



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**DIFERENTS ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA
SENSIBILITAT EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR.
APLICACIÓ A LA DETERMINACIÓ DE FÀRMACS
ANTIINFLAMATORIS**

**Memòria presentada per
Ma ALBA MACIÀ i PUIG
per optar al grau de
Doctor en Química
Tarragona, 2006**



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Departament
de Química Analítica
i Química Orgànica

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

La Dra. CARME AGUILAR i ANGUERA, Professora Agregada del mateix Departament,

CERTIFIQUEM:

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "DIFERENTS ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA SENSIBILITAT EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR. APLICACIÓ A LA DETERMINACIÓ DE FÀRMACS ANTIINFLAMATORIS", presentada per Ma ALBA MACIÀ i PUIG 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, i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 10 de novembre de 2006.

Dra. Marta Calull i Blanch

Dra. Carme Aguilar i Anguera

M'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que han contribuït i han fet possible la realització d'aquesta tesi, i especialment:

Voldria manifestar el meu agraïment a les meves directores de tesi, la Dra. Marta Calull i la Dra. Carme Aguilar per la seva confiança, així com per la seva dedicació, suport i ajuda que m'han mostrat durant aquests anys. També voldria agrair al Dr. Francesc Borrull per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi al seu grup d'investigació.

A la Dra. Eva Pocurull i la Dra. Rosa Maria Marcé pel suport i ànims rebuts durant aquests anys.

Al Dr. Salvatore Fanali del Consiglio Nazionale delle Ricerca di Roma per haver-me acollit en el seu grup de recerca durant la meva estada de dos mesos.

Gràcies al Dr. José Barbosa, la Dra. Victòria Sanz-Nebot, la Dra. Elena Hernández i el Dr. Fernando Benavente de la Universitat de Barcelona per la seva col·laboració i dedicació en la realització d'un treball de la present Tesi Doctoral.

A la Dra. Maria José Motilva i la Dra. Mari Paz Romero juntament amb el Manuel, la Nàdia, l'Arantza i la Luz del Departament de Tecnologia dels Aliments de la Universitat de Lleida pel seu suport i ànims rebuts en els darrers mesos d'aquesta tesi.

També voldria donar les gràcies a tots els companys del meu grup d'investigació, les noves incorporacions i en especial amb els que he compartit molt bons moments dins i fora del laboratori durant aquests anys. Gràcies Rosa, Vanessa, Marta, Toni, Houda, Anna, Sandra, Marta, Irene, Antonio, Ignasi, Rosana, Lúdia, Ester, Sandra, Enric, i Núria per la vostra amistat, ànims i consells, i especialment també voldria agrair a la Patri per la seva ajuda en aquests quatre anys.

Als meus companys de pis per la seva amistat i per tots els bons moments que hem compartit plegats. Gràcies per la vostra amistat i ànims.

Finalment voldria agrair als meus pares i a la meva germana els seus ànims i els seus consells, i molt especialment al Dani, per la seva comprensió i fer-me costat en tot moment.

A tots, moltes gràcies.

ÍNDEX



OBJECTIU	3
1 INTRODUCCIÓ	5
1.1 Contaminants orgànics emergents.....	6
1.2 Fàrmacs antiinflamatoris	6
1.3 Estratègies per augmentar la sensibilitat en electroforesi capil·lar.....	11
1.3.1 Estratègies per augmentar la quantitat de mostra injectada: Tècniques de preconcentració	11
1.3.1.1 Tècniques de preconcentració electroforètiques	12
a) Tècniques de <i>sample stacking</i>	14
b) <i>pH-mediated sample stacking</i>	31
c) <i>Stacking</i> amb acetonitril.....	34
d) <i>Dynamic pH-junction</i>	35
e) Isotacoforesis capil·lar (ITP)	38
f) <i>Sweeping</i>	43
1.3.1.2 Tècniques de preconcentració cromatogràfiques.....	46
a) Acoblament de l'extracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar (SPE-CE).....	48
b) Acoblament de la microextracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar (SPME-CE) ...	59
c) Tècniques de preconcentració aplicades en electrocromatografia capil·lar (CEC)	61
1.3.2 Estratègies per a millorar la capacitat de detecció	63

1.4	<i>Capillary electrophoresis for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>	65
1.5	Bibliografia	101
2	PART EXPERIMENTAL I RESULTATS	117
2.1	Aplicació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques en electroforesi capil·lar per zones	121
2.1.1	<i>Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples</i>	127
2.1.2	<i>Application of capillary electrophoresis with different sample stacking strategies for the determination of a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range</i>	145
2.2	Aplicació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques en cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica	161
2.2.1	<i>Separation and on-column preconcentration of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by microemulsion electrokinetic capillary chromatography using high-speed separations</i>	167
2.2.2	<i>Analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water samples using microemulsion electrokinetic capillary chromatography under pH-suppressed electroosmotic flow with an on-column preconcentration technique</i>	189

2.3 Aplicació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques en cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica	205
2.3.1 <i>Different sample stacking strategies to analyse some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography in mineral waters</i>	211
2.4 Aplicació de l'acoblament <i>in-line</i> de l'extracció en fase sòlida i l'electroforesi capil·lar com a tècnica de preconcentració cromatogràfica.....	245
2.4.1 <i>In-line strategies to enhance the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of naproxen in water samples. Chromatographic versus electrophoretic approaches</i>	251
2.5 Acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses	269
2.5.1 <i>Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry</i>	275
3 RESULTATS I DISCUSSIÓ	291
4 CONCLUSIONS	299
ANNEXOS	305
I. Estructura química i número CAS dels fàrmacs antiinflamatoris..	307
II. Abreviacions.....	312
III. Publicacions	314

OBJECTIU |

La present Tesi Doctoral té com a objectiu principal el desenvolupament de diferents estratègies per disminuir els límits de detecció de l'electroforesi capil·lar. Aquestes estratègies s'han basat en la injecció d'un gran volum de mostra en el capil·lar amb l'aplicació de tècniques de preconcentració tant electro-forètiques com cromatogràfiques, i també en l'ús de l'espectrometria de masses com a sistema de detecció per augmentar la capacitat de detecció dels analits.

Un segon objectiu ha estat l'aplicació d'aquestes diferents estratègies a la determinació de fàrmacs antiinflamatoris en mostres aquoses.

1 INTRODUCCIÓ



Des dels últims anys hi ha una preocupació creixent per les possibles conseqüències ambientals i sanitàries que pot produir la possible presència de contaminants orgànics emergents en el medi ambient. Aquests es defineixen com contaminants prèviament desconeguts o no reconeguts com a tals perquè quasi no s'han investigat per l'absència de dades ambientals i la falta de mètodes analítics apropiats [1, 2].

De tots els contaminants orgànics emergents, els fàrmacs és un dels grups que genera una major preocupació. Això és degut al seu elevat consum tant per espècies humanes com animals. Com a resultat d'aquest ús tan estès, una gran quantitat d'aquests compostos arriben a les estacions de tractament d'aigües residuals (EDAR), procedents de l'excreció fecal o de l'orina, i posteriorment poden entrar en el medi ambient aquàtic degut a la seva elevada estabilitat, resistència i solubilitat en aigua. En aquest sentit, es pot destacar que alguns estudis han posat en evidència la presència de fàrmacs a les aigües superficials a nivells de baixos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [1-14]. Aquest fet ha comportat que la determinació i la identificació d'aquests compostos en el medi ambient aquàtic sigui un camp important d'investigació de la Química Analítica, ja que la presència d'aquests en les aigües pot arribar a ser un gran problema ambiental en el cas d'una possible reutilització d'aquesta aigua.

Fins al moment, només es disposa d'informació sobre els riscos ambientals associats a alguns fàrmacs, com els antibiòtics o els reguladors hormonals. D'altra banda, per a la majoria de fàrmacs més consumits, com els antiinflamatoris, reguladors de lípids i antidepressius, la informació sobre el seu impacte ambiental encara és limitada. Tot i no conèixer els riscos de la seva presència en les aigües, s'estan realitzant diferents estudis per conèixer la distribució d'aquests compostos en els diferents medis ambientals aquàtics, així com també per millorar l'eficàcia dels sistemes de les estacions EDAR per a una completa eliminació d'aquests [1, 3, 6, 11, 13, 14].

Tot l'esmentat planteja la necessitat de desenvolupar mètodes d'anàlisi fiables i sensibles que permetin determinar aquests compostos a baixos nivells de concentració. De les diverses tècniques analítiques que s'han utilitzat més extensament cal esmentar la cromatografia de gasos (GC) i la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC), emprant l'espectrometria de masses (MS) o aquesta en tàndem (MS/MS) com a sistema de detecció [1, 3, 15-25].

La tècnica d'electroforesi capil·lar (CE) s'ha utilitzat escassament per la determinació d'aquests fàrmacs en aigües, si bé la seva aplicació és més comuna en mostres biològiques. Aquest fet és degut principalment a la baixa sensibilitat de la tècnica, que limita la determinació d'analits a baixos nivells de concentració. Amb l'objectiu de millorar la sensibilitat de la tècnica i ampliar d'aquesta manera la seva aplicabilitat en altres camps, com el mediambiental, el desenvolupament de diferents estratègies per disminuir els límits de detecció (LODs) és molt important i és objecte d'estudi de diferents grups d'investigació [26-35].

1.1 CONTAMINANTS ORGÀNICS EMERGENTS

En el grup de contaminants orgànics emergents s'inclouen productes d'ús diari, com els detergents, fàrmacs (antiinflamatoris, antipirètics, antidepressius, betabloquejants, reguladors de lípids, antiepilèptics, antibiòtics), additius de la benzina, plastificants, productes per a la higiene personal, entre d'altres.

Dins d'aquest grup també hi ha els disruptors endocrins, naturals o sintètics, que interfereixen el sistema endocrí o hormonal d'espècies humanes i d'animals alterant el seu desenvolupament, creixement, reproducció i comportament. Entre els compostos identificats com disruptors endocrins destquen els estrògens sintètics i naturals, els pesticides, els aftarats, dioxines i bifenils policlorats, entre d'altres

Degut a la falta de metodologies analítiques apropiades per a la determinació d'aquestes substàncies, dels subproductes de la seva fabricació i dels seus productes de degradació, i a la falta de mètodes toxicològics per a la determinació de la seva activitat biològica, les conseqüències de la seva presència en el medi ambient sovint estan passant inadvertides [1, 2].

1.2 FÀRMACS ANTIINFLAMATORIS

Els antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) (NSAIDs en el seu acrònim en anglès) són els fàrmacs més emprats arreu del món, essent l'aspirina el compost més conegut d'aquest grup. Els NSAIDs són medicaments que es caracteritzen per tenir una gran diversitat d'activitats, com l'analgèsica (alleugerir el dolor), l'antiinflamatòria (disminuir la inflamació) i l'antipirètica (baixar la febre). Alguns exemples característics dels usos d'aquests fàrmacs inclouen el tractament de l'artritis, la gota, el dolor menstrual, i el mal de cap. Tot i els seus efectes positius, aquests fàrmacs tenen l'inconvenient que no es pot superar una dosi de tolerància o sostre terapèutic a causa dels greus efectes adversos com és l'hemorràgia digestiva [36, 37].

Des del punt de vista químic, aquests fàrmacs es caracteritzen per ser àcids febles, degut al grup carboxílic (tenen un pK entre 3 i 7), no volàtils, polars, altament solubles en medis aquosos, i majoritàriament es troben en la seva forma racèmica. En l'Annex I es mostra l'estructura dels NSAIDs més emprats arreu del món.

L'ús tan estès d'aquests fàrmacs ha suposat que la seva determinació hagi estat objecte d'estudi en diferents camps de la química, com el forense, el clínic, el farmacèutic i l'ambiental. A la bibliografia es troben diferents metodologies analítiques que es basen en la determinació d'aquests fàrmacs en mostres biològiques, com sèrum, plasma i orina, amb l'objectiu de realitzar estudis farmacocinètics i de toxicologia en el cas de sobredosi o

d'abús crònic [38, 39]. També, aquests fàrmacs s'analitzen en preparats farmacèutics per determinar les seves impureses i la seva estabilitat [40]. Addicionalment, tal com s'ha comentat anteriorment, els NSAIDs són també objecte d'estudi en el camp mediambiental aquàtic per avaluar la qualitat de l'aigua en el cas d'una possible reutilització d'aquesta i l'eficàcia de les estacions EDAR [1-3].

Degut a la necessitat d'analitzar aquests fàrmacs, en els últims anys s'han emprat diferents tècniques analítiques de separació que han anat evolucionant d'acord amb el desenvolupament tecnològic de la instrumentació analítica i de les necessitats requerides. Les tècniques de separació emprades per la determinació d'aquests fàrmacs han estat principalment la GC i la HPLC en fase inversa. Malgrat les característiques de la GC i haver estat una de les primeres tècniques aplicades en la determinació d'aquests fàrmacs, la seva aplicabilitat és inferior a la de HPLC ja que en tractar-se de compostos polars i no volàtils, és necessari sempre una etapa de derivatització prèvia. Aquest procediment, apart de ser laboriós, pot generar degradació dels analits. El sistema de detecció habitualment emprat amb aquesta tècnica cromatogràfica en la determinació d'aquests fàrmacs en aigües és l'MS, i també l'MS en tàndem (GC-MS/MS) [1, 3, 15-19].

La introducció de la HPLC a la determinació dels NSAIDs va resoldre la problemàtica o inconvenient de derivatització que plantejava la GC. Aquest fet, junt amb el gran progrés en els darrers anys en l'acoblament entre la HPLC i l'MS o MS/MS afavorit per l'aparició d'interfícies basades en la ionització atmosfèrica com l'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI), ha contribuït a que aquesta tècnica sigui àmpliament emprada per molts investigadors [1-3, 20-25].

Els LODs que s'obtenen en la determinació d'aquests fàrmacs mitjançant aquestes dues tècniques, GC-MS/(MS) i HPLC-MS/(MS), són comparables, de l'ordre de baixos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en mostres aquoses. Cal remarcar que aquests

resultats s'han obtingut mitjançant l'acoblament *off-line* de la tècnica d'extracció en fase sòlida (SPE) amb la tècnica cromatogràfica, amb la finalitat de netejar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits [1-3, 15-25].

Des de principis dels anys noranta, l'ús de l'CE en l'anàlisi de NSAIDs ha anat en augment degut principalment als recents avenços en la instrumentació i la gran versatilitat, ja que permet operar en diferents modes de separació, juntament amb els avantatges que presenta, com ara l'elevada eficàcia de separació, rapidesa o consum mínim de reactius i mostra (de l'ordre de nL).

Els NSAIDs s'han analitzat en els diferents modes electroforètics, com l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) [41-54], la cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica (MEKC) [55-59], la cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica (MEEKC) [60-63], l'electrocromatografia capil·lar (CEC) [64-69] i la isotacoforesi capil·lar (ITP) [70-73].

L'CZE és el mode electroforètic més emprat en la determinació d'aquests fàrmacs degut a la seva simplicitat i al seu elevat poder de separació. Les solucions més freqüentment utilitzades com a electròlits en la separació d'aquests fàrmacs són les solucions de borat sòdic (10-50 mM, pH 8-10) [41-45], excepte en l'ús d'un sistema no aquós o en l'acoblament de la CE a la MS en què s'empren normalment solucions d'acetat sòdic o d'amònic (10-30 mM, pH 4-6) [46-51].

En la determinació de dos o tres NSAIDs es prefereix un medi electrolític aquós [41-43]. No obstant, quan s'analitza un nombre més elevat de fàrmacs és necessària l'addició d'un solvent orgànic [44, 46-50], de ciclodextrines [51-53] o d'una base orgànica [54] a la solució electrolítica per tal d'obtenir una bona resolució. Com a exemple, Fillet *et al.* [47] i Cherkaoui *et al.* [48] van separar fins a tretze NSAIDs emprant un medi electrolític completament no aquós en un temps d'anàlisi inferior als 14

minuts. Les ciclodextrines, a més d'addicionar-se a la solució electrolítica per millorar la resolució, s'han utilitzat també en la determinació enantioselectiva de NSAIDs [52].

Els modes electroforètics MEKC [55-59] i MEEKC [60-63] també s'han emprat en la separació d'aquests fàrmacs. El surfactant que s'ha utilitzat és dodecil sulfat de sodi (SDS), emprant com a solucions tampó borat sòdic (pH 9.2) o fosfat sòdic (pH 9) [55-62]. Mardones *et al.* [58] van analitzar sis NSAIDs per MEKC en un temps d'anàlisi de 8 minuts, i amb l'objectiu de millorar la resolució dels analits en estudi el medi electrolític contenia ciclodextrines. Recentment, s'ha utilitzat un medi electrolític àcid en la determinació de cinc NSAIDs per MEKC utilitzant fosfat sòdic a pH 2.5 com a tampó i una addició de 40% d'acetonitril [59]. En la separació per MEEKC, el sistema electrolític està format per un surfactant, generalment SDS en una concentració més petita que en el cas de la separació per MEKC, un oli (com *n*-octà i acetat d'etil), un cosurfactant (un alcohol de cadena curta, com 1-butanol) i una solució tampó. També es pot addicionar un percentatge de solvent per obtenir una bona separació. Emprant un electròlit alcalí, es van separar cinc NSAIDs en 8 minuts mitjançant l'ús del tampó borat sòdic (pH 9.2) i l'addició d'un 6% d'acetonitril [62]. D'altra banda, els cinc mateixos NSAIDs també es van resoldre emprant un electròlit àcid, en 16 minuts, mitjançant l'ús del tampó fosfat sòdic (pH 2.5) i una addició d'un 15% d'acetonitril [63].

Diferents autors han utilitzat el mode electroforètic CEC en la determinació de NSAIDs, i en aquest cas, els capil·lars habitualment emprats han estat preparats manualment en el propi laboratori (*home-made*). Concretament, s'han emprat tres tipus de capil·lars, capil·lars empaquetats [64-67], capil·lars on la fase estacionària és enllaçada covalentment a les parets internes del capil·lar [68] i monòlits [69].

Els capil·lars empaquetats emprant com a fase estacionària octadecilsilica (C₁₈) són els que més s'han utilitzat en la determinació d'aquests fàrmacs.

Com a exemple, De Rossi *et al.* [66] van analitzar sis NSAIDs en 13 minuts emprant una fase mòbil formada per 37.5% de metanol i 37.5% d'acetonitril. També s'han utilitzat altres fases estacionàries, com vancomicina i teicoplanina per la separació enantioselectiva de NSAIDs [67].

En els últims anys han sorgit dues aplicacions en l'anàlisi d'aquests analits emprant els altres dos tipus de capil·lars. Pai *et al.* [68] van enllaçar covalentment histidina, com a fase estacionària, a les parets internes del capil·lar i en aquestes condicions van analitzar set NSAIDs, encara que el temps d'anàlisi va ser molt llarg, de 50 minuts. Hoegger *et al.* [69] van polimeritzar *in situ* un monòlit d'acrilamida a l'interior del capil·lar i van aplicar aquest capil·lar en la determinació de set NSAIDs que van ser resolts en 15 minuts.

Finalment, Sadecká *et al.* [70-73] van descriure diferents metodologies basades en ITP per la determinació d'aquests fàrmacs. En aquesta tècnica, els ions de la mostra migren en una zona compresa entre dos electròlits anomenats capdavanter o frontal (EF) i terminal (ET). Aquests electròlits, EF i ET, contenen ions que tenen una mobilitat superior i inferior, respectivament, als ions de la mostra que es volen analitzar. En la determinació de NSAIDs s'ha emprat com a electròlit EF diferents solucions que tenen un pH entre 4.5 i 5.0 i com a elèctrolit ET sempre s'ha emprat l'àcid 2-(N-morfolino)ethanesulfònic (MES). La ITP, apart d'utilitzar-se com a mode de separació electroforètic, també s'ha emprat com a tècnica de separació i posterior separació dels analits preconcentrats. Aquests estudis s'han realitzat emprant un sol capil·lar [72, 73] o acoblant dos capil·lars [70-72]. L'avantatge de treballar amb dos capil·lars és que permet l'anàlisi directe de mostres biològiques sense una tècnica prèvia de pretractament de la mostra.

Malgrat el gran potencial de la tècnica d'CE, generalment els LODs que s'assoleixen emprant qualsevol tècnica electroforètica no són suficients per la determinació d'analits a nivells traça degut al petit volum de mostra

injectat (entre 1 i 2% de la capacitat del capil·lar) i al petit camí òptic que tenen els capil·lars que s'utilitzen. Ja que l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral és el desenvolupament de diferents estratègies per disminuir els LODs de la tècnica d'CE, a continuació s'inclou un apartat on es descriuen les diferents estratègies més freqüentment emprades per aconseguir aquest objectiu en els diferents modes electroforètics. Degut a que els compostos objecte d'estudi en la Tesi Doctoral són els fàrmacs antiinflamatoris, l'enfoc d'aquestes estratègies s'ha centrat en analits que poden ser neutres o carregats negativament en funció del pH de treball, com és el cas d'aquest tipus de fàrmacs.

1.3 ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA SENSIBILITAT EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Tal com s'ha comentat en l'apartat anterior, l'CE presenta una baixa sensibilitat com a conseqüència del petit volum de mostra que es pot injectar en el capil·lar i del limitat camí òptic que tenen els capil·lars que s'utilitzen, ja que habitualment el detector es troba en línia quan s'utilitza la detecció UV-VIS. Amb la finalitat d'augmentar la sensibilitat i com a conseqüència disminuir els LODs de la tècnica, en CE s'han desenvolupat diferents estratègies per preconcentrar la mostra i augmentar la capacitat de detecció de la tècnica. Entre aquestes cal destacar les tècniques de preconcentració electroforètiques i les tècniques de preconcentració cromatogràfiques que utilitzen diferents alternatives per augmentar la quantitat de mostra injectada, i l'ús de l'MS com a sistema de detecció per millorar la capacitat de detecció.

1.3.1 Estratègies per augmentar la quantitat de mostra injectada: Tècniques de preconcentració

En CE s'han aplicat diferents alternatives per augmentar la quantitat de mostra injectada en el capil·lar, i en la present Tesi, aquestes s'han classificat en tècniques de preconcentració electroforètiques i cromatogràfiques. A continuació es descriu el fonament d'aquestes tècniques i també es fa referència a alguns dels exemples a què s'han aplicat.

1.3.1.1 Tècniques de preconcentració electroforètiques

Les tècniques de preconcentració electroforètiques són les més freqüentment emprades per preconcentrar la mostra en CE. Aquestes es basen en les diferències de mobilitat dels analits entre la zona de la mostra i la zona de l'electròlit.

Entre les tècniques de preconcentració electroforètiques hi ha les tècniques de *sample stacking*, de *pH-mediated sample stacking*, de *stacking* amb acetonitril, de *dynamic pH junction*, de ITP i de *sweeping*. Aquestes tècniques es diferencien entre elles en funció de la propietat físico-química que proporciona a l'analit aquesta diferència de mobilitat entre la zona de la mostra i la zona de l'electròlit. Així, per exemple, una diferència de conductivitat entre les dues zones és la responsable de la preconcentració en les tècniques de *sample stacking*, o una diferència de pH ho és de les tècniques de *pH-dynamic junction*.

a) Tècniques de *sample stacking*

Les tècniques anomenades *sample stacking* són les tècniques de preconcentració electroforètiques més estudiades i aplicades en CE. La

Figura 1.1 mostra un esquema d'aquest mecanisme de preconcentració per analits carregats negativament en el qual es representa el capil·lar de separació i la solució que conté el vial del punt d'injecció (*inlet*) i la que conté el vial del punt de detecció (*outlet*). El mecanisme de preconcentració es basa en una diferència de conductivitats i, consegüentment, de velocitats electroforètiques dels analits entre la zona de la mostra on el camp elèctric és elevat (zona de baixa conductivitat) i la zona de l'electròlit on el camp elèctric és baix (zona d'elevada conductivitat). En aquestes tècniques, tal com s'observa a la Figura 1.1, després d'injectar un gran volum de mostra en el capil·lar (a), els anions que conté aquesta migren més ràpidament en la zona de la mostra que en la zona de l'electròlit i redueixen la seva velocitat en aproximar-se a la zona de l'electròlit (b). Els anions de la mostra es preconcentren en un volum més petit quan arriben a la interfície de les dues zones (mostra/electròlit) i augmenta d'aquesta manera la concentració d'aquests analits en la zona de la mostra (c).

