktail: Compound removal efficiency and effects on juvenile rainbow trout*, *Water Res.*, 62 (2014) 271-280.
- [12] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M.Á. Ferro-García, G. Prados-Joya, R. Ocampo-Pérez, *Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review*, *Chemosphere*, 93 (2013) 1268-1287.
- [13] S. Ramos, V. Homem, A. Alves, L. Santos, *A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants*, *Environ. Int.*, 86 (2016) 24-44.
- [14] Y. Luo, W. Guo, H.H. Ngo, L.D. Nghiem, F.I. Hai, J. Zhang, S. Liang, X.C. Wang, *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*, *Sci. Total Environ.*, 473-474 (2014) 619-641.
- [15] V. Matamoros, D. Calderón-Preciado, C. Domínguez, J.M. Bayona, *Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review*, *Anal.Chim. Acta*, 722 (2012) 8-20.
- [16] J.L. Wilkinson, P.S. Hooda, J. Barker, S. Barton, J. Swinden, *Ecotoxic pharmaceuticals, personal care products, and other emerging contaminants: A review of environmental, receptor-mediated, developmental, and epigenetic toxicity with discussion of proposed toxicity to humans*, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 46 (2016) 336-381.
- [17] N. Nassiri Koopaei, M. Abdollahi, *Health risks associated with the pharmaceuticals in wastewater*, *DARU Journal*, 25 (2017) 9-17.
- [18] M. Lei, L. Zhang, J. Lei, L. Zong, J. Li, Z. Wu, Z. Wang, *Overview of emerging contaminants and associated human health effects*, *Biomed Res. Int.*, 2015 (2015) 1-12.
- [19] H. Kataoka, *Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 339-364.
- [20] M. Lores, M. Llompart, G. Álvarez-Rivera, E. Guerra, M. Vila, M. Celeiro, J.P. Lamas, C. Garcia-Jares, *Positive lists of cosmetic ingredients: Analytical methodology for regulatory and safety controls - A review*, *Anal. Chim. Acta*, 915 (2016) 1-26.

- [21] G. Carlucci, M. Carlucci, M. Locatelli, *Analysis of anti-inflammatory enantiomers by HPLC in human plasma and urine: A review*, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 11 (2012) 96-112.
- [22] I. Rykowska, W. Wasiak, *Research trends on emerging environment pollutants - A review*, *Open Chem.*, 13 (2015) 1353-1370.
- [23] O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto, *Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review*, *Anal. Chim. Acta*, 736 (2012) 7-29.
- [24] M.C. Breadmore, R.M. Tubaon, A.I. Shallan, S.C. Phung, A.S. Abdul Keyon, D. Gstoettenmayr, P. Prapatpong, A.A. Alhusban, L. Ranjbar, H.H. See, M. Dawod, J.P. Quirino, *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2012-2014)*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 36-61.
- [25] M.C. Breadmore, A. Wuethrich, F. Li, S.C. Phung, U. Kalsoom, J.M. Cabot, M. Tehranirokh, A.I. Shallan, A.S. Abdul Keyon, H.H. See, M. Dawod, J.P. Quirino, *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2014-2016)*, *Electrophoresis*, 38 (2017) 33-59.
- [26] F. Kitagawa, K. Otsuka, *Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 1335 (2014) 43-60.
- [27] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. De Jong, *Recent developments in coupled SPE-CE*, *Electrophoresis*, 31 (2010) 44-54.
- [28] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, *Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis*, *Electrophoresis*, 32 (2011) 116-126.
- [29] E. Sánchez-López, M.L. Marina, A.L. Crego, *Improving the sensitivity in chiral capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 19-34.
- [30] A. Šlampová, Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, *Recent progress of sample stacking in capillary electrophoresis (2014-2016)*, *Electrophoresis*, 38 (2017) 20-32.
- [31] S. Bacchi, P. Palumbo, A. Sponta, M.F. Coppolino, *Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review*, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 11 (2012) 52-64.

- [32] D.L. Bhatt, J. Scheiman, N.S. Abraham, E.M. Antman, F.K.L. Chan, C.D. Furberg, D.A. Johnson, K.W. Mahaffey, E.M. Quigley, R.A. Harrington, E.R. Bates, C.R. Bridges, M.J. Eisenberg, V.A. Ferrari, M.A. Hlatky, S. Kaul, J.R. Lindner, D.J. Moliterno, D. Mukherjee, R.S. Schofield, R.S. Rosenson, J.H. Stein, H.H. Weitz, D.J. Wesley, ACCF/ACG/AHA 2008 *Expert Consensus Document on Reducing the Gastrointestinal Risks of Antiplatelet Therapy and NSAID Use: A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents*, J. Am. Coll. Cardiol., 52 (2008) 1502-1517.
- [33] R. Camille, M.-P. Johanne, D. Jean-Marc, H. Boulos, P. Jean-Pierre, *Cardiovascular Adverse Effects of Anti-Inflammatory Drugs, Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 12 (2013) 55-67.
- [34] M.D. Hernando, M. Mezcuca, A.R. Fernández-Alba, D. Barceló, *Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments*, Talanta, 69 (2006) 334-342.
- [35] B.S. He, J. Wang, J. Liu, X.M. Hu, *Eco-pharmacovigilance of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Necessity and opportunities*, Chemosphere, 181 (2017) 178-189.
- [36] J. Wang, B. He, D. Yan, X. Hu, *Implementing ecopharmacovigilance (EPV) from a pharmacy perspective: A focus on non-steroidal anti-inflammatory drugs*, Sci. Total Environ., 603 (2016) 772-784.
- [37] I.C. Guiloski, L.D. Stein Piancini, A.C. Dagostim, S.L. de Moraes Calado, L.F. Fávaro, S.L. Boschen, M.M. Cestari, C. da Cunha, H.C. Silva de Assis, *Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish Rhamdia quelen*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 139 (2017) 291-300.
- [38] V. Stancova, A. Zikova, Z. Svobodova, W. Kloas, *Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug(NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (Danio rerio)*, Environ. Toxicol. Pharmacol., 40 (2015) 343-348.
- [39] J.C. López-Doval, J.V.K. Kukkonen, P. Rodrigo, I. Muñoz, *Effects of indomethacin and propranolol on Chironomus riparius and Physella (Costatella) acuta*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 78 (2012) 110-115.
- [40] M. Locatelli, V. Ferrone, R. Cifelli, R.C. Barbacane, G. Carlucci, *Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine*, J. Chromatogr. A, 1367 (2014) 1-8.

[41] S. Riaño, M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography*, Anal. Bioanal. Chem., 403 (2012) 2583-2589.

[42] Reglamento (CE) no 726/2004 del parlamento europeo y del consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la agencia europea de medicamentos.

[43] Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal

[44] *Good-quality water in Europe (EU Water Directive), Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.*

[45] *Directive 2013/39/EU of the european parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.*

[46] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?*, Environmental Health Perspectives, 107 (1999) 907-938.

[47] G.J. Nohynek, H. Schaefer, *Benefit and risk of organic ultraviolet filters*, Regul. Toxicol. Pharmacol., 33 (2001) 285-299.

[48] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, *UV filters: From sunscreens to human body and the environment*, Trends Anal. Chem., 26 (2007) 360-374.

[49] A. Chisvert, A. Salvador, 3.1 - *UV Filters in Sunscreens and other Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods*, in: *Analysis of Cosmetic Products*, Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 83-120.

[50] Y. Ding, Y. Huang, T. Zhao, Q. Cai, Y. Luo, B. Huang, Y. Zhang, X. Pan, *Determination of five representative ultraviolet filters in water by gas chromatography-mass spectrometry*, Chin. J. Chromatogr., 32 (2014) 629-634.

[51] M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems*, Trends Anal. Chem., 28 (2009) 708-717.

- [52] K.H. Langford, M.J. Reid, E. Fjeld, S. Øxnevad, K.V. Thomas, *Environmental occurrence and risk of organic UV filters and stabilizers in multiple matrices in Norway*, Environ. Int., 80 (2015) 1-7.
- [53] A. J. M. Santos, M. S. Miranda, J. C. E. da Silva, *The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions*. Water Res., 46 (2012) 3167-3176
- [54] J. Wang, L. Pan, S. Wu, L. Lu, Y. Xu, Y. Zhu, M. Guo, S. Zhuang, *Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters*, Int. J. Environ. Res. Public Health, 13 (2016) 782-793.
- [55] E. Diamanti-Kandarakis, J.-P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, A.C. Gore, *Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement*, Endocr. Rev., 30 (2009) 293-342.
- [56] T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, K. Sugihara, N. Fujimoto, S. Ohta, *Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 203 (2005) 9-17.
- [57] P.Y. Kunz, H.F. Galicia, K. Fent, *Comparison of In Vitro and In Vivo Estrogenic Activity of UV Filters in Fish*, Toxicol. Sci., 90 (2006) 349-361.
- [58] Reglamento (CE) No 1223/2009 del parlamento europeo y consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.
- [59] A. Sobek, S. Bejgarn, C. Rudén, L. Molander, M. Breitholtz, *In the shadow of the Cosmetic Directive - Inconsistencies in EU environmental hazard classification requirements for UV-filters*, Sci. Total Environ., 461-462 (2013) 706-711.
- [60] *Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, Amending and Repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and Amending Regulation (EC) No 1907/2006* (2008).
- [61] C.M. White, *Mephedrone and 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV): Synthetic Cathinones With Serious Health Implications*, J. Clin. Pharmacol., 56 (2016) 1319-1325.
- [62] C.L. German, A.E. Fleckenstein, G.R. Hanson, *Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon*, Life Sci., 97 (2014) 2-8.
- [63] *European Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2015a). New psychoactive substances in Europe – An update from the EU Early Warning System.*

- [64] J.B. Zawilska, *Mephedrone and other cathinones*, *Curr. Opin. Psychiatry*, 27 (2014) 256-262.
- [65] B. Silva, C. Fernandes, M.E. Tiritan, M.M.M. Pinto, M.J. Valente, M. Carvalho, P.G. de Pinho, F. Remião, *Chiral enantioresolution of cathinone derivatives present in "legal highs", enantioselectivity evaluation on cytotoxicity of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV)*, *Forensic Toxicol.*, 34 (2016) 372-385.
- [66] F.P. Busardò, C. Kyriakou, S. Napoletano, E. Marinelli, S. Zaami, *Mephedrone related fatalities: A review*, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 19 (2015) 3777-3790.
- [67] J. Ezaki, A. Ro, M. Hasegawa, K. Kibayashi, *Fatal overdose from synthetic cannabinoids and cathinones in Japan: demographics and autopsy findings*, *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, 42 (2016) 520-529.
- [68] P. Adamowicz, J. Gieroń, D. Gil, W. Lechowicz, A. Skulska, B. Tokarczyk, D. Zuba, *Blood concentrations of α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP) determined in 66 forensic samples*, *Forensic Toxicol.*, 34 (2016) 227-234.
- [69] K.N. Ellefsen, M. Concheiro, M.A. Huestis, *Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases*, *Drug. Metab. Rev.*, 48 (2016) 237-265.
- [70] P. Adamowicz, J. Gieroń, D. Gil, W. Lechowicz, A. Skulska, B. Tokarczyk, *The prevalence of new psychoactive substances in biological material - a three-year review of casework in Poland*, *Drug Test Anal.*, 8 (2016) 64-71.
- [71] E.L. Øiestad, Å.M.L. Øiestad, A. Gjelstad, R. Karinen, *Oral fluid drug analysis in the age of new psychoactive substances*, *Bioanalysis*, 8 (2016) 691-710.
- [72] I. González-Mariño, E. Gracia-Lor, N.I. Rousis, E. Castrignanò, K.V. Thomas, J.B. Quintana, B. Kasprzyk-Hordern, E. Zuccato, S. Castiglioni, *Wastewater-Based Epidemiology To Monitor Synthetic Cathinones Use in Different European Countries*, *Environ. Sci. Technol.*, 50 (2016) 10089-10096.
- [73] P.K. Thai, F.Y. Lai, M. Edirisinghe, W. Hall, R. Bruno, J.W. O'Brien, J. Prichard, K.P. Kirkbride, J.F. Mueller, *Monitoring temporal changes in use of two cathinones in a large urban catchment in Queensland, Australia*, *Sci. Total Environ.*, 545-546 (2016) 250-255.
- [74] R. Bade, L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Gracia-Lor, F. Hernández, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of synthetic cathinones and phenethylamines in influent wastewater of eight European cities*, *Chemosphere*, 168 (2017) 1032-1041.

[75] Procedimiento 2010/0293/NLE COM (2010) 583: *Proposal for a council decision on submitting 4-methylmethcathinone (mephedrone) to control measures.*

[76] Decisión de Ejecución (UE) 2015/1875 del Consejo, de 8 de octubre de 2015, por la que se someten a medidas de control las sustancias 4-yodo-2,5-dimetoxi-N-(2-metoxibencil)fenetilamina, 3,4-dicloro-N-[[1(dimetilamino)ciclohexil]metil]benzamida (AH-7921), 3,4-metilendioxiptovalerona (MDPV) y 2-(3-metoxifenil)-2-(etilamino)ciclohexanona (metoxetamina) DO L 275 de 20.10.2015, p. 38/42.

[77] Decisión de Ejecución (UE) 2016/1070 del Consejo, de 27 de junio de 2016, por la que se somete a medidas de control a la sustancia 1-fenil-2-(pirrolidin--1-il)-pentan-1-ona (α -pirrolidinovalerofenona, α -PVP) DO L 178 de 2.7.2016, p. 18/20.

[78] S. 3190 — *112th Congress: Synthetic Drug Abuse Prevention Act of 2012, 9th July, 2012*, S. 3190 — *112th Congress: Synthetic Drug Abuse Prevention Act of 2012, 9th July, 2012.*

[79] S.D. Brandt, S. Freeman, H.R. Sumnall, F. Measham, J. Cole, *Analysis of NRG 'legal highs' in the UK: identification and formation of novel cathinones*, *Drug Test Anal.*, 3 (2011) 569-575.

[80] T. Hyötyläinen, *Critical evaluation of sample pretreatment techniques*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 743-758.

[81] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Green Analytical Chemistry*, *Trends Anal. Chem.*, 27 (2008) 497-511.

[82] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, *The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices*, *Trends Anal. Chem.*, 50 (2013) 78-84.

[83] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. De La Guardia, J. Namieśnik, *Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques*, *Talanta*, 119 (2014) 34-45.

[84] J. Płotka-Wasyłka, K. Owczarek, J. Namieśnik, *Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction*, *Trends Anal. Chem.*, 85 (2016) 46-64.

[85] S. Liu, P.K. Dasgupta, *Liquid Droplet. A Renewable Gas Sampling Interface*, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2042-2049.

[86] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2236-2240.

- [87] Y. He, H.K. Lee, *Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe*, *Anal.Chem.*, 69 (1997) 4634-4640.
- [88] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1817-1821.
- [89] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle*, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 235-239.
- [90] Z.A. Allothman, M. Dawod, J. Kim, D.S. Chung, *Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review*, *Anal. Chim. Acta*, 739 (2012) 14-24.
- [91] K. Choi, S.J. Kim, Y.G. Jin, Y.O. Jang, J.-S. Kim, D.S. Chung, *Single Drop Microextraction Using Commercial Capillary Electrophoresis Instruments*, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 225-230.
- [92] Z. Zhu, X. Zhou, N. Yan, L. Zhou, X. Chen, *On-line combination of single-drop liquid-liquid-liquid microextraction with capillary electrophoresis for sample cleanup and preconcentration: A simple and efficient approach to determining trace analyte in real matrices*, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1856-1861.
- [93] Q. Wang, H. Qiu, J. Li, X. Liu, S. Jiang, *On-line coupling of ionic liquid-based single-drop microextraction with capillary electrophoresis for sensitive detection of phenols*, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5434-5439.
- [94] H.-Y. Xie, Y.-Z. He, W.-E. Gan, C.-Z. Yu, F. Han, D.-S. Ling, *In-line coupling headspace liquid-phase microextraction with capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1203-1207.
- [95] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650-2656.
- [96] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, Á. Ríos, M. Valcárcel, *In-line liquid-phase microextraction for selective enrichment and direct electrophoretic analysis of acidic drugs*, *Electrophoresis*, 28 (2007) 3284-3289.
- [97] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*, *Electrophoresis*, 21 (2000) 579-585.

- [98] P. Kubáň, P. Boček, *Direct coupling of supported liquid membranes to capillary electrophoresis for analysis of complex samples: A tutorial*, Anal. Chim. Acta, 787 (2013) 10-23.
- [99] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, Á. Ríos, M. Valcárcel, *New supported liquid membrane-capillary electrophoresis in-line arrangement for direct selective analysis of complex samples*, Electrophoresis, 27 (2006) 3075-3085.
- [100] S. Almeda, L. Nozal, L. Arce, M. Valcárcel, *Direct determination of chlorophenols present in liquid samples by using a supported liquid membrane coupled in-line with capillary electrophoresis equipment*, Anal. Chim. Acta, 587 (2007) 97-103.
- [101] P. Pantůčková, P. Kubáň, P. Boček, *A simple sample pretreatment device with supported liquid membrane for direct injection of untreated body fluids and in-line coupling to a commercial CE instrument*, Electrophoresis, 34 (2013) 289-296.
- [102] P. Pantůčková, P. Kubáň, P. Boček, *Sensitivity enhancement in direct coupling of supported liquid membrane extractions to capillary electrophoresis by means of transient isotachopheresis and large electrokinetic injections*, J Chromatogr. A, 1389 (2015) 1-7.
- [103] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, *New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction*, Trends Anal. Chem., 43 (2013) 14-23.
- [104] C. Herrero Latorre, J. Álvarez Méndez, J. Barciela García, S. García Martín, R.M. Peña Crecente, *Carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents prior to atomic spectrometric determination of metal species: A review*, Anal. Chim. Acta, 749 (2012) 16-35.
- [105] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, *Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis*, Trend Anal. Chem., 59 (2014) 26-41.
- [106] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *Overview of the novel sorbents available in solid-phase extraction to improve the capacity and selectivity of analytical determinations*, Contrib. Sci., 6 (2010) 199-213.
- [107] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications*, Anal. Chim. Acta, 616 (2008) 1-18.

- [108] R. Ramautar, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis* 2009-2011, *Electrophoresis*, 33 (2012) 243-250.
- [109] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis* 2011-2013, *Electrophoresis*, 35 (2014) 128-137.
- [110] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Chromatographic Preconcentration Coupled To Capillary Electrophoresis via an In-Line Injection Valve*, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4432-4436.
- [111] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Design and applications of coupled SPE-CE*, *Electrophoresis*, 29 (2008) 108-128.
- [112] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman, *Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1140 (2007) 205-212.
- [113] K. Jooß, J. Sommer, S.C. Bunz, C. Neusüß, *In-line SPE-CE using fritless bead string design-Application for the analysis of organic sulfonates including inline SPE-CE-MS for APTS-labeled glycans*. *Electrophoresis*, 35 (2014) 1236-1243
- [114] I. Botello, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Investigation of in-line solid-phase extraction capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse and their metabolites in water samples*, *Electrophoresis*, 33 (2012) 528-535.
- [115] I. Botello, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *In-line solid-phase extraction-capillary zone electrophoresis for the determination of barbiturate drugs in human urine*, *Anal. Sci.*, 30 (2014) 971-977.
- [116] I. Maijó, N. Fontanals, F. Borrull, C. Neususs, M. Calull, C. Aguilar, *Determination of UV filters in river water samples by in-line SPE-CE-MS*, *Electrophoresis*, 34 (2013) 374-382.
- [117] T. Baciu, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Enantioselective determination of cathinone derivatives in human hair by capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2352-2362.
- [118] M. Tascon, L.G. Gagliardi, F. Benavente, *Parts-per-trillion detection of harmala alkaloids in *Undaria pinnatifida* algae by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry*, *Anal. Chim. Acta*, 954 (2017) 60-67.

[119] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Developments in coupled solid-phase extraction–capillary electrophoresis 2013–2015*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 35-44.

[120] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Sensitivity enhancement for the analysis of naproxen in tap water by solid-phase extraction coupled in-line to capillary electrophoresis*, *J. Sep. Sc.*, 31 (2008) 872-880.

[121] M. Tascon, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, L.G. Gagliardi, *A high performance system to study the influence of temperature in on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis*, *Anal. Chim. Acta*, 863 (2015) 78-85.

[122] L. Pont, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *On-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry using Fab´antibody fragments for the analysis of serum transthyretin*, *Talanta*, 170 (2017) 224-232.

[123] Y.H. Tennico, V.T. Remcho, *In-line extraction employing functionalized magnetic particles for capillary and microchip electrophoresis*, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2548-2557.

[124] N. Gasilova, A.-L. Gassner, H.H. Girault, *Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS*, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2390-2398.

[125] G. Morales-Cid, S. Cárdenas, B.M. Simonet, M. Valcárcel, *Direct automatic determination of free and total anesthetic drugs in human plasma by use of a dual (microdialysis–microextraction by packed sorbent) sample treatment coupled at-line to NACE–MS*, *Electrophoresis*, 30 (2009) 1684-1691.

[126] T. Baciú, F. Borrull, C. Neusüß, C. Aguilar, M. Calull, *Capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction using magnetic particles as new adsorbents for the determination of drugs of abuse in human urine*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 1232-1244.

[127] G. Morales-Cid, J.C. Diéz-Masa, M. de Frutos, *On-line immunoaffinity capillary electrophoresis based on magnetic beads for the determination of alpha-1 acid glycoprotein isoforms profile to facilitate its use as biomarker*, *Anal. Chim. Acta*, 773 (2013) 89-96.

[128] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145-2148.

- [129] E. Boyaci, Á. Rodríguez-Lafuente, K. Gorynski, F. Mirnaghi, É.A. Souza-Silva, D. Hein, J. Pawliszyn, *Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases*, *Anal. Chem. Acta*, 873 (2015) 14-30.
- [130] J. Pawliszyn, *Handbook of solid phase microextraction*, Elsevier, 2011.
- [131] C.-W. Whang, J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction coupled to capillary electrophoresis*, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 353-356.
- [132] A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Separation and Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Solid Phase Microextraction/Cyclodextrin-Modified Capillary Electrophoresis*, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1726-1731.
- [133] Z. Liu, J. Pawliszyn, *Microdialysis hollow fiber as a macromolecule trap for on-line coupling of solid phase microextraction and capillary electrophoresis*, *The Analyst*, 131 (2006) 522-528.
- [134] B. Santos, B.M. Simonet, Á. Ríos, M. Valcárcel, *On-line coupling of solid-phase microextraction to commercial CE-MS equipment*, *Electrophoresis*, 28 (2007) 1312-1318.
- [135] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, *Sample preparation with fiber-in-tube solid-phase microextraction for capillary electrophoretic separation of tricyclic antidepressant drugs in human urine*, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3785-3790.
- [136] Z. Liu, J. Pawliszyn, *Online coupling of solid-phase microextraction and capillary electrophoresis*, *J. Sep. Sci.*, 44 (2006) 366-374.
- [137] F.E.P. Mikkers, F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, *High-performance zone electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 169 (1979) 11-20.
- [138] S. Liu, Q. Li, X. Chen, Z. Hu, *Field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for on-column concentration of alkaloids in *Sophora flavescens* Ait*, *Electrophoresis*, 23 (2002) 3392-3397.
- [139] D.S. Burgi, R.-L. Chien, *Improvement in the method of sample stacking for gravity injection in capillary zone electrophoresis*, *Anal. Biochem.*, 202 (1992) 306-309.
- [140] M.-M. Hsieh, E.-P. Lin, S.-W. Huang, *On-line concentration and separation of cationic and anionic neurochemicals by capillary electrophoresis with UV absorption detection*, *Talanta*, 88 (2012) 638-645.

- [141] N. Khan, J. Cheng, J.P. Pezacki, M.V. Berezovski, *Quantitative analysis of microRNA in blood serum with protein-facilitated affinity capillary electrophoresis*, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 6196-6201.
- [142] S. Dziomba, M. Biernacki, I. Olędzka, E. Skrzydlewska, T. Bączek, P. Kowalski, *Repetitive injection field-amplified sample stacking for cationic compounds determination*, *Talanta*, 125 (2014) 1-6.
- [143] H. Ye, S. Xia, L. Yu, X. Xu, C. Zheng, H. Xu, L. Wang, X. Liu, Z. Cai, G. Chen, *Solid-phase extraction-field-amplified sample injection coupled with CE-ESI-MS for online pre-concentration and quantitative analysis of brain-gut peptides*, *Electrophoresis*, 32 (2011) 2823-2829.
- [144] X.-Z. Hu, M.-L. Chen, Q. Gao, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, *Determination of benzimidazole residues in animal tissue samples by combination of magnetic solid-phase extraction with capillary zone electrophoresis*, *Talanta*, 89 (2012) 335-341.
- [145] J. Duan, B. Hu, M. He, *Nanometer-sized alumina packed microcolumn solid-phase extraction combined with field-amplified sample stacking-capillary electrophoresis for the speciation analysis of inorganic selenium in environmental water samples*, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2953-2960.
- [146] U. Alshana, N.G. Göğür, N. Ertaş, *Dispersive liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products*, *Food Chem.*, 138 (2013) 890-897.
- [147] Y.-Y. Tu, M.-M. Hsieh, S.Y. Chang, *Sensitive detection of piperaziny phenothiazine drugs by field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis with dispersive liquid-liquid microextraction*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2828-2836.
- [148] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*, *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 1-9.
- [149] R.-L. Chien, D.S. Burgi, *Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 559 (1991) 141-152.
- [150] D. Deng, H. Deng, L. Zhang, Y. Su, *Determination of Ephedrine and Pseudoephedrine by Field-Amplified Sample Injection Capillary Electrophoresis*, *J. Chromatogr. Sci.*, 52 (2014) 357-362.

- [151] H.F. Lau, N.M. Quek, W.S. Law, J.H. Zhao, P.C. Hauser, S.F.Y. Li, *Optimization of separation of heavy metals by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*, *Electrophoresis*, 32 (2011) 1190-1194.
- [152] M.F. Us, U. Alshana, I. Lubbad, N.G. Göğçer, N. Ertaş, *Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with field-amplified sample injection in capillary electrophoresis for the determination of beta(2)-agonists in bovine urine*, *Electrophoresis*, 34 (2013) 854-861.
- [153] B. Claude, R. Nehmé, P. Morin, *Analysis of urinary neurotransmitters by capillary electrophoresis: Sensitivity enhancement using field-amplified sample injection and molecular imprinted polymer solid phase extraction*, *Analytica Chimica Acta*, 699 (2011) 242-248.
- [154] C. Chen, X. Li, X. Xie, F. Chang, M. Li, Z. Zhu, *Highly sensitive detection of copper(i) and copper(ii) in cell specimens by CE-UV with large-volume sample stacking*, *Anal. Methods*, 8 (2016) 4272-4276.
- [155] L.-Y. Fan, T. He, Y.-Y. Tang, W. Zhang, C.-J. Song, X. Zhao, X.-Y. Zhao, C.-X. Cao, *Sensitive Determination of Barbiturates in Biological Matrix by Capillary Electrophoresis Using Online Large-Volume Sample Stacking*, *J. Forensic Sci.*, 57 (2012) 813-819.
- [156] C. Quesada-Molina, M.d. Olmo-Iruela, A.M. García-Campana, *Analysis of cephalosporin residues in environmental waters by capillary zone electrophoresis with off-line and on-line preconcentration*, *Anal. Methods*, 4 (2012) 2341-2347.
- [157] M.-S. Chun, D.S. Chung, *Large volume sample stacking in capillary electrophoresis of weakly acidic compounds using coated capillaries at high pH*, *Anal. Chim. Acta*, 491 (2003) 173-179.
- [158] F. Kitagawa, T. Kawai, K. Otsuka, *On-line Sample Preconcentration by Large-volume Sample Stacking with an Electroosmotic Flow Pump (LVSEP) in Microscale Electrophoresis*, *Anal. Sci.*, 29 (2013) 1129-1139.
- [159] A.Z. Buzatto, S.F. Guedes, M. de Oliveira Silva, J.M. Gallafrio, A.V.C. Simionato, *Higher detectability method for the analysis of nucleosides, putative tumor biomarkers, in blood serum samples by CE-UV with reversed EOF*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2968-2975.
- [160] T. Kawai, H. Koino, K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, *Highly sensitive chiral analysis in capillary electrophoresis with large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump*, *J. Chromatogr. A*, 1246 (2012) 28-34.

- [161] S.T. Park, J. Kim, K. Choi, H.R. Lee, D.S. Chung, *Headspace-single drop microextraction with a commercial capillary electrophoresis instrument*, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2961-2968.
- [162] Y.-L. Feng, J. Zhu, *On-Line Enhancement Technique for the Analysis of Nucleotides Using Capillary Zone Electrophoresis/Mass Spectrometry*, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 6608-6613.
- [163] Y.-L. Feng, H. Lian, J. Zhu, *Application of pressure assisted electrokinetic injection technique in the measurements of DNA oligonucleotides and their adducts using capillary electrophoresis-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1148 (2007) 244-249.
- [164] H. Zhang, J. Gavina, Y.-L. Feng, *Understanding mechanisms of pressure-assisted electrokinetic injection: Application to analysis of bromate, arsenic and selenium species in drinking water by capillary electrophoresis-mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3095-3104.
- [165] Y.-L. Feng, J. Zhu, *Constant pressure-assisted electrokinetic injection for on-line enhanced detection of monophthalates in capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to human urine*, *Electrophoresis*, 29 (2008) 1965-1973.
- [166] Z. Xu, A. Li, Y. Wang, Z. Chen, T. Hirokawa, *Pressure-assisted electrokinetic injection stacking for verteporfin drug to achieve highly sensitive enantioseparation and detection in artificial urine by capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 1355 (2014) 284-290.
- [167] L. D'Ulivo, Y.-L. Feng, *Expanding the scope of pressure-assisted electrokinetic injection for online concentration of positively charged analytes in capillary electrophoresis-mass spectrometry*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 1024-1027.
- [168] A. Gentili, *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental samples by chromatographic and electrophoretic techniques*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 1185-1202.
- [169] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs*, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 133-153.
- [170] A. Podar, Ş. Suciú, R. Oprean, *Review – Recent enantiomer separation strategies of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by capillary electrophoresis*, *Farmacia*, 64 (2016) 159-170.

- [171] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, *Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases—Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. B*, 1008 (2016) 115-124.
- [172] A. García-Vázquez, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Single-drop microextraction combined in-line with capillary electrophoresis for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 274-281.
- [173] M.A. Rahim, W.A.W. Ibrahim, Z. Ramli, M.M. Sanagi, *New functionalised sol-gel hybrid sorbent coating for stir bar sorptive extraction of selected non-steroidal anti inflammatory drugs in human urine samples*, *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19 (2015) 481-492.
- [174] K.S. Hasheminasab, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H. Ahmar, *A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples*, *J. Chromatogr. A*, 1285 (2013) 1-6.
- [175] M. Villar Navarro, M. Ramos Payán, R. Fernández-Torres, M.A. Bello López, *Hollow fiber liquid-phase microextraction and determination of nonsteroidal anti-inflammatories by capillary electrophoresis and sulfonamides by HPLC in human urine*, *Biomed. Chrom.*, 27 (2013) 246-253.
- [176] L. Čapka, P. Lacina, M. Vávrová, *Development and application of SPE/CZE method for detection and determination of selected nonsteroidal anti-inflammatory drugs in wastewater*, *Fresen. Environ. Bull.*, 21 (2012) 3312-3317.
- [177] I. Botello, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrokinetic supercharging focusing in capillary zone electrophoresis of weakly ionizable analytes in environmental and biological samples*, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2964-2973.
- [178] I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Simultaneous determination of weakly ionizable analytes in urine and plasma samples by transient pseudo-isotachopheresis in capillary zone electrophoresis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 527-534.
- [179] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, P.R. Haddad, *Electrokinetic supercharging for on-line preconcentration of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples*, *J. Chromatogr. A*, 1189 (2008) 278-284.

- [180] M. Dawod, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, P.R. Haddad, *Counter-flow electrokinetic supercharging for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples*, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3380-3386.
- [181] M.M. Meighan, M. Dawod, R.M. Guijt, M.A. Hayes, M.C. Breadmore, *Pressure-assisted electrokinetic supercharging for the enhancement of non-steroidal anti-inflammatory drugs*, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6750-6755.
- [182] Y.J. Huang, G.R. Wang, K.P. Huang, Y.F. Hsieh, C.Y. Liu, *Functionalized carbon nanotubes as the pseudostationary phase for capillary EKC separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs*, *Electrophoresis*, 30 (2009) 3964-3970.
- [183] G. Bonvin, J. Schappler, S. Rudaz, *Non-aqueous capillary electrophoresis for the analysis of acidic compounds using negative electrospray ionization mass spectrometry*, *J. Chromatogr. A*, 1323 (2014) 163-173.
- [184] I. Maijó, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *On-Column Preconcentration of Anti-Inflammatory Drugs in River Water by Anion-Selective Exhaustive Injection-Sweeping-MEKC*, *Chromatographia*, 73 (2011) 83-91.
- [185] S. Almeda, L. Arce, M. Valcarcel, *Combination of solid-phase extraction and large-volume stacking with polarity switching in micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of traces of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in saliva*, *Electrophoresis*, 29 (2008) 3074-3080.
- [186] S. Benítez-Martínez, B.M. Simonet, M. Valcárcel, *Graphene nanoparticles as pseudostationary phase for the electrokinetic separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, *Electrophoresis*, 34 (2013) 2561-2567.
- [187] J.P. Quirino, A.M. Guidote Jr, *Two-step stacking in capillary zone electrophoresis featuring sweeping and micelle to solvent stacking: II. Organic anions*, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1004-1010.
- [188] Y.L. Kuo, W.L. Liu, S.H. Hsieh, H.Y. Huang, *Analyses of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs in Environmental Water Samples with Microemulsion Electrokinetic Chromatography*, *Anal. Sci.*, 26 (2010) 703-707.
- [189] M.C. Mavroudi, C.P. Kapnissi-Christodoulou, *Combined use of l-alanine tert butyl ester lactate and trimethyl- β -cyclodextrin for the enantiomeric separations of 2-arylpropionic acids nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2442-2450.

- [190] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, Y. Lei, *Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis*, *Talanta*, 119 (2014) 193-201.
- [191] M. Purrà, R. Cinca, J. Legaz, O. Núñez, *Solid-phase extraction and field-amplified sample injection–capillary zone electrophoresis for the analysis of benzophenone UV filters in environmental water samples*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2014) 6189-6202.
- [192] T. Ma, Z. Li, Q. Niu, Y.Y. Li, W.H. Zhou, *Double dispersant-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for the determination of benzophenone-type ultraviolet filters in sunscreen cosmetic product*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2530-2537.
- [193] Y.-W. Wu, Y.-Y. Jiang, J.-F. Liu, K. Xiong, *Cloud point extraction combined with micellar electrokinetic capillary chromatography determination of benzophenones in cosmetic matrix*, *Electrophoresis*, 29 (2008) 819-826.
- [194] J. Lopez-Gazpio, R. Garcia-Arrona, E. Millán, *Simultaneous determination of multiclass preservatives including isothiazolinones and benzophenone-type UV filters in household and personal care products by micellar electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 1064-1072.
- [195] Y.-H. Lin, C.-Y. Lu, S.-J. Jiang, W.-Y. Hsiao, H.-L. Cheng, Y.-L. Chen, *Application of a multivariate approach for analyte focusing by micelle collapse-micellar electrokinetic chromatography for analyzing sunscreen agents in cosmetics*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 2396-2403.
- [196] H.-Y. Huang, C.-W. Chiu, Y.-C. Chen, J.-M. Yeh, *Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography as methods for the analysis of ten benzophenones*, *Electrophoresis*, 26 (2005) 895-902.
- [197] C.W. Klampfl, T. Leitner, E.F. Hilder, *Development and optimization of an analytical method for the determination of UV filters in suntan lotions based on microemulsion electrokinetic chromatography*, *Electrophoresis*, 23 (2002) 2424-2429.
- [198] L. Li, I.S. Lurie, *Regioisomeric and enantiomeric analyses of 24 designer cathinones and phenethylamines using ultra high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis with added cyclodextrins*, *Forensic Sci. Int.*, 254 (2015) 148-157.

Introducción | 120

[199] M. Moini, C.M. Rollman, *Compatibility of highly sulfated cyclodextrin with electrospray ionization at low nanoliter/minute flow rates and its application to capillary electrophoresis/electrospray ionization mass spectrometric analysis of cathinone derivatives and their optical isomers*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 29 (2015) 304-310.