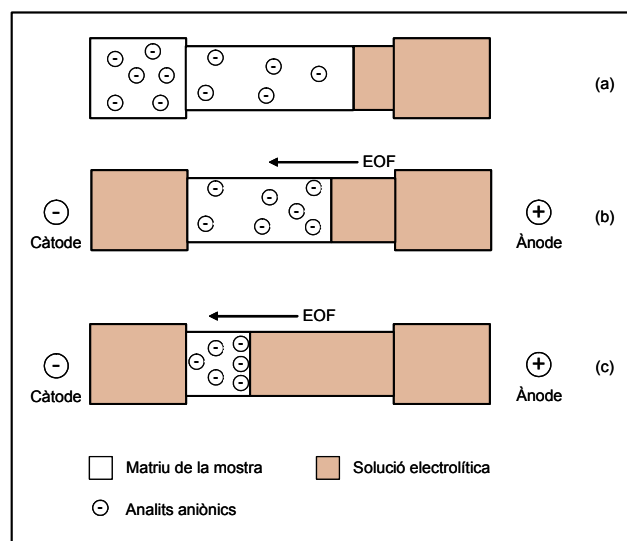


Figura 1.1. Representació esquemàtica de la tècnica de *sample stacking* per a la preconcentració d'anions.

A la Taula 1.1 es presenten les tècniques de *sample stacking* més característiques per a disminuir els LODs en CE per analits carregats negativament. Aquestes tècniques, en la present Tesi Doctoral s'han classificat en funció del tipus d'injecció utilitzat per introduir la mostra en el capil·lar de separació i de si existeix o no supressió del flux electroosmòtic (EOF) per tal d'eliminar la matriu de la mostra del capil·lar. Com s'observa, en funció del mode electroforètic emprat per a preconcentrar la mostra, les tècniques de *sample stacking* poden rebre noms diferents.

Taula 1.1. Tècniques de preconcentració de *sample stacking* aplicades per l'anàlisi d'anions.

Tècniques de <i>sample stacking</i>						
	Sense supressió de l'EOF			Amb supressió de l'EOF		
	CZE	MEKC	MEEKC	CZE	MEKC	MEEKC
Una injecció						
Hidrodinàmica	LVSS	REPSM	REPSM	LVSEP	SRMM SRW	SRMP SRW
Electrocinètica	FASI	FESI	FESI	FAEP <i>Stacking sequential</i>	FESI-RMM	FESI-RMM
Més d'una injecció						
Hidrodinàmica / hidrodinàmica	---	Múltiple <i>stacking</i>	---	---	---	---
Hidrodinàmica / electrocinètica	---	---	---	LVSEP-ASEI	SRMM-ASEI	---

- **Tècniques de *sample stacking* basades en una injecció**

Les tècniques de *sample stacking* es basen en la introducció d'un gran volum de mostra en el capil·lar mitjançant l'ús de la injecció hidrodinàmica (aplicant pressió durant un temps determinat) o electrocinètica (aplicant una

diferència de potencial durant un temps determinat). Per tal d'obtenir un elevat factor de preconcentració, la mostra es prepara en aigua o en una matriu de més baixa conductivitat que la solució electrolítica.

Una injecció hidrodinàmica

Aquestes tècniques de preconcentració es basen en la injecció hidrodinàmica d'un gran volum de mostra. Degut a que en aquestes condicions aproximadament tot el capil·lar és ple de mostra, la matriu de la mostra ha de ser eliminada del capil·lar prèviament a la separació electroforètica per tal d'obtenir una bona resolució després que el procés de preconcentració s'hagi completat. Existeixen dues maneres d'eliminar la matriu de la mostra del capil·lar, amb o sense supressió de l'EOF.

Sense supressió de l'EOF

Quan la matriu de la mostra s'elimina del capil·lar sense la supressió de l'EOF, és necessària l'aplicació d'un voltatge negatiu (càtode a l'extrem de detecció) per invertir el sentit de l'EOF (Figura 1.1). D'aquesta manera aquest arrossega substàncies interferents fora del capil·lar per l'extrem d'injecció. Per tal que els analits preconcentrats en la interfície mostra/electròlit no siguin també eliminats del capil·lar conjuntament amb la matriu de la mostra, el corrent electroforètic s'ha de monitoritzar acuradament fins que assoleixi el 95-99% del seu valor original (quan tot el capil·lar és ple de solució electrolítica). En aquest moment, s'atura el voltatge i s'aplica una diferència de potencial positiva per a dur a terme la separació electroforètica dels anions de la mostra.

Chien *et al.* [32, 74-77] van estudiar intensament el mecanisme de preconcentració d'aquesta tècnica per CZE, que en aquest cas s'anomena **large-volume sample stacking** (LVSS). La Figura 1.2 mostra una

representació esquemàtica d'aquesta tècnica. Inicialment, s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra, de manera que s'omple tot el capil·lar (a). Seguidament, es canvia el vial de la mostra pel vial de l'electròlit i s'aplica una diferència de potencial negativa per tal d'invertir el sentit de l'EOF (càtode en l'extrem d'injecció) i s'eliminen d'aquesta manera cations i analits neutres (b). La matriu de la mostra es va eliminant del capil·lar per l'EOF i els anions de la mostra es van preconcentrant en la interfície mostra/electròlit (c). Quan la matriu de la mostra s'ha eliminat del capil·lar, el valor de la intensitat de corrent és aproximadament el 95% del valor de la intensitat respecte quan el capil·lar és ple d'electròlit, llavors el voltatge s'atura; sinó fos així els analits preconcentrats es podrien perdre en el vial d'injecció (d). Una vegada s'ha eliminat la matriu, es torna a invertir el sentit de l'EOF aplicant un voltatge positiu (càtode en l'extrem de detecció) i es duu a terme la separació electroforètica. Els analits migren cap al detector per la mobilitat de l'EOF, ja que la magnitud d'aquest és més gran que les mobilitats electroforètiques efectives (μ_e) dels anions de la mostra (e).

Aquesta tècnica de preconcentració a més de ser aplicada en CZE per la determinació d'analits de poca mobilitat, també ho ha estat en MEKC i en MEEKC, i en aquests casos la tècnica s'ha anomenat **reversed electrode polarity stacking mode** (REPSM). Tot i que el fonament d'aquesta tècnica és molt semblant al de la tècnica anterior (LVSS), en REPSM l'eficàcia de la tècnica, a banda de ser deguda a la diferència de conductivitat entre les dues zones, també depèn de l'afinitat que tenen els analits de la mostra vers la fase pseudoestacionària. Com més afinitat tenen els analits per aquesta fase, més retenció hi ha i, conseqüentment, el factor de preconcentració i l'eficàcia dels pics és més gran.

Aquestes dues tècniques de preconcentració, LVSS i REPSM, s'han aplicat en la determinació de diferents analits, com fàrmacs [62, 78, 79], fenols [80], obtenint-se un factor de preconcentració entre 2 i 150 vegades comparat amb la injecció hidrodinàmica normal (injecció d'un petit volum de

mostra). Per exemple, Wang *et al.* [81] van determinar diferents fàrmacs en una mostra de plasma a nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mitjançant la tècnica *off-line* SPE-LVSS-CZE.

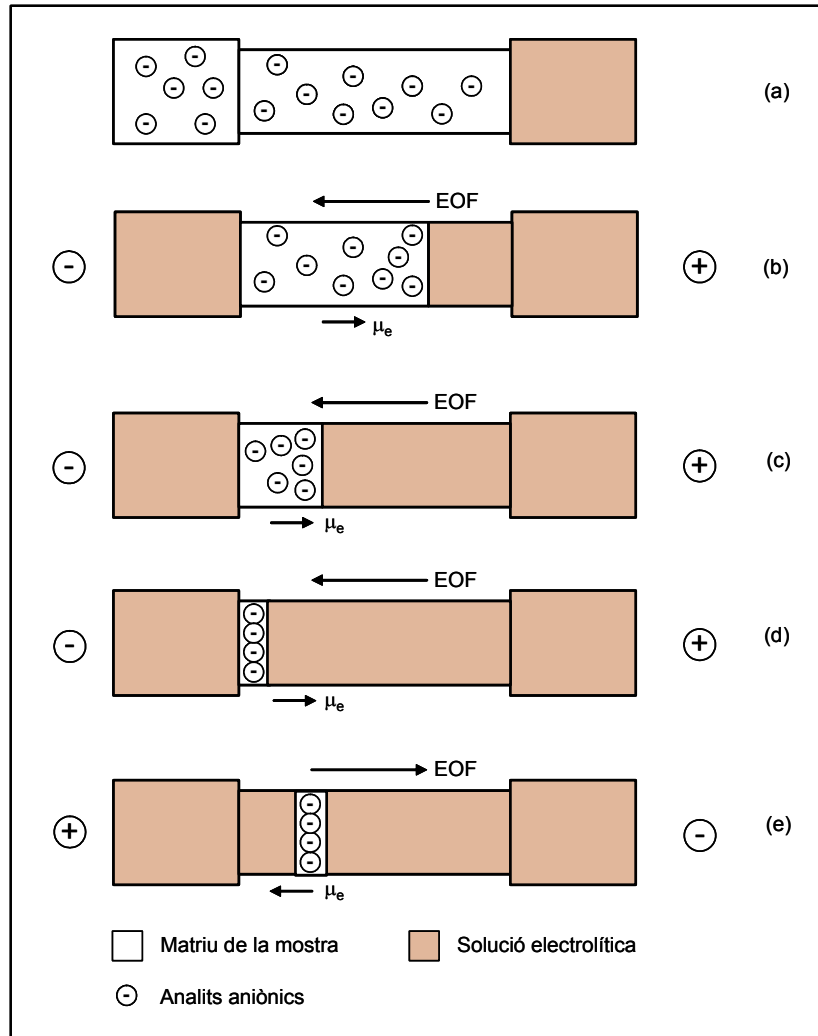


Figura 1.2. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcetració de LVSS en CZE per l'anàlisi d'anions.

Amb supressió de l'EOF

Tal com s'ha comentat prèviament, en aquestes tècniques de preconcentració en què la mostra s'injecta en el capil·lar hidrodinàmicament, la matriu de la mostra també es pot eliminar del capil·lar mitjançant la supressió de l'EOF. A la bibliografia s'han descrit diferents estratègies per aconseguir-ho com la utilització d'un electròlit de pH àcid (pH inferiors a 3) [59, 63, 82-84], treballar amb capil·lars on els grups silanols de les parets s'han modificat [85-88] o addicionar un modificador de l'EOF a l'electròlit, com dietilentriamina (DETA) [89], bromur de tetradeciltrimetilamoni (TTAB) [90-92], òxid de polietilè (PEO) [93], poliamina [91] o surfactants amfotèrics [94]. Recentment, també s'ha emprat el metanol com a solvent de l'electròlit [44, 95-97] i el condicionament del capil·lar amb un medi àcid (pH-histèresis) [98] per suprimir l'EOF.

Chien *et al.* [89] van desenvolupar la tècnica de preconcentració anomenada ***large-volume stacking using the EOF pump*** (LVSEP) en el mode electroforètic de CZE. En aquesta tècnica s'introdueix hidrodinàmicament un gran volum de mostra en el capil·lar mentre la matriu de la mostra s'elimina del capil·lar mitjançant la supressió de l'EOF. En LVSEP, aplicant un mateix voltatge negatiu es duu a terme consecutivament la preconcentració dels analits i la separació electroforètica dels mateixos. Així, un avantatge d'aquesta tècnica respecte la tècnica de LVSS, és que en aquesta no és necessari monitoritzar acuradament el corrent per no perdre els analits concentrats cap al vial d'injecció. Un requisit, però, per poder aplicar aquesta tècnica a anions és que les μ_e absolutes dels analits han de ser més grans que l'EOF.

La Figura 1.3 mostra una representació esquemàtica d'aquesta tècnica de preconcentració per anions en CZE. Inicialment, s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra, de manera que s'omple tot el capil·lar de mostra (a). Seguidament, es canvia el vial de la mostra pel de l'electròlit i s'aplica una diferència de potencial negativa (b). La matriu de la mostra es va

eliminant del capil·lar a mesura que l'EOF es va suprimint, degut a que el capil·lar cada vegada es va omplint d'electròlit procedent del vial de l'extrem de detecció. Mentrestant, els anions de la mostra es van preconcentrant en la interfície mostra/electròlit (c), fins al punt en què tota la matriu de la mostra s'ha eliminat del capil·lar i les dues mobilitats, la dels analits (μ_e) i la de l'EOF s'han compensat (d). Conseqüentment, els analits migren cap al detector per la seva μ_e i té lloc la separació electroforètica (e).

Aquesta tècnica de preconcentració apart de ser aplicada en CZE, també ho ha estat en MEKC i en MEEKC, i en aquests dos modes les tècniques s'anomenen ***stacking with reverse migrating micelles*** (SRMM) i ***stacking with reverse migrating pseudostationary phase*** (SRMP), respectivament, tal com es mostra a la Taula 1.1.

Aquestes tècniques de preconcentració, LVSEP, SRMM i SRMP, s'han aplicat a la determinació de fàrmacs [44, 59, 63, 85], d'àcids orgànics [82, 95, 98], d'anions inorgànics [82, 83, 87, 92], d'aminoàcids [86, 90, 91], de proteïnes [87], de fragments de DNA [93] i de fenols [97, 98] entre d'altres. La sensibilitat de la tècnica ha augmentat en un interval ben ampli, des de 5 a 1000 vegades, respecte la injecció hidrodinàmica normal. Com exemple, alguns fàrmacs antiinflamatoris es van determinar a baixos nivells de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en una mostra d'aigua mineral mitjançant la tècnica de LVSEP en combinació amb la tècnica d'SPE *off-line* [44]. Maeso *et al.* [90] van mostrar l'aplicabilitat de la tècnica per determinar diferents aminoàcids en la seva forma oxidada en orina de rates diabètiques.

Una altra tècnica de preconcentració que s'ha aplicat suprimint l'EOF i injectant la mostra hidrodinàmicament s'anomena ***stacking using reverse migrating micelles and a water plug*** (SRW). En aquesta tècnica, que només s'ha aplicat en MEKC i en MEEKC, abans d'introduir un gran volum de mostra en el capil·lar, que també s'ha preparat en una matriu de més baixa conductivitat que la solució electrolítica, s'introdueix hidrodinàmicament en el capil·lar una petita quantitat d'aigua o d'un solvent orgànic (*solvent plug*).

Després d'introduir la mostra, els analits es preconcentren seguint el mateix mecanisme que el de la tècnica LVSEP [99].

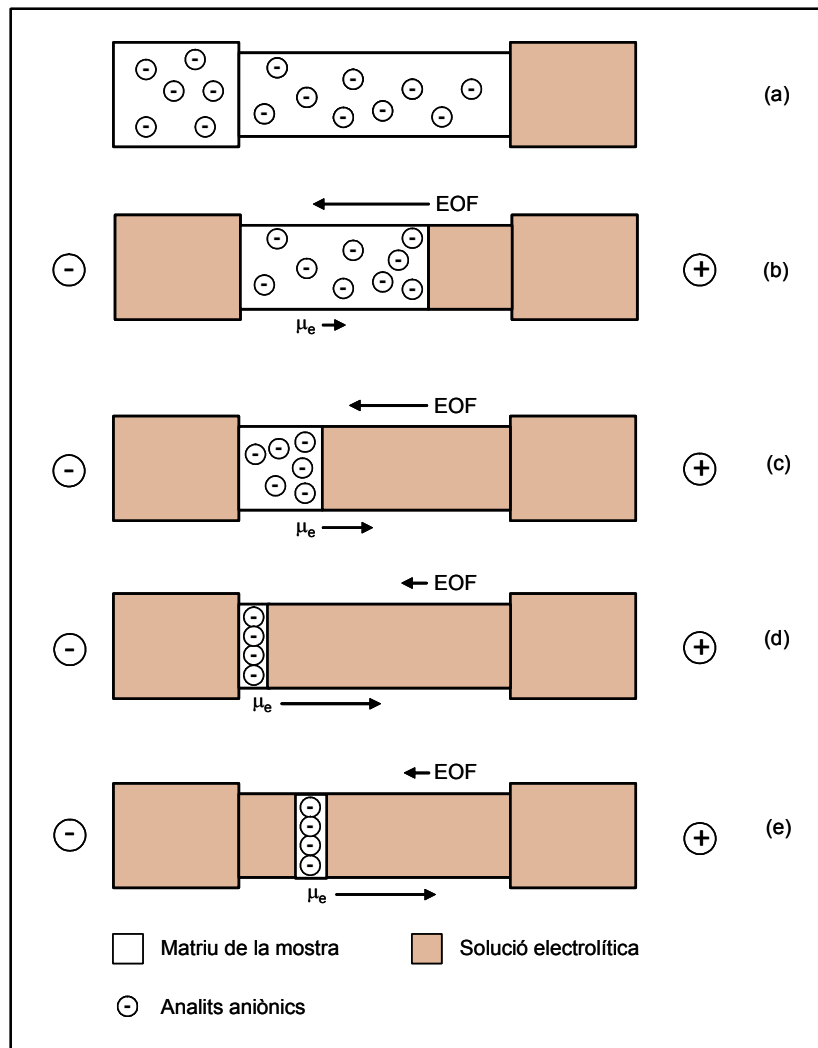


Figura 1.3. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració de LVSEP per l'anàlisi d'anions en CZE.

El *solvent plug* també es caracteritza per tenir una baixa conductivitat, i com a resultat de la seva introducció es produeix un augment del camp elèctric en el punt d'injecció. Aquest fet permet injectar més anions en el capil·lar, obtenint-se així un factor de preconcentració més gran [77]. L'aigua és el *solvent plug* més emprat en aquesta tècnica [99, 100].

La SRW s'ha aplicat, entre d'altres, en la determinació de fenols [99, 100], d'hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) [99] i de dioxines [101] en MEKC i en la determinació d'esteroides [102] en MEEKC. Així, per exemple, diferents alquilfenols i el bisfenol A es van determinar mitjançant la tècnica *off-line* SPE-SRW-MEKC en mostres d'aigua superficial a nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [100].

Una injecció electrocinètica

Un altre grup de tècniques de preconcentració de *sample stacking* es basen en la injecció electrocinètica d'un gran volum de mostra en el capil·lar. De la mateixa manera que en les tècniques anteriors, la matriu de la mostra ha de ser eliminada del capil·lar prèviament a la separació electroforètica per tal d'obtenir una bona resolució després que el procés de preconcentració s'hagi completat. En aquesta tècnica de preconcentració també existeixen dues maneres d'eliminar la matriu de la mostra del capil·lar, amb o sense supressió de l'EOF.

En aquestes tècniques de preconcentració, generalment com a pas previ a la injecció electrocinètica de la mostra, s'introdueix hidrodinàmicament una petita quantitat de *solvent plug*, que tal com s'ha comentat per la tècnica de SRW, proporciona un augment del camp elèctric en el punt d'injecció [77]. Tot i que el *solvent plug* més emprat és l'aigua, alguns investigadors n'han emprat d'altres, com una solució formada per metanol:aigua (70:30 v/v) [103] o per acetonitril:aigua (50:50 v/v) [104, 105]. A més, amb l'addició d'un *solvent plug* s'ha observat un augment de la sensibilitat entre 2 i 3

vegades respecte a no injectar-lo. Zhang *et al.* [106], apart d'un *solvent plug*, també van addicionar hidrodinàmicament un *preinjection plug*, format per etilenglicol, que s'injectava entre el *solvent plug* i la mostra. L'addició d'aquest component va suposar un augment de la sensibilitat de 2 vegades respecte a no addicionar-lo.

Sense supressió de l'EOF

Quan la matriu de la mostra s'elimina del capil·lar sense la supressió de l'EOF cal aplicar una diferència de potencial negativa per tal d'invertir el sentit de l'EOF. Aquesta tècnica s'anomena **field-amplified sample injection** (FASI) en CZE i **field-enhanced sample injection** (FESI) en MEKC i MEEKC. La Figura 1.4 mostra una representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració FASI per anions.

Inicialment, una petita quantitat de *solvent plug* de baixa conductivitat s'injecta hidrodinàmicament en el capil·lar per augmentar el camp elèctric en el punt d'injecció (a). Després, s'introdueix electrocinèticament un gran volum de mostra en el capil·lar (b). A continuació, es canvia el vial de la mostra pel vial de l'electròlit i s'aplica una diferència de potencial negativa (c). De la mateixa manera que en LVSS, la matriu de la mostra es va eliminant del capil·lar per l'EOF i els anions es van preconcentrant en la interfície mostra/electròlit (d). Quan tota la matriu de la mostra s'ha eliminat del capil·lar, és a dir, quan el valor de la intensitat de corrent és aproximadament el 95% del valor de la intensitat respecte quan el capil·lar és ple d'electròlit, s'atura el voltatge aplicat (e). Seguidament s'aplica una diferència de potencial positiva per a que es dugui a terme la separació electroforètica i els analits migren cap al detector per l'EOF (f).

Les tècniques FASI i FESI s'han aplicat a la determinació de diferents analits com fluorur [107], fenols [108, 109], estrògens [110] i proteïnes [111]. Els factors de preconcentració que s'han obtingut són d'unes 100 vegades,

respecte la injecció hidrodinàmica normal. Zhu *et al.* [107] van determinar l'ió fluorur en pasta de dents mitjançant la tècnica FASI i el LOD en solucions estàndards va ser de $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

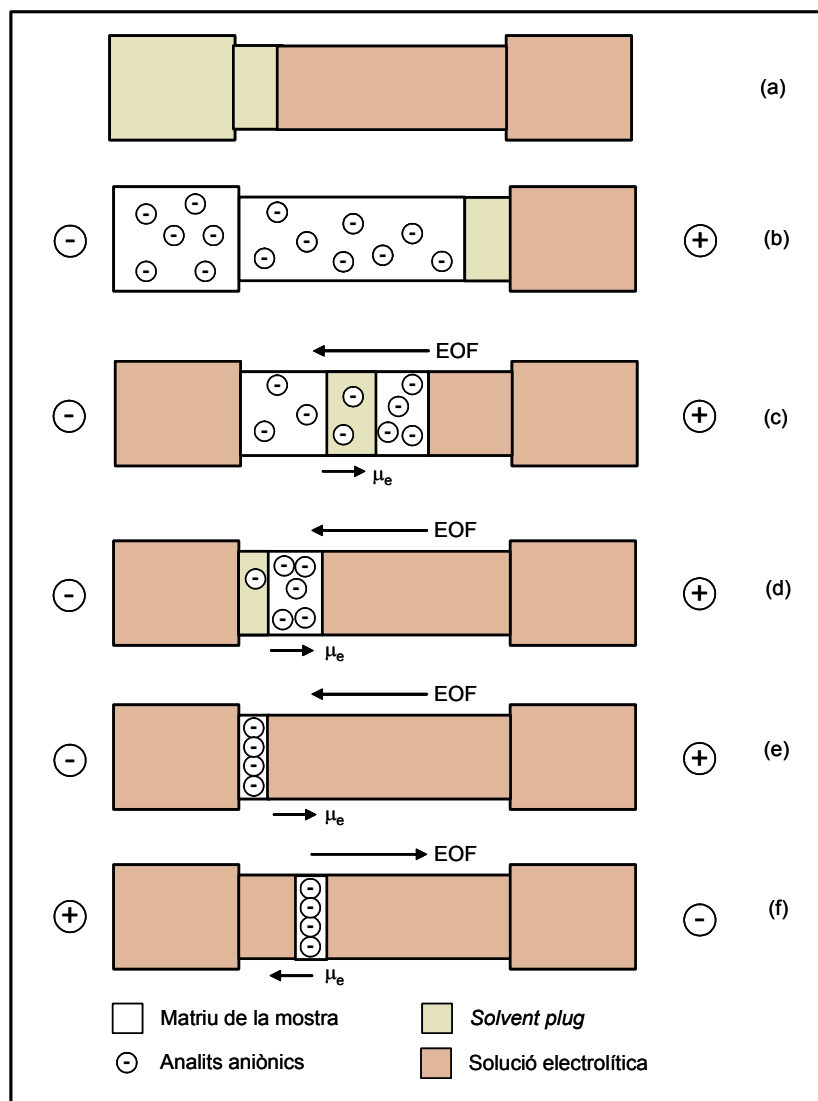


Figura 1.4. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració FASI en CZE per l'anàlisi d'anions.