[200] G. Merola, H.Z. Fu, F. Tagliaro, T. Macchia, B.R. McCord, *Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection*, Electrophoresis, 35 (2014) 3231-3241.

[201] M. Taschwer, M.G. Hofer, M.G. Schmid, *Enantioseparation of benzofurys and other novel psychoactive compounds by CE and sulfobutylether β -cyclodextrin as chiral selector added to the BGE*, Electrophoresis, 35 (2014) 2793-2799.

[202] S. Mohr, S. Pilaj, M.G. Schmid, *Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 33 (2012) 1624-1630.

[203] M. Švidrnoch, L. Lněničková, I. Válka, P. Ondra, V. Maier, *Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs*, J. Chromatogr. A, 1356 (2014) 258-265.

2. OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

El principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de diferentes métodos analíticos basados en el uso de la electroforesis capilar en combinación *in-line* con diferentes estrategias de preconcentración para la determinación de diferentes grupos de compuestos orgánicos emergentes. Se evaluarán diferentes estrategias de preconcentración, tales como técnicas de microextracción y técnicas de preconcentración electroforéticas.

Para conseguir este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Desarrollar una metodología basada en el acoplamiento *in-line*-SDME-CE para la determinación de antiinflamatorios en orina humana.
- Desarrollar un método *in-line* SPE-CE para la determinación de catinonas sintéticas en orina humana.
- Desarrollar un método para la determinación de filtros ultravioleta a bajos niveles de concentración. Para conseguirlo, se evaluará la técnica de preconcentración electroforética PAEKI en la determinación de muestras de orina humana y muestras de crema solar.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

3. PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS y DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

En este capítulo se incluye la parte experimental, así como los principales resultados y su discusión de los diferentes estudios que se han llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral. En estos estudios se han desarrollado diferentes métodos analíticos basados en la CE que involucran el uso de distintas técnicas de preconcentración electroforéticas o técnicas de microextracción acopladas *in-line* con el objetivo de incrementar la limitada sensibilidad de la CE. Los resultados de uno de estos estudios han sido publicados en la revista científica internacional "Electrophoresis" (*Electrophoresis*, 37 (2016) 274-281) y los demás son estudios que darán pie a futuros trabajos y sus respectivas publicaciones. Cada estudio se muestra en una sección de este capítulo, que comenzara con una breve introducción para centrar al lector en el contexto de la investigación y seguidamente se comentan las condiciones experimentales y finalmente se muestran los resultados más relevantes obtenidos, así como la discusión de los mismos.

En el primer estudio, se desarrolló un método para la determinación de AINEs en muestras de orina, utilizando la técnica *single drop microextraction* (SDME) en 3 fases acoplada *in-line* a la CE. El método fue validado con muestras de orina y posteriormente la aplicabilidad de la metodología desarrollada fue demostrada para el análisis de muestras procedentes de pacientes que estaban siguiendo tratamiento médico con un tipo de AINE, concretamente ibuprofeno.

El segundo estudio se centró en el uso la técnica de SPE combinada *in-line* con la CE para la determinación de catinonas en muestras de orina, usando como sorbente de extracción un sorbente polimérico, concretamente Oasis HLB. Cabe destacar, que debido al carácter enantiomérico de estos compuestos también se realizó la separación enantiomérica de los compuestos estudiados mediante la adición al BGE de ciclodextrinas como selectores quirales.

El tercer estudio se centró en la evaluación de una técnica de preconcentración electroforética, en concreto, *pressure assisted electrokinetic injection* (PAEKI) para la determinación de filtros

128 | Parte experimental, resultados y discusión

ultravioleta. Este método fue validado en muestras patrón y posteriormente aplicado a muestras de orina y a muestras de crema de protección solar. Previamente a estas aplicaciones se realizó un pretratamiento para el lavado en cada tipo de muestra.

Todos los estudios mencionados en la presente Tesis Doctoral han estado financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, proyecto CTQ2014-52617.

3.1. *Single-drop microextraction* (SDME) acoplada a la electroforesis capilar para la determinación de AINEs en muestras de orina

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Como se ha comentado en el capítulo 1, los AINEs son un grupo de compuestos farmacéuticos que, debido a sus propiedades como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios son frecuentemente utilizados. Estos fármacos son los medicamentos más prescritos en el mundo [1], y como ejemplo de su consumo, en 2009 la prescripción de estos medicamentos representó un mercado de 9 billones de dólares en los Estados Unidos [2]. Aunque los AINEs se utilizan habitualmente y se cree que son totalmente seguros para la salud, su abuso crónico o una sobredosis aguda puede causar efectos secundarios graves, como problemas gastrointestinales, anemia, insuficiencia renal y/o hepática [3, 4]. Por esta razón, en los últimos años se ha prestado especial atención en controlar estos compuestos en los individuos que están bajo su tratamiento. Los AINEs han sido estudiados en diferentes tipos de muestras biológicas, de las cuales la orina y la sangre han sido las matrices más analizadas [5-7].

La orina como matriz de análisis tiene la ventaja que es fácil de obtener y su volumen no es limitado [8]. De todos modos, es una matriz compleja desde el punto de vista de la química analítica, por lo tanto, su tratamiento es una etapa crucial del procedimiento analítico.

En los últimos años, se han empleado diferentes estrategias de tratamiento de muestra basadas en la LLE o SPE en combinación con LC, GC y CE para la determinación de AINEs en muestras de orina [9-11]. No obstante, el uso de las técnicas convencionales de extracción tiene la desventaja del elevado consumo de solventes orgánicos. Por ello, en los últimos años existe una tendencia a simplificar, miniaturizar, facilitar de manipulación y reducir el volumen de los solventes orgánicos y de las muestras. El empleo de la LPME ha tenido un papel importante en este sentido [12-14].

El estudio que se presenta en esta Tesis Doctoral se centra en el empleo de la técnica de microextracción SDME en su combinación *in-line* con la CE. Cabe señalar, que la metodología desarrollada no ha sido empleada con anterioridad para la determinación de AINEs en

muestras biológicas. La SDME se basa en la distribución de los analitos entre una gota de un solvente de extracción (fase aceptora) y una fase acuosa que contiene los analitos (fase dadora). En la bibliografía están discutidas diferentes aplicaciones basadas en el uso de este acoplamiento donde se muestran resultados muy alentadores en los que se obtuvieron elevados factores de preconcentración [15,16]. Teniendo en cuenta estos resultados, el objetivo principal de nuestro estudio ha sido explorar el acoplamiento *in-line* de la SDME en 3 fases con la CE, evaluando los diferentes parámetros que pueden influir en el proceso de extracción, proceso de lavado y preconcentración para extraer los AINEs de una matriz biológica compleja como es la orina y su posterior aplicación del método para la determinación de un grupo de AINEs de muestras de orina de pacientes que estaban bajo tratamiento médico.

3.1.1 Materiales y métodos

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. El agua utilizada en la preparación de las soluciones se purificó mediante un sistema Milli-Q Veolia Waters (Sant Cugat del Vallés, Barcelona, España). Los estándares de los AINEs: ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco sódico, ketoprofeno y el tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Madrid, España). El proveedor del hidróxido de sodio fue Panreac (Barcelona, España) y el acetato de etilo, octanol, diclorometano (DCM), tolueno y metanol fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania).

Las soluciones de los estándares individuales de ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco sódico y ketoprofeno fueron preparadas en metanol a una concentración de 1000 mg/L y el diclofenaco sódico en una solución de metanol-agua (80:20) v/v, y todas ellas fueron almacenadas a -20°C . Semanalmente se preparó una solución que

contenía todos los estándares a una concentración de 10 mg/L por dilución de las soluciones estándar de 1000 mg/L en agua Milli-Q y almacenadas a 4°C. Las soluciones a bajas concentraciones se prepararon diariamente mediante dilución en agua Milli-Q.

Instrumentación

La instrumentación empleada para la separación electroforética fue un instrumento 3D CE de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de diodos en línea (DAD). Se usó un capilar de sílice, adquirido a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, Estados Unidos) con unas dimensiones de 60 cm de largo (52 cm de longitud efectiva), diámetro interno de 50 μm y un diámetro externo de 360 μm . Los capilares fueron cortados a la longitud deseada con un cortador cerámico de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Para verificar que los cortes fueron realizados correctamente, ya que esto puede afectar la estabilidad de la gota, se utilizó un microscopio Nikon SE (Amstelveen, Holanda). El tratamiento de los datos se realizó mediante el *software* ChemStation B.04.03. Para medir el pH fue empleado un pH- metro Basic 20 Crison (Barcelona, España) y para el pretratamiento de las muestras de orina fue empleada una centrifuga Hettich Zentrifugen (Tuttligen, Alemania).

Condiciones de la CE

Para la separación mediante CE fue empleado como BGE una solución 40 mM de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (pH 9.2) que se preparó disolviendo la cantidad apropiada de tetraborato de sodio anhidro en agua Milli-Q, se sonicó durante 5 minutos y se filtró con un filtro de PTFE adquirido a Linealab (Barcelona, España).

Antes del primer uso, el capilar fue acondicionando haciendo pasar a través de él una solución de NaOH 1 M aplicando una presión de 930 mbar durante 40 minutos y agua Milli-Q durante 10 minutos. Cada día, el capilar fue acondicionado haciendo pasar 5 minutos de NaOH

134 | Parte experimental, resultados y discusión

1 M, 5 minutos de agua Milli-Q y 10 minutos de BGE. Entre experimentos, el capilar fue acondicionado haciendo pasar durante 2 minutos una solución de NaOH 1 M, 2 minutos de agua Milli-Q y 5 minutos de BGE. Las inyecciones se realizaron hidrodinámicamente aplicando una presión de 50 mbar durante 3 segundos sobre el vial *inlet*. La polaridad empleada para la separación fue de +20 kV y la longitud de onda seleccionada para la detección fue de 214 nm. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura del compartimento del capilar de 25°C.

El procedimiento de *in-line* SDME-CE seguido se muestra en la Figura 25. Antes del proceso de extracción, 400 µL de muestra a pH 2 (fase dadora) ajustada con HCl 0.1 M, se mezcló con el vortex en un vial de CE durante 5 segundos con 300 µL de acetato de etilo (fase orgánica) de manera *off-line* (A). Posteriormente, se introdujo el BGE en el capilar y una vez que está lleno, se introdujo la fase aceptora (NaOH 0.001 M) mediante una inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 420 segundos desde el vial *inlet* hasta el *outlet* (B). Después, el vial de la fase aceptora fue reemplazado por el vial de la muestra con la fase orgánica, y se aplicó una presión en sentido opuesto (-50 mbar) durante 400 segundos sobre el vial *inlet* para la formación de la gota de fase aceptora (NaOH 0.001 M) dentro de la fase orgánica de acetato de etilo (C). En esta etapa, es crucial que el extremo del capilar *inlet* se mantenga inmerso en la fase orgánica. En este punto, se realizó la transferencia de los analitos durante 10 minutos (D), y posteriormente, el extracto enriquecido fue inyectado hidrodinámicamente a 50 mbar durante 3 segundos (E). Finalmente, se reemplazó el vial de la muestra por el vial con BGE y aplicando un voltaje de 20 kV se realizó la separación (F).

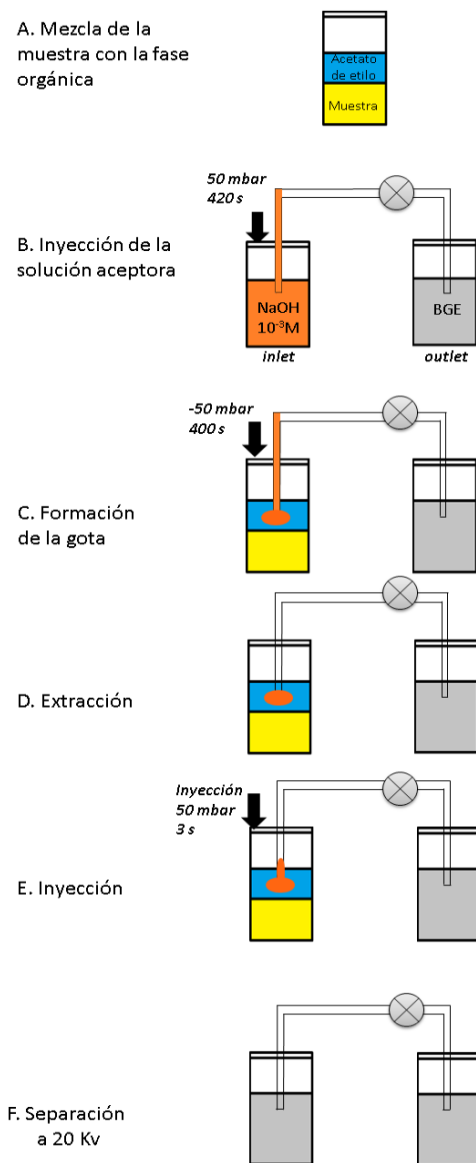


Figura 25. Diagrama del procedimiento in-line SDME-CE en la modalidad de 3 fases

Toma de muestra y almacenamiento

Las muestras de orina fueron recolectadas de voluntarios adultos sanos entre el personal del laboratorio y de pacientes que estaban

bajo tratamiento con ibuprofeno durante el período de tiempo de este estudio. Los voluntarios fueron informados de todo el procedimiento y firmaron un documento de consentimiento. Las muestras fueron almacenadas en tubos de polipropileno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Preparación de las muestras de orina

Antes de proceder al análisis de las muestras éstas se descongelaron a temperatura ambiente y posteriormente se llevó a cabo la centrifugación de las mismas a 9000 rpm durante 10 minutos. Después, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Linealab, Barcelona), y las muestras fueron diluidas 1/10 en agua Milli-Q ajustadas con HCl 0.1 M a pH 2. Finalmente, se aplicó el procedimiento *in-line* SDME descrito anteriormente.

Validación del método

Se realizó la calibración mediante la preparación de estándares a partir de muestras blanco de orina diluidas 1/10 y enriquecidas con la cantidad apropiada de una mezcla de AINEs a concentraciones finales de 5, 20, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$. Para la obtención de la recta cada estándar fue preparado por triplicado.

Las recuperaciones relativas en las muestras de orina fueron calculadas comparando el área de los picos de los AINEs en muestras blanco de orina enriquecidas con las mezclas de las soluciones estándar frente a las áreas de los picos de las soluciones estándares en agua Milli-Q a la misma concentración. Concretamente, se calcularon estas recuperaciones relativas a dos niveles de concentración, a 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Los factores de preconcentración se calcularon comparando el área de los picos de los compuestos analizados mediante CZE frente al área de los picos obtenidos aplicando la metodología *in-line* SDME-CE a la misma concentración (10 $\mu\text{g/mL}$). La repetitividad y reproducibilidad la define la desviación estándar relativa (RSD) en términos de área de pico, y fue calculada a partir de muestras blanco de orina enriquecidos a dos

niveles de concentración distintos, a 5 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La repetitividad se realizó analizando 5 réplicas en el mismo día y la reproducibilidad realizando 5 réplicas de cada análisis durante 5 días consecutivos.

3.1.2 Resultados y discusión

En la optimización de la separación, se seleccionó un BGE constituido por tetraborato sódico anhidro en base a previos estudios para el análisis de AINEs [17]. Para esta selección también se tuvo en cuenta la compatibilidad del BGE con la fase aceptora de la SDME, para hacer posible el acoplamiento *in-line* de las dos técnicas. En nuestro caso, fue necesaria una fase aceptora alcalina para transferir los analitos desde la fase orgánica (gota) hasta la fase aceptora. Por esta razón, un BGE básico como el constituido por tetraborato sódico es adecuado. Además, los analitos debido a que sus valores de pK_a están comprendidos entre 3 y 7, en estas condiciones se encuentran en forma iónica, lo cual también es un requisito necesario para que se pueda llevar a cabo su separación electroforética mediante CZE.

Con el objetivo de conseguir una separación óptima de los analitos, se evaluó el efecto de la concentración del BGE sobre la separación. Se examinaron diferentes concentraciones de tetraborato de sodio anhidro entre 20 y 50 mM. A las diferentes concentraciones estudiadas se obtuvieron buenos resultados en la separación, no obstante, se optó por una concentración de 40 mM ya que con ésta se obtuvo la mejor resolución de los picos empleando un voltaje de separación de 20 kV. Bajo estas condiciones, el tiempo de análisis fue de 12 minutos.

Con el fin de extraer los analitos, se optó por el empleo de la técnica de microextracción SDME debido a la posibilidad que ofrece extraer los analitos y de realizar el lavado de la muestra de una manera simple y automatizada cuando es combinada *in-line* con la CE.

Para optimizar el procedimiento de extracción mediante SDME, se consideraron varios factores importantes que influyen en la eficiencia de extracción, como la naturaleza de la fase orgánica, el pH de la fase dadora y aceptora, el volumen de las 3 fases, el tiempo de extracción y el tiempo de inyección.

Las condiciones iniciales del proceso de SDME fueron las siguientes: 400 μL de una solución estándar que contenía 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada AINE ajustada a pH 4 con 0.1 M de HCl mezclada con 300 μL de fase orgánica durante 5 segundos con un agitador vórtex. La fase aceptora (0.001 M NaOH) fue introducida dentro del capilar mediante inyección hidrodinámica de 50 mbar durante 220 segundos y posteriormente se formó la gota aplicando una presión negativa a 50 mbar durante 200 segundos. La gota se mantuvo durante 5 minutos y finalmente se inyectó la muestra a 50 mbar durante 3 segundos. La selección del volumen de la muestra se basó en requerimientos instrumentales. Por una parte, el volumen debe de ser lo más grande posible para obtener los mayores factores de preconcentración y, por otro lado, el volumen de la fase orgánica que se encuentra justo encima de la fase dadora debe de ser el suficiente para que el extremo del capilar, que contiene la fase aceptora (gota), quede totalmente inmerso en la fase orgánica.

Para analitos ácidos, como es el caso de los AINEs, que presentan unos valores de pK_a de entre 4 y 7, el pH de la fase dadora seleccionado fue de 4, en relación a los valores de pK_a para facilitar la distribución de los analitos desde ésta a la fase orgánica. Por otra parte, cabe que incrementando el pH de la fase acuosa aceptora, los analitos extraídos desde la fase orgánica se ionizan y de este modo, se evita que vuelvan a la fase orgánica. Con respecto al pH de la fase aceptora, éste debe asegurar la desprotonación con un valor de pH por encima de los valores de pK_a de los analitos para proporcionar una extracción óptima, por lo tanto, fue seleccionada una solución de NaOH 0.001 M (pH 11), de esta manera nos aseguramos que los analitos estén en forma ionizada para garantizar la separación electroforética mediante CZE.

En SDME, la correcta selección del solvente de extracción es una decisión importante para obtener una buena selectividad y eficiencia en la extracción. Para llevar a cabo la SDME en 3 fases, el solvente de extracción debe de tener una buena afinidad con los analitos de estudio, ser inmiscible en agua y tener una densidad más baja que el agua. En base a la bibliografía, se seleccionaron 4 solventes de extracción diferentes [16]. Concretamente, fueron evaluados los siguientes solventes: octanol, tolueno, una mezcla de DCM/tolueno (1:1) y acetato de etilo. Comparando entre estos solventes, el acetato de etilo fue el que proporcionó mayor reproducibilidad en la inyección de la muestra y estabilidad de la corriente durante el proceso de separación posterior, por lo tanto, se seleccionó para los siguientes estudios.

Otro parámetro relacionado con la fase orgánica es su volumen. La relación entre el volumen de ésta y de la muestra es un parámetro importante debido a que contribuye a tener una buena eficiencia en la extracción y a permitir que el extremo del capilar se mantenga sumergida en el centro de la fase orgánica. Debido a las pequeñas dimensiones del vial de CE, para llevar a cabo el proceso satisfactoriamente el volumen mínimo de fase orgánica necesario es de 300 μL . con la finalidad de asegurar la estabilidad de la gota y facilitar el transporte de los analitos hacia la fase aceptora. El volumen de la fase orgánica fue evaluado entre 300 y 500 μL en intervalos de 50 μL . Los mejores resultados de área de los picos analíticos estudiados se obtuvieron con un volumen de 300 μL , ya que a volúmenes más grandes la eficiencia de extracción es menor, posiblemente debido a que produce un efecto de dilución en ésta y los analitos que pasan finalmente a la fase aceptora son menos.

El pH es otro parámetro importante a tener en cuenta. Para obtener una buena eficiencia de extracción es necesario que el pH de la fase dadora este por debajo del pK_a de los analitos. Así se asegura que se encuentren en forma su neutra para que de este modo sean afines a la fase orgánica y se puedan extraer. Por lo tanto, se llevó a cabo el estudio de pH en el rango de 2 a 4 a intervalos de 0.5, por adición de

HCl 0.1 M. En los resultados obtenidos no se observaron diferencias significativas para el intervalo de pH evaluado. Finalmente, se seleccionó pH 2, un valor por debajo del pK_a de los analitos para asegurarse que los analitos se mantengan en forma neutra.

En el proceso *in-line* SDME, la formación de la gota es una etapa crucial. Al inicio, se introduce la fase aceptora (NaOH 0.001 M) en el extremo *inlet* de capilar que posteriormente tras aplicación de una presión negativa se forma la gota que es sumergida en la fase orgánica. Teniendo en cuenta esto, se han considerado algunos parámetros importantes como el tiempo y presión de la inyección de la fase aceptora, además del tiempo y presión negativa para la formación de la gota. Generalmente, el uso de una gota de mayores dimensiones puede incrementar la respuesta, por otro lado, las gotas grandes son más inestables y en ellas se produce la dilución de los analitos extraídos. En este sentido, se evaluaron diferentes presiones a 25 y 50 mbar para la inyección de la fase aceptora y para la inyección mediante presión negativa para la formación de la gota. Previamente, se observó que se requerían 20 segundos más en la etapa de la inyección de la fase aceptora que en la etapa de la formación de la gota para evitar la inestabilidad de la gota. Aplicando 220/200 segundos (tiempo de inyección de la fase aceptora/tiempo de presión negativa para la formación de la gota) a 50 mbar y 420/400 segundos a 25 mbar, no se observaron diferencias significativas en la estabilidad de la gota, por lo tanto, se seleccionó 50 mbar debido a que con estas condiciones el tiempo empleado es menor. Posteriormente, fueron estudiados los valores desde 220 a 620 segundos, y desde 200 a 220 segundos para la inyección de la fase aceptora y presión negativa para la formación de la gota, respectivamente. En los resultados obtenidos, se observó que la señal era directamente proporcional al tiempo hasta 420/400 segundos, pero a tiempos mayores la señal disminuía. Este fenómeno se muestra en la figura 26, y puede ser explicado por el hecho de que a tiempos mayores de 420/400 segundos, la extracción de los analitos alcanza su máximo valor en este punto y a tiempos de formación de la gota mayores se produce un efecto de dilución que

reduce la eficiencia de la extracción. Bajo las condiciones óptimas de formación de la gota (400 segundos, 50 mbar), se realizó una estimación del tamaño de la gota mediante la ecuación de Poiseuille siendo esta de 510 μL .

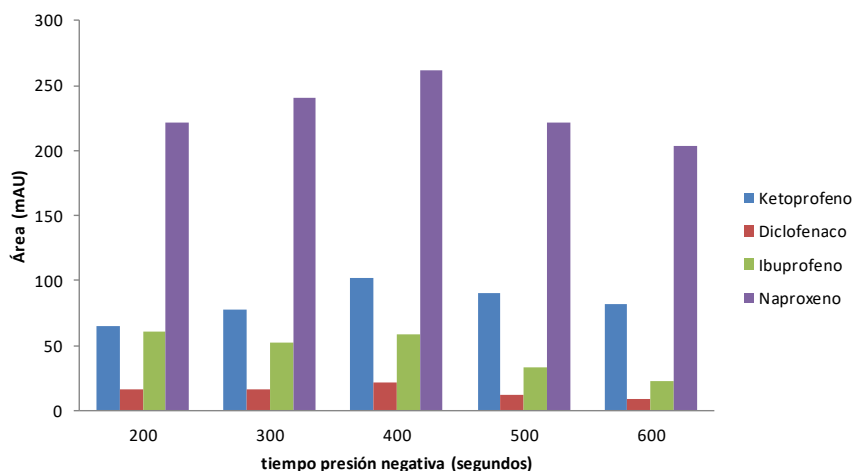


Figura 26. Efecto del tiempo de inyección de la presión negativa (50 mbar) de la formación de la gota sobre la eficiencia de extracción. Condiciones de extracción; 400 μL de muestra de AINEs a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a pH 2, mezclada con 350 μL de fase orgánica de acetato de etilo en el vórtex durante 5 segundos; fase aceptora de NaOH 0.001 M; tiempo de extracción 5 minutos; inyección a 50 mbar durante 3 segundos; y voltaje de separación a 20 kV.

También se estudió el tiempo de extracción. Se evaluaron los tiempos entre 5 hasta 20 minutos en intervalos de 5 minutos. En la figura 27, se observa que la eficiencia de la extracción incrementa con el tiempo de extracción hasta los 15 minutos. Después de este tiempo, la eficiencia disminuye principalmente en el caso del naproxeno, debido a la disolución de la gota en las fases dadora y aceptora. Teniendo en cuenta este efecto junto a la consideración de la reproducibilidad referente a la estabilidad de la gota, finalmente se optó por 10 minutos como un compromiso entre eficiencia de extracción y reproducibilidad.

142 | Parte experimental, resultados y discusión

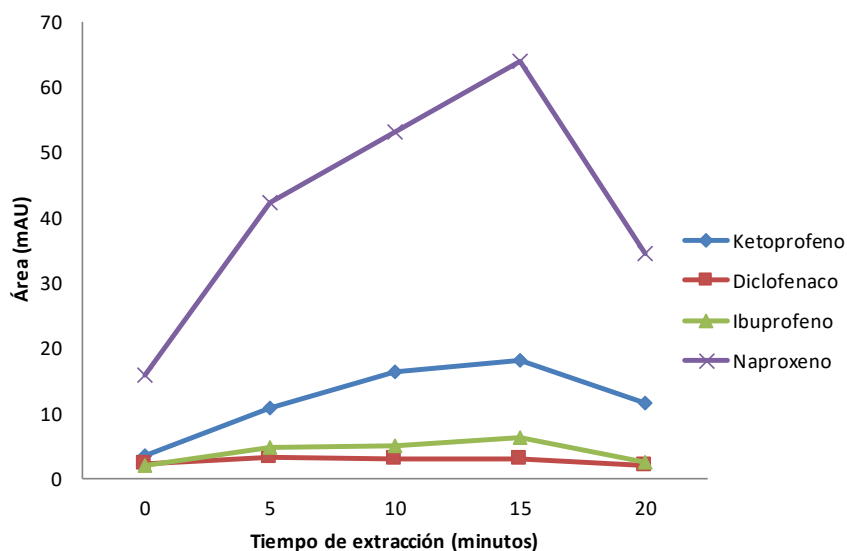


Figura 27. Efecto del tiempo extracción sobre la eficiencia de extracción. Las condiciones experimentales se muestran en la figura 26, excepto el tiempo de inyección de la fase aceptora y tiempo de formación de la gota, 420 segundos a 50 mbar y 400 segundos a -50mbar, respectivamente. Concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada AINE.

Las condiciones óptimas finalmente fueron un volumen de muestra de 400 μl pH 2 mezclada durante 2 minutos con 350 μl de acetato de etilo como fase orgánica. Una inyección de 420 segundos a 50 mbar y 400 segundos a -50 mbar para la formación de la gota.

Para la validación del estudio y demostrar la aplicabilidad del método desarrollado *in-line* SDME-CE se tomaron muestras de voluntarios sanos de nuestro laboratorio y se llevó a cabo el tratamiento de muestra que se describe en la sección 3.1.1. En la figura 28A se muestra un electroferograma de un blanco de orina obtenido con el método *in-line* SDME-CE optimizado. En la figura 28B se muestra un electroferograma de una muestra de orina enriquecida a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. También se observan algunos picos interferentes, pero es importante señalar que no afectaron al análisis de los AINEs, por lo que podemos resaltar que el método propuesto

es una estrategia efectiva que permite una limpieza de la muestra con un tratamiento de muestra simple, que solo requiere como etapas previas la centrifugación y acidificación de la muestra de orina.

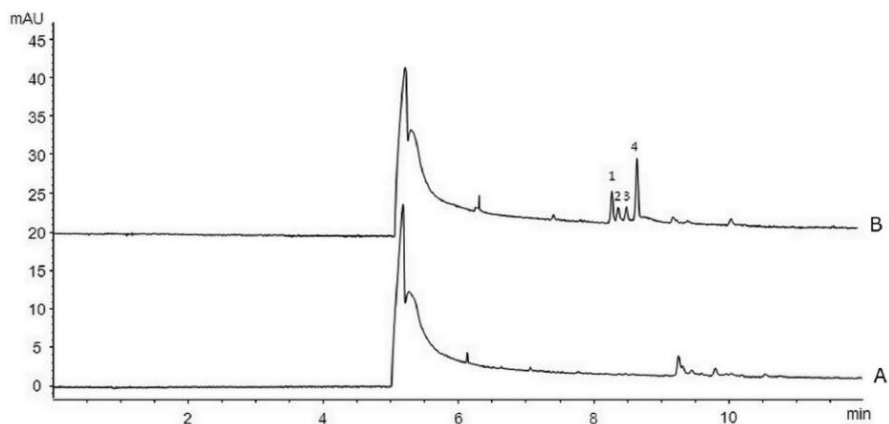


Figura 28. Electroferograma de un blanco de muestra de orina (A) y electroferograma de muestra de orina fortificada a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. (1) ketoprofeno, (2) diclofenaco, (3) ibuprofeno, (4) naproxeno. Las condiciones son las mismas que muestra la figura 27, con un tiempo de extracción de 10 minutos.

En la tabla 4 se muestran los intervalos de linealidad, los LODs y los factores de preconcentración que se obtuvieron. Los LODs se calcularon reduciendo la concentración de la mezcla de analitos hasta el punto en que la altura del pico de un analito es igual a 3 veces la altura del ruido de fondo (coeficiente entre señal del analito y señal del ruido de fondo igual a 3). Los factores de preconcentración obtenidos fueron de 12 para el ibuprofeno y 44 para el naproxeno. Estos valores no fueron muy elevados, no obstante, posibilitaron la detección en la orina en un intervalo de concentración adecuada para el análisis de los compuestos estudiados. En cuanto a los valores de %RSD para la reproducibilidad, a pesar de los altos valores obtenidos, éstos son similares a los reportados por otros autores que emplearon *in-line* SDME-CE para la limpieza y preconcentración de muestra [18,19].

Tabla 4. Datos de validación del método propuesto para la determinación de AINEs en muestras de orina

	ketoprofeno	diclofenaco	ibuprofeno	naproxeno
Intervalo de linealidad (ng/mL)	5-100	25-500	25-500	25-500
Ecuación de calibración ^{a)}	$y = 6.7957x + 0.0081$	$y = 4.877x + 4.2607$	$y = 6.9609x + 3.8888$	$y = 26.349x + 4.7594$
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9956	0,9451	0,9792	0,9868
LOD (ng/mL)	2.0	2.0	2.5	1.0
Repetitividad (% RSD; n=5)	50 µg/ml	9.8	9.5	11.8
	5 µg/ml	8.5	15.3	12.9
Reproducibilidad (% RSD; n=5)	50 µg/ml	19.2	10.5	14.1
	5 µg/ml	8.3	18.5	20.2
Factores de preconcentración	27	14	12	44

a) y ; valor de área del pico (mAU por segundo); x ; concentración (ng/mL)

La tabla 5 muestra los diferentes valores de las recuperaciones relativas obtenidos a 10 y 100 µg/mL para los AINEs estudiados. Se puede observar, que los valores están por encima de 82%. También se observó que a concentraciones de 100 µg/mL se obtuvieron mayores valores que a 10 µg/mL.

Tabla 5. Recuperaciones relativas realizadas en muestras blanco de orina enriquecida con los analitos a 2 niveles de concentración

Recuperaciones relativas (%)				
	ketoprofeno	diclofenaco	ibuprofeno	naproxeno
10 µg/mL	82	94	86	98
100 µg/mL	89	99	91	115

En método se aplicó al análisis de un paciente que se encontraba bajo prescripción médica de ibuprofeno con una dosis de 600 mg (1800 mg/día). La muestra fue recogida 5 horas después de la última toma de ibuprofeno. En la figura 29, se muestra el correspondiente electroferograma donde se confirma la presencia de ibuprofeno por comparación con los tiempos de migración obtenidos. Además, se confirmó identificación añadiendo un estándar de ibuprofeno. La concentración fue calculada mediante calibración por adiciones estándar debido a la presencia de interferencias en el electroferograma en la zona del analito estudiado. El valor obtenido fue de 14.7, siendo este valor comparable con los valores de farmacocinética y de vida media de los AINEs [20].

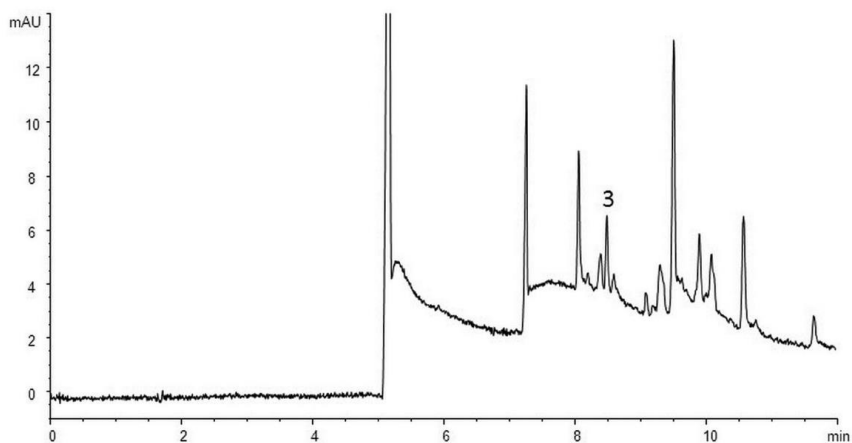


Figura 29. Electroferograma de una muestra de orina obtenida de un paciente bajo tratamiento con ibuprofeno. Las condiciones experimentales son las mismas que se muestran en la figura 28.

3.1.3. Bibliografía

- [1] S. Bacchi, P. Palumbo, A. Sponta, M.F. Coppolino, *Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review*, *Antiinflamm. Antiallergy Agents Med. Chem.*, 11 (2012) 52-64.
- [2] I. Melnikova, *Pain market*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 589-590.
- [3] S. Harirforoosh, W. Asghar, F. Jamali, *Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications*, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 16 (2013) 821-847.
- [4] Y. Pan, L. Zhang, F. Wang, X. Li, H. Wang, *Status of non-steroidal anti-inflammatory drugs use and its association with chronic kidney disease: A cross-sectional survey in China*, *Nephrology*, 19 (2014) 655-660.
- [5] M. Locatelli, V. Ferrone, R. Cifelli, R.C. Barbacane, G. Carlucci, *Microextraction by packed sorbent and high performance liquid chromatography determination of seven non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and urine*, *J. Chromatogr. A*, 1367 (2014) 1-8.
- [6] S. Riaño, M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 403 (2012) 2583-2589.
- [7] M. Villar Navarro, M. Ramos Payán, R. Fernández-Torres, M.A. Bello López, *Hollow fiber liquid-phase microextraction and determination of nonsteroidal anti-inflammatories by capillary electrophoresis and sulfonamides by HPLC in human urine*, *Biomed. Chrom.*, 27 (2013) 246-253.
- [8] P. Olszowy, B. Buszewski, *Urine sample preparation for proteomic analysis*, *J. Sep. Sci.*, 37 (2014) 2620-2928.
- [9] I. Baranowska, A. Wilczek, *A rapid UHPLC method for the simultaneous determination of selected B-blockers, nsoids, and their metabolites in human urine and water samples*, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.*, 33 (2010) 1776-1790.
- [10] B. Yilmaz, A.F. Erdem, *Determination of ibuprofen in human plasma and urine by gas chromatography/mass spectrometry*, *J. AOAC Int.*, 97 (2014) 415-420.