Amb supressió de l'EOF

La tècnica basada en la injecció electrocinètica d'un gran volum de mostra també s'ha aplicat suprimint l'EOF per eliminar la matriu de la mostra del capil·lar i s'han emprat les mateixes estratègies comentades anteriorment. Aquesta tècnica de preconcentració aplicada en CZE s'anomena ***field-amplified sample injection with sample matrix removal using the EOF pump*** (FAEP) i a la Figura 1.5 es mostra una representació esquemàtica d'aquesta tècnica. Inicialment, una quantitat més gran de *solvent plug* que en les tècniques anteriors s'injecta hidrodinàmicament en el capil·lar (a). Una vegada aquest s'ha injectat, s'introdueix la mostra electrocinèticament en el capil·lar (b). La matriu de la mostra es va eliminant del capil·lar a mesura que l'EOF es va suprimint, ja que cada vegada el capil·lar es va omplint d'electròlit procedent del vial del punt de detecció (c), al mateix temps que els anions de la mostra es van preconcentrant en la interfície mostra/electròlit (d). Quan tota la matriu de la mostra s'ha eliminat del capil·lar (e), és a dir, quan el corrent del sistema és el 95% del valor de la intensitat respecte quan el capil·lar és ple d'electròlit, s'atura la injecció de la mostra, i es canvia el vial de la mostra pel vial de l'electròlit. En aquest moment les dues mobilitats, la pròpia dels analits (μ_e) i la de l'EOF, es compensen i s'aplica una diferència de potencial negativa per a dur a terme la separació electroforètica. Els analits migren cap al detector per la seva μ_e (f).

Aquesta tècnica de preconcentració, apart d'aplicar-se en CZE, també ho ha estat en MEKC i MEEKC i les tècniques s'anomenen ***field-enhanced sample injection with reverse migrating micelles*** (FESI-RMM) i ***field-enhanced sample injection with reverse migrating pseudostationary phase*** (FESI-RMP), respectivament. Quan s'apliquen aquestes dues tècniques, l'EOF es suprimeix treballant amb solucions electrolítiques àcides (pH inferiors a 3).

En el cas d'analits que tenen grups carboxílics en la seva estructura molecular, a aquests valors de pH es troben en la seva forma neutra i per a

que es puguin injectar electrocinèticament en el capil·lar, la mostra es prepara amb la mateixa solució electrolítica però diluïda.

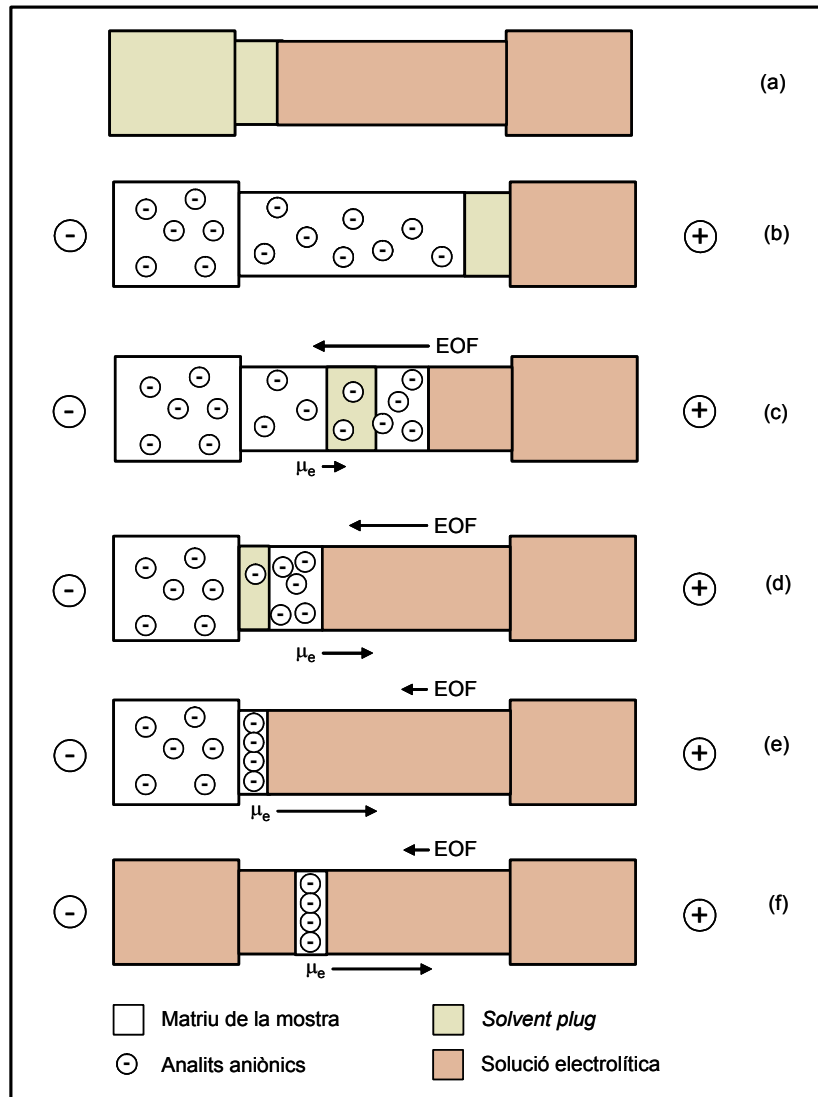


Figura 1.5. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració FAEP en CZE per l'anàlisi d'anions.

Les tècniques FAEP, FESI-RMM i FESI-RMP s'han aplicat a la determinació d'una gran varietat d'analits, entre ells fàrmacs [105, 112], herbicides [104, 113], anions inorgànics [83], alcaloides [114], favonoides [115] i fenols [116], obtenint-se factors de preconcentració de fins a 3000, respecte la injecció hidrodinàmica normal. En la determinació de fàrmacs antiinflamatoris mitjançant FAEP-CZE, els LODs en solucions estàndard van ser inferiors a $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [105]. Zhu *et al.* [104] van determinar diferents herbicides mitjançant la tècnica *off-line* SPE-FAEP-CZE en aigua de riu i els LODs van ser de $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Buchberger *et al.* [112] van determinar un antibiòtic en sang humana mitjançant la combinació de la tècnica d'SPE *off-line* i FESI-RMM-MEKC, i el LOD va ser de $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Recentment, Zhang *et al.* [117] han aplicat la tècnica de preconcentració anomenada ***stacking sequential*** que es basa en introduir consecutivament la mostra i una solució alcalina electrocinèticament. En aquesta tècnica, que s'ha aplicat per CZE, l'EOF es suprimeix mitjançant l'addició de TTAB a la solució electrolítica. La Figura 1.6 mostra una representació esquemàtica d'aquesta tècnica de preconcentració per l'anàlisi d'anions.

Inicialment, es condiciona el capil·lar amb la solució electrolítica que conté TTAB, i aquest s'adsorbeix dinàmicament a la paret interna del capil·lar. Abans d'injectar la mostra, una petita quantitat d'aigua (*solvent plug*) s'injecta hidrodinàmicament en el capil·lar. En la zona del capil·lar on hi ha el *solvent plug*, la superfície del capil·lar es restaura, ja que el TTAB de la superfície del capil·lar es dissol amb l'aigua (a). Una vegada s'ha injectat el *solvent plug*, els anions de la mostra s'introdueixen per injecció electrocinètica i aquests migren ràpidament cap a la interfície *solvent plug*/electròlit (b). Quan els anions arriben a aquesta interfície, les seves mobilitats (μ_e) van disminuint ja que el camp elèctric en la zona de l'electròlit és més petit. Mentrestant, el *solvent plug* es va eliminant del capil·lar per l'EOF. Degut a que en tot aquest procés el capil·lar es va omplint d'electròlit procedent del vial de l'extrem de detecció, el TTAB de la solució electrolítica

es va adsorbint a la paret interna del capil·lar una altra vegada i, consegüentment l'EOF es fa cada vegada més petit (c).

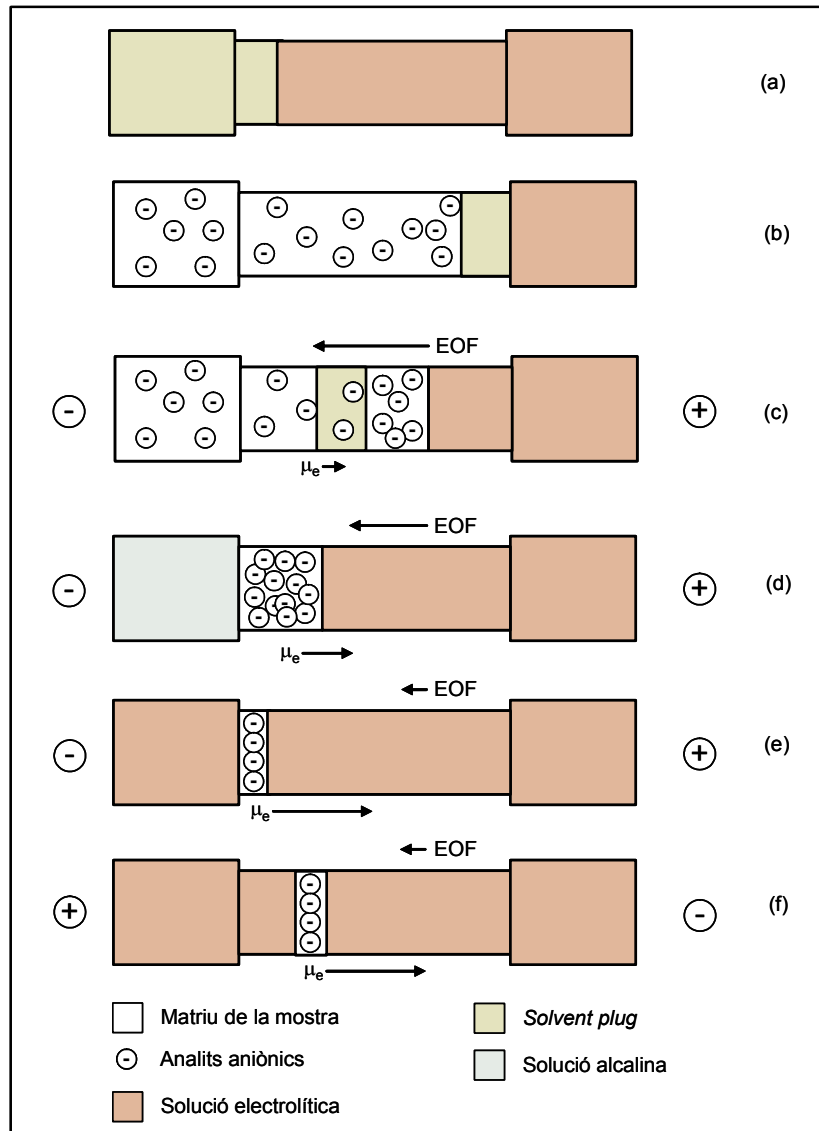


Figura 1.6. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració de *stacking sequential* per l'anàlisi d'anions.

Després de la introducció de la mostra, s'injecta una solució alcalina electrocinèticament (d). Degut als grups hidroxils d'aquesta solució i al catió de l'electròlit, es produeix una reacció de neutralització i es crea així una zona de més baixa conductivitat, en la que els analits de la mostra es preconcentren encara més. Després d'introduir la solució alcalina, es canvia el vial d'aquesta solució pel vial de la solució electrolítica (e) i s'aplica una diferència de potencial negativa per a dur a terme la separació electroforètica (f).

El potencial d'aquesta tècnica de preconcentració es mostra amb el gran augment de senyal que s'obté, entre 80.000 i 130.000 vegades, en comparació amb la injecció hidrodinàmica normal. Zhang *et al.* [117] van aplicar aquesta tècnica, en combinació amb una extracció líquid-líquid (LLE) com a tractament de la mostra, per determinar sis anions inorgànics (clorur, nitrit, nitrat, sulfat, fluorur i monohidrogenfosfat) en una mostra de tabac a baixos nivells de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (6-14 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$).

- **Tècniques de sample stacking basades en més d'una injecció**

Apart de les tècniques de preconcentració *sample stacking* basades en la injecció hidrodinàmica o electrocinètica d'un gran volum de mostra, diferents investigadors n'han aplicat d'altres que es basen en l'ús de més d'una injecció. Així, els analits s'introdueixen emprant dues injeccions consecutives, dues hidrodinàmiques o una hidrodinàmica seguida d'una electrocinètica.

Urban *et al.* [118] van emprar dues injeccions hidrodinàmiques consecutives per introduir els analits de la mostra en el capil·lar en la determinació d'esteroides. En aquesta tècnica, anomenada **múltiple *stacking*** i que s'ha aplicat en MEKC, després de condicionar el capil·lar i injectar un gran volum de mostra hidrodinàmicament (fins a la finestra del detector), s'introdueix una petita quantitat d'electròlit en el capil·lar per tal d'evitar pèrdues dels

analits. Seguidament, s'aplica una diferència de potencial per eliminar la matriu de la mostra durant un cert temps. Aquest procés es pot repetir més d'una vegada per tal d'augmentar la sensibilitat. Després de preconcentrar els analits, s'aplica una diferència de potencial positiva i té lloc la separació electroforètica. El factor de preconcentració que van obtenir va ser de 200, respecte la injecció hidrodinàmica normal, en repetir el procés dues vegades.

Una altra tècnica de preconcentració que utilitza dues injeccions consecutives, hidrodinàmica i electrocinètica, per introduir els analits de la mostra en el capil·lar és la tècnica *LVSEP-anion selective exhaustive injection* (ASEI) o SRMM-ASEI, segons si s'aplica en CZE o en MEKC, respectivament. En aquesta combinació, després d'injectar hidrodinàmicament un gran volum de mostra en el capil·lar, s'introdueix electrocinèticament una quantitat addicional de mostra al mateix temps que s'elimina la matriu de la mostra degut a la supressió de l'EOF, aquest es realitza emprant les estratègies comentades anteriorment. La Figura 1.7 mostra una representació esquemàtica de la tècnica LVSEP-ASEI per l'anàlisi de compostos aniònics.

Inicialment, tot el capil·lar s'omple de mostra mitjançant una injecció hidrodinàmica (a). Després, sense canviar el vial de la mostra, s'injecta electrocinèticament una quantitat addicional d'aquesta amb l'objectiu d'injectar més anions (b). A mesura que la matriu de la mostra es va eliminant del capil·lar degut a la supressió de l'EOF (c), els anions es van preconcentrant en la interfície mostra/electròlit. Quan el corrent arriba al 95% del valor de la intensitat respecte quan el capil·lar és ple d'electròlit s'atura la injecció de la mostra (d). Seguidament, es canvia el vial de la mostra pel vial de l'electròlit i es duu a terme la separació electroforètica aplicant un voltatge negatiu, i els anions preconcentrats migren cap al detector mitjançant la seva μ_e (e).

Kim *et al.* [95] i Macià *et al.* [59, 105] van aplicar aquesta tècnica de preconcentració per la determinació d'anions orgànics d'acidesa feble i de

fàrmacs antiinflamatoris, respectivament. El potencial d'aquesta tècnica es va demostrar a través del gran augment de sensibilitat que es va obtenir, de fins a 1200 vegades. Recentment, s'han determinat fàrmacs antiinflamatoris en una mostra d'aigua mineral mitjançant la tècnica *off-line* SPE-SRMM-ASEI-MEKC i els LODs van ser de $200 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [59].

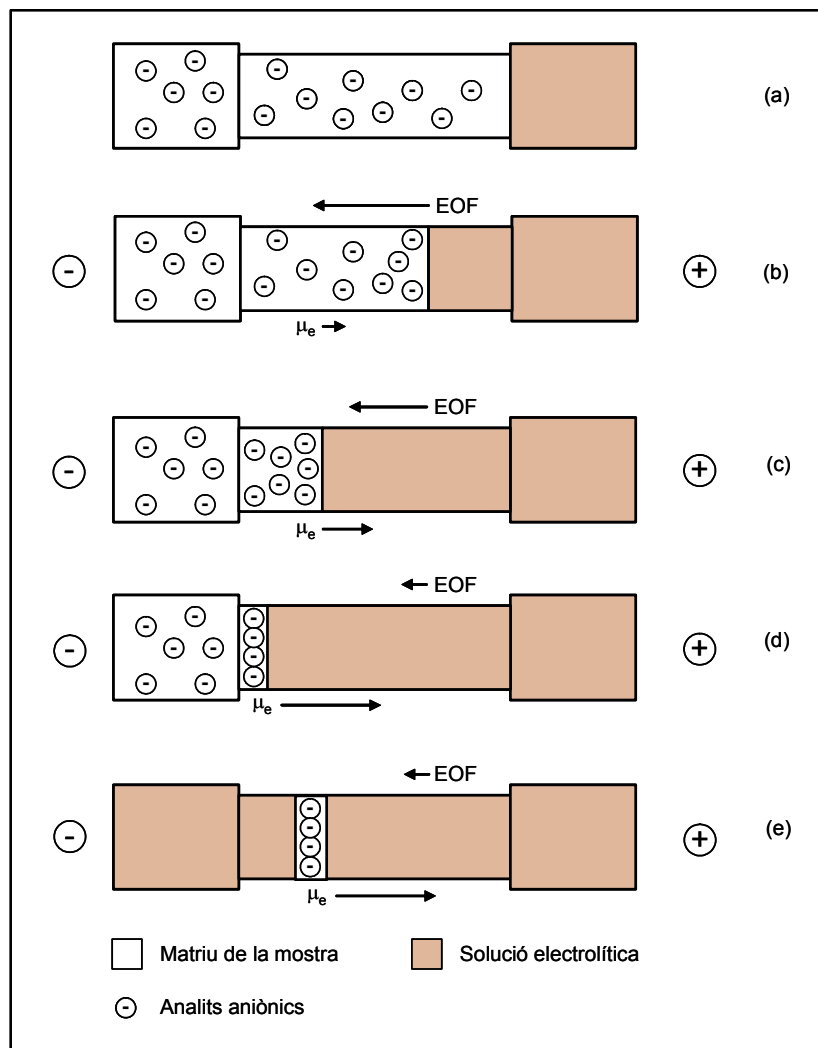


Figura 1.7. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració de LVSEP-ASEI en CZE per l'anàlisi d'anions.

Un requisit de les tècniques de *sample stacking* tal com s'ha comentat, és que la mostra s'ha de preparar en una matriu de més baixa conductivitat que la solució electrolítica. No obstant, això no sempre és possible ja que les conductivitats d'algunes mostres, com les biològiques, són molt superiors a les dels electrolits habituals degut a la gran quantitat de sals que contenen. Així doncs, per a poder aplicar les tècniques de *sample stacking* a aquestes mostres és necessària una etapa prèvia de tractament de la mostra, com una LLE o una SPE per disminuir la conductivitat de la mostra.

Una alternativa que no precisa de cap tècnica de tractament de la mostra és la tècnica de *pH-mediated sample stacking*, la qual es descriu a continuació. Aquesta tècnica, desenvolupada per Lunte *et al.* [119-124], permet preconcentrar analits que estan preparats en una matriu d'elevada conductivitat i només s'ha aplicat emprant com a tècnica de separació electroforètica l'CZE.

b) *pH-mediated sample stacking*

Les tècniques de *pH-mediated sample stacking* es basen en disminuir la conductivitat de la mostra, inicialment d'elevada conductivitat amb una solució alcalina. La Figura 1.8 mostra una representació esquemàtica d'aquesta tècnica per preconcentrar anions. Inicialment, després de condicionar el capil·lar amb un electrolit que té com a catió l'ió amoni (com l'acetat amònic), s'injecta electrocinèticament un gran volum de mostra d'elevada conductivitat (a). A continuació, s'injecta electrocinèticament una petita quantitat d'una solució alcalina. Els grups hidroxils (OH⁻) d'aquesta solució es neutralitzen amb el catió amoni de la mostra i es crea una zona de més baixa conductivitat (b). Aquest fet permet que els anions de la mostra migrin ràpidament i es preconcentrin a la interfície entre la zona de la mostra i la zona de l'electrolit (c). Després d'injectar la solució alcalina, es canvia el vial d'aquesta solució pel vial de l'electrolit i s'aplica una diferència de potencial negativa per a dur a terme la separació electroforètica (d).

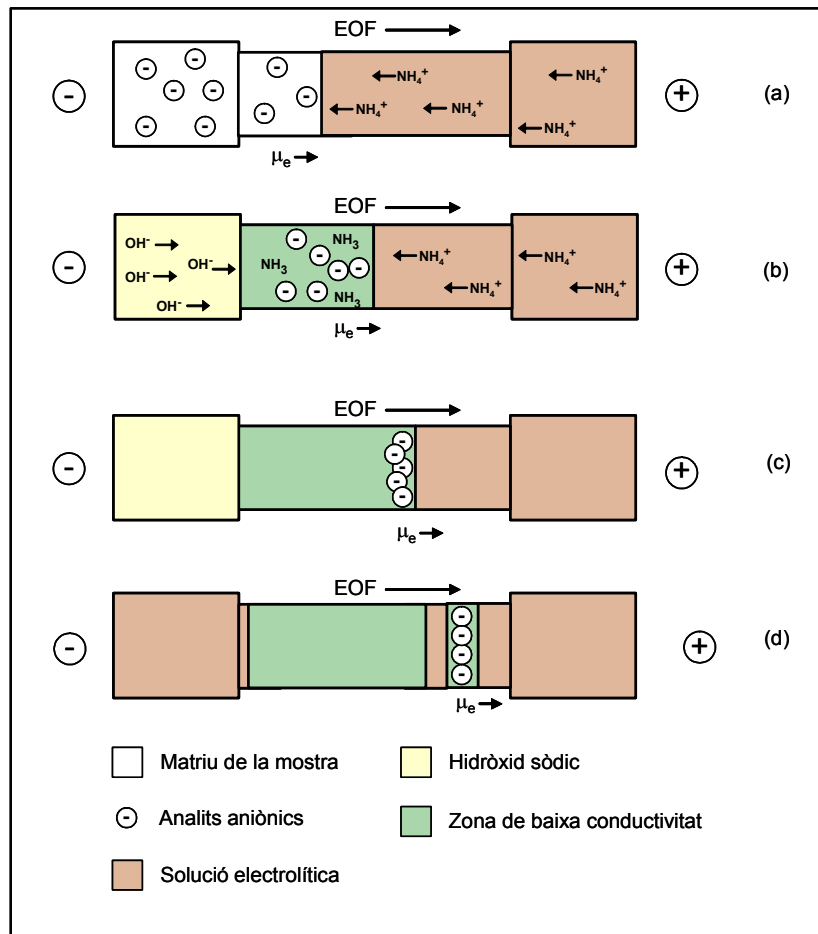


Figura 1.8. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració de *pH-mediated sample stacking* per l'anàlisi d'anions.

En aquesta tècnica és necessari invertir el sentit de l'EOF per a que tant els ions hidroxil com els ions de la mostra migrin en el sentit contrari al del catió de l'electròlit (NH_4^+). Com a modificador de l'EOF s'utilitza el TTAB [120, 122-124]. El TTAB és un surfactant catiònic que té propietats modificadores de l'EOF, en funció de la seva concentració aquest pot suprimir o invertir l'EOF. En aquesta tècnica, es suprimeix l'EOF mitjançant una addició de 0.5 mM de TTAB.

Tal com s'ha comentat anteriorment, aquesta tècnica de preconcentració s'ha aplicat per la determinació de fàrmacs [122, 123], aminoàcids [122], pèptids [124] i fenols [120] en l'anàlisi de mostres biològiques. Com a exemple, es van determinar diferents àcids fenòlics en mostres biològiques a nivells de desenes de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, obtenint-se un factor de preconcentració de 66 [120].

Una altra diferència important d'aquesta tècnica de preconcentració amb les descrites en l'apartat a), és que la matriu de la mostra no s'elimina del capil·lar després d'injectar un gran volum de mostra. En *pH-mediated sample stacking* una gran part del capil·lar s'utilitza per preconcentrar la mostra, mentre que només una petita part d'aquest s'utilitza per realitzar la separació electroforètica. Aquest fet limita la quantitat de mostra que es pot injectar en el capil·lar tot mantenint l'eficàcia de separació. Zhao *et al.* [120] van solucionar aquest problema acoblant tres capil·lars (A, B i C) tot formant una "T", tal com es mostra a la Figura 1.9. En aquest sistema, després d'injectar la mostra en el capil·lar A, s'aplica una diferència de potencial entre els capil·lars A i C. Els analits es van preconcentrant i quan aquests arriben a la interfície entre els dos capil·lars s'atura aquest voltatge, i s'aplica un altre voltatge entre els capil·lars C i B on els analits es van separant electroforèticament en el capil·lar B. El moment de canvi de voltatge és un paràmetre crític del sistema i s'optimitza mitjançant l'ús d'un sol capil·lar, que en aquest cas seria l'ús d'un capil·lar de longitud efectiva de 50 cm. Mitjançant aquest sistema, Zhao *et al.* [120] van obtenir un augment de la sensibilitat de 300 vegades tot mantenint una bona eficàcia de separació, per la determinació de tres fenols en mostres biològiques i els LODs van ser de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

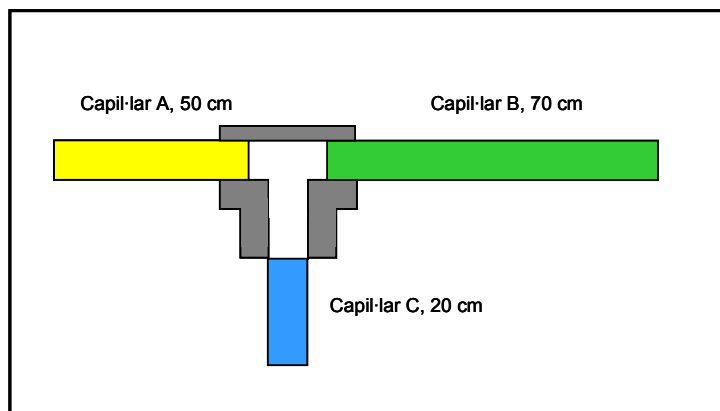


Figura 1.9. Representació esquemàtica de l'ús de tres capil·lars en la tècnica de preconcentració de *pH-mediated sample stacking* que van emprar Zhao *et al.* [120] per l'anàlisi d'anions.

c) *Stacking* amb acetonitril

La tècnica d'*stacking* amb acetonitril va ser descrita per Shihabi *et al.* [125-130] i s'utilitza amb dos objectius, el de netejar una matriu biològica, sèrum o plasma, i el de preconcentrar els anions a determinar. El seu fonament es basa en addicionar acetonitril a la mostra biològica. Mitjançant aquesta addició, les proteïnes de la mostra precipiten, mentre que els analits (anions) romanen en el medi sobrenadant. D'aquesta manera es produeix una neteja de la matriu de la mostra, ja que s'eliminen substàncies interferents com són les proteïnes. Seguidament, després d'eliminar el precipitat mitjançant una filtració, s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra del medi sobrenadant en el capil·lar.

Aquesta tècnica permet injectar un gran volum de mostra degut a que en el medi sobrenadant encara hi ha acetonitril, ja que aquest és un solvent de baixa conductivitat.

Aquesta tècnica s'ha aplicat, entre d'altres, per a la determinació de fàrmacs [125, 126, 130] i pèptids [128, 131] en sèrum i plasma. Shihabi *et al.* [128]

van determinar insulina en un teixit de pàncrees. Després d'addicionar un 66% d'acetonitril a la mostra i centrifugar aquesta, es va obtenir un augment de la sensibilitat d'unes 20 vegades, respecte la injecció hidrodinàmica normal, i el LOD va ser de $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tot i que els LODs que s'obtenen amb aquesta tècnica són suficients per a la determinació d'analits en mostres biològiques, aquesta tècnica no s'ha emprat en el camp mediambiental ja que els factors de preconcentració que s'assoleixen no són gaire elevats.

d) *Dynamic pH junction*

El *dynamic pH junction* és una tècnica de preconcentració que es basa en la diferència de mobilitats dels analits, en funció del seu grau d'ionització, entre la zona de la mostra i la zona de l'electròlit. Aquesta tècnica, intensament estudiada per Britz-Mckibbin *et al.* [132-135], permet preconcentrar selectivament analits amfotèrics i àcids febles. Addicionalment, aquesta tècnica de preconcentració, que només s'ha aplicat en CZE, també permet millorar l'eficàcia de separació dels analits que tenen una acidesa feble [132-140].

La Figura 1.10 mostra una representació esquemàtica d'aquesta tècnica de preconcentració per anions. Inicialment, després de condicionar el capil·lar amb un electròlit que té un pH elevat (per exemple borat sòdic), s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra. La mostra es prepara amb un electròlit que té un pH més baix que l'electròlit de separació, així que normalment els analits estan en la seva forma neutra (a). Després d'injectar la mostra, es canvia el vial de la mostra pel de l'electròlit de separació i s'aplica una diferència de potencial positiva (càtode en l'extrem de detecció). Els anions de la solució electrolítica migren cap a la zona de la mostra i l'EOF ho fa en direcció oposada, cap al càtode. Com a resultat, els analits neutres que estan en la zona de la mostra van adquirint càrrega

negativa a mesura que l'electròlit de separació entra en la zona de la mostra. D'aquesta manera augmenta la mobilitat dels analits cap a la interfície mostra/electròlit on es van preconcentrant (b). Una vegada els analits s'han preconcentrat es duu a terme de manera consecutiva la separació electroforètica per CZE (c).

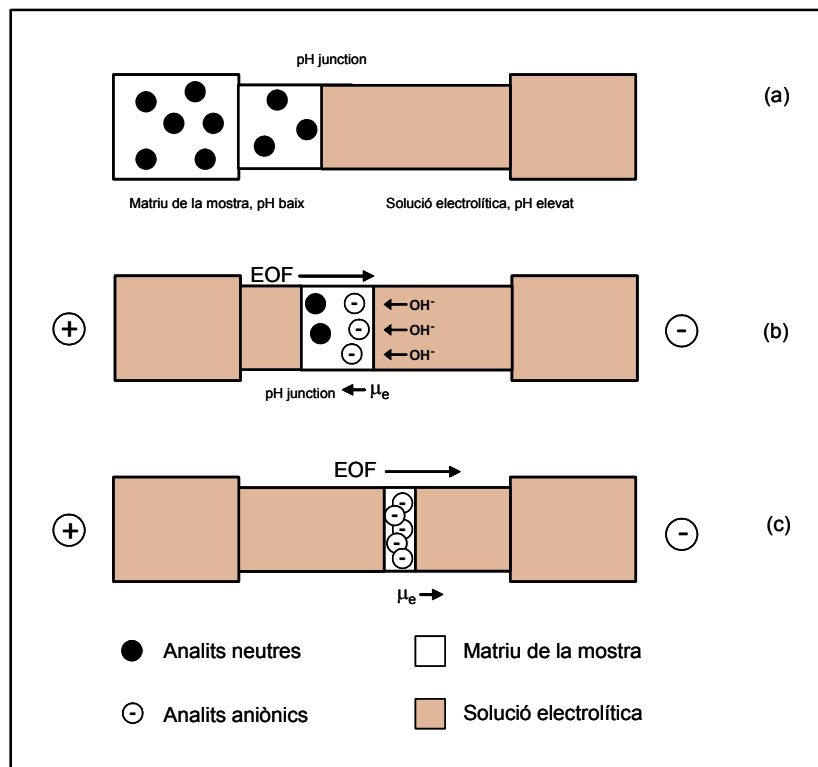


Figura 1.10. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració *dynamic pH junction* per CZE en l'anàlisi d'anions.

L'eficàcia d'aquesta tècnica de preconcentració depèn del pH i de la concentració d'electròlit tant de la matriu de la mostra com de la solució electrolítica, així com també de les propietats de protonació i desprotonació dels analits amfotèrics. Totes aquestes variables determinen els canvis de

velocitat dels analits entre les dues zones (mostra/electròlit) [132-140], que fa que aquesta tècnica de preconcentració sigui diferent de les altres tècniques comentades anteriorment, ja que en aquest cas la conductivitat de la matriu de la mostra no és una variable important, i aquesta pot ser fins i tot més gran que la de la solució electrolítica.

La tècnica s'ha aplicat per determinar una gran varietat d'analits, com catecolamines [132], nucleòsids [133], nucleòtids [133], fàrmacs [138], fenols [132], proteïnes [136, 140], pèptids [139], aminoàcids [140] o vitamines [139]. Els factors de preconcentració varien des de 3 a 7000, i els LODs en solucions estàndard són entre desenes i baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Com a exemple, Su *et al.* [137] van aplicar aquesta tècnica per determinar la vitamina riboflavina en un interval de concentracions de 130 a 280 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en diferents cerveses comercials de Taiwan. Com a tractament de la mostra, la cervesa només es va filtrar abans de ser analitzada.

e) Isotacoforesis capil·lar (ITP)

La ITP, apart de ser una tècnica electroforètica de separació, també és una tècnica de preconcentració per a una posterior separació dels analits per CZE o per altres modes electroforètics (ITP-CE).

En aquesta tècnica ITP-CE, la mostra es pot preconcentrar mitjançant tres possibles combinacions, que es diferencien en els electròlits que s'empren per a realitzar la separació electroforètica, l'EF, l'ET, o bé un altre diferent. La combinació més emprada i la més senzilla és quan l'ET és el propi electròlit de separació. Apart d'aquestes possibles combinacions, la tècnica ITP-CE, es pot dur a terme emprant un únic capil·lar (*transient*-ITP) o emprant dos capil·lars (*coupled*-ITP-CE).

- **Transient-ITP**

En el sistema *transient*-ITP (*t*-ITP), tant la preconcentració com la separació dels analits de la mostra tenen lloc en el mateix capil·lar. Els principals avantatges d'aquesta configuració són la facilitat d'automatització i la simplicitat de la instrumentació.

En aquesta metodologia, tal i com es mostra a la Figura 1.11, després de condicionar el capil·lar amb l'EF (a), s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra seguit d'una petita quantitat d'ET (b). Mantenint el vial d'ET en l'extrem d'entrada del capil·lar, es duu a terme el procés de preconcentració ITP mentre s'aplica una diferència de potencial negativa (ànode en el detector) alhora que s'aplica una pressió positiva per no perdre els analits en el vial d'injecció (c). Després, es canvia el vial de l'ET de l'extrem d'entrada del capil·lar pel de l'EF i es torna a aplicar una diferència de potencial negativa sense la pressió positiva (d). En aquesta etapa de la preconcentració, s'elimina del capil·lar tant l'ET com possibles substàncies interferents presents a la matriu de la mostra. Quan la intensitat de corrent és aproximadament el 95% del valor de quan el capil·lar està ple d'EF, s'inverteix de nou la polaritat de la font i es duu a terme la separació electroforètica per CZE dels analits preconcentrats (e).

Mitjançant aquesta tècnica, *t*-ITP-CZE, és possible omplir el capil·lar entre un 30 i un 50% de mostra, tot mantenint una bona eficàcia de separació, mitjançant el moviment de les zones (EF, mostra i ET) cap a l'extrem d'injecció del capil·lar per eliminar del capil·lar els ions que no es volen analitzar, tal com va proposar Reinhoud *et al.* [141-144].

Entre les aplicacions d'aquesta tècnica es poden esmentar la determinació de diferents analits, com fàrmacs [72, 73, 145], compostos aromàtics sulfonats [146], aminoàcids [147] o anions inorgànics (bromur, iodur, clorur i oxalat) [148], obtenint un factor de preconcentració de 1000. Hernández *et al.* [145] van determinar diferents antibiòtics mitjançant *off-line* SPE i *t*-

ITP-CZE en mostres de plasma i els LODs van ser entre 50 i 85 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Altres autors, com Sadecká *et al.* [72, 73] i Hirokawa *et al.* [148] van determinar fàrmacs antiinflamatoris i ions inorgànics, respectivament, en mostres de sèrum. Aquestes mostres van ser introduïdes directament en el capil·lar després d'una simple filtració, però els LODs eren relativament alts, de baixos $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

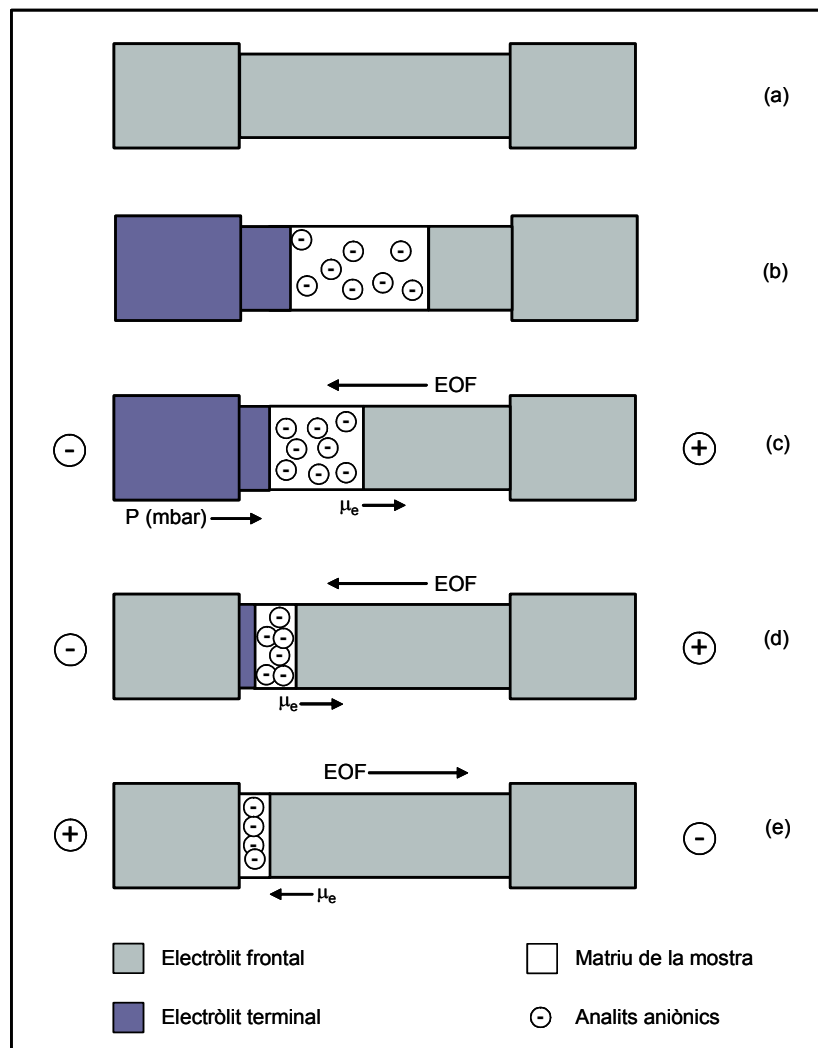


figura 1.11. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració t -ITP per l'anàlisi d'anions.

Un avantatge de la tècnica *t*-ITP-CE respecte les tècniques de *sample stacking*, és que permet la preconcentració i la separació d'analits presents en matrius que contenen una elevada quantitat de sals. No obstant, en aquests casos s'empra un mode operatiu anomenat *self-induced stacking* [149, 150] que consisteix en emprar la pròpia matriu de la mostra com a EF, mentre que l'ET és l'electròlit de separació. Sovint, en aquestes anàlisis, s'addiciona un surfactant catiònic a la solució electrolítica, com clorur de cetiltrimetilamoni (CTAC), per disminuir la mobilitat dels ions i poder-los separar d'altres anions que estan presents a la mostra en concentracions més elevades, com poden ser els ions clorur o els ions sulfat. Així, per exemple, mitjançant aquesta tècnica, s'han determinat nitrats i nitrats entre desenes i centenars de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [149-155], i iodurs i iodats a nivells de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [151, 152, 156-158] en aigua de mar. D'altra banda, en mostres biològiques, com sèrum i plasma, s'han determinat iodur, nitrit, nitrat i citrat a baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en presència d'ions clorur [159].

Amb l'objectiu de millorar encara més la sensibilitat de la tècnica, alguns autors han combinat dues tècniques de preconcentració. Així, per exemple, Shim *et al.* [160] van combinar la tècnica de preconcentració *t*-ITP amb *pH-dynamic junction* per la determinació d'un grup d'àcids febles en una mostra que contenia una elevada quantitat de sals. Emprant aquesta metodologia, la sensibilitat de la tècnica es va augmentar fins a 1200 vegades.

- **Acoblament ITP-CE**

La tècnica de preconcentració ITP i la posterior separació dels analits per CZE també es pot realitzar emprant dos capil·lars i el sistema s'anomena acoblament ITP-CE (cITP-CE). En aquest sistema s'empra un capil·lar per a dur a terme la preconcentració per ITP i un altre per la separació electroforètica. El primer capil·lar té una longitud inferior i un diàmetre intern (ID) superior, i el disseny és tal com es mostra a la Figura 1.12.

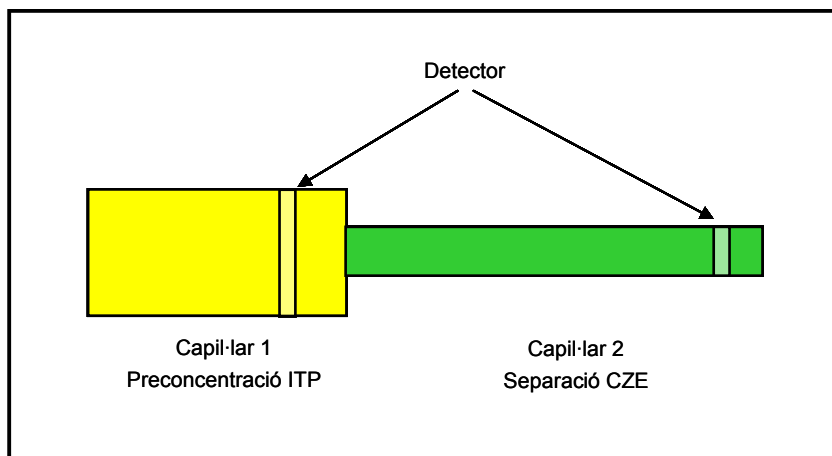


Figura 1.12. Representació esquemàtica de l'acoblament c-ITP-CE.

En aquest acoblament, després d'injectar l'EF i la mostra en el primer capil·lar, i l'ET en el segon capil·lar, s'aplica una intensitat de corrent durant un determinat temps. Quan els analits arriben a la finestra del detector del primer capil·lar s'atura aquest corrent i s'aplica una altra intensitat però més petita per a que els analits preconcentrats per ITP s'introdueixin en el segon capil·lar i es separin electroforèticament.

Un paràmetre crític en aquesta tècnica és conèixer el moment en què els analits d'interès arriben a la interfície entre els dos capil·lars. Per això, s'estudia el canvi de corrent que es produeix en arribar els analits d'interès al sistema de detecció del primer capil·lar. Habitualment s'empra un detector conductimètric [70, 71, 161-169] encara que alguns investigadors han emprat marcadors colorejats, com l'àcid pícric, per conèixer aquest temps òptim [165, 166].

El principal avantatge d'aquesta tècnica és que a part de preconcentrar els analits de la mostra, també permet eliminar substàncies interferents en el primer capil·lar i introduir només en el capil·lar de separació els analits d'interès. Addicionalment, aquesta tècnica també permet l'anàlisi de mostres biològiques directament sense cap tractament previ de la mostra

[70, 71, 164]. Sádecká *et al.* [70] van eliminar quasi un 97% de la matriu de la mostra en la determinació directa d'un fàrmac antiinflamatori en sèrum. Un altre avantatge de la tècnica, és que permet injectar una quantitat més gran de mostra en comparació amb *t*-ITP. No obstant, en el cas de la tècnica cITP-CE es precisa d'una instrumentació més complexa.

La tècnica cITP-CZE ha estat aplicada per determinar àcid fumàric en suc de poma [162], flavonoides en extractes de flors [165] i en vi [166], vitamines en orina [164], clorurs en aigua de l'aixeta [168], fàrmacs en sèrum [70, 71], i àcid domoic en ostres i en marisc [169]. Mitjançant aquestes metodologies, els LODs van ser de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a centenars de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Com a exemple, Hamoudová *et al.* [1656] van determinar flavonoides en vi i els LODs van ser entre 30 i 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, i Kvasnicka *et al.* [169] van determinar àcid domoic en ostres i marisc i el LOD va ser de 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

f) **Sweeping**

El *sweeping* és una tècnica de preconcentració que van introduir Quirino *et al.* [102, 170-173] per preconcentrar analits tant neutres com iònics. En aquesta tècnica, els analits es preconcentren en el capil·lar en funció de la seva afinitat per la fase pseudoestacionària utilitzant els modes de separació MEKC i MEEKC. Una condició necessària per aplicar aquesta tècnica és que les mostres s'han de preparar en una matriu que tingui una conductivitat semblant a la solució electrolítica però sense fase pseudoestacionària. Igual que en les tècniques de *sample stacking*, una vegada s'ha injectat un gran volum de mostra en el capil·lar, la matriu de la mostra s'ha d'eliminar del capil·lar, mitjançant la supressió o no de l'EOF, abans que es produeixi la separació electroforètica per tal de tenir una bona eficàcia de separació.

La Figura 1.13 mostra una representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració *sweeping* per MEKC en condicions àcides per la preconcentració d'analits neutres. Inicialment, s'injecta hidrodinàmicament

un gran volum de mostra en el capil·lar. Tal com s'ha comentat, la mostra es prepara amb una matriu que té una conductivitat semblant a la de la solució electrolítica però sense fase pseudostacionària (a). Seguidament es canvia el vial de la mostra pel de l'electròlit i s'aplica una diferència de potencial negativa (b). Llavors la fase pseudoestacionària aniònica procedent del vial d'injecció entra en la zona de la mostra i s'enduu els analits neutres (c). Després que aquesta fase pseudoestacionària ha escombrat els analits de la mostra, té lloc la separació electroforètica per MEKC (d).

La tècnica *sweeping* s'ha aplicat a la determinació de diferents analits, com fàrmacs [174, 175], fenols [176], PAHs [177], esteroides [178] i alcaloides [179]. El gran potencial d'aquesta tècnica es mostra a través del factor de preconcentració que s'obté, que pot variar entre 10 i 10.000, respecte la injecció hidrodinàmica normal. Hsieh *et al.* [180] van determinar resveratrol en vi, mitjançant una LLE i *sweeping*-MEKC, i el LOD va ser de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. D'altra banda, Quirino *et al.* [102] van realitzar l'única aplicació d'aquesta tècnica per MEEKC. En aquest estudi, es van determinar set esteroides i es va augmentar la sensibilitat fins a 300 vegades.