- [11] I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Simultaneous determination of weakly ionizable analytes in urine and plasma samples by transient pseudo-isotachopheresis in capillary zone electrophoresis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400 (2011) 527-534.
- [12] Y. He, H.K. Lee, *Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe*, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4634-4640.
- [13] M.C. Breadmore, R.M. Tubaon, A.I. Shallan, S.C. Phung, A.S. Abdul Keyon, D. Gstoettenmayr, P. Prapatpong, A.A. Alhusban, L. Ranjbar, H.H. See, M. Dawod, J.P. Quirino, *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2012–2014)*, *Electrophoresis*, 36 (2015) 36-61.
- [14] I. Kohler, J. Schappler, S. Rudaz, *Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 125-141.
- [15] K. Choi, S. J. Kim, Y. G., Jin, Y. O., Jang, J. S., Kim, D. S. Chung, *Single drop microextraction using commercial capillary electrophoresis instruments*. *Anal. Chem.*, 81 (2008) 225-230.
- [16] Z.A. Alothman, M. Dawod, J. Kim, D.S. Chung, *Single-drop microextraction as a powerful pretreatment tool for capillary electrophoresis: A review*, *Anal. Chim. Acta*, 739 (2012) 14-24.
- [17] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, M., C Aguilar, *Capillary electrophoresis for the analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs*, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 133-153.
- [18] K. Choi, J. Kim, Y. O.Jang, D. S. Chung, *Direct chiral analysis of primary amine drugs in human urine by single drop microextraction in-line coupled to CE*, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2905-2911.
- [19] J. Choi, K. Choi, J. Kim, A. Y. B. H. Ahmed, Z. A., Al-Othman, D. S. Chung, D. S. *Sensitive analysis of amino acids with carrier-mediated single drop microextraction in-line coupled with capillary electrophoresis*, *J. Chromatogr. A*, 1218, (2011) 7227-7233.
- [20] N.M. Davies, *Clinical pharmacokinetics of ibuprofen. The first 30 years*, *Clin. Pharmacokinet.*, 34 (1998) 101-154.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

3.2. *In-line* SPE como técnica de preconcentración para la determinación de cationas mediante electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Como hemos comentado en la introducción, la determinación de catinonas en diferentes tipos de muestras biológicas, como la orina, el cabello o el plasma sanguíneo, es importante para la realización de estudios farmacocinéticos, así como para estudiar sus efectos y su toxicidad. Por este motivo en los últimos años se han desarrollado diferentes métodos analíticos para la determinación de este tipo de compuestos en muestras clínicas y forenses para llevar a cabo su determinación [1-4]. Las catinonas son sustancias quirales, por lo tanto, también se debe tener en cuenta la naturaleza quiral de estos compuestos, ya que los efectos de cada enantiómero pueden ser diferentes [5]. Además, en matrices biológicas como la orina estos compuestos se encuentran a bajos niveles de concentración. Por todo ello, es necesario llevar el empleo de estrategias de preconcentración para llevar a cabo su determinación.

La CE es una técnica que se ha aplicado con éxito para la separación y determinación de estas sustancias tal como se ha comentado en el apartado 1.8. Estas separaciones se realizan generalmente utilizando el método de separación CZE o MEKC. Con el fin de conseguir la separación enantiomérica de estos compuestos mediante CE, una práctica extendida es el uso de ciclodextrinas (CDs) como selector quiral, ya que con la simple adición de éstas al BGE se obtienen buenos resultados en la separación [2, 6-8].

Para solventar el problema de la sensibilidad de CE y al mismo tiempo poder obtener LODs bajos, se han desarrollado diferentes estrategias. En este trabajo, se seleccionó la *in-line* SPE para la determinación y preconcentración de las catinonas en muestras de orina.

En la bibliografía se pueden encontrar pocos trabajos en los que se ha empleado la CE para la determinación de catinonas en muestras biológicas. No obstante, Švidrnoch y col. [9] desarrollaron un método basado en MEKC para la determinación de 16 catinonas en muestras de orina empleando la SPE como tratamiento previo de muestra y recientemente, Baciu y col. [2] desarrollaron una metodología

basada en *in-line* SPE-CE para la determinación enantiomérica de la mefedrona y la MDPV en muestras de cabello.

En el acoplamiento *in-line* SPE-CE la preconcentración y la separación electroforética se lleva cabo en el mismo capilar de separación. Es por eso que el acoplamiento *in-line* SPE-CE puede resultar un gran beneficio en forma de tiempo y ahorro de uso de disolventes comparándolo con la SPE *off-line* convencional. Además, la cantidad de sorbente necesario para la fabricación de un SPE *in-line* es muy pequeña.

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un método *in-line* SPE mediante CE para la determinación de catinonas sintéticas en orina humana. Hasta la fecha no se tiene constancia de que la CE haya sido empleada para la determinación de catinonas en orina.

Los compuestos seleccionados fueron la α -pirrolidinopentiofenona (α -PVP), la 2-(metilamino)-1-fenil-1-pentanona (pentadrona), la 3,4-dimetilmetacatinona (DMMC) y la 3,4-metilenedioxipirovelerona (MDPV), debido a que es de interés el desarrollo de métodos analíticos para su identificación en muestras biológicas, ya que son relativamente nuevas y tienen efectos nocivos para el ser humano.

En este estudio se lleva a cabo la optimización de las condiciones que influyen en la eficacia, tiempo de análisis y selectividad del método. También se emplearon diferentes tipos de ciclodextrinas (CDs) para alcanzar una separación enantiomérica efectiva. Posteriormente, se estudió el acoplamiento *in-line* SPE, así como los diferentes parámetros que influyen en el proceso de preconcentración. Finalmente, se propuso la metodología *in-line* SPE-CE para el análisis de las catinonas estudiadas en muestras de orina humana.

3.3.1 Materiales y métodos

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico. El MeOH fue suministrado por VWR International Eurolab S.L. (Barcelona). Las cationas α -PVP, MDPV, DMMC y pentadrona se adquirieron a LGC Standards (Barcelona, España).

El hidróxido sódico (NaOH) 97%, ácido fórmico 98%, ácido hidroclicóric 37%, ácido fosfórico 85%, acetato de etilo (EA), dimetilsulfóxido (DMSO), hexano y las ciclodextrinas α -CD 98%, β -CD 97%, γ -CD 98% se adquirieron a Sigma-Aldrich (Madrid, España). El agua Milli-Q utilizada en la preparación de las soluciones se obtuvo a partir de un sistema de purificación Veolia Waters (Barcelona, España). Los cartuchos de Oasis HLB (tamaño de partícula de 60 μm) fueron suministrados por Waters (Milford, MA, Estados Unidos).

Las soluciones estándar para cada compuesto estudiado se prepararon a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol y se almacenaron a -20°C . Las soluciones estándar trabajo de los cuatro compuestos fueron preparadas semanalmente a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MeOH. Las soluciones patrón de trabajo a concentraciones bajas se prepararon diariamente diluyendo volúmenes apropiados de las soluciones estándar con agua Milli-Q y fueron almacenadas a la temperatura de 4°C . La solución de BGE se preparó diariamente y se filtró antes de su uso.

Instrumentación

La instrumentación utilizada para la separación electroforética se realizó en un sistema 7100 CE Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) equipado con un detector ultravioleta de diodos en línea (DAD). Para el procesamiento de datos, se utilizó el *software* Agilent 3D Chemstation. Los capilares de sílice utilizados con unas dimensiones de 50 y 150 μm de diámetro interno y 360 de diámetro

externo, fueron comprados a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, Estados Unidos). Los capilares fueron cortados con una pieza cerámica (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) y con la ayuda de un microscopio óptico binocular Nikon Modelo SE (Amstelveen, Holanda). Todas las medidas de pH se realizaron con un pHmetro de laboratorio Basic 20+ Crison (Barcelona, España) y para el pretratamiento de las muestras fue empleada una centrifuga Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Alemania).

Condiciones de la CE

La separación mediante CE se realizó en un capilar de 80 cm de longitud (72.5 cm de longitud efectiva) con un diámetro interno de 50 μm y un diámetro externo de 360 μm . El voltaje de separación aplicado fue de + 30 kV. El BGE empleado fue una solución acuosa de fosfato monosódico 80 mM (ajustado con ácido fosfórico a pH 2.5) con 10 mg/mL de β -CD. Antes del primer uso, el capilar se acondicionó con NaOH 1 M durante 40 min y agua Milli-Q durante 10 minutos. Al comienzo de cada día, el capilar se acondicionó con NaOH 1 M durante 5 min, agua Milli-Q durante 5 min y BGE durante 10 min. Entre análisis, el capilar se acondicionó con 1 M NaOH durante 5 minutos, agua Milli-Q 5 minutos y BGE 5 minutos. Las muestras estándar se inyectaron hidrodinámicamente aplicando una presión de 50 mbar durante 3 s.

Para la realización de la *in-line* SPE, el primer paso es la construcción del dispositivo de SPE. Primero se cortaron 2 mm de capilar de sílice de 150 μm de diámetro interno y 360 μm de diámetro externo. Esta pequeña pieza de capilar denominada concentrador de analitos (AC), es introducida 1 mm en un tubo de 5 mm de politetrafluoroetileno (PTFE) (Grupo Taper, Madrid, España) con un diámetro interno de 250 μm . En el otro extremo del tubo de PTFE se introduce un fragmento de capilar de 7.5 cm de longitud y 50 μm de diámetro interno hasta conectarse completamente con el fragmento de capilar de 2 mm. A continuación, el extremo libre del capilar de 50 μm de diámetro interno se conecta a una bomba de vacío con una jeringa y

el extremo libre del capilar de 150 μm de diámetro interno se introduce en un vial que contiene el sorbente (Oasis HLB). Después el fragmento de 2 mm se llena de partículas de sorbente que se quedan retenidas debido al tamaño de partícula que es de 60 μm . Previamente a la utilización de las partículas de sorbente, éstas han sido tamizadas con un tamiz con un tamaño 50 μm para garantizar que el tamaño de las partículas del sorbente sea mayor de 50 μm y no se introduzca en el capilar de separación ya que podría introducirse en éste e interferir en el análisis. Posteriormente, se desplaza el capilar de 50 μm de diámetro interno para situar el fragmento de 2 mm en la mitad del tubo de PTFE. Al otro lado del tubo se introduce el capilar de separación de 72.5 cm de longitud hasta que las 3 partes estén totalmente unidas. Finalmente, el montaje se instala en un *cassette* CE y se comprueba que el flujo a través del capilar sea normal antes del análisis. Entre análisis el capilar con el dispositivo de SPE se acondiciona con MeOH durante 4 minutos y agua Milli-Q ajustada a pH 10 con NaOH 1 M durante 4 minutos a 930 mbar.

La figura 30 muestra un diagrama de las etapas de preconcentración y posterior separación mediante el procedimiento *in-line* SPE-CE. El primer paso consiste en la inyección de muestra a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 930 mbar durante 10 minutos (A). A continuación, se lleva a cabo un lavado con el BGE (pH 2.5) a 930 mbar durante 2 minutos (B). Esta etapa permite eliminar las moléculas que no se han retenido en el sorbente durante la etapa de carga de muestra. También permite equilibrar el capilar antes de la elución y posterior separación de los analitos. Para la etapa de elución se inyecta el solvente de elución, concretamente MeOH con ácido fórmico al 2% (v/v) a 50 mbar durante 20 segundos (C). Posteriormente, éste es impulsado a través del sorbente mediante el BGE a 50 mbar durante 220 segundos (D) con el fin de desplazar el solvente de elución a través del sorbente y así eluir los analitos para que posteriormente se lleve a cabo la separación. Finalmente se aplica un voltaje de +30 kV para la separación electroforética de los analitos (E).

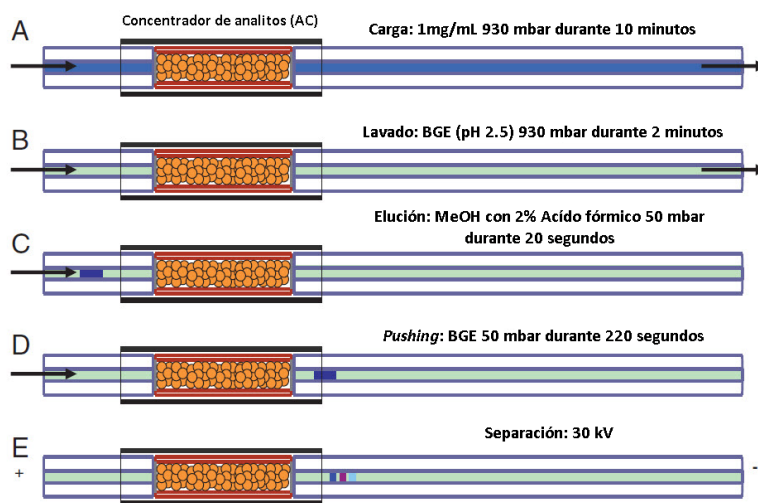


Figura 30. Diagrama del procedimiento *in-line* SPE

Toma de muestra y almacenamiento

Las muestras de orina fueron recolectadas de voluntarios adultos sanos entre el personal del laboratorio. Las muestras fueron almacenadas en tubo de polipropileno a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la realización de los análisis.

Preparación de las muestras de orina

En el momento de realizar el análisis se descongeló la muestra a temperatura ambiente y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos. Después, el sobrenadante fue filtrado a través de un filtro de nylon de $0.22\text{ }\mu\text{m}$ (Linealab, Barcelona). Posteriormente, se realizó una LLE utilizando un 1 mL de muestra de orina ajustada a pH 10 con NaOH 0.1 M. Como disolvente se empleó 1 mL de EA/Hexano. Tras mezclar con el vórtex durante 1 minuto se centrifugó durante 10 min 7000 rpm. Se recogió la fase orgánica y se transfirió a un vial al que se le añadió 20 μL de DMSO para evitar la completa evaporación del solvente y posteriormente se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 . Como última etapa, se reconstituyó la muestra con 1 mL de agua

Milli-Q ajustada con NaOH 0.1 M a pH 10. Finalmente, se aplicó el procedimiento *in-line* SPE explicado con anterioridad.

3.2.2 Resultados y discusión

Los analitos estudiados presentan grupos amino y tienen unos valores de pK_a comprendidos entre 7,21 y 8,49, por lo tanto, con el fin de mantener los analitos cargados positivamente en el BGE y así que puedan migrar hacia el extremo del cátodo, el pH del BGE se ajustó a 2,5 con ácido fosfórico.

En los experimentos iniciales, se evaluó la separación quiral mediante CZE de los compuestos utilizando un BGE de fosfato monosódico a diferentes concentraciones entre 50 y 100 mM, a intervalos de 10 mM. La elección del BGE se basó en estudios previamente publicados en los que se utilizaron satisfactoriamente BGEs constituidos con fosfato de sodio para analizar diferentes drogas de abuso mediante CE [7,10].

Este estudio se llevó a cabo inyectando soluciones estándar que contenían los analitos a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ a 50 mbar durante 3 segundos empleando un voltaje de separación de 30 kV. Las demás condiciones de acondicionamiento del capilar fueron las mismas que las descritas en el apartado anterior 3.2.1. Tras el estudio, se seleccionó una concentración 80 mM de fosfato monosódico debido a que se obtuvieron mejores resultados en la separación y resolución para los analitos estudiados. No obstante, uno de los objetivos planteados en este estudio era la separación quiral de la catinonas incluidas. Por ello, se llevó a cabo el estudio de la separación quiral.

Basándose en los trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía donde se emplean CDs como selectores quirales [2, 6-8], para la separación quiral se estudiaron diferentes tipos de CDs, en concreto, α -CD, β -CD, γ -CD. Para estudiar qué tipo de CD muestra los mejores

resultados se añadió al BGE 5 mg/L de cada una por separado y se hicieron análisis en las mismas condiciones de separación que las utilizadas en la elección del BGE. En este estudio se observó que con el empleo de β -CD se obtenía una mejor separación de todos los enantiómeros, respecto a α -CD, γ -CD, posiblemente porque las dimensiones de la cavidad interna de la β -CD son más adecuadas para el que se produzca el complejo CD-enantiómero. En este sentido, la β -CD fue seleccionada como selector quiral. Estos resultados corroboran el trabajo de Merola y col. [7] en el que también se evaluaron diferentes tipos de CDs y los mejores resultados se obtuvieron empleando β -CD para 12 catinonas sintéticas.

Una vez escogida la β -CD como selector quiral, se estudió su concentración. A mayores concentraciones de ciclodextrinas en el medio de separación, la probabilidad de que se forme el complejo CD-enantiómero es mayor, por lo tanto, se pueden separar una mayor cantidad de analitos [11]. Se probó cuatro concentraciones diferentes de β -CD entre 5 y 12 mM, ya que está documentado que a concentraciones por encima de 12 mM la solubilidad en agua de las CDs es limitada y en caso de precipitación podría provocar obstrucciones en el capilar [12]. Las condiciones de separación fueron las mismas que en el estudio anterior para la selección del tipo de CDs. A bajas concentraciones, los resultados muestran una peor separación, debido a que si hay poca cantidad de selector quiral la probabilidad de que se forme el complejo es menor. A concentraciones altas de CDs (10-12 mM) no se observaron diferencias significativas por lo tanto se seleccionó la de 10 mM para asegurarse no estar en el límite del valor de esta en la solubilidad en agua, para evitar posibles problemas de precipitación y de obstrucción del capilar. En la figura 31, se muestra la separación mediante CD-CZE de los compuestos estudiados con las condiciones óptimas.

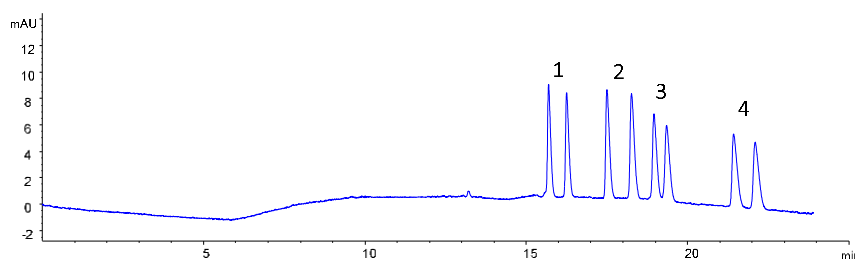


Figura 31. Electroferograma obtenido mediante CD-CZE. α -PVP (1), pentadrona (2), DMMC (3), MDPV (4) a 100 ng/mL. BGE 80mM fosfato monosódico + β -CD 10 mg/mL; inyección 50 mbar/3 segundos; voltaje de separación 30 kV.

Posteriormente, se propuso desarrollar el método *in-line* SPE-CE para la separación enantiomérica y preconcentración de la α -PVP, la pentadrona, la DMMC y la MDPV.