Diferents autors han combinat aquesta tècnica de *sweeping* amb una altra tècnica de preconcentració electroforètica per augmentar encara més la sensibilitat. Així, la tècnica *sweeping* s'ha combinat amb ASEI [181, 182] i amb *dynamic pH junction* [183-186]. La combinació ASEI-*sweeping*-MEKC s'ha aplicat tant emprant SDS [182] com CTAC [181] com a surfactants de la fase pseudoestacionària en la determinació d'àcids carboxílics [181], àcids naftalensulfònics [181] i herbicides [182]. Es va treballar suprimint l'EOF emprant una solució electrolítica àcida [181] o modificant les parets internes del capil·lar amb poliacrilàmida (PAA) [182]. En aquestes metodologies la sensibilitat de la tècnica es va augmentar fins a 100.000 vegades. D'altra banda, la tècnica *sweeping* també s'ha combinat amb la de *dynamic pH junction*. Britz-Mckibbin *et al.* [183-185] i Yu *et al.* [186] van emprar aquesta combinació per la determinació de flavins i d'alcaloides, i van obtenir un factor de preconcentració de 1200 i 90, respectivament.

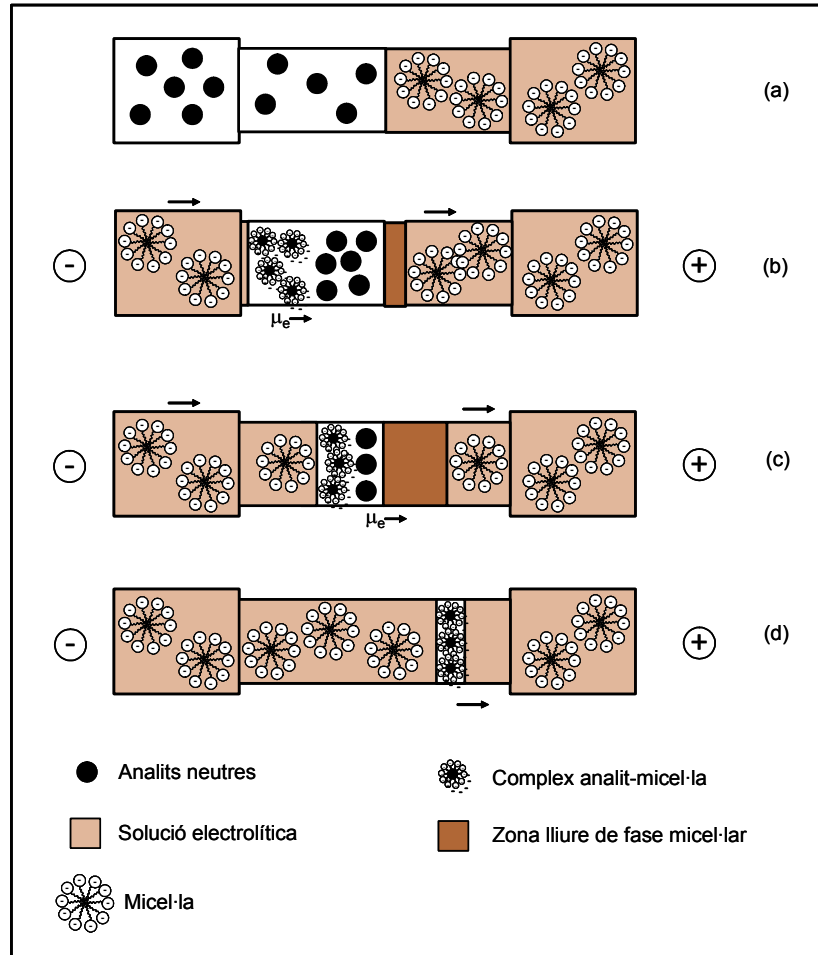


Figura 1.13. Representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració *sweeping* amb supressió de l'EOF.

1.3.1.2 TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ CROMATOGRÀFIQUES

Una altra alternativa per incrementar la sensibilitat de la tècnica CE és l'ús de les tècniques cromatogràfiques. Aquestes es basen en la retenció dels

analits en una fase estacionària i en la seva posterior elució mitjançant un eluent.

A continuació s'expliquen les tècniques de preconcentració cromatogràfiques, emprades en combinació amb l'CE, així com algunes de les seves aplicacions. En aquest grup de tècniques, s'han inclòs l'acoblament de l'SPE amb l'CE, l'acoblament de la microextracció en fase sòlida (SPME) amb l'CE i les tècniques de preconcentració aplicades en CEC.

a) Acoblament de l'extracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar (SPE-CE)

L'SPE és una tècnica basada en l'ús de sorbents, que permet extreure eficientment els analits d'una mostra líquida i alhora preconcentrar-los. Els objectius principals d'aquesta tècnica són l'eliminació de les interferències de la matriu de la mostra i la preconcentració dels analits d'interès.

La tècnica d'SPE s'ha aplicat generalment en CE emprant l'acoblament *off-line*. Aquest acoblament es prou conegut i s'utilitza com a pretractament previ de la mostra per a una posterior introducció d'aquesta en el sistema electroforètic. En els darrers anys han sorgit altres alternatives per tal d'automatitzar el sistema. Aquestes alternatives són els acoblaments *at-line*, *on-line* i *in-line* de l'SPE amb l'CE. En aquests sistemes, el mecanisme de preconcentració es basa en les mateixes etapes que el sistema *off-line*, condicionament i activació de la fase estacionària; introducció i retenció dels analits; neteja de la fase estacionària, aquesta etapa és opcional i consisteix en passar un solvent que elueixi les interferències però a la vegada no elueixi els analits; elució dels analits retinguts amb un solvent adequat; i posterior separació electroforètica dels analits preconcentrats [27-29, 187]. A continuació es descriuen cadascun d'aquests acoblaments.

- ***at-line* SPE-CE**

En l'acoblament *at-line* entre l'SPE i l'CE, la mostra es preconcentra automàticament emprant un sistema de flux continu que està acoblat a l'equip electroforètic mitjançant un braç mecànic i una vàlvula de sis vies. A la bibliografia s'han descrit dos dissenys diferents per realitzar aquest acoblament [188-193].

Valcárcel *et al.* [188-190] van emprar el disseny que es mostra a la Figura 1.14, en el qual la vàlvula està situada abans del braç mecànic. En aquest sistema, la precolumna, que és el dispositiu que conté la fase estacionària, es connecta entre dues vies d'una vàlvula de sis, la qual permet realitzar tot el procés de preconcentració de manera automàtica mitjançant les seves dues posicions, la de càrrega i la d'injecció. Addicionalment, aquesta vàlvula també està connectada a dues vàlvules més (SV1 i SV2) i al sistema electroforètic. Mitjançant la vàlvula SV1 es condiciona i s'activa la fase estacionària de la precolumna i s'introdueix el solvent d'elució, i mitjançant la vàlvula SV2 s'introdueix la mostra. Inicialment, després de condicionar i activar la fase estacionària, s'introdueix la mostra on aquesta hi queda retinguda. Seguidament, es neteja aquesta fase estacionària per eliminar possibles substàncies interferents o part de la mostra que no ha quedat retinguda. A continuació, es canvia la posició de la vàlvula que conté la precolumna i s'elueixen els analits retinguts mitjançant una solució que conté un percentatge elevat de solvent orgànic. La mostra eluïda s'introdueix en un vial del sistema electroforètic amb l'ajuda d'un braç mecànic i finalment és injectada en el capil·lar de separació.

Valcárcel *et al.* [188-190] van emprar aquest disseny per determinar pesticides, fàrmacs i fenols utilitzant una precolumna que contenia una fase estacionària de C₁₈. Aquests analits es van determinar en diferents tipus de mostres, les quals prèviament només eren filtrades, com orina [189, 190], sèrum [189] i aigua de riu [188] i el volum de mostra que es va analitzar va ser de 8 mL, 1 mL i 25 mL, respectivament. Els LODs que es van obtenir per

solucions estàndard van ser entre 30 i 460 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, suposant un augment de la sensibilitat de fins a 400 vegades.

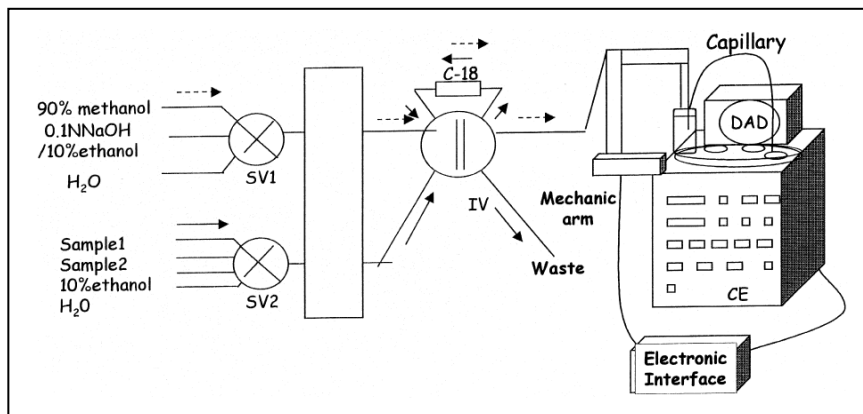


Figura 1.14. Representació esquemàtica de l'acoblament *at-line* SPE-CE que van emprar Valcárcel *et al.* [188-190].

Un altre disseny, descrit per Veraart *et al.* [191-193], es basa en posicionar la vàlvula de sis vies després del braç mecànic. La Figura 1.15 mostra una representació esquemàtica d'aquest disseny, on s'observa que la precolumna i el capil·lar de separació estan separats per una vàlvula de sis vies, que conté un *loop*, i per una interfície. En aquest disseny, la mostra que s'elueix de la fase estacionària, mitjançant l'ús d'un solvent orgànic, s'injecta en el *loop* de la vàlvula mitjançant un *injection port*. Canviant la posició de la vàlvula, els analits preconcentrats s'introdueixen en la interfície. Una vegada la mostra arriba al capil·lar de separació es canvia de nou la posició de la vàlvula. Seguidament, s'omple el capil·lar de separació amb solució electrolítica tot aplicant una pressió negativa, i quan tot el capil·lar és ple d'aquesta solució, s'aplica una diferència de potencial per a dur a terme la separació electroforètica. El temps que triga la mostra en passar de la interfície al capil·lar de separació després d'haver canviat la posició de la vàlvula és un paràmetre important del sistema i s'ha d'optimitzar.

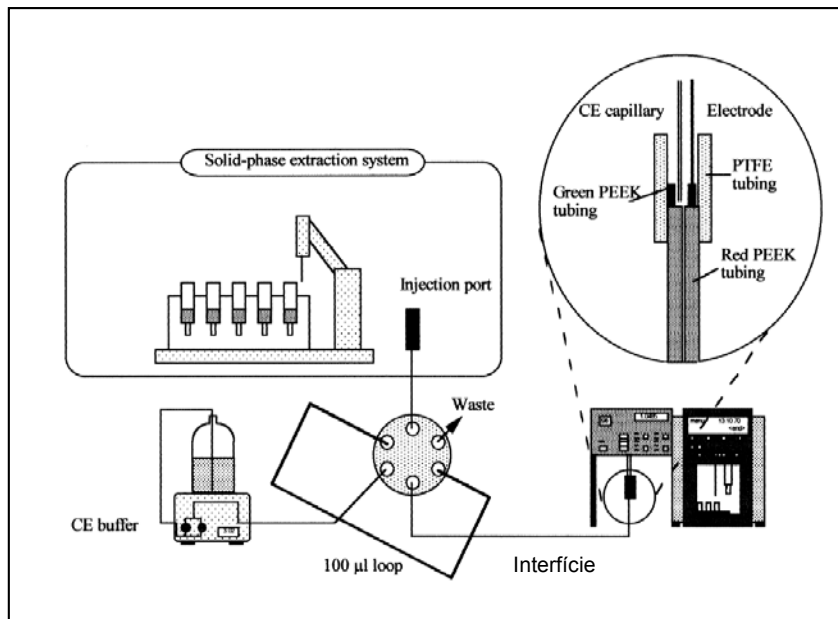


Figura 1.15. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPE-CE emprat per Veraart *et al.* [191-193].

Aquest sistema es va aplicar per a determinar un anticoagulant i alguns fàrmacs en mostres biològiques, com plasma, sèrum i orina. Quan l'anticoagulant es va analitzar en mostres de plasma i d'orina, els LODs van ser de 100 i 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivament [191]. D'altra banda, en la determinació d'alguns fàrmacs antiinflamatoris en mostres de sèrum i d'orina, els LODs van ser de 400 i 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivament [192, 193]. Aquests resultats es van obtenir en l'anàlisi directa de 8 mL d'orina, i en la precipitació prèvia de les proteïnes del sèrum, amb àcid fòrmic o d'acetonitril, en l'anàlisi d'1 mL de mostra de sèrum i plasma.

- ***on-line* SPE-CE**

L'acoblament *on-line* de l'SPE amb l'CE es diferencia de l'acoblament *at-line* SPE-CE en què el solvent d'elució que conté els analits preconcentrats es

transfereix directament al sistema electroforètic sense l'ús d'un braç mecànic. Per a la transferència dels analits al capil·lar de separació és necessària l'ús d'una interfície, i a la bibliografia s'han descrit diferents alternatives, entre les que cal destacar l'ús d'una vàlvula [194, 195] o d'una peça "T" [196-198].

La Figura 1.16 mostra la interfície consistent en una vàlvula de sis vies. En aquest cas per possibilitar el procés d'SPE són necessàries tres vàlvules (vàlvules 1, 2 i 3), cadascuna d'elles té un *loop* connectat de diferent capacitat, sent el que s'empra en la introducció de la mostra (vàlvula 3) de major volum que els emprats per la introducció del solvent d'elució (vàlvula 2) i per la interfície (vàlvula 1). A la figura també es mostra la longitud, en cm, dels capil·lars emprats per connectar els diferents dispositius. El sistema està totalment automatitzat i el procés és el següent, primer es condiciona i s'activa la fase estacionària, a continuació s'introdueix la mostra mitjançant la vàlvula 2 i aquesta queda retinguda a la fase estacionària. Seguidament es neteja aquesta fase per eliminar possibles substàncies interferents i part de la mostra que no ha quedat retinguda. Una vegada s'ha eluït la mostra, aquesta s'introdueix en el *loop* de la vàlvula 3 i s'aplica una diferència de potencial i després de canviar la posició de la vàlvula. Després d'un determinat temps, es canvia de nou la posició de la vàlvula i es duu a terme la separació electroforètica. De Jong *et al.* [194, 195] van aplicar aquest sistema a la determinació de pèptids i recentment a la d'aminoàcids, i els LODs van ser entre 5 i 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Un altra interfície descrita a la bibliografia per acoblar *on-line* l'SPE a l'CE és l'ús d'una peça "T", tal com es mostra a la Figura 1.17. En aquest sistema, s'utilitzen dues vàlvules, una per introduir la mostra (vàlvula 1) i l'altra per introduir el solvent orgànic (vàlvula 2), i els *loops* que tenen connectats també tenen diferent capacitat, sent el que s'empra en la introducció de la mostra de major volum que l'emprat per la introducció del solvent d'elució. Després d'eluir la mostra de la fase estacionària, aquesta entra al sistema electroforètic mitjançant la peça "T". Degut a diferències de resistències, ja

que el tros de capil·lar que va al sistema de detecció (120 cm de longitud) és més llarg que el tros de capil·lar que va al vial *inlet*, només una petita part de la mostra entra en el capil·lar de separació, mentre que la major part d'aquesta va a residus (vial *inlet*) [196, 197]. Un avantatge d'aquest sistema respecte el sistema anterior, és que en aquest no és necessària una precisió tan elevada en la metodologia de treball. Aquest fet és degut a que la mostra s'introdueix en el sistema electroforètic mitjançant l'ús d'una vàlvula i aquesta pot portar a resultats irreproduïbles si no es monitoritza acuradament el temps d'injecció de la mostra.

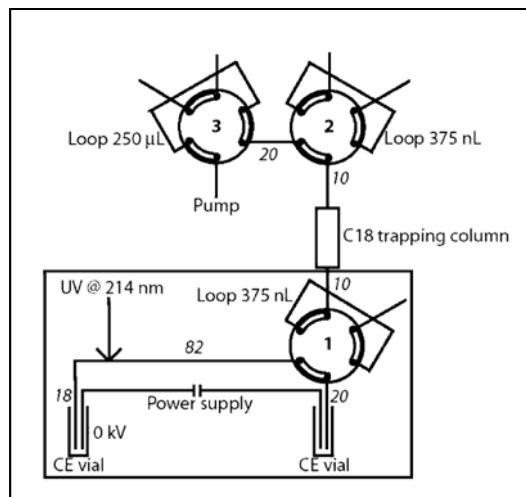


Figura 1.16. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPE-CE que van emprar de Jong *et al.* [194, 195]

Bonneil *et al.* [196] i De Jong *et al.* [197] van emprar aquest sistema per la determinació de pèptids. L'augment de la sensibilitat va ser entre 200 i 800 vegades, i els LODs en solucions estàndard van ser de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en l'anàlisi d'entre 50 i 250 μL de mostra.

Recentment, de Jong *et al.* [198] van acoblar *on-line* a aquest sistema una columna d'exclusió per la determinació de pèptids del fluid cerebroespinal, i en l'anàlisi de 20 μL de mostra, els LODs van ser de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquesta columna d'exclusió fracciona la mostra en funció del seu pes molecular. La fracció de pes molecular baix, que conté els pèptids, es transfereix directament a la columna d'SPE, que conté C_{18} , on els pèptids queden retinguts i es preconcentren.

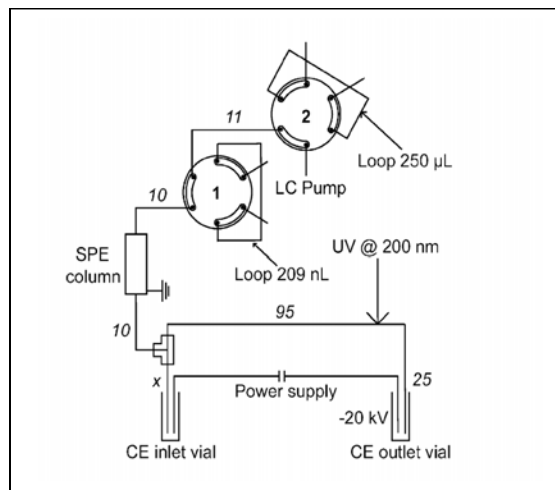


Figura 1.17. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPE-CE que van emprar Bonneil *et al.* [196] i De Jong *et al.* [197] i

- ***in-line* SPE-CE**

A diferència dels altres dos acoblaments, en l'acoblament *in-line* SPE-CE la preconcentració i la separació electroforètica es realitzen en el mateix capil·lar. Al llarg dels anys s'han desenvolupat diferents dissenys per possibilitar aquest tipus d'acoblament *in-line* l'SPE a la CE, com l'ús d'un microcartutx empaquetat amb una fase estacionària [199-207], l'ús d'una

fase estacionària que està enllaçada a les parets internes del capil·lar [208], l'ús d'un disc o d'una membrana [209-220] o l'ús d'un monòlit [221-226].

La majoria dels treballs que hi ha a la bibliografia sobre aquest acoblament es basen en l'ús d'un microcartutx i s'han descrit diferents configuracions, tal com es mostra a la Figura 1.18a i b. La configuració que es mostra a la Figura 1.18a conté un microcartutx que està incorporat entre dos capil·lars de separació, l'*inlet* i l'*outlet*. El microcartutx està format per un capil·lar, de ID més gran que l'emprat per la separació, que està empaquetat amb una fase estacionària i aquesta es manté retinguda a l'interior del capil·lar mitjançant dos fritats. La longitud del microcartutx pot variar entre entre 1 i 10 mm. En l'altra configuració, la qual es mostra a la Figura 1.18b, el capil·lar està empaquetat amb fase estacionària, entre 3 i 5 mm, i aquesta també es manté retinguda mitjançant l'ús de fritats.

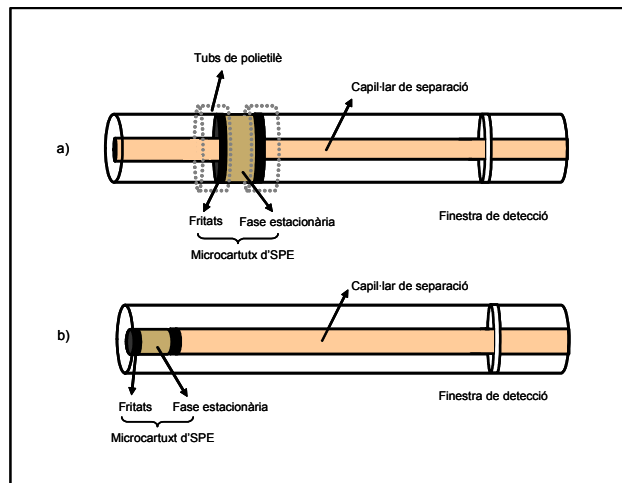


Figura 1.18. Representació esquemàtica de l'acoblament *in-line* SPE-CE emprant un microcartutx d'SPE que es troba incorporat (a) entre dos capil·lars de separació o (b) en el mateix capil·lar de separació.

En aquest acoblament, després de condicionar i d'activar la fase estacionària, s'introdueix un gran volum de mostra en el capil·lar (de l'ordre de μL). Mitjançant una etapa de neteja s'eliminen del microcartutx les impureses de la mostra i part d'aquesta que no ha quedat retinguda. Seguidament, s'elueix la mostra amb un petit volum d'una solució que conté un gran percentatge de solvent orgànic (de l'ordre de nL). Finalment, s'aplica una diferència de potencial i es duu a terme la separació electroforètica.

Els sorbents emprats habitualment en aquest disseny han estat C_{18} [199-202, 204-207] i divinilbenzè [203]. Els analits que s'han determinat són fàrmacs [199, 201], pèptids [202, 204, 205] i proteïnes [200, 203], obtenint-se un augment de la sensibilitat entre 100 i 10.000 vegades, respecte la injecció hidrodinàmica normal. En aquestes metodologies, els LODs varien entre 100 i $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard en la injecció de fins a $360 \mu\text{L}$ de mostra [201, 204, 206, 207]. Entre els tipus de mostres a què s'ha aplicat aquest disseny, en combinació amb una tècnica de pretractament, cal esmentar les mostres biològiques, com orina [199] i fetge [200], i mostres d'aigua [206, 207]. Recentment, s'ha determinat un fàrmac antiinflamatori a baixos nivells de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en una mostra d'aigua de l'aixeta que prèviament es va pretractar mitjançant la tècnica d'SPE *off-line* [207].

Tot i els bons resultats que s'obtenen en emprar aquest disseny, aquest també presenta l'inconvenient que pot produir una pèrdua d'eficàcia i en conseqüència de resolució degut a la presència del microcartutx i a l'elevat volum de solvent orgànic que es necessita per eluir els analits. També hi ha la problemàtica de la formació de bombolles a l'interior del capil·lar degut a la presència dels fritats que s'utilitzen per retenir la fase estacionària. Com a conseqüència de tot l'esmentat, diferents investigadors han intentar millorar aquest disseny mitjançant l'ús d'una fase estacionària enllaçada covalentment a les parets internes del capil·lar més properes a l'extrem d'injecció del capil·lar. Aquest disseny el van utilitzar Cai *et al.* [208] per la determinació d'herbicides i els LODs que van obtenir van ser de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

en solucions estàndard. No obstant, una limitació d'aquest disseny és la petita quantitat de mostra que es pot injectar en aquests capil·lars.