Basándose en estudios de previos de nuestro grupo [2], el tipo de sorbente seleccionado para la *in-line* SPE fue el Oasis HLB. El Oasis HLB es un sorbente polimérico con un grupo polar, con características de retención tanto hidrófilo como lipofílico, y por lo tanto capaz de extraer compuestos ácidos, neutros y básicos en un amplio rango de pH. Considerando los valores de pK_a de los compuestos diana (entre 7,21 y 8,49), el pH de la muestra se alcaliniza a pH 10 con NaOH 0.1 M para asegurar unas condiciones adecuadas para retener los analitos, ya que, a este valor de pH, éstos no están cargados y su retención en el sorbente se ve favorecida. En base a estos trabajos también se seleccionó el MeOH con un 2% de ácido fórmico (v/v) como solvente de elución. En estas condiciones nos aseguramos que todos los compuestos estudiados están cargados positivamente en la etapa de elución, por lo tanto, se liberan más fácilmente del sorbente.

Las condiciones iniciales en el procedimiento *in-line* SPE fueron, la carga de una solución patrón a una concentración de 1 mg/mL mediante inyección hidrodinámica a 930 mbar durante 10 minutos, el lavado de la muestra mediante inyección hidrodinámica de BGE (pH 2.5) a 930 mbar durante 2 minutos, la etapa de elución inyectando hidrodinámicamente MeOH con un 2% de ácido fórmico

a 50 mbar durante 20 segundos, la etapa *pushing* inyectando el BGE hidrodinamicante durante 20 segundos a 50 mbar y con una separación a 30 kV.

Con el fin de obtener buenas recuperaciones, se ha realizado un estudio de la etapa de elución, concretamente el volumen de elución y el volumen de *pushing*. El *pushing* es una etapa que consiste en desplazar mediante una inyección hidrodinámica de BGE el *plug* de elución (MeOH con un 2% de ácido fórmico) a través del sorbente y así eluir los analitos del mismo. Se evaluó el tiempo de *pushing* entre 200, 220 y 250 segundos aplicando una presión de 50 mbar en base al trabajo comentado anteriormente. Se seleccionó el tiempo de 220 segundo debido a que con estas condiciones se obtuvieron los mejores resultados de separación y tiempo de análisis. Por lo tanto, este valor ha sido escogido para los estudios posteriores. Mediante la fórmula de *Poiseuille* se estimó que este volumen que comprende, siendo este de 255 nL. Esta variable es importante debido a que permite a las catinonas retenidas en el sorbente puedan atravesarlo y llegar al capilar de separación. Un tiempo demasiado corto de *pushing* haría que los compuestos no puedan salir del concentrador de analito. En cambio, un tiempo demasiado largo de *pushing* hace que las catinonas avancen demasiado por el capilar de separación, haciendo así que se reduzca la longitud efectiva del capilar y, en consecuencia, se obtendría una resolución menor.

También se estudiaron diferentes tiempos de elución, concretamente introduciendo el eluyente mediante inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 10, 15, 20, 25 y 30 segundos. Se observó que las áreas de los picos aumentaban hasta el tiempo de 20 segundos, y a partir de este tiempo estos valores se mantenían constantes, posiblemente porque con 20 segundos ya es suficiente para eluir todos los compuestos. Además, a partir de 20 segundos los tiempos de retención se prolongaban y los picos se ensanchaban ligeramente. Por estos motivos, el tiempo de elución fue fijado en 20 segundos.

Con el fin de inyectar más cantidad de muestra en el capilar y así aumentar la señal detectada, se estudió el tiempo de inyección de una solución de una mezcla de los compuestos estudiados a una concentración de 100 ng/mL entre 20 y 40 minutos. A continuación, en la figura 32 se muestra el efecto del aumento de la carga de la muestra en el área de los picos.

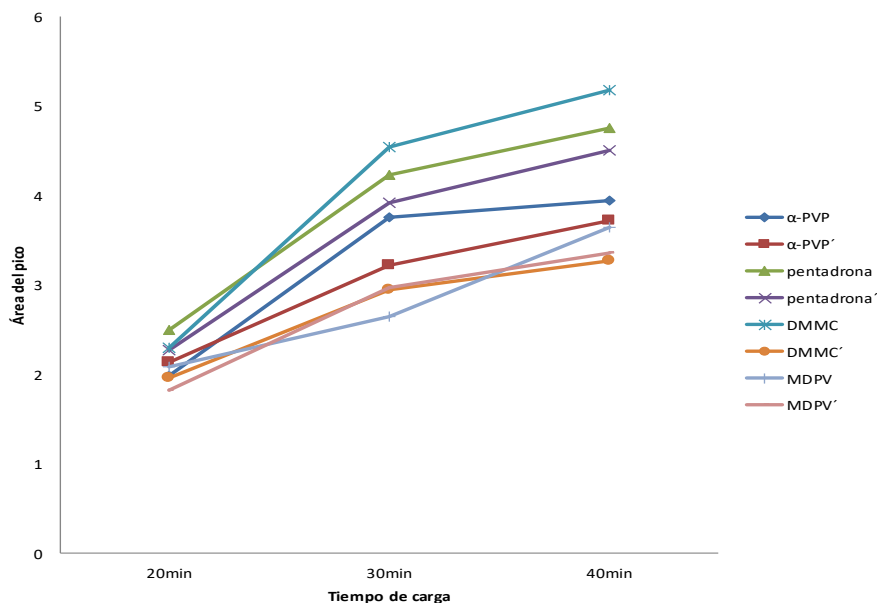


Figura 32. Efecto del tiempo de carga de la muestra en el área del pico de los analitos mediante *in-line* SPE-CE. Inyección hidrodinámica a 930 mbar de solución estándar de los compuestos estudiados a una concentración de 100 ng/mL. Volumen de elución 20 segundos a 50 mbar, volumen de *pushing* 220 segundos a 50 mbar (n = 3).

Como se observa, a medida que se inyecta más cantidad de muestra la señal aumenta para todos los analitos sin llegar al punto de ruptura de la *in-line* SPE. Por este motivo, se seleccionó el tiempo de 40 minutos como tiempo óptimo.

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del método desarrollado *in-line* SPE-CE se tomaron muestras de orina en voluntarios sanos de nuestro laboratorio. Se realizó una búsqueda bibliográfica para el

tratamiento de la muestra de orina para la determinación de este tipo de compuestos y se seleccionó la LLE llevada a cabo por Natta y col. [13] debido a que obtuvieron buenas recuperaciones en el proceso de extracción. El tratamiento de muestra que se describe en la sección 3.2.1. En la en la figura 36A se muestra un electroferograma de un blanco de muestra de orina y en la figura 36B se muestra un electroferograma de una muestra de orina enriquecida a una concentración de 10 ng/mL y, ambos obtenido con el método *in-line* SPE-CE optimizado. Para confirmar la identificación, sus espectros de absorción UV-Vis fueron analizados y corresponden con los espectros de los analitos. Además, se realizaron adiciones estándar para asegurar su correcta identificación. Por lo tanto, el método propuesto es una estrategia efectiva que permite la preconcentración de los analitos estudiados y su detección en muestras de orina. En la bibliografía podemos encontrar diversos trabajos [14,15] en los cuales han sido detectadas diferentes catinonas en la orina en varios casos de intoxicación. Estas sustancias se suelen encontrar en un intervalo de concentración en la orina de entre 86 y 3800 ng/mL para α -PVP, 300 ng/mL para efedrona [14] y entre 340 y 13860 ng/mL en el caso de MDPV [15], por lo que el método propuesto sería válido para detectar este tipo de sustancias en el intervalo de concentración que se suele encontrar en la orina.

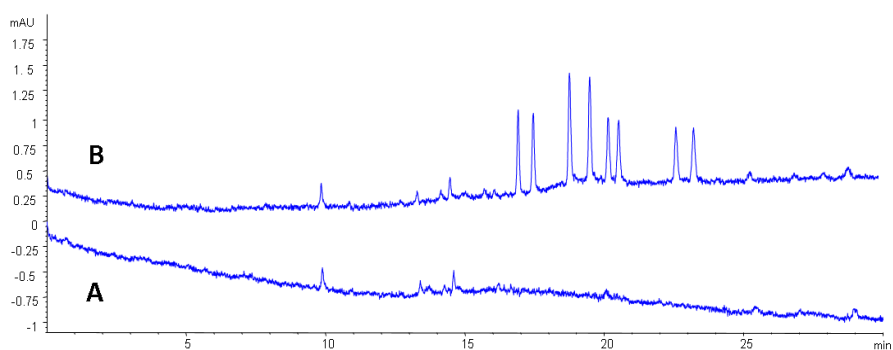


Figura 36. Electroferograma de un blanco de muestra de orina (A) y electroferograma de una muestra de orina fortificada a una concentración de 10 ng/mL (B); (1) α -PVP, (2) pentadrona, (3) DMMC, (4) MDPV

3.2.3 Bibliografía

- [1] K.N. Ellefsen, M. Concheiro, M.A. Huestis, *Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases*, *Drug. Metab. Rev.*, 48 (2016) 237-265.
- [2] T. Baciú, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Enantioselective determination of cathinone derivatives in human hair by capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction*, *Electrophoresis*, 37 (2016) 2352-2362.
- [3] L. Gautam, A. Shanmuganathan, M. Cole, *Forensic analysis of cathinones*, *Forensic Sci. Rev.*, 25 (2013) 47.
- [4] J.P. Smith, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, *An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs)*, *The Analyst*, 140 (2015) 4932-4948.
- [5] K.M. Rentsch, *The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory*, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 54 (2002) 1-9.
- [6] S. Mohr, S. Pilaj, M.G. Schmid, *Chiral separation of cathinone derivatives used as recreational drugs by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis*, *Electrophoresis*, 33 (2012) 1624-1630.
- [7] G. Merola, H.Z. Fu, F. Tagliaro, T. Macchia, B.R. McCord, *Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection*, *Electrophoresis*, 35 (2014) 3231-3241.
- [8] M. Taschwer, M.G. Hofer, M.G. Schmid, *Enantioseparation of benzofurys and other novel psychoactive compounds by CE and sulfobutylether β -cyclodextrin as chiral selector added to the BGE*, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2793-2799.
- [9] M. Švidrnoch, L. Lněničková, I. Válka, P. Ondra, V. Maier, *Utilization of micellar electrokinetic chromatography–tandem mass spectrometry employed volatile micellar phase in the analysis of cathinone designer drugs*, *J. Chromatogr. A*, 1356 (2014) 258-265.
- [10] T. Baciú, I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Capillary electrophoresis and related techniques in the determination of drugs of abuse and their metabolites*, *Trends Anal. Chem.*, 74 (2015) 89-108.

Parte experimental, resultados y discusión | 164

- [11] P. Řezanka, K. Navrátilová, M. Řezanka, V Král, D. Sýkora. *Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 35 (2014) 2701-2721.
- [12] A. Aranyi, A. Péter, I. Ilisz, F. Fülöp, G.K.E. Scriba, *Cyclodextrin-mediated enantioseparation of phenylalanine amide derivatives and amino alcohols by capillary electrophoresis—Role of complexation constants and complex mobilities*, *Electrophoresis*, 35 (2014) 2848-2854.
- [13] K. V. Natta, M. Kozak, Quantification on Bath Salts/Cathinones in Urine by LC-MS/MS. Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA. Application Note 596
- [14] P. Adamowicz, J. Gieroń, D. Gil, W. Lechowicz, A. Skulska, B. Tokarczyk. *The prevalence of new psychoactive substances in biological material—a three-year review of casework in Poland*, *Drug Test. Anal.*, 8 (2016) 63-70.
- [15] H. A. Spiller, M. L. Ryan, R. G. Weston, J. Jansen. *Clinical experience with and analytical confirmation of “bath salts” and “legal highs”(synthetic cathinones) in the United States*, *Clin. Toxicol.*, 49 (2011) 499-505.

3.3. *Pressure-assisted electrokinetic injection* (PAEKI) como técnica de preconcentración para la determinación de filtros ultravioleta mediante electroforesis capilar

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

Los filtros ultravioleta son frecuentemente utilizados como aditivos en productos de uso diario tales como cosméticos, cremas hidratantes, productos para después del afeitado, barras de labios, champús, maquillaje y protectores solares [1]. Debido a que tienen la propiedad de bloquear o reflejar la radiación ultravioleta de la luz solar, se utilizan para evitar daños en la piel como quemaduras de sol y el cáncer de piel [2]. La UE reconoce y regula 26 compuestos diferentes que están permitidos para este uso. El contenido máximo de estos compuestos en los cosméticos está regulado por la legislación actual, a una concentración habitual entre 0, 1% y 10% (p/p) [3].

Las principales fuentes de contaminación de los filtros ultravioleta son las descargas de aguas residuales industriales, las actividades de baño y las plantas de tratamiento de aguas residuales [2]. La persistencia de estos contaminantes en el medio ambiente es motivo de gran preocupación por los posibles efectos sobre la salud en los seres humanos. Se ha demostrado que los filtros ultravioleta también presentan la capacidad de modificar la actividad hormonal, en particular los derivados de la benzofenona, lo que sugiere que pueden inducir un riesgo en la fauna acuática y en los seres humanos [4, 5]. Se sospecha que este tipo de filtros ultravioleta poseen propiedades de disruptores endocrinos. Varios estudios afirman que estas propiedades están en relación con diversas enfermedades endocrinas tales como algunos trastornos reproductivos, la infertilidad, la obesidad, la diabetes y los trastornos del desarrollo neurológico [3-6]. Por todo ello, se plantea este estudio con el objetivo principal de desarrollar un método para la determinación de filtros ultravioletas a bajos niveles de concentración utilizando CE y la técnica de preconcentración PAEKI. Para conseguir este objetivo se plantea como objetivo secundario evaluar el potencial de la técnica de preconcentración PAEKI como estrategia para la mejora de la sensibilidad en el análisis de filtros ultravioleta mediante la CE.

La técnica de preconcentración electroforética PAEKI fue utilizada por primera vez por Feng y col. en 2006 [7] y posteriormente desarrollada por Zhang y col. [8]. Cuando se aplica la técnica PAEKI, los analitos se acumulan en el límite entre el BGE de separación y de la muestra, y se van apilando según los principios de *stacking*. En la inyección, el flujo electroosmótico (EOF) se equilibra con una presión hidrodinámica externa posibilitando que se puedan realizar inyecciones más prolongadas e introduciendo más cantidad de analitos en el capilar, lo que posteriormente se traducirá en mayor preconcentración y por lo tanto mayor señal analítica en la detección.

3.3.1. Materiales y métodos

Reactivos y soluciones

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. El MeOH fue suministrado por VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, España) y el ácido clorhídrico (35% v/v), acetato de etilo (EA) y hexano por Panreac (Barcelona, España). El tetraborato de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$), el hidróxido de sodio (NaOH) y el cloruro sódico (NaCl), la benzofenona-3 (BP-3), la 2,2-dihidroxi-4-metoxibenzofenona (DHMB), la 2,4-dihidroxibenzofenona (DHB) y el ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico (PMDSA) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El agua Milli-Q se obtuvo a partir de un sistema de purificación de agua Veolia Waters (Barcelona, España).

Al inicio se prepararon las soluciones estándares individuales de cada filtro ultravioleta a 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en MeOH, excepto el PMDSA que se preparó en una mezcla de MeOH-Agua (80:20) debido a que en MeOH al 100% no se disolvía totalmente. Estas soluciones se conservaron a -20°C y a partir de estas soluciones, cada día se prepararon las soluciones estándares mezcla de todos los analitos a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua Milli-Q. Todas las soluciones

se almacenaron en un matraz de vidrio oscuro a 4°C. La solución de BGE se preparó diariamente y se filtró antes de su uso.

Instrumentación

Los análisis mediante CE se realizaron con un instrumento HP 3D (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de diodos en línea (DAD). Para el procesamiento de datos, se utilizó el *software* ChemStation B.04.03. Se utilizaron capilares diferentes, uno de 60 cm (52 cm de longitud efectiva) para la optimización de la separación y otro de 100 cm (92 cm de longitud efectiva) para el estudio de la técnica de preconcentración PAEKI. Los capilares tenían un diámetro interior de 50 μm y un diámetro externo de 360 μm , y fueron adquiridos a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, Estados Unidos). Todas las medidas de pH se realizaron con un pHmetro de Laboratorio Basic 20+ Crison (Barcelona) y para el pretratamiento de las muestras fue empleada una centrífuga Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Alemania).

Condiciones de la CE

Para la separación mediante CZE, el BGE estaba constituido por tetraborato de sodio anhidro a una concentración de 40 mM (pH 9.2). Este fue preparado disolviendo la cantidad apropiada de tetraborato de sodio en agua Milli-Q, sonicado durante 5 minutos y filtrado con un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 μm adquirido en Linealab (Barcelona, España).

Antes del primer uso, el capilar fue acondicionando haciendo pasar a través suyo NaOH (1 M) aplicando una presión de 930 mbar durante 40 minutos y agua Milli-Q durante 10 minutos. Cada día, el capilar fue acondicionado haciendo pasar 5 minutos de NaOH (1 M), 5 minutos de agua Milli-Q y 10 minutos de BGE. Entre experimentos, el capilar fue acondicionado con 3 minutos de NaOH (1 M), 3 minutos de agua Milli-Q y 5 minutos de BGE a 930 mbar. Las inyecciones se realizaron aplicando una presión de 50 mbar durante 3 segundos

sobre el vial *inlet*. La polaridad empleada para la separación fue de +20 kV y la longitud de onda seleccionada para la detección fue de 200 nm. Todos los experimentos fueron realizados a una temperatura del compartimento del capilar de 25°C.

En la figura 37 se muestra el diagrama con las condiciones óptimas del PAEKI-CE. Las condiciones finales después de optimizar los parámetros principales que afectan a PAEKI fueron, la utilización de un capilar de 100 cm (92.5 efectiva) usando como medio de separación un BGE de tetraborato sódico anhidro 40 mM (pH 9.2). Se aplicó una inyección de una muestra a pH 10 aplicando una contrapresión de 50 mbar y simultáneamente una diferencia de potencial de -7.5 kV durante 3 minutos.

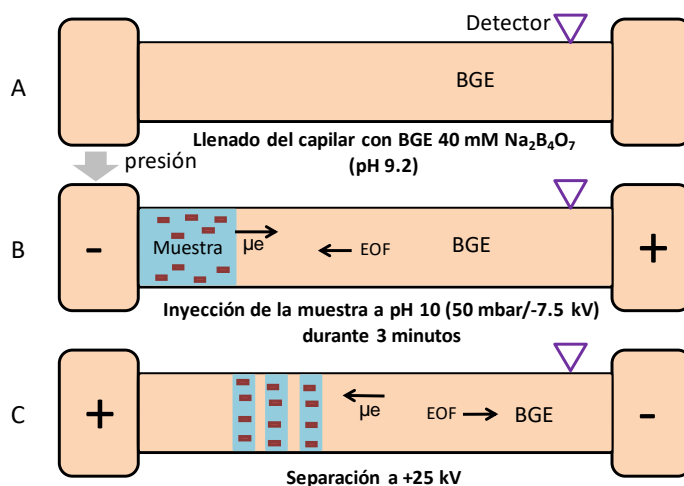


Figura 37. Diagrama del procedimiento PAEKI-CE con las condiciones óptimas.