Un altre disseny, descrit per Yang *et al.* [217], va ser la introducció d'una membrana polimèrica entre dos segments de capil·lars. Aquesta membrana es manté unida als capil·lars mitjançant un tub de teflon, tal com es mostra a la Figura 1.19. Aquestes membranes estan impregnades amb un sorbent cromatogràfic, com etil-sílica (C₂), butilsílica (C₄), octilsílica (C₈), C₁₈, poliestirè-divinilbenzè (PS) o de bescanvi iònic. El potencial d'aquest sistema es mostra en la determinació directa de pèptids en orina (10-20 µL) i de proteïnes en l'humor aquós (10 µL) emprant una membrana impregnada de C₂ [214, 215] o de PS [210, 211, 216, 218-220]. Diferents autors han acoblat aquests capil·lars a l'MS [209, 210, 212, 215, 216, 219, 220] o a tàndem MS/MS [216] en la determinació de pèptids i proteïnes.

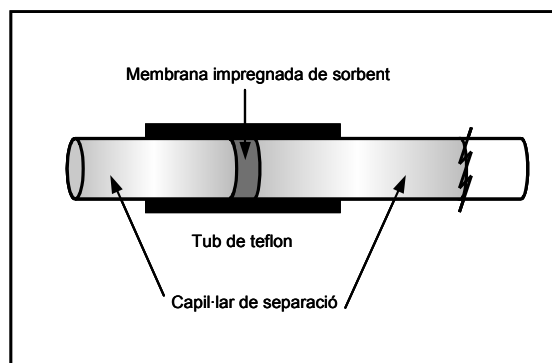


Figura 1.19. Representació esquemàtica de l'acoblament *in-line* SPE-CE emprant una membrana impregnada de sorbent.

Una alternativa a aquestes configuracions i que últimament està sent emprada per alguns investigadors és l'ús d'una fase estacionària monolítica. L'avantatge d'aquesta alternativa és que no és necessari l'ús de fritats per retenir la fase estacionària en l'interior del capil·lar. Aquestes fases poden ser inorgàniques de base sílica o polimèriques. Els monòlits de base sílica

s'han utilitzat recentment per la determinació d'anions inorgànics en el mode electroforètic de CEC. Aquesta metodologia es va aplicar per determinar ions fluorur en aigua de mar i els LODs van ser de baixos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [222, 225]. Els monòlits polimèrics es preparen *in situ* a l'interior del capil·lar mitjançant la polimerització de solucions monomèriques que estan formades per un monòmer, un *crosslinker*, un porogen i un iniciador. Addicionalment, aquesta polimerització es pot iniciar tèrmicament, lumínicament o per radiació. Aplicacions d'aquests monòlits cal esmentar l'anàlisi de fàrmacs [221], de pèptids [224], de proteïnes [223] i d'aminoàcids [226] en solucions estàndard.

Generalment, en l'acoblament *in-line* SPE-CE es pot produir una pèrdua d'eficàcia i de resolució com a conseqüència del possible deteriorament del capil·lar en l'anàlisi de mostres reals, i aquest fet dependrà del pretractament previ que s'hagi fet en aquestes mostres.

b) Acoblament de la microextracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar (SPME-CE)

El mecanisme de preconcentració de la tècnica d'SPME-CE es basa en l'extracció dels analits de la mostra mitjançant una fibra o un tub, seguida de la desorció d'aquests mitjançant l'ús d'un solvent adequat. Posteriorment, aquests s'introdueixen al sistema electroforètic on es duu a terme la separació. La combinació d'aquestes dues tècniques s'ha dut a terme tant emprant el mode *off-line* [227-230] com *on-line* [231-237], si bé el mode *off-line* és el més emprat.

Recentment, Liu *et al.* [237] han revisat les diferents aplicacions sobre l'acoblament *on-line* SPME-CE. L'escassa bibliografia sobre aquest mode és degut a la diferent mida que hi ha entre la fibra i els capil·lars de separació que s'utilitzen. Normalment, les fibres tenen una mida o un diàmetre més gran, per tal d'extreure la màxima quantitat de mostra, en

comparació amb el ID dels capil·lars de separació. D'aquesta manera, per poder connectar la fibra *on-line* amb l'extrem d'entrada del capil·lar d'CE és necessari l'ús d'un adaptador o d'una interfície. Nguyen *et al.* [231], que van ser els primers que van emprar l'acoblament *on-line* SPME-CE, van construir un adaptador al punt d'injecció del capil·lar, i l'estructura d'aquest es mostra a la Figura 1.20. El punt d'injecció del capil·lar de separació (50 μm ID x 350 μm OD) està connectat a un petit segment d'un capil·lar que té un ID i OD més gran (1.5 cm x 180 μm ID x 380 μm OD). Aquests dos capil·lars es mantenen units mitjançant un tub de teflon. La fibra, que té un diàmetre de 150 μm , està incorporada a l'interior d'aquest petit segment de capil·lar.

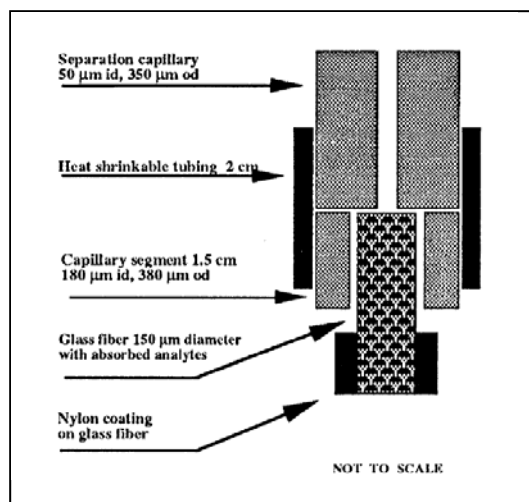


Figura 1.20. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPME-CE que van emprar Nguyen *et al.* [231].

Aquests investigadors van aplicar aquest sistema per determinar PAHs emprant una fibra de polidimetilsiloxà (PDMS), i els LODs van ser entre 8 i 75 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. Després de l'adsorció dels analits en la fibra, en un temps de 2 hores, es realitza un *clean-up* submergint la fibra en

aigua durant 30 minuts. Seguidament, la fibra s'acobla al capil·lar de separació i s'injecta una petita quantitat de metanol durant 3 s. Després d'un temps de 5 minuts de contacte de la fibra amb el metanol, s'aplica una diferència de potencial i es duu a terme la separació electroforètica. En finalitzar l'anàlisi s'elimina la fibra del capil·lar. Un avantatge d'aquest sistema és que permet l'ús de fibres de gran tamany, amb la qual cosa s'augmenta el factor de preconcentració [231].

Una altra configuració que s'ha emprat per possibilitar l'acoblament SPME-CE es basa en inserir una fibra de mida o de diàmetre petit, a l'interior del capil·lar de separació mitjançant l'ús d'una interfície. Wang *et al.* [232] van emprar una fibra de poliacrilat (PA) de 40 μm de diàmetre i la van inserir en un capil·lar de 75 μm de ID per determinar fenols en solucions estàndard i els LODs van ser de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. El capil·lar i la fibra es mantenen units mitjançant un tub de teflon, tal com es mostra a la Figura 1.21.

En aquest sistema, després de l'adsorció dels analits de la mostra a la fibra durant un temps de 40 minuts, aquesta s'insereix a l'interior del capil·lar de separació. Prèviament, aquest s'ha condicionat amb electròlit i s'hi ha addicionat una petita quantitat d'hidròxid sòdic, 5 s, el qual és el solvent d'elució. Seguidament, s'aplica una diferència de potencial i es duu a terme la separació electroforètica. Durant tot l'anàlisi la fibra es manté a l'interior del capil·lar. Un inconvenient d'aquest sistema radica en la dificultat d'inserir la fibra a l'interior de capil·lar amb un ID petit [232].

Aquesta mateixa configuració també s'ha emprat recentment per l'anàlisi de proteïnes. Per millorar la capacitat de detecció de la tècnica es va utilitzar un detector de fluorescència [233, 234].

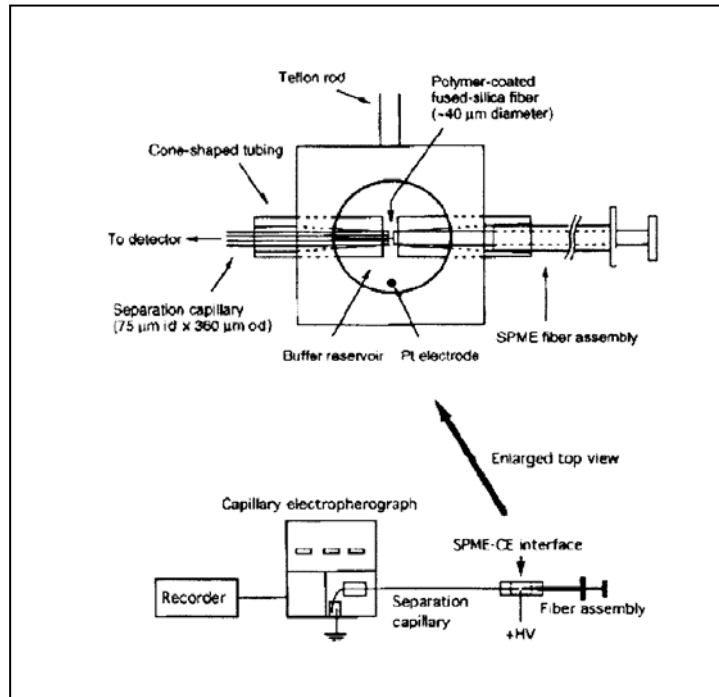


Figura 1.21. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPME-CE que van emprar Whang *et al.* [232].

Altres autors han acoblat directament l'SPME amb l'CE mitjançant l'ús de la configuració *in-tube* SPME-CE, i una representació esquemàtica es mostra a la Figura 1.22. En aquest sistema, l'adsorció dels analits al material extractant, que pot ser una fibra orgànica o un sorbent cromatogràfic, es realitza a l'interior del mateix capil·lar de separació. En aquest cas, per realitzar el procés d'extracció i posterior separació dels analits preconcentrats són necessaris quatre capil·lars que estan connectats en forma de creu mitjançant un connector, i la fibra està incorporada a l'interior d'un dels capil·lars, tal com es mostra a la figura. Emprant una xeringa s'introdueix la mostra en el capil·lar que conté la fibra, durant un temps determinat i a una velocitat determinada, i els analits hi queden adsorbits. A continuació, mitjançant una altra xeringa s'introdueix el solvent d'elució,

com acetonitril, en el mateix capil·lar i els analits s'elueixen i es transfereixen al petit espai que hi ha a l'interior del connector. Seguidament, els analits s'introdueixen al capil·lar de separació, i s'aplica una diferència de potencial per a dur a terme la separació electroforètica. Aquest sistema s'ha aplicat a l'anàlisi de fàrmacs [235, 236] i pèptids [236] en solucions estàndard, i els LODs van ser en entre 0.5 i 153 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

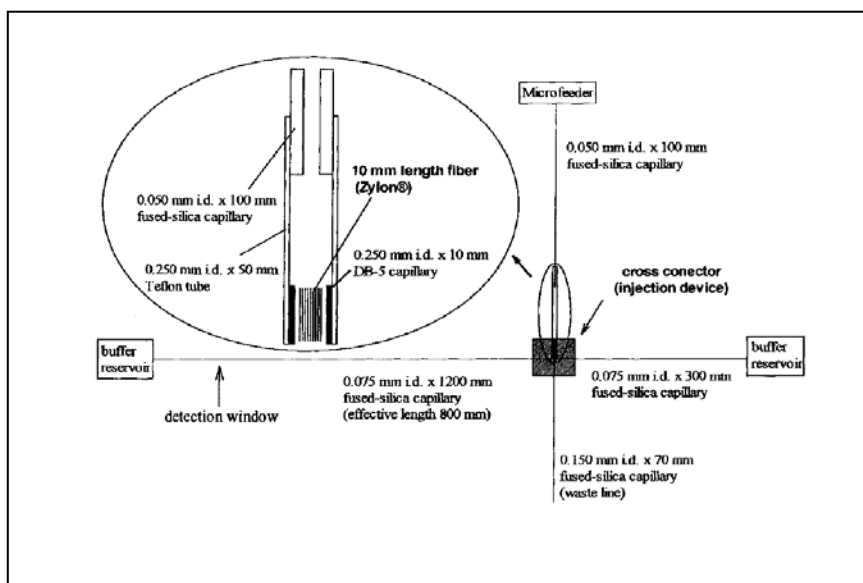


Figura 1.22. Representació esquemàtica de l'acoblament *on-line* SPME-CE que van emprar Jinno *et al.* [235].

c) Tècniques de preconcentració aplicades en electrocromatografia capil·lar (CEC)

L'CEC és una tècnica electroforètica de separació emprada per molts investigadors per la determinació d'analits neutres i iònics. Tot i els nombrosos avantatges que presenta aquesta tècnica, com l'elevada eficàcia

de separació i selectivitat, té limitacions per la determinació d'analits a baixos nivells de concentració.

Amb l'objectiu de disminuir els LODs de la tècnica, s'han aplicat diferents tècniques de preconcentració, les quals es basen en la injecció d'un gran volum de mostra en el capil·lar, normalment electrocinèticament, en condicions en què els analits de la mostra queden retinguts. Per a que aquest fet sigui possible, la mostra es prepara en una matriu que té una força d'elució més petita que la solució que s'empra per la separació electroforètica. Conseqüentment, els analits es van preconcentrant just a l'entrada del capil·lar. Després d'introduir la mostra en el capil·lar, s'aplica una diferència de potencial i es duu a terme l'elució i la separació electroforètica dels analits preconcentrats. En aquesta etapa hi ha un enriquiment addicional de la banda de l'analit ja preconcentrada, tal com es mostra a la Figura 1.23. Aquest fet és degut a que les molècules d'analit que estan en contacte amb la fase mòbil es mouen més ràpidament que les molècules d'analit que estan en el costat oposat, ja que la matriu de la mostra té una força d'elució molt més petita [238].

L'eficàcia d'aquesta tècnica de preconcentració depèn de l'afinitat que tenen els analits de la mostra vers la fase estacionària. Com més gran és aquesta, més estreta és la banda de l'analit preconcentrada. Les fases estacionàries que més s'utilitzen són les apolars i és per això que majoritàriament aquesta tècnica s'aplica per la determinació d'analits neutres [186, 238-243], ja que aquests tenen una afinitat més gran cap a la fase estacionària que els analits iònics [243-246].

A la bibliografia s'han emprat diferents tipus de capil·lars en CEC, com capil·lars empaquetats [186, 238-242, 244], capil·lars on la fase estacionària s'ha enllaçat covalentment a les parets internes del capil·lar [246] i capil·lars monolítics [243, 245]. Tal com s'ha comentat anteriorment en l'apartat de l'SPE, aquests dos últims tenen l'avantatge que no contenen fritats per retenir la fase estacionària.

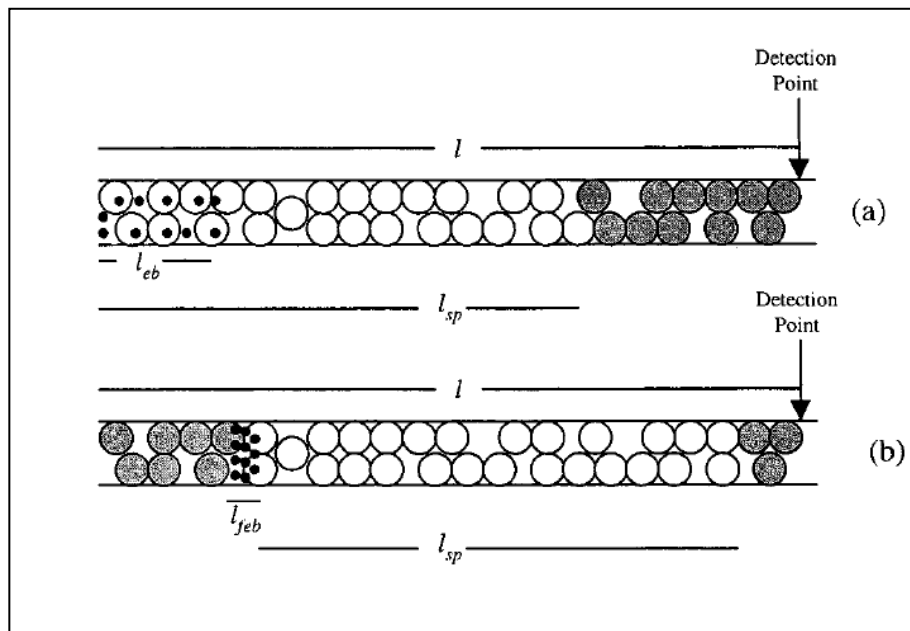


Figura 1.23. Representació esquemàtica de l'enriquiment addicional de la banda de l'analit preconcentrada. (a) S'injecta un gran volum de mostra preparada en una matriu de força d'elució petita, i (b) s'aplica una diferència de potencial i la fase mòbil, que s'ha preparat en una matriu de força d'elució gran, elueix els analits de la mostra cap al detector.

Els capil·lars empaquetats són els més emprats i en aquests, la fase estacionària més utilitzada és C_{18} [186, 238, 239, 241, 245]. S'han analitzat esteroides [186, 241], herbicides [239], pesticides [240, 242] i insecticides [238], i els factors de preconcentració que s'han obtingut són de fins a 17.000, respecte la injecció hidrodinàmica normal i emprant un capil·lar sense fase estacionària. Tegeler *et al.* [242] van utilitzar un capil·lar empaquetat amb dues fases estacionàries diferents per la determinació de pesticides en aigües. Una petita longitud de la primera part del capil·lar estava empaquetada amb una fase estacionària que tenia una gran afinitat pels analits a preconcentrar. D'altra banda, la segona part del capil·lar estava empaquetada amb una fase estacionària que tenia una gran

selectivitat i eficàcia vers els analits preconcentrats. Els LODs que es van obtenir van ser de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Un altre tipus de capil·lars utilitzats en CEC són els que la fase estacionària s'ha enllaçat covalentment a les parets internes del capil·lar. Pai *et al.* [246] els van utilitzar per determinar fàrmacs antiinflamatoris en orina a baixos nivells de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ emprant una fase estacionària d'histidina.

En els darrers anys, la tendència és l'ús de monòlits per preconcentrar els analits per CEC i concretament s'han emprat monòlits polimèrics, com el metacrilat [245] i inorgànics, de base sílica [243] per la determinació de pèptids.

1.3.2 ESTRATÈGIES PER MILLORAR LA CAPACITAT DE DETECCIÓ

Una alternativa a la utilització de les tècniques de preconcentració per a disminuir els LODs de la tècnica és l'ús d'un sistema de detecció sensible. Els detectors més emprats en CE són els d'absorbància UV-visible, de longitud d'ona fixa, i el de díodes en fila (DAD), de longitud d'ona variable, degut a la seva universalitat i baix cost. Aquests detectors estan habitualment en línia amb el sistema electroforètic i la finestra de detecció s'obté retirant una part del recobriment de poliimida que protegeix i dona flexibilitat al capil·lar.

La dependència de l'absorbància amb el camí òptic, segons la llei de Lambert-Beer, fa que la sensibilitat de la tècnica emprant aquests detectors sigui limitada com a conseqüència del petit camí òptic que ofereixen els capil·lars que s'utilitzen, que tenen un ID entre 50 i 100 μm .

Existeixen diferents metodologies que permeten millorar la capacitat de detecció mitjançant l'augment del camí òptic. Entre aquestes, cal destacar l'ús de capil·lars en què la seva geometria en la finestra de detecció s'ha

modificat en forma de bombolla [247-256] o en forma de zeta [245, 257-260]. Mitjançant l'ús d'aquests capil·lars, el camí òptic en la finestra de detecció s'augmenta entre 3 i 5 vegades respecte els capil·lars normals, i donen un increment de la sensibilitat entre 2 i 3 vegades sense una pèrdua important de l'eficàcia de separació. Aquests capil·lars s'han emprat, entre d'altres, per a la determinació de pesticides en mostres d'aigua [242] i l'anàlisi de proteïnes [256] i pèptids [249] en solucions estàndard.

Una altra estratègia per millorar la capacitat de detecció és l'ús d'un sistema de detecció més sensible. Els detectors electroquímics, de fluorescència o l'MS permeten augmentar considerablement la sensibilitat i la selectivitat de la tècnica en comparació amb els resultats obtinguts amb la detecció UV-visible [30, 261-266].

Els sistemes de detecció electroquímics, com l'amperomètric, el conductimètric i el potenciomètric presenten una bona sensibilitat i selectivitat pels analits electroactius [267-270]. Algunes aplicacions d'aquests detectors inclouen l'anàlisi d'aminoàcids [271-274], pèptids [275, 276] i compostos fenòlics [277-279].

El detector de fluorescència s'empra àmpliament en CE, ja que ofereix una gran sensibilitat i selectivitat per a aquests analits. En aquest sistema de detecció es prefereix la instrumentació basada en la utilització del làser com a font de radiació per poder centralitzar-la en una regió prou petita del capil·lar. La gran sensibilitat del sistema consisteix en el baix soroll de fons i la relació entre la intensitat de la radiació i l'excitació produïda [261, 280]. Les diferents aplicacions d'aquest sistema de detecció inclouen l'anàlisi de fàrmacs [281], proteïnes [282, 283] i aminoàcids [284].

En el camp mediambiental i també en d'altres camps d'aplicació, la sensibilitat no és, però, l'únic requisit en el desenvolupament de qualsevol metodologia analítica. Un altre dels aspectes a tenir en compte és la identificació dels diferents analits presents a la mostra. Per aquest motiu,

l'MS ha experimentat un gran desenvolupament tecnològic en els últims anys tant per la seva sensibilitat com la seva selectivitat. D'aquesta manera, mitjançant aquest detector és possible obtenir informació tant estructural com del pes molecular del compost a analitzar, proporcionant així, la possibilitat d'identificar els analits presents en una mostra complexa. En els darrers anys, l'acoblament de l'CE a l'MS ha esdevingut de gran importància en diversos camps com el farmacèutic, el clínic, l'alimentari i el mediambiental, entre d'altres [263-270].

Per realitzar aquest acoblament és necessari l'ús d'una interfície per ionitzar les molècules i obtenir els ions en fase gas. Tot i la gran varietat d'interfícies que s'han desenvolupat, la tècnica d'ionització d'electrosprai (ESI) és la més emprada actualment. Aquesta, que es realitza a pressió atmosfèrica, és una tècnica d'ionització suau i els ions que majoritàriament s'obtenen són els pseudomoleculars $[M-H]^-$ o $[M+H]^+$, segons si es treballa en el mode negatiu o positiu, respectivament.

A la bibliografia s'han descrit diferents dissenys per formar un electrosprai estable i mantenir el circuit elèctric necessari per a dur a terme la separació electroforètica en aplicar una diferència de potencial, sent el *sheath-flow* el més emprat. Aquesta interfície està formada per tres tubs concèntrics, un d'ells és el propi capil·lar de separació que està rodejat d'un tub d'acer inoxidable per on hi flueix un líquid auxiliar, i un tercer tub en el qual s'introdueix un gas nebulitzador que afavoreix la formació de l'electrosprai i el procés d'ionització. Mitjançant l'ús d'aquest líquid auxiliar, s'augmenta el flux necessari per formar un electrosprai estable, i també manté el corrent elèctric a l'interior del capil·lar [262-266].

No obstant, tot i els avantatges d'aquesta interfície, aquesta presenta una baixa sensibilitat degut a la dilució de la mostra que produeix l'ús d'aquest líquid auxiliar. D'altra banda, és necessari considerar altres paràmetres com són la composició i el flux d'aquest líquid auxiliar, la pressió del gas nebulitzador, el tampó, entre d'altres, ja que aquests influeixen tant a la

intensitat del senyal de l'MS com a la separació electroforètica. La Figura 1.24 mostra una representació esquemàtica de l'acoblament CE-ESI-MS emprant una interfície *sheath-flow* en condicions d'operació en mode negatiu.