Validación del método

La calibración instrumental se realizó mediante la preparación de estándares enriquecidos con la cantidad apropiada de una mezcla de los filtros ultravioleta a concentraciones finales de 25, 50, 100, 200 y 500 ng/mL en agua Milli-Q. Cada estándar fue preparado por triplicado.

Preparación de las muestras

Se estudiaron dos tipos de muestras diferentes, por un lado, muestras de orina y por otro, un producto cosmético, concretamente una crema solar comercial. Para el tratamiento de muestra se realizó una búsqueda bibliográfica y se adaptaron protocolos de tratamiento de muestra de estudios previos para la determinación de este tipo de compuestos tanto para las muestras de orina [9], como para las cremas solares [10].

Muestras de orina

Las muestras de orina fueron tomadas del personal del laboratorio y fueron almacenadas en tubos de PTFE a -20°C . Después, se tomaron 500 μL en un vial de centrifuga. A continuación, las muestras se extrajeron 3 veces con 500 μL de EA cada vez. Para cada mezcla sucesiva, ésta se agitó con la ayuda del vortex durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 min. A continuación, se combinaron los sobrenadantes (fases orgánicas) y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones anteriores. El sobrenadante fue filtrado (PTFE 0.22 μm) y posteriormente evaporado a sequedad en corriente de N_2 . Finalmente, el extracto se reconstituyó con agua Milli-Q ajustada con NaOH 0.1 M a pH 10 para del análisis.

Muestras de crema solar

En el tratamiento de las muestras de crema solar, se tomaron con una espátula 0.02 gramos de producto en un tubo de centrifuga de 15 mL y se extrajeron con 5 mL de MeOH durante 10 minutos en un baño de ultrasonidos. Posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos a 7500 rpm. A continuación, se recogió el sobrenadante y se filtró con un filtro de PTFE 0.45 μm . Después se recogió 100 μL de éste y se diluyó en 10 mL de MeOH. Finalmente, 30 μL de esta solución se reconstituyó en 5 mL de agua Milli-Q a pH 10 ajustada con NaOH 0.1 M para el análisis.

3.3.2. Resultados y discusión

Como se comentó anteriormente, el objetivo de este trabajo es desarrollar un método para determinar filtros ultravioletas a bajas concentraciones en orina y cremas solares. En primer lugar, se estudió la separación de los analitos por CZE, y posteriormente se evaluó la técnica de preconcentración PAEKI.

Para la separación por CZE es necesario que los analitos estén cargados. Teniendo en cuenta que los valores de pK_a de los compuestos estudiados, que se encuentran entre 4.45 y 7.56, es necesario la utilización de un BGE con un pH superior al pK_a de los analitos. Se realizó una búsqueda bibliográfica con el objetivo de encontrar el medio de separación adecuado para estos compuestos. En este sentido, Juang y col. [11] emplearon un BGE formado por tetraborato de sodio anhidro proporcionando estabilidad de la corriente durante la separación y buenos resultados en la resolución, por este motivo, éste fue seleccionado para los posteriores experimentos.

Para la optimización de la separación de los compuestos se ensayaron diferentes concentraciones entre 20-60 mM del BGE de tetraborato de sodio anhidro. La concentración de filtros ultravioleta para este estudio se fijó en 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se inyectaron mediante una inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 3 segundos y la separación fue llevada a diferentes voltajes de separación a +15, +20, +25 y +30 kV. A voltajes por encima de +20 kV los compuestos PMDSA y HMB se solapaban. Se observó los mejores resultados en la separación a +20 kV, por lo que este valor fue fijado como óptimo. Durante la separación se empleó un capilar con una longitud de 60 cm (51.5 cm de longitud efectiva) y 50 μm de diámetro interno. El capilar se acondicionó siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado anterior 3.3.1. Los resultados obtenidos mostraron que con las diferentes concentraciones de tetraborato de sodio anhidro del BGE evaluadas se conseguía una buena separación. Se fijó la concentración de 40 mM porque se obtuvieron resultados

ligeramente mejores en términos de resolución. Además, a concentraciones superiores a 40 mM el área para el analito BP-3 disminuía.

Como hemos comentado con anterioridad, una de las características de PAEKI es que el EOF es compensado mediante la aplicación de una presión durante la inyección EKI, que permite realizar inyecciones durante más tiempo, por lo tanto, con un capilar de mayor longitud se pueden realizar inyecciones durante más tiempo consiguiendo así inyectar más cantidad de muestra [12]. Durante la optimización de la técnica de preconcentración PAEKI se empleó un capilar de una longitud mayor respecto al empleado para la separación con el objetivo de poder realizar inyecciones más prolongadas y poder inyectar más cantidad de muestra. Concretamente fue seleccionando un capilar de 100 cm (91.5 cm de longitud efectiva). Se realizaron unas pruebas de separación con el BGE optimizado previamente, y se observó que las condiciones previamente seleccionadas eran adecuadas para llevar a cabo los experimentos posteriores.

El pH de la muestra es otro parámetro esencial ya que, al modificar el valor de pH, los estados de ionización de los analitos pueden ser cambiados facilitando o impidiendo la entrada de los analitos en el capilar desde la muestra. En este caso nos interesa que los analitos estén en su forma negativa para así asegurar la entrada de la mayor cantidad de analitos en el capilar, por lo que teóricamente un pH básico por encima de los valores de pK_a de los analitos garantizaría el proceso. No obstante, para asegurarnos de introducir la mayor cantidad de analitos durante la inyección, el estudio se llevó a cabo de la siguiente manera. Se realizó inyectando una mezcla de los compuestos estudiados a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ en agua Milli-Q durante 1 minuto con las condiciones de PAEKI previamente optimizadas (inyección a 50 mbar aplicando un voltaje durante la inyección de -5 kV), a valores de pH 6, 7, 8, 10 y 11. La acidificación de la muestra se realizó añadiendo HCl 0,1 M y la alcalinización añadiendo NaOH 0,1 M. En la figura 38 se muestra la respuesta obtenida para los diferentes analitos en los estudios del pH de la

muestra. Tal como se puede observar, los mayores valores en términos de área se obtuvieron en las muestras alcalinas. Esto es debido a que los analitos estudiados tienen unos pK_a de entre 4.45 y 7.56, por lo que los analitos están en forma negativa a pH por encima de su valor de pK_a . Finalmente se seleccionó como valor óptimo el pH 10 debido a que con valores superiores se observó que el área de los picos disminuía. Esto puede ser debido a que un pH tan elevado, los iones hidroxilo de NaOH presentes en el medio compiten con los analitos estudiados para entrar en el capilar y por lo tanto la eficacia se ve disminuida.

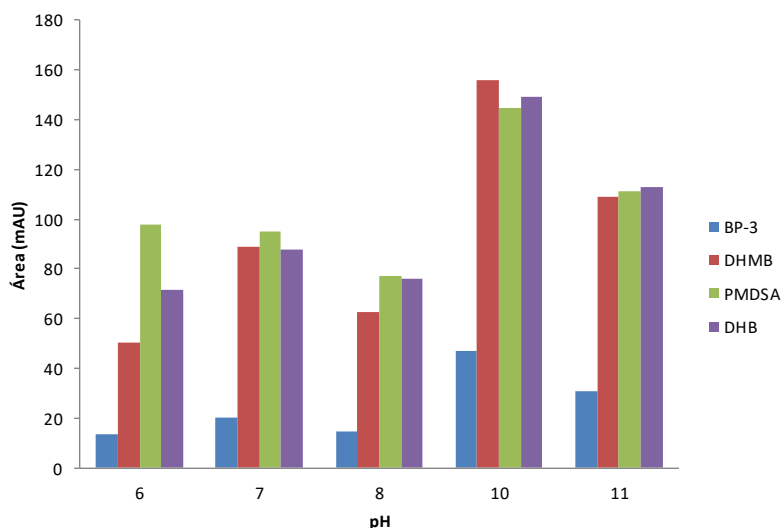


Figura 38. Efecto del pH de la muestra sobre la eficiencia en la preconcentración. Condiciones mezcla de 1 $\mu\text{g/mL}$, voltaje de inyección -5 kV, tiempo de inyección 1 minuto con una contrapresión a 50 mbar; voltaje de separación a 20 kV.

El siguiente parámetro que se evaluó fue la presión aplicada durante la inyección. La presión aplicada durante PAEKI contrabalancea el EOF, y posibilita la introducción de más analitos durante la etapa de preconcentración [7,8], por lo que es un parámetro importante a tener en cuenta. Para evaluarla se aplicaron dos valores diferentes de presión durante la inyección, concretamente 25 y 50 mbar. Para esta prueba se realizó la inyección electrocinética a -5 kV de una mezcla de los analitos a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ durante 1

minuto en las condiciones de separación previamente optimizadas (BGE 40mM tetraborato sódico anhidro, muestra pH 10, voltaje de separación +20 kV). En la figura 39, se muestra que se obtuvieron los mayores valores de área para todos los analitos estudiados cuando se aplicó la presión de 50 mbar. Con este estudio se confirmó que a más presión la cantidad de analito que entra en el capilar es mayor, por lo tanto, en este caso el parámetro óptimo para la presión aplicada durante la inyección se fijó en 50 mbar. A continuación, se evalúa el voltaje aplicado durante la inyección, ya que presión y voltaje de inyección, son los parámetros que directamente están implicados en el equilibrio necesario entre la velocidad electroforética de los analitos cuando éstos son inyectados y el EOF que es compensado con la presión aplicada, con la finalidad de que entre en el capilar la mayor cantidad de analitos.

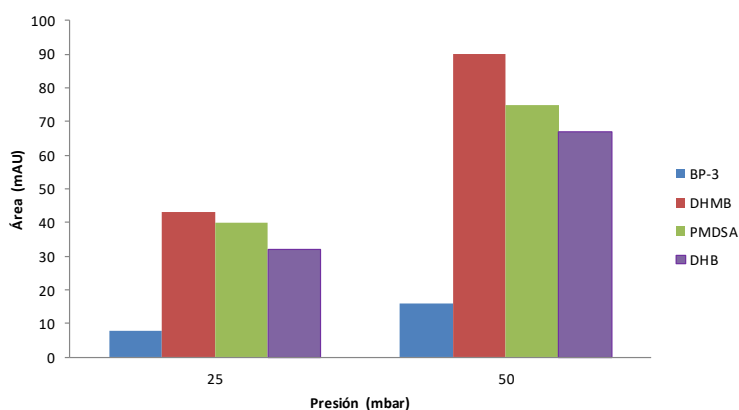


Figura 39. Efecto de la presión durante la inyección sobre la eficiencia de la preconcentración. Condiciones mezcla de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua milli-Q, tiempo de inyección 1 minuto a -5 kV; voltaje de separación a 20 kV.

El voltaje durante la inyección es un parámetro crucial en PAEKI. Debemos tener en cuenta, que la velocidad electroforética es proporcional a la intensidad del campo eléctrico del medio, por lo que sería deseable tener voltajes de inyección elevados. El equilibrio entre el EOF y la velocidad electroforética de los analitos se consigue evaluando el voltaje de la inyección. Para su optimización, se fijaron como condiciones iniciales las establecidas previamente en la

separación realizando una inyección aplicando una presión de 50 mbar y simultáneamente aplicando un determinado voltaje. El voltaje de inyección debe ser negativo debido a que los analitos de estudio para su separación están cargados negativamente. Se estudiaron diferentes voltajes entre -5 y -15 kV, en intervalos de 2.5 kV, aplicando una presión de 50 mbar durante 1 minuto. A continuación, en la figura 40 se representa el área de los picos obtenidos en función de los diferentes valores de voltaje aplicados durante la inyección. Los resultados muestran que para valores por encima de -7.5 kV la respuesta del analito es baja y esto es debido a que el EOF es más grande que el flujo generado por la presión aplicada, por lo tanto, los analitos no pueden llegar al extremo donde se encuentra el detector y en consecuencia el área obtenida de todos los analitos en estas condiciones es más baja. En concreto, para BP-3 la respuesta va disminuyendo a medida que se aumenta el voltaje de inyección hasta el punto que a -15 kV no ha sido detectado. Los mejores resultados en términos de área se observaron aplicando un voltaje durante la inyección de -7.5 kV, por lo tanto, este fue fijado como valor óptimo para los experimentos posteriores.

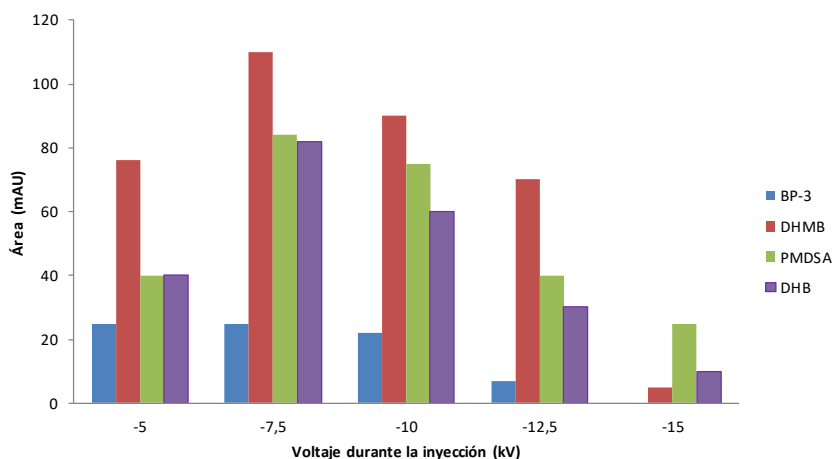


Figura 40. Efecto del voltaje de inyección sobre la eficiencia de extracción. Condiciones: mezcla de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en agua milli-Q, tiempo de inyección 1 minuto a contrapresión 50 mbar; voltaje de separación a 20 Kv.

Posteriormente, se optimizó el tiempo de inyección para aumentar la señal de los analitos. Se evaluaron diferentes tiempos de inyección en el intervalo de 1 hasta 5 minutos en intervalos de 1 minuto. Para este estudio se seleccionaron las condiciones de PAEKI previamente optimizadas (inyección 50 mbar a -7.5 kV, muestra a pH 10) y se preparó la muestra a una concentración menor que en los anteriores experimentos, concretamente a 50 ng/mL, ya que a concentraciones altas al aumentar el tiempo de inyección podría verse afectada la separación debido a que los picos se podrían solapar. En la figura 41, se muestran los resultados obtenidos y se observó que hasta 3 minutos el área aumenta para todos los analitos estudiados. Inyecciones más prolongadas interfieren negativamente en el proceso de preconcentración, posiblemente debido a que a un determinado tiempo el equilibrio entre el EOF y las movilidades electroforéticas se ve alterado y en consecuencia no se introduce en el capilar más cantidad de analitos. En este sentido, se observó que las señales obtenidas, en general comienzan a disminuir a partir de 3 minutos, por lo tanto, se fijó éste valor como el tiempo óptimo de inyección.

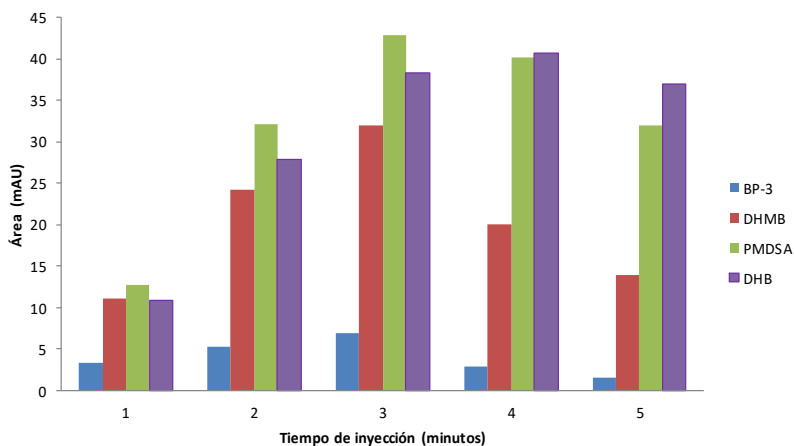


Figura 41. Efecto del tiempo de inyección sobre la eficiencia de la preconcentración. Condiciones mezcla de 50 ng/mL a pH 10, tiempo de inyección 1 minuto a -7.5 kV; voltaje de separación a 20 kV.

En estas condiciones óptimas, se realizó la validación del método en muestras de agua Milli-Q con las soluciones estándares a concentraciones finales de 25, 50, 100, 200 y 500 ng/mL. Cada estándar fue preparado por triplicado y se realizó una recta de calibrado con los datos obtenidos entre el área de los picos y las concentraciones de cada filtro ultravioleta. El intervalo de linealidad fue de 25 a 500 ng/mL para todos los analitos estudiados. Los LODs se calcularon teniendo en cuenta el coeficiente entre la señal del analito y la señal del ruido de fondo igual a 3. Los LODs obtenidos fueron entre 5 ng/mL para DHMB y 12 ng/mL para BP-3. La repetitividad y reproducibilidad las definen la desviación estándar relativa (RSD), y fueron calculadas a partir de muestras de agua Milli-Q enriquecidas a dos niveles de concentración distintos, a 25 y 500 ng/mL. La repetitividad se realizó analizando 5 réplicas del análisis en el mismo día y la reproducibilidad 5 réplicas de cada análisis durante 5 días consecutivos. Se observó que en las concentraciones altas el valor de % RSD para la repetitividad como para la reproducibilidad fueron más bajos para todos los analitos estudiados. A pesar que los valores de reproducibilidad son elevados, están por debajo del 20 % de RSD, por lo que son aceptables para la aplicación del método PAEKI-CE para la preconcentración de la muestra. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos, linealidad, LODs, repetitividad, reproducibilidad y factores de preconcentración obtenidos.

Los factores de preconcentración (SEF) fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$SEF_{\text{area}} = (A_{\text{prec}} / A_{\text{HD}}) f$$

donde A_{prec} es el área del pico de cada compuesto obtenida con mediante PAEKI-CZE, A_{HD} es el área de pico de cada compuesto mediante CZE y f es el factor de dilución. Aplicando esta ecuación, se obtuvieron de factores de preconcentración de entre 413 del DHMB y 1593 del DHB. Los valores obtenidos, son mayores de los factores de preconcentración que se puede encontrar en la bibliografía con detección UV-Vis. En el caso de Xu y col. [13,14] reportan valores de

entre 39 y 166 en la determinación de verteporfina en orina y 62 para el fármaco citalopran en biofluidos humanos. En cambio, D'Ulivo y col. [15] consiguieron valores superiores 3000 en la preconcentración de aminoácidos, y Zhang y col. [16] valores de hasta 20000 en la determinación de ácidos haloacéticos en agua de consumo, pero en ambos casos se empleó la detección por MS.

Tabla 6. Datos de validación del método PAEKI-CE para la determinación de filtros ultravioleta en agua Milli-Q

	BP-3	DHMB	PMDSA	DHB
Intervalo de linealidad (ng/mL)	25-500	25-500	25-500	25-500
Ecuación de calibración ^{a)}	$y = 0,153x + 3,9206$	$y = 0,6256x + 11,931$	$y = 0,9427x + 16,121$	$y = 0,8719x + 13,129$
Coefficiente de correlación (r^2)	0,9923	0,996	0,9935	0,9943
LOD (ng/mL)	12.0	10.0	10.0	5.0
Repetitividad 500 ng/ml (% RSD; n=5)	5.54	0.42	3.36	5.90
25 ng/ml	9.13	9.23	13.85	12.59
Reproducibilidad 500 ng/ml (% RSD; n=5)	5.76	1.56	5.34	7.1
25 ng/ml	11.65	12.87	19.24	16.76
Factores de preconcentración	829	413	705	1593

a) y; valor de área del pico (MAU por segundo); x; concentración (ng/mL)

Posteriormente se empleó la técnica PAEKI en el análisis de filtros ultravioleta en muestras de orina. Los filtros ultravioleta pueden ser absorbidos por la piel y tras su asimilación por el cuerpo humano pueden llegar hasta la orina, por lo tanto, es de interés analizarlos en esta matriz [17]. Se tomaron muestras de orina de personal sano del laboratorio y fueron tratadas en base a un estudio encontrado en la bibliografía en el que se emplea el EA como solvente mediante una LLE para diferentes compuestos, entre ellos, filtros ultravioleta del tipo benzofenona [9]. El protocolo es descrito en el apartado 3.3.1.

Se aplicó PAEKI en las condiciones óptimas en el análisis de blancos de orina y en muestras de orina con una mezcla de los 4 filtros ultravioleta a una concentración de 50 ng/mL. En la figura 42 se muestra la comparación entre los electroferogramas tras la aplicación del método PAEKI-CE a un blanco de orina (Figura 42A), un blanco de orina a la que se le añadieron una mezcla de los filtros ultravioleta estudiados a una concentración de 50 ng/mL (Figura 42B) y un patrón con la mezcla de los 4 estándares a una concentración de 50 ng/mL (Figura 42C). Se puede observar que el analito PMDSA no ha sido detectado. Esto puede ser debido a que en el proceso de pretratamiento de muestra éste no se ha extraído, por lo tanto, este método no es adecuado para la determinación de este compuesto en la orina. Como antes hemos comentado, el trabajo en el que se basó el tratamiento de muestra empleado en nuestro método fue para filtros ultravioleta del tipo benzofenona. Los compuestos estudiados excepto el PDMSA, son benzofenonas, por lo tanto, este puede ser el motivo por el que el que el PMDSA no fue extraído.

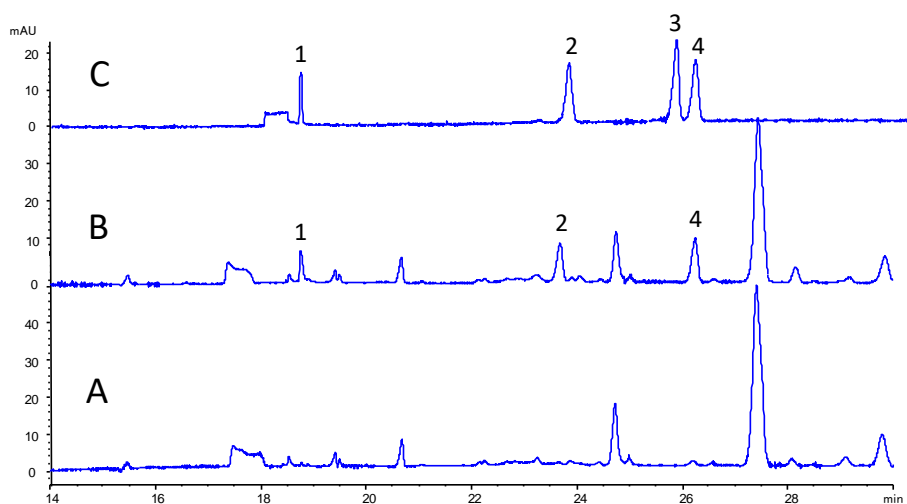


Figura 42. Comparación de los electroferogramas obtenidos mediante PAEKI-CE en un blanco de orina (A) y un blanco de orina enriquecido con la mezcla de los analitos estudiados a una concentración de 50 ng/mL (B), patrón de los estándares a una concentración de 50 ng/mL. Condiciones PAEKI: Inyección 3 minutos a 50mbar (-7.5 kV); y voltaje de separación a 20 Kv. BP-3 (1), DHMB (2), PMDSA (3), HMB (4).

Con el fin de solventar esta problemática, se probaron diferentes solventes, como DCM y una mezcla de EA/hexano. El PMDSA tampoco puede ser extraído con los solventes evaluados, así que finalmente debido a que se obtuvieron las mejores recuperaciones para los demás analitos el solvente de extracción seleccionado fue el EA. Por lo tanto, para los demás filtros no observan interferencias en la muestra a sus tiempos de migración, por lo tanto, el método propuesto puede ser válido para el análisis de BP-3, DHMB y DHB.

Después se analizó una muestra de producto de protección solar con el objetivo de comprobar la viabilidad del método en la determinación de filtros ultravioleta en otro tipo de matriz compleja, en concreto una crema solar. Para ello se adquirió una crema que entre otros compuestos contenía BP-3 tal como se indicaba en su etiqueta. Se tomaron las muestras de una crema solar comercial y se trató la muestra siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.1. En este caso el solvente de extracción utilizado fue MeOH, en base a un trabajo encontrado en la bibliografía donde fue empleado en el tratamiento de muestra de una crema solar para la determinación de este tipo de compuestos [10]. En la figura 43 se muestra la comparación de los electroferogramas tras emplear el método propuesto PAEKI-CE de una muestra de una crema solar que contenía en su composición BP-3 (Figura 42A), en una solución estándar de los 4 filtros ultravioleta a una concentración de 50 ng/mL en agua Milli-Q (Figura 42B), y la misma muestra de crema solar enriquecida con una mezcla de los 4 analitos estudiados a una concentración de 100 ng/mL (Figura 42C). Se observó que en estas condiciones y para este tipo de muestra, es posible la detección de los 4 analitos estudiados. En el caso del BP-3, éste fue detectado en una muestra de crema solar comercial. La presencia de este analito fue confirmada mediante adiciones estándar.

Parte experimental, resultados y discusión | 182

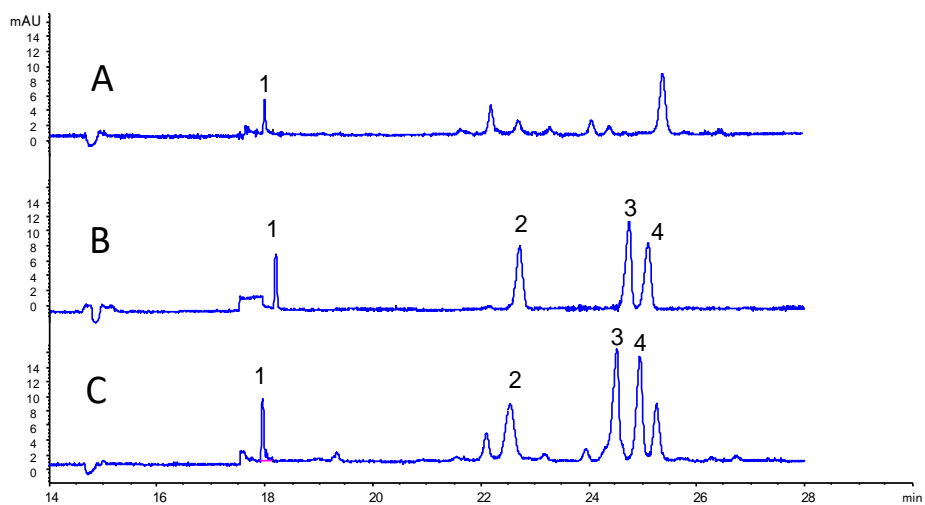


Figura 43. Comparación de los electroferogramas obtenidos mediante PAEKI-CE en una muestra crema de protección solar que contiene BP-3 (A), en un patrón de los analitos estudiados a 50 ng/mL en agua Milli-Q (B) y muestra blanco de crema solar enriquecida con la mezcla de los analitos estudiados a una concentración de 100 ng/mL (C). Mismas condiciones experimentales que en figura 42. BP-3 (1), DHMB (2), PMDSA (3), HMB (4).

3.3.3 Bibliografía

- [1] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?*, Environmental Health Perspectives, 107 (1999) 907-938.
- [2] D. L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, *UV filters: From sunscreens to human body and the environment*, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 360-374.
- [3] Reglamento (CE) No 1223/2009 del parlamento europeo y consejo de 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos.
- [4] P. Y. Kunz, H. F. Galicia, K. Fent, *Comparison of In Vitro and In Vivo Estrogenic Activity of UV Filters in Fish*, Tox. Sci. 90 (2006) 349-361.
- [5] T. Suzuki, S. Kitamura, R. Khota, K. Sugihara, N. Fujimoto, S. Ohta, *Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens*, Tox. Applied Pharm. 203 (2005) 9-17.
- [6] E. Diamanti-Kandarakis, L. P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller, A. C. Gore, *Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement*, Endocrine Reviews 30 (2009) 293-342.
- [7] Y. L. Feng, J. Zhu, *Anal. Chem. On-Line Enhancement Technique for the Analysis of Nucleotides Using Capillary Zone Electrophoresis/Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 78 (2006) 6608-6613
- [8] H. Zhang, J. Gavina, Y. L. Feng, *Understanding mechanisms of pressure-assisted electrokinetic injection: Application to analysis of bromate, arsenic and selenium species in drinking water by capillary electrophoresis-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 3095-3104.
- [9] A. G. Asimakopoulos, L. Wang, N. S. Thomaidis, K. Kannan, (2014). *A multi-class bioanalytical methodology for the determination of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters, benzophenone-type ultraviolet filters, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 1324 (2014) 141-148.
- [10] T. Ma, Z. Li, Q. Niu, Y.Y. Li, W.H. Zhou, *Double dispersant-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for the determination of benzophenone-type ultraviolet filters in sunscreen cosmetic product*, Electrophoresis, 36 (2015) 2530-2537.

Parte experimental, resultados y discusión | 184

[11] L.J. Juang, B.S. Wang, H.M. Tai, W.J. Hung, M.H. Huang, *Simultaneous identification of eight sunscreen compounds in cosmetic products using high-performance Liquid chromatography and capillary electrophoresis*, J. Food Drug Anal. 16 (2008) 22-28.

[12] Y. L. Feng, J. Zhu, *Constant pressure-assisted electrokinetic injection for on-line enhanced detection of monophtalates in capillary electrophoresis-mass spectrometry with application to human urine*, Electrophoresis 29 (2008) 1965-1973.

[13] Z. Xu, F. Ye, Y. Wang, A. Li. *Pressure-assisted electrokinetic injection stacking for citalopram drug to achieve highly sensitive detection and enantioseparation by capillary electrophoresis*, Chin. J. Chromatogr. (2015) 988-994.

[14] Z. Xu, A. Li, Y. Wang, Z. Chen, T. Hirokawa. *Pressure-assisted electrokinetic injection stacking for verteporfin drug to achieve highly sensitive enantioseparation and detection in artificial urine by capillary electrophoresis*. J. Chromatogr. A, 1355 (2014) 284-290.

[15] L. D'Ulivo, Y.L. Feng. *Expanding the scope of pressure-assisted electrokinetic injection for online concentration of positively charged analytes in capillary electrophoresis-mass spectrometry*, Electrophoresis, 36 (2015) 1024-1027.

[16] H. Zhang, J. Zhu, R. Aranda-Rodriguez, Y.L. Feng. *Pressure-assisted electrokinetic injection for on-line enrichment in capillary electrophoresis-mass spectrometry: a sensitive method for measurement of ten haloacetic acids in drinking water*, Anal. Chim. Acta, 706 (2011) 176-183.

[17] N. R. Janjua, B. Mogensen, A. M. Andersson, J. H. Petersen, M. Henriksen, N. E. Skakkebaek, H. C. Wulf. *Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans*, J. Invest. Dermatol., 123 (2004) 57-61.

4. CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

- La aplicación de la técnica de microextracción SDME en su combinación *in-line* con la CE, permitió la limpieza y preconcentración de la muestra con un mínimo pretratamiento previo, y posibilitó la determinación de AINEs en muestras de orina de pacientes que estaban siguiendo un tratamiento médico con ibuprofeno.
- El método *in-line* SDME-CE propuesto es simple y debido a su bajo consumo de solventes constituye una alternativa ambientalmente sostenible comparado con las técnicas de extracción convencionales.
- El empleo de ciclodextrinas en el BGE permite la separación enantiomérica de catinonas sintéticas.
- El uso del acoplamiento *in-line* SPE-CE permite la inyección de volúmenes más altos en comparación con las técnicas de preconcentración electroforética y, en general, también se pueden obtener factores de preconcentración más altos. En esta tesis doctoral, el sorbente Oasis HLB, se utilizó con éxito para la extracción y la preconcentración de catinonas sintéticas en muestras de orina.
- El empleo de la *in-line* SPE es una técnica de microextracción que ofrece buenos resultados en términos de preconcentración de los analitos estudiados y del lavado de la muestra, no obstante, presenta el inconveniente de que se tiene que fabricar el concentrador de analitos manualmente.
- La técnica de preconcentración PAEKI, debido a que se puede inyectar una gran cantidad de muestra electrocinéticamente a la vez que el EOF es suprimido mediante la aplicación de una contrapresión, permitió obtener LODs del orden de ng/mL y elevados factores de preconcentración.

- Mediante el método PAEKI-CE se identificó el compuesto BP-3 en muestras de crema de protección solar, lo que demuestra que esta metodología puede ser empleada para la identificación de filtros ultravioleta en muestras complejas con un simple pretratamiento de muestra.

ANEXO I. Abreviaciones

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

α -PVP- α -pirrolidinovalerofenona

AC- Concentrador de analitos

AALs- Líquidos iónicos basados en aminoácidos

ACN- Acetonitrilo

AFMC- *Analyte focusing by micelle collapse*

AINEs- Antiinflamatorios no esteroideos

CDs- Ciclodextrinas

CE- Electroforesis capilar

CF- *Counter-flow*

CHES- Ácido 2-ciclohexilamino etanosulfónico

CNTs- Nanotubos de carbono

CPE- *Cloud point extraction*

CZE- Electroforesis capilar por zonas

CW- Carbowax

BGE- Electrólito de separación

BP-3- Benzofenona-3

CTAB- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAD- Detector de diodos en línea

DCM- Diclorometano

DHB- 2,4-dihidroxi-benzofenona

DHMB- 2,2-dihidroxi-4-metoxibenzofenona

DI- Inmersión directa

DLLME- *Dispersive liquid-liquid microextraction*

DMSO- Dimetilsulfóxido

DVB- Divinilbenceno

EDAR- Estación depuradora de aguas residuales

EDC- Compuestos disruptores endocrinos

EKI- Inyección electrocinética

EKS- *Electrokinetic supercharging*

EMA- Agencia de Medicamentos Europea

EOC- Contaminantes orgánicos emergentes

EOF- Flujo electroosmótico

ESI- Ionización de electrospray

FA SI- *Field amplified simple injection*

FA SS- *Field amplified simple stacking*

GC- Cromatografía de gases

HCl- Ácido clorhídrico

HDI- Inyección hidrodinámica

HS- Espacio de cabeza

ID- Diámetro interno

IL- Líquido iónico

ITP- Isotacoforesis

LC- Cromatografía líquida

LE- Electrólito lider

LLE- Extracción líquido- líquido

LOD- Límite de detección

LOQ- Límite de cuantificación

LPME- Microextracción en fase líquida

LVSS- *Large volumen sample stacking*

LVSEP- *Large volume sample stacking with matrix removal by an EOF pump*

MALDI- *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

MDMA- 3,4-metilendioximetanfetamina

ME- Microextracción

MEECK- *Microemulsion electrokinetic capillary chromatography*

MECK- *Micellar electrokinetic chromatography*

MeOH- Metanol

MIPs- *Molecularly imprinted polymers*

MS- Espectrometría de masas

MSPE- *Magnetic solid-phase extraction*

MTBE- Éter metil terbutílico

NACE- Electroforesis capilar no acuosa

NaCl- Cloruro de sodio

NaOH- Hidróxido de sodio

NPS- Nuevas sustancias psicoactivas

ODTS- Octadeciltrimetoxilano

PA- Poliacrilato

PAEKI- *Pressure assisted electrokinetic injection*

PCPs- Productos de higiene y cuidado personal

PDMS- Polidimetilsiloxano

PFOA- Ácido perfluorooctanico

PGDA- Diacetato de propilenglicol

PLE- *Pressurized liquid extraction*

PMDSA- Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico

PTFE- Politetrafluoroetileno

PVA- Acetato de polivinilo

RSD- Desviación estándar relativa

SEF- Factores de preconcentración

SBSE- *Stir-bar sorptive extraction*

SDME- *Single-drop microextraction*

SDS- Dodecilsulfato sódico

SLM- *Supported liquid membranes*

SPE- Extracción en fase sólida

SPME- Microextracción en fase sólida

TCA- Ácido tricloroacético

TE- Electrólito terminal

TOF- *Time of flight*

UV/Vis- Ultravioleta-visible

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

ESTRATEGIAS DE PRECONCENTRACIÓN COMBINADAS IN-LINE CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR

Alejandro García Vázquez