Diferents estudis han mostrat que utilitzar medis de separació volàtils, com el tampó acetat o formiat, amb una força iònica entre baixa i mitja proporcionen millors resultats en l'acoblament CE-ESI-MS. Addicionalment, utilitzar un líquid auxiliar que contingui una quantitat elevada de solvent orgànic i una petita quantitat d'àcid o de base, segons es treballi en mode positiu o negatiu, respectivament; i l'ús de líquids auxiliars suficientment conductors però amb una força iònica no gaire elevada, contribueixen a millorar l'ionització dels analits de la mostra i a completar el circuit elèctric a l'interior del capil·lar de separació. Els fluxos del líquid auxiliar i del gas nebulitzador han de ser suficientment baixos per a permetre un electrosprai estable i per evitar una dilució excessiva dels analits de la mostra [263-265].

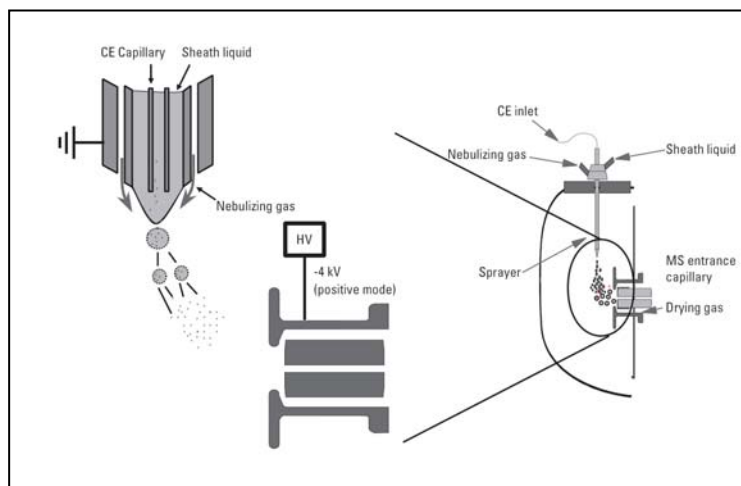


Figura 1.24. Representació esquemàtica de l'acoblament CE-ESI-MS emprant una interfície *sheath-flow* i treballant en mode negatiu.

Un dels problemes que planteja l'acoblament CE-MS és la incompatibilitat d'alguns modes electroforètics amb l'MS. En aquest sentit es pot esmentar que algunes substàncies, com ara ions borat, fosfat, surfactants i ciclodextrines, presenten una volatilitat molt limitada i la seva presència pot afectar negativament l'operació de l'MS ja que poden contribuir a la disminució de la sensibilitat i poden arribar a contaminar el sistema de detecció. Per aquest motiu a la bibliografia la majoria d'aplicacions que empren aquest acoblament utilitzen com a mode electroforètic l'CZE i l'CEC. L'ús de l'acoblament de l'MEKC-MS és poc freqüent ja que els surfactants que s'addicionen a l'electròlit, normalment SDS, són poc volàtils, modifiquen la tensió superficial del medi modificant la formació de l'esprai, contaminen la font d'ions i, en el cas de surfactants iònics, aquests poden competir amb els analits en l'adquisició de càrregues elèctriques durant el procés d'ionització.

El nombre d'aplicacions de CE-MS és molt elevat i entre elles cal esmentar l'anàlisi de fàrmacs [34, 39, 49, 50, 264], pèptids [285, 286], proteïnes [287-289], herbicides [290, 291] i fenols [292, 293].

L'MS també s'ha acoblat a l'CE en tàndem (CE-MS/MS) proporcionant un augment més gran de la sensibilitat i selectivitat, ja que permet una millor identificació dels analits en una mostra complexa, respecte l'acoblament CE-MS. No obstant, aquestes metodologies són cares, complexes i de difícil operació ja que, de la mateixa manera que en l'acoblament CE-MS, no és aplicable en bons resultats a tots els modes electroforètics per la incompatibilitat d'algunes substàncies de baixa volatilitat amb el procés d'ionització. Exemples d'algunes aplicacions d'aquest acoblament inclouen l'anàlisi de pèptids [294-297], aminoàcids [298] i nucleòtids [299] Juan-García *et al.* [300] van determinar diferents pesticides mitjançant *off-line* SPE-CE-ESI-MS/MS en fruites com préssecs i nectarines, i els LODs van ser entre 0.01 i 0.05 mg/Kg.

1.4 *Capillary electrophoresis for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*

A continuació s'adjunta una còpia del treball enviat a la revista *Trends in Analytical Chemistry* sorgit arran de la revisió bibliogràfica realitzada sobre l'anàlisi dels fàrmacs antiinflamatoris NSAIDs per CE. En aquest treball també s'inclouen alguns dels resultats més rellevants de la present Tesi Doctoral, degut a que aquesta revisió s'ha efectuat una vegada finalitzada la part experimental de la mateixa.

1.4 *Capillary electrophoresis for the analysis of nonsteroidal antiinflammatory drugs*

CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR THE ANALYSIS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS

Alba Macià, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
c/ Marcel·lí Domingo s/n, 43007 TARRAGONA, Spain

Abstract

Thousands of tons of pharmacologically active substances are used yearly to treat or prevent illnesses, or to help people in the stress of modern life. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) the group of pharmaceutical compounds most often used in human health care, since they are available without prescription for the treatment of fever and minor pain. The present review addresses the use of various modes of capillary electrophoresis (CE) for the analysis of NSAIDs. Special attention is paid to those aspects that decrease the detection limits (LODs) of these drugs by using an electrophoretic or a chromatographic preconcentration approach. Additionally, the application of CE for the analysis of NSAIDs from pharmaceutical preparations, biological samples and water samples with their sample pre-treatments are also examined. Finally, an outline of future trends is briefly presented.

Keywords: Biological samples / Capillary electrophoresis / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Preconcentration strategies / Water samples

INDEX

- 1 Introduction
- 2 Capillary electrophoresis (CE)
 - 2.1 CE separation modes
 - 2.1.1 Capillary zone electrophoresis (CZE)
 - 2.1.2 Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)
 - 2.1.3 Microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC)
 - 2.1.4 Capillary electrochromatography (CEC)
 - 2.1.5 Capillary isotachopheresis (ITP)
 - 2.2 Detection system

3 Strategies to enhance sensitivity

3.1 Preconcentration strategies

3.1.1 Electrophoretic approach

3.1.1.1 Sample stacking techniques

3.1.1.1.1 No suppressing the electroosmotic flow (EOF)

3.1.1.1.2 Suppressing the electroosmotic flow (EOF)

3.1.2 Chromatographic approach

3.1.2.1 Solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE) coupling

3.1.2.2 Preconcentration technique applied in capillary electrochromatography (CEC)

3.2 Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS)

4 Applications

4.1 Analysis of pharmaceutical preparations

4.2 Analysis of biological samples

4.3 Analysis of water samples

5 Concluding remarks and future trends

6 Acknowledgements

7 References

1 Introduction

Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are the analgesics and anti-inflammatory drugs most commonly used across the world nowadays. They are used mainly to treat pain, inflammation and fever in animal and human species.

These pharmaceutical compounds are weak acidic compounds, due to the carboxylic groups or to the keto enol tautomerism, with pK values between 3 and 7. Many of these compounds are chiral drugs, but often they are administered as racemates. Table 1 shows the CAS number and molecular structure of the NSAIDs most commonly used around the world.

Capillary electrophoresis (CE) has emerged as a powerful analytical technique in the analysis of pharmaceutical compounds, such as NSAIDs [1, 2]. The potential of this technique for NSAIDs analysis was first demonstrated in 1993 by Donato *et al.* [3] who investigated the separation of a group of these drugs by capillary zone electrophoresis (CZE) and by micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). Since that first paper, the application of CE for the NSAIDs analysis has been the subject of a great number of publications, in which the CE modes have been applied to determine these compounds in pharmaceutical preparations, biological samples and water samples [4-54].

Table 1. CAS number and molecular structure of the analysed NSAIDs by CE.

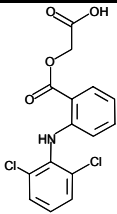
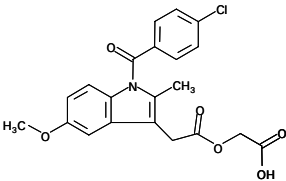
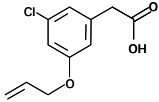
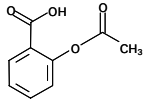
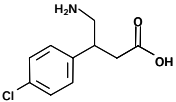
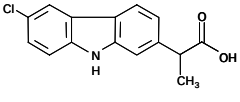
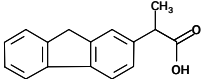
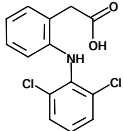
NSAID	CAS number	Molecular structure
Fenbufen	89796-99-6	
Acemetacin	53164-05-9	
Alclofenac	22131-79-9	
Aspirin	50-78-2	
Baclofen	1134-47-0	
Carprofen	53716-49-7	
Cicloprofen	36950-96-6	
Diclofenac sodium	15307-79-6	

Table 1. *Continued.*

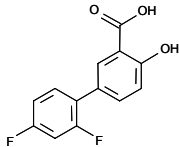
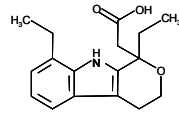
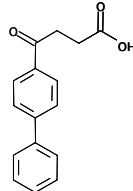
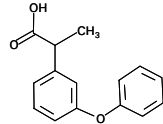
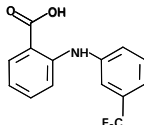
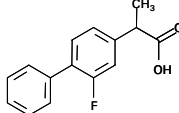
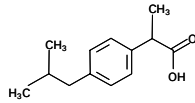
NSAID	CAS number	Molecular structure
Diflunisal	22494-42-4	
Etodolac	41340-25-4	
Fenbufen	36330-85-5	
Fenoprofen	53746-45-5	
Flufenamic acid	530-78-9	
Flurbiprofen	5104-49-4	
Ibuprofen	15687-27-1	

Table 1. *Continued.*

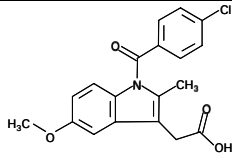
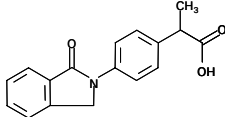
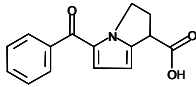
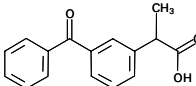
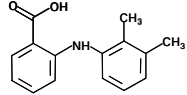
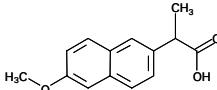
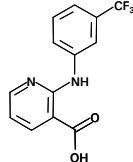
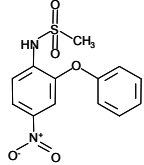
NSAID	CAS number	Molecular structure
Indomethacin	53-86-1	
Indoprofen	31842-01-0	
Ketorolac	74103-07-04	
Ketoprofen	22071-15-4	
Mefenamic acid	61-68-7	
Naproxen	22204-53-1	
Niflumic acid	4394-00-7	
Nimesulide	51803-78-2	

Table 1. *Continued.*

NSAID	CAS number	Molecular structure
Piroxicam	36322-90-4	
Sulindac	38194-50-2	
Suprofen	40828-46-4	
Tenoxicam	59804-37-4	
Tiaprofenic acid	033005-95-7	
Tolmetin sodium	64490-92-2	

The aim of this paper is to review the recently published literature for the analysis of NSAIDs by CE. Special attention is paid to the strategies used to decrease the LODs for the analysis of NSAIDs at low levels mainly those preconcentration techniques, which have been classified in this review according to its preconcentration mechanism: electrophoretic, by sample

stacking, or chromatographic, by using SPE coupled to CE and by applying a preconcentration technique in CEC. Additionally, the analysis of these drugs in the different matrices, such as pharmaceutical preparations, biological samples, and water samples with their sample pretreatments have been also examined. Finally, the future trends of

CE to determine these drugs at low levels are briefly commented.

2 Capillary electrophoresis (CE)

2.1 CE separation modes

In the literature, NSAIDs have been analysed by using different CE modes, such as CZE [3-25], MEKC [3, 26-33], MEEKC [34-38], CEC [39-47], and ITP [48-51]. These CE methodologies are summarised in Table 2, and each CE mode is examined in the following subsections.

2.1.1 Capillary zone electrophoresis (CZE)

CZE is the most widely used CE mode for NSAIDs analysis due to its high simplicity. As can be seen in Table 2, the buffers used to analyse these drugs by this CE mode have been borate [5-8, 13, 19, 22], acetate [4, 9-12, 16, 19-21, 23-25], phosphate [3, 14, 15, 18], and (hydroxymethyl)aminomethane (Tris) [17] at a pH range of 7-9, even by using an aqueous or a nonaqueous BGE solution. Under these conditions, the drugs are anions, since their pK values are in the 3-7 range.

An aqueous solution was the preferred BGE when only two or three drugs were analysed [3, 5-10]. However, when more compounds had to be analysed, since they are structurally similar, this approach was not valid and in that case the addition of organic solvents [4, 11, 12, 20-25], β -cyclodextrin (β -CD) [15] and organic bases [13] into the BGE solution has

been reported to improve their resolution.

The addition of 70% methanol in the BGE solution allowed six NSAIDs (aspirin, ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac sodium and ketoprofen) to be resolved within 22 min [22]. In this system, due to the suppression of the EOF by methanol at a higher percentage higher than 50% [55] the electroosmotic mobility was lower than the effective mobilities of NSAIDs, and consequently negative voltages had to be applied.

Completely nonaqueous BGE solutions have also been used for the simultaneous analysis of different NSAIDs [4, 21, 24, 25]. Cherkaoui *et al.* [24] and Ahrer *et al.* [4, 21] separated nine NSAIDs and four NSAIDs, respectively, with acetate buffer in a methanol:acetonitrile (40:60 v/v) mixture. Fillet *et al.* [25] resolved thirteen and eleven NSAIDs in a solution of acetate in methanol:acetonitrile (70:30 v/v) mixture and 100% methanol, respectively. In all these analyses, the drugs were resolved within 14 min. Figure 1A shows the electropherogram obtained by Fillet *et al.* [25] when thirteen NSAIDs were analysed in a methanolic buffer containing 30% acetonitrile.

Furthermore, the addition of organic bases into the BGE solution was reported to improve the resolution of NSAIDs. Zinellu *et al.* [13] added *N*-methyl-D-glucamine into the BGE solution to analyse two NSAIDs, diclofenac and aceclofenac. Glucamine masked the silanol groups on the

surface of the uncoated capillary wall and caused a decrease of the EOF that allowed the complete peak resolution.

β -CDs have been employed in CE to improve the selectivity of both non-chiral and chiral analytes. Chen *et al.* [15] used the 2,6-di-O-methyl- β -CD to improve the resolution of the sulindac, as a non-chiral drug, from its two metabolites, since these three analytes have poor resolution in CE analysis due to their similar structures.

Apart of analysing NSAIDs as a racemic mixture, the enantioresolutions of these drugs is of great importance in pharmaceutical analysis [56]. The enantioseparation of chiral NSAIDs has mainly been achieved by simply adding a chiral selector to the BGE solution. β -CDs [16, 18] and vancomycin [17] are the most used chiral selectors for the analysis of NSAIDs by CZE. Quaternary ammonium β -CD, as a cationic β -CD, was used in formamide for the chiral separation of six NSAIDs (carprofen, fenoprofen, flurbi-profen, ketoprofen, indoprofen and suprofen) [16]. However, in some cases is not possible to achieve a complete enantioseparation by only employ one chiral selector. Abushoffa *et al.* [18] combined an anionic β -CD, heptakis-6-sulfato- β -CD, and a cationic β -CD derivate, permethyl monoamino- β -CD, to enantioseparate four NSAIDs (feno-profen, ketoprofen, ibuprofen and flurbiprofen). On the other hand, the chiral selector vancomycin was used to shorten the analysis time [17].

2.1.2 Micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC)

In the literature, different MEKC methodologies have been reported for the analysis of NSAIDs. Sodium dodecyl sulfate (SDS) is the most used surfactant as can be concluded from data reported in Table 2 [3, 26-32] since it has a fairly low CMC (8.1 mM) in comparison with other surfactants. However, when enantiomer separations were required, the enantiomeric surfactant (1R, 2S)-(-)-N-dodecyl-N-methyl-ephedrinium bromide (DMEB) was used [33].

MEKC has been applied either using an alkaline [3, 26-31, 33] and acidic [32] micellar BGE solutions for the analysis of NSAIDs. The alkaline micellar BGE solution is preferred because the analysis time is relatively shorter than the obtained by an acidic micellar BGE solution, due to a higher EOF. As aqueous buffers, borate [3, 26, 29, 31], phosphate [27, 30, 32, 33] and borate/phosphate mixture [28] at a pH range of 7-10 have been used. Thus, when the NSAIDs were analysed by these alkaline micellar BGE solutions, the drugs were resolved according their partitioning between the micellar phase and the aqueous phase; and their electrophoretic mobility, since at this pH range the drugs were anionic.

Recently, an acidic micellar BGE solution has been investigated for the analysis of five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen and diclofenac sodium) with the purpose of applying different sample stacking techniques under pH-suppressed EOF.

In this case, phosphate at pH 2.5 was used as the buffer [32]. Under these conditions, the drugs were only resolved according their partitioning between the micellar phase and the aqueous phase, since at this pH the drugs were uncharged.

In order to improve the separation of these drugs in these methodologies, both organic solvents [3, 27, 29, 32] and β -CDs [33] were added into the micellar BGE solution. Thus, 9% acetonitrile was added in an alkaline micellar BGE solution to resolve ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities [29], and 3% methanol was needed to resolve fifteen NSAIDs (diclofenac,

diflunisal, etodolac, fenbufen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, naproxen, niflumic acid, piroxicam, sulindac, tenoxicam and tiaprofenic acid) [27]. When an acidic micellar BGE solution was used to separate five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen and diclofenac sodium), a higher percentage of organic solvent, 40% of acetonitrile, was needed to resolve them since the EOF was suppressed [32]. On the other hand, Mardones *et al.* [30] used β -CD to improve the separation of six NSAIDs (ibuprofen, fenbufen, tolmetin, ketoprofen, acetylsalicylic acid and indomethacin), as it is shown in the electropherogram of Figure 1B.

Table 2. Different CE modes to resolve NSAIDs.

CE mode	Compound	BGE solution	Detector	Analysis time (min)	Ref.
CZE	Acemetacin, piroxicam	30 mM sodium phosphate pH 8.0	UV	8	[3]
	Ibuprofen	160 mM sodium borate pH 8.5	UV	6	[5]
	Ibuprofen	250 mM sodium borate pH 8.5	UV	10	[6]
	Ketoprofen	250 mM sodium borate pH 8.9	UV	10	[7]
	Indomethacin, diclofenac, ketoprofen	Sodium borate pH 9.0	UV	7.5	[8]
	Ibuprofen, naproxen, ketoprofen	30 mM ammonium acetate pH 4.75	UV	12	[9]
	Ibuprofen, ketoprofen, naproxen, flurbiprofen	20 mM acetate pH 4.6	UV	12	[10]
	Ibuprofen, naproxen, ketoprofen, flurbiprofen	50 mM ammonium acetate pH 4.6 with 10% methanol	UV	15	[11]

Table 2. *Continued.*

CE mode	Compound	BGE solution	Detector	Analysis time (min)	Ref.
CZE	Sulindac, ketoprofen, indomethacin, piroxicam, nimesulide, ibuprofen, naproxen	60 mM sodium borate pH 8.5, 13% methanol	UV	15	[12]
	Diclofenac, aceclofenac	300 mM sodium borate, 200 mM <i>N</i> -methyl-D-glucamine, pH 8.9	DAD	3	[13]
	Diclofenac	Sodium phosphate pH 7.0	Electrochemical	7.5	[14]
	Sulindac	80 mM sodium phosphate, 0.75 mM 2,6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, 0.01% PEO	UV	8	[15]
	Carprofen, fenoprofen, flurbiprofen, ketoprofen, indoprofen, suprofen	20 mM ammonium acetate, 20 mM cyclodextrin, 1% acetic acid in formamida	UV	12	[16]
	Ketoprofen	50 mM Tris pH 6.0, 0.002% (w/v) HDB, 2 mM vancomycin	UV	4	[17]
	Fenoprofen, ketoprofen, ibuprofen, flurbiprofen	100 mM phosphoric acid, pH 2.5 with triethanolamine containingheptakis-6-sulfato- β -cyclodextrin / permethyl-6-monoamino-6-monodeoxy- β -cyclodextrin (4/18mM)	UV	17	[18]
	Aspirin, ibuprofen, naproxen, ketoprofen	50 mM sodium borate pH 9.4 50 mM ammonium acetate pH 9.8	UV (ESI)-MS	8 20	[19]
	Naproxen, other drugs	20 mM ammonium acetate with methanol:water (60:40 v/v)	(ESI)-MS	14	[20]
	Naproxen, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid	20 mM ammonium acetate with metanol:acetonitrile (40:60 v/v)	(ESI)-MS	7.5	[4, 21]
	Aspirin, ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen, fenoprofen	30 mM sodium borate with 70% methanol	DAD	22	[22]
	Naproxen	20 mM ammonium acetate with 70% methanol	DAD	15	[23]
	Baclofen, indoprofen, ibuprofen, fenoprofen, indomethacin, ketoprofen, suprofen, diclofenac, mefenamic acid	20 mM ammonium acetate with methanol:acetonitrile (40:60 v/v)	DAD	8	[24]

Table 2. *Continued.*

CE mode	Compound	BGE solution	Detector	Analysis time (min)	Ref.
	Niflumic acid, flufenamic acid, piroxicam, alclofenac, tiaprofenic acid, flurbiprofen, ketoprofen, naproxen, indomethacin, carprofen, sulindac	20 mM ammonium acetate, 13.7 mM ammonium hydroxide with methanol	DAD	14	[25]
	Niflumic acid, flufenamic acid, piroxicam, alclofenac, tiaprofenic acid, flurbiprofen, suprofen, ketoprofen, naproxen, indomethacin, carprofen, indoprofen, sulindac	50 mM ammonium acetate, 13.7 mM ammonium hydroxide in methanol:acetonitrile (70:30 v/v)	DAD	13	[25]
MEKC	Ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen, naproxen	50 mM borate, 40 mM SDS, pH 9.0, 10% acetonitrile	UV	17	[3]
	Ibuprofen, flurbiprofen	50 mM borate, 40 mM SDS, pH 9.0	UV	7	[26]
	Diclofenac, diflunisal, etodolac, fenbufen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, naproxen, niflumic acid, piroxicam, sulindac, tenoxicam, tiaprofenic acid	40 mM sodium phosphate, 104 mM SDS, 3% methanol, pH 8.0	UV	24	[27]
	Ketorolac and their impurities	13 mM boric acid and phosphoric acid, 73 mM SDS at pH 9.1	DAD	6	[28]
	Ibuprofen, codeine phosphate, their degradation products and impurities	40 mM borate pH 10.0, 40 mM SDS, 9% acetonitrile	DAD	12	[29]
	Ibuprofen, fenbufen, tolmetin, ketoprofen, aspirin, indomethacin	20 mM sodium phosphate, 20 mM β -cyclodextrin, 50 mM SDS at pH 9.0	DAD	8	[30]
	Sulindac	30 mM borate, 50 mM SDS, pH 9.0	UV	6	[31]
	Ketoprofen, fenoprofen, naproxen, ibuprofen, diclofenac	25 mM sodium phosphate pH 2.5, 75 mM SDS, 40% acetonitrile	DAD	20	[32]
	Ibuprofen, suprofen, ketoprofen, fenoprofen	20 mM sodium phosphate, 10 mM DMEB	UV	33	[33]

Table 2. *Continued.*

CE mode	Compound	BGE solution	Detector	Analysis time (min)	Ref.
MEEKC	Ketoprofen, indomethacin	0.8% w/w n-octane, 6.6 % w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	UV	7	[34]
	Ibuprofen, indomethacin	0.8% w/w n-octane, 6.6 % w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	UV	7	[35]
	Naproxen	0.8% w/w n-octane, 6.6 % w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	UV	5	[36]
	Ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen, fenoprofen	0.8% w/w n-heptane, 6.6 % w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	DAD	32	[37]
	Ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen, fenoprofen	0.8% w/w ethyl acetate, 6.6 % w/w butan-1-ol, 1.0% w/w SDS, 6% w/w acetonitrile, 91.6% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	DAD	8	[37]
	Ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen, fenoprofen	0.8% w/w ethyl acetate, 6.6 % w/w butan-1-ol, 1.0% w/w SDS, 17% w/w methanol, 91.6% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2	DAD	15	[37]
	Ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen, fenoprofen	0.8% w/w n-heptane, 6.6 % w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, 15% w/w acetonitrile, 74.3% w/w 25 mM sodium phosphate, pH 2.5	DAD	16	[38]
CEC	Carprofen, fenoprofen, ibuprofen, ketoprofen, suprofen, cicloprofen, flurbiprofen, indoprofen, naproxen, tiaprofen	Packed capillary with C ₁₈ particles 50 mM ammonium formate pH 2.5, 60% acetonitrile	DAD (ESI)-MS	25	[39]
	Ibuprofen and its related impurities	Packed capillary with C ₁₈ particles 5 mM ammonium formate pH 2.5, 50% acetonitrile	DAD	32	[40]
	Ketorolac and its related impurities	Packed capillary with C ₁₈ particles 50 mM ammonium formate pH 3.5, 70% acetonitrile	DAD	9	[41]
	Indoprofen, suprofen, ketoprofen, naproxen, fenoprofen, ibuprofen	Packed capillary with C ₁₈ particles 5 mM MES pH 5.0, 37.5% acetonitrile, 37.5% methanol	UV	13	[42]
	Suprofen	Packed capillary with vancomycin 5 mM ammonium formate pH 3.5, 90% acetonitrile	DAD	4	[43]
	Carprofen, ketoprofen	Packed capillary with teicoplanin derivates 5 mM sodium phosphate pH 6.0, 50% acetonitrile	DAD	17	[43]

Table 2. Continued.

CE mode	Compound	BGE solution	Detector	Analysis time (min)	Ref.
CEC	Fenoprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, naproxen, suprofen, flurbiprofen	Packed capillary with polysaccharide 45 mM ammonium formate pH 2.9, 65% acetonitrile	DAD	55	[44]
	Indoprofen, ketoprofen, suprofen, naproxen, flurbiprofen, fenoprofen, ibuprofen	Open tubular capillaries, histidine bonded phase 20 mM sodium acetate pH 5, 20% ethanol	UV	50	[45]
	ketoprofen	Open tubular capillaries, with liposomes	UV	3	[46]
	Ibuprofen, indoprofen, fenoprofen, ketoprofen, suprofen, diclofenac, baclofen, mefenamic acid	Monolithic capillary, acrylamide 25 mM ammonium acetate pH 3, 20% methanol, 20% acetonitrile	DAD	15	[47]
ITP	Fenoprofen	Leading BGE: 10 mM HCl, 6-aminocaproic acid pH 4.8, 0.1% polyvinylpyrrolidone Terminating BGE: 5 mM MES, TRIS, pH 6.9	Conductivity	3	[48]
	Fenoprofen, naproxen, ibuprofen, ketoprofen	Leading BGE: 10 mM HCl, creatine pH 4.5, 0.1% methylhydroxyethyl cellulose Terminating BGE: 10 mM MES, TRIS, pH 6.9	Conductivity	6	[49]
	Ibuprofen, naproxen	Leading BGE: 10 mM HCl, creatine pH 4.5, 0.1% polyvinylpyrrolidone Terminating BGE: 10 mM MES	Conductivity	8	[50]
	Aspirin, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproxen	Leading BGE: 5 mM Tween 20, 10 mM HCl, histidine pH 6.0 Terminating BGE: 5 mM MOPS	Fluorescence	14	[51]

2.1.3 Microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC)

MEEKC has also employed for the analysis of NSAIDs. A microemulsion BGE solution for the analysis of NSAIDs has also been used either in alkaline [34-37] and acidic mediums [38]. Usually, NSAIDs have been resolved by using an alkaline microemulsion BGE solution formed by butan-1-ol as the

cosurfactant, SDS as the surfactant, and borate at pH 9.2 as the buffer because relatively shorter migration times were obtained in comparison with the obtained for acidic microemulsion BGE solutions. As the oil droplet, different substances such as *n*-heptane [37], *n*-octane [34-36] and ethyl acetate [37] were reported. When ethyl acetate was used instead of *n*-heptane and *n*-octane, a lower SDS

concentration could be used to form a stable microemulsion BGE solution since this oil has a lower surface tension. Consequently, the migration times decreased considerably since higher voltages could be applied. Thus, when five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen and fenoprofen) were analysed by using *n*-heptane as the oil droplet, the analysis time was 32 min; in contrast, when ethyl acetate was used, these drugs were resolved in 8 min as can be observed in Figure 1C. Additionally, when the short-end-injection procedure was used, the drugs were resolved in 3 min with ethyl acetate as the oil droplet. In this procedure, the injection was made from the outlet side of the capillary and the analytes were moved through the short end to the detector (8.5 cm) with a strong EOF [37].

Recently, an acidic microemulsion BGE solution has also been studied to

analyse the same five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen and fenoprofen) with the aim of applying a sample stacking technique under suppressed EOF conditions. In this case, phosphate at pH 2.5 and *n*-heptane were used as the buffer and oil droplet, respectively. Under these conditions, the drugs were resolved in 16 min, being this time lower than the obtained in alkaline BGE solution (32 min) for the analysis of the same NSAIDs [38]. In addition, as can be observed in Table 2, the migration times obtained by MEEKC at acidic conditions (16 min) were relatively shorter than the ones obtained by acidic MEKC (19 min) for the analysis of the same drugs. This can be explained by the lower SDS concentration needed to form a stable microemulsion BGE solution in comparison with the concentration needed for MEKC.

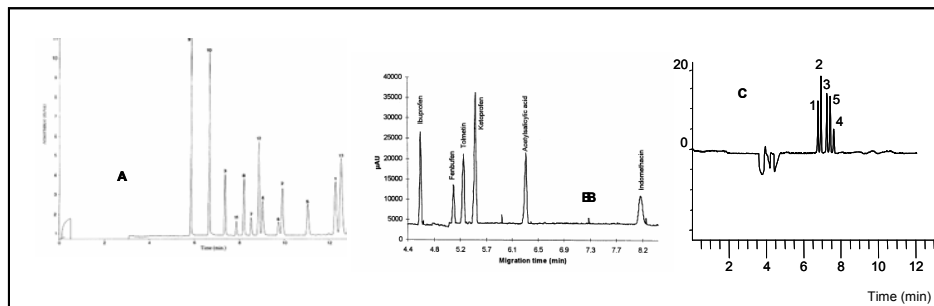


Figure 1. Electropherograms of standard solutions of some NSAIDs in the different CE modes. **(A)** Electropherogram obtained when thirteen NSAIDs were analysed by CZE by nonaqueous CE. BGE solution: 50 mM ammonium acetate, 13.75 mM ammonia in methanol:acetonitrile (70:30 v/v). Peak designation: (1) niflumic acid; (2) flufenamic acid; (3) piroxicam; (4) alclufenac; (5) tiaprofenic acid; (6) flurbiprofen; (7) suprofen; (8) ketoprofen; (9) naproxen; (10) indomethacin; (11) carprofen; (12) carprofen; (13) sulindac. (From Ref. [25] with permission). **(B)** Electropherogram achieved when six NSAIDs were analysed by MEKC. Micellar BGE solution: 20 mM sodium phosphate, 20 mM β -cyclodextrin, 50 mM SDS, pH 9.0. Peak designation: (1) ibuprofen; (2) fenbufen; (3) tolmetin; (4) ketoprofen; (5) aspirin; (6) indomethacin. (From Ref. [30] with permission). **(C)** Electropherogram obtained when five NSAIDs were analysed by MEEKC. Microemulsion BGE solution: 0.8% ethyl acetate, 6.6% butan-1-ol, 6.0% acetonitrile, 1.0% SDS, and 10 mM sodium borate, pH 9.2. Peak designation: (1) ketoprofen; (2) naproxen; (3) fenoprofen; (4) diclofenac; (5) ibuprofen. (From Ref. [37] with permission).

2.1.4 Capillary electrochromatography (CEC)

CEC separations for the analysis of NSAIDs have been performed in home-made columns. Packed columns [39-44] are the mostly used for separation, but open tubular CEC gained attraction for its simplicity [45, 46]. Novel monolithic separation media has also shown a great potential for CEC [47].

In packed capillaries the stationary phase, which is normally based on silica, C₁₈ and C₈, is retained in the capillary between an inlet and an outlet frits. In this case, Fanali *et al.* [39-41] and Desiderio *et al.* [42] reported the analysis of some NSAIDs after packing a capillary with C₁₈ particles, and by using an acidic and alkaline mobile phase, respectively. When the acidic mobile phase was used, ammonium formate at pH range of 2.5 and 3.5 was used as the buffer. For the analysis of ten NSAIDs (carprofen, cicloprofen, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, naproxen, suprofen and tiaprofen) the optimum acidic mobile phase was found to be formate at pH 2.5 with an addition of 60% of acetonitrile, even that under these conditions, two NSAIDs coeluted [39]. In addition, ketorolac [41] and ibuprofen [40] were separated from its related impurities by an acidic mobile phase. Ketorolac and its impurities were analysed by using a mobile phase made of formate at pH 3.5 with 70% acetonitrile in 9 min [41]. Short-end-injection was used to resolve ibuprofen from its impurities, and in this case, the drugs were analysed in 32 min by using

formate at pH 2.5 with 50% acetonitrile as the mobile phase [40].

On the other hand, when an alkaline mobile phase was used, six NSAIDs (indoprofen, suprofen, ketoprofen, naproxen, fenoprofen and ibuprofen) were resolved within 13 min. In this case, the mobile phase was formed by 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) at pH 5.0 with 37.5% of methanol and 37.5% of acetonitrile [42]. As can be observed in Table 2, when the alkaline mobile phase was used for the analysis of these drugs, the migration times were shorter than the ones obtained when the acidic mobile phase was used. This can be due to the lower EOF generated under acidic conditions, since it is responsible for the bulk transport of the analytes.

Recent trends have been directed toward the development of new packing materials in order to improve the selectivity and the separation of chiral analytes. In this sense, the individually enantioselectivity for some NSAIDs (fenoprofen, ibuprofen, indoprofen, ketoprofen, naproxen, suprofen, flurbiprofen and carprofen) was achieved by using a capillary packed with polysaccharide [44], vancomycin [43] and teicoplanin derivatives [43].

Problems in capillary packing and frit construction are eliminated by open tubular and monolithic capillaries. Recently, Pai *et al.* [45] used an open tubular capillary consisting in the attachment of histidine functional groups to the capillary walls to analyse seven NSAIDs (indoprofen, ketoprofen, suprofen, naproxen, flurbiprofen, feno-

profen and ibuprofen). Manetto *et al.* [46] used an open tubular capillary to immobilize liposome at the inner wall of the capillary in order to reveal the drug-liposome interactions. Liposomes are typically used for these studies, as they can encapsulate a wide range of analytes, such as NSAIDs.

However, nowadays the main trend in CEC research is the development and application of monoliths as stationary phase for its advantages over the other designs. Hoegger *et al.* [47] used a stationary phase based on acrylamide monolith to resolve seven NSAIDs (ibuprofen, indoprofen, fenoprofen, ketoprofen, suprofen, diclofenac, baclofen and mefenamic acid), and the drugs were resolved in 15 min.

2.1.5 Capillary isotachopheresis (ITP)

Sádecká *et al.* [48-51] analysed different NSAIDs by ITP. These ITP methodologies could be operated in a single [50, 51] or a double-capillary mode [48, 49], and these were named transient ITP, or coupled ITP-CE, respectively. One advantage of using double-capillary mode is that the drugs could be directly injected in the analysis of biological samples, such as serum. For this purpose Sádecká *et al.* [48, 49] used a commercially available instrument with two coupled capillaries. The first capillary, the pre-separation capillary, was combined with the second one, the analytical capillary, where further separation and detection took place. The pre-separation capillary had a higher ID than the analytical capillary in order to increase the load capacity of the system without increasing the

analysis time. Once the leading and the terminating buffer were chosen, a proper switching of the current lead to the ITP analysis in the analytical capillary of a very simplified part of the sample, since further interferences were eliminated from the matrix. Therefore, the matrix components were almost totally removed from the separation system prior to enter to the analytical capillary. So, the ionic NSAIDs could be determined without sample pre-treatment for the analysis of biological samples. Consequently, these ITP methodologies can be a good alternative to existing methods.

Hydrochloric acid (HCl), and 6-aminocaproic acid [48] or creatine [49, 50] at pH 4.5-5.0, with methylhydroxyethyl cellulose [49] or polyvinylpyrrolidone [48, 50] were reported to be the leading BGE when several NSAIDs were analysed. At this pH range, the carboxylic group of the NSAIDs was dissociated so they migrated as the anion. In addition, at this pH range, MES was usually used as the terminator buffer since it was the slowest anionic analyte, and therefore ensured a correct ITP migration [48-50].

Recently, Sádecka *et al.* [51] have shown that the resolution of some NSAIDs (aspirin, fenoprofen, flurbiprofen, ibuprofen, ketoprofen and naproxen) could be improved by adding non-ionic surfactants in the leading BGE. The best results were obtained when Tween 20 with HCl and histidine at pH 6.0 were used as the leading BGE, and 4-morpholine propanesulfonic acid (MOPS) as the terminating buffer.

The migration order of these drugs primarily depended on the hydrophobic interactions of each drug with the Tween micelles; however, electrostatic interactions might also play a significant role.

2.2. Detection system

The most usual detection system used in CE for NSAIDs analysis is the UV detection. Other detectors other than UV, such as electrochemical [14], and conductivity detectors [48-50] have also been used for the analysis of these drugs. An electrochemical detector was used to determine diclofenac sodium in urine [14], and conductivity detector was used to analyse some NSAIDs in serum samples [48-50]. The LODs for the analysis of these drugs by using UV, electrochemical and conductivity were approximately at low $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ levels.

Fluorescence spectrometry has also been applied to the determination of two NSAIDs (ibuprofen and naproxen) in tablets at hundred $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [51]. Recently one of the preferred detector systems is MS since it provides structural information which facilitates the identification of the analytes. However, on-line interfacing of CE with MS is not as easy as that of CE-UV where on-column detection is carried out so the use of CE-MS is still quite limited due to the initial incompatibility between the two techniques. Electro-spray ionization (ESI) is the most popular interface between CE and MS because it facilitates the transfer of analytes from the liquid phase of the CE to the gas phase of the MS. Three

interface designs have been developed in the last years for coupling both techniques. Among them, the sheath flow is the preferred interface for the analysis of NSAIDs by CE-ESI-MS [14, 19-21, 39]. The high concentration sensitivity of this detector is shown by the low LODs obtained, low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. More details about CE-MS are given in 3.2 section.

3 Strategies to enhance sensitivity

In modern analytical chemistry, trace analysis has been a very active area because of increasing sensitivity requirements, especially in the environmental and the biological fields. The analysis of NSAIDs in environmental and biological samples requires determining them at low levels. To carry out this aim, several preconcentration strategies [10, 11, 15, 22, 23, 30, 32, 37, 38, 52, 53], and the use of more sensitive detection systems, such as MS [4, 19-21] have been reported for the analysis of these drugs. In the following sections, these strategies to increase sensitivity are presented.

3.1 Preconcentration strategies

The application of some strategies to increase the amount of sample injected without impairing peak shape or resolution have been used for the analysis of NSAIDs at low levels by CE. These preconcentration strategies have been classified in this review according to the involved mechanism: electrophoretic by sample stacking [15, 22, 32, 37, 38, 53], or chromatographic by two approaches, by using the SPE-CE

coupling [10, 11, 23, 30] or by applying a preconcentration technique in CEC [52].

3.1.1 Electrophoretic approach

Preconcentration techniques based on an electrophoretic approach are one of the easiest ways for sample enrichment in CE, since the preconcentration step is performed within the same capillary used for the analysis. The electrophoretic techniques developed to improve the concentration sensitivity of CE include sample stacking, pH-mediated sample stacking, ITP preconcentration, dynamic pH junction, and sweeping [57, 58]. Each technique relies on specific modification of the composition of the BGE used for separation. In this

review we only refer to sample stacking since these are the preconcentration techniques that have been applied to enrich NSAIDs.

3.1.1 Sample stacking techniques

Table 3 shows the sample stacking techniques reported in the literature to enrich NSAIDs. These techniques have been classified in this review according to the sample injection mode and the EOF since this could be suppressed or not to remove the sample matrix from the capillary. In the following sections, the basis of these preconcentration techniques and the LODs obtained are presented, and these are summarised in Table 4.

Table 3. Sample stacking techniques and their characteristics used to enrich NSAIDs.

Sample stacking techniques			
Sample injection mode	Suppressing the EOF		No suppressing the EOF
	Using an EOF modifier	Using an acidic BGE solution	
Hydrodynamic injection	<i>Large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP-CZE)</i>	<i>Stacking with reversed migrating pseudostationary phase (SRMP-MEEKC)</i> <i>Stacking with reversed migrating micelles (SRMM-MEKC)</i>	<i>Reversed electrode polarity stacking mode (REPSM-MEEKC)</i>
Hydrodynamic and electrokinetic injection	<i>LVSEP with anion selective exhaustive injection (LVSEP-ASEI-CZE)</i>	<i>SRMM with anion selective exhaustive injection (SRMM-ASEI-MEKC)</i>	---
Electrokinetic injection	<i>Field-amplified sample injection with sample matrix removal using the EOF pump (FAEP-CZE)</i>	<i>Field-enhanced stacking injection with reversed migrating micelles (FESI-RMM-MEKC)</i>	---

3.1.1.1.1 No suppressing the EOF

Five NSAIDs (ibuprofen, fenoprofen, naproxen, diclofenac and ketoprofen) were preconcentrated by reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) in MEEKC. Under these conditions, once the analytes were introduced into the capillary by hydrodynamic injection, a negative voltage was applied to remove the sample matrix from the capillary until the current of the system reached approximately 95% of the original value (when the capillary was full of BGE solution). At that moment, the voltage was stopped, and afterwards, the polarity was switched and the electrophoretic separation started. Microemulsions with both *n*-heptane and ethyl acetate, as the oil droplet phase, were tested to enrich NSAIDs and the LODs achieved were similar, between 5 to 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for standard solutions [37].

3.1.1.1.2 Suppressing the EOF

One advantage of adding an EOF suppressor into the BGE solution is that the preconcentration and the separation can be performed consequently under the same applied voltage.

As it can be observed in Table 3, various sample stacking techniques have been applied for the analysis of NSAIDs by suppressing the EOF. The strategies reported to suppress the EOF have been the addition of an EOF suppressor, such as methanol as the BGE solvent [22, 53] and poly(ethylene oxide) (PEO) [15] in CZE, and the use of an acidic BGE solution in MEKC [32] and MEEKC [38]. Under these condi-

tions, the anionic species migrate to the detection window by their own effective mobility, while the weak EOF moved in the opposite direction.

The addition of an EOF modifier

For the analysis of these drugs by CZE, three different sample stacking techniques have been applied by suppressing the EOF. These techniques were large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP) [22], LVSEP with anion-selective exhaustive injection (ASEI) [53], and field-amplified sample injection with sample matrix removal using the EOF pump (FAEP) [53].

When these preconcentration techniques were applied to enrich five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac and ketoprofen) in CZE by using methanol as the BGE solvent to suppress the EOF, the sensitivity was enhanced up to 100-, 1200-, and 1800-fold, respectively, and the LODs achieved were between 0.1 to 35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for standard solutions [22, 53]. Figure 2 shows the electropherograms obtained when a standard solution of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was analysed by LVSEP, LVSEP-ASEI and FAEP, respectively. The sensitivity enhancement was evaluated by comparing the area of the peaks with those obtained for normal hydrodynamic injection.

FAEP was also applied to the analysis of sulindac. PEO, as an EOF modifier, was shown to suppress the EOF and to dynamically bind into the capillary walls by hydrophobic interactions or hydrogen-bonding. By using this precon-

tration technique, the LOD was $36 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for standard solutions [15].

The use of an acidic BGE solution

The preconcentration techniques LVSEP, LVSEP-ASEI and FAEP were also applied in MEKC and in MEEKC. The basis of these techniques are similar than those in MEEKC and MEKC under pH-suppressed EOF even that they are named in a different manner. In this way LVSEP is known as stacking with reversed migrating micelles (SRMM) and stacking with reversed migrating pseudostationary phase (SRMP) in MEKC and in MEEKC, respectively. Additionally, LVSEP-ASEI and FAEP are known as SRMM-ASEI and field-enhanced stacking injection with reversed migrating micelles (FESI-RMM), respectively in MEKC.

The three sacking techniques SRMM, SRMM-ASEI and FESI-RMM in MEKC [32], and SRMP in MEEKC [38] were

applied to preconcentrate five NSAIDs (ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac and ketoprofen). In these methodologies, the EOF was effectively suppressed by adjusting the BGE pH at the acidic range.

When the three stacking techniques were applied in MEKC, the LODs were between 7 and $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ when SRMM and SRMM-ASEI were used, and between 40 and $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ when FESI-RMM was used for standard solutions. These values were slightly lower and similar, respectively than those obtained by applying the preconcentration technique LVSEP (10 to $35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in CZE [32]. On the other hand, when the preconcentration technique SRMP was applied in MEEKC, the LODs achieved were between 5 to $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for standard solutions. These results were similar than those obtained by applying the preconcentration techniques SRMM and SRMM-ASEI in MEKC [38].

Table 4. Preconcentration strategies reported for the analysis of NSAIDs in CE.

Compound	CE mode	Preconcentration strategy	Sensitivity enhancement ^a	LODs ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
Electrophoretic approach by sample stacking techniques					
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	CZE	LVSEP	80-100	10-35	[22]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	CZE	LVSEP-ASEI	700-1200	0.2-1.0	[53]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	CZE	FAEP	1200-1800	0.1-0.4	[53]

Table 4. *Continued.*

Compound	CE mode	Preconcentration strategy	Sensitivity enhancement ^a	LODs ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
Electrophoretic approach by sample stacking techniques					
Sulindac	CZE	FAEP	---	36	[15]
buprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	MEKC	SRMM	146-300	7-25	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	MEKC	SRMM-ASEI	109-270	5-15	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	MEKC	FESI-RMM	37-112	40-75	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	MEKC	SRMP	51-54	5-15	[38]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	MEKC	REPSM	38-40b 20b	5-20 7-15	[37]
Chromatographic approach by coupling SPE with CE					
Naproxen	CZE	in-line SPE-CE	1820	0.2	[23]
Ibuprofen, ketoprofen, naproxen, flurbiprofen	CZE	at-line SPE-CE	---	---	[10]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen flurbiprofen	CZE	at-line SPE-CE	---	---	[11]
Ibuprofen, fenbufen, tolmetin, ketoprofen, acetylsalicylic acid, indomethacin	MEKC	at-line SPE-CE	400	12-250	[30]

Chromatographic approach by applying a preconcentration technique in CEC

Indoprofen, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, fenoprofen, flurbiprofen, suprofen	CEC	---	10-45	3-57	[54]
---	-----	-----	-------	------	------

^a Sensitivity enhancement evaluated through the area of the peaks

^b *n*-heptane, as the oil droplet phase

^c Ethyl acetate, as the oil droplet phase

3.1.2 Chromatographic approach

The chromatographic approach for preconcentration is another strategy to improve the LODs in CE. In this approach, analytes are adsorbed onto a chromatographic phase from a large volume of low concentration sample and then eluted in a much smaller volume. Applications of chromatographic approach for the preconcentration of NSAIDs includes the coupling between SPE to CE [10, 11, 23, 30], and a preconcentration technique applied in CEC [54].

3.1.2.1 Solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE) coupling

The integration of SPE with CE can be accomplished by different ways, such as by using a robotic interface (at-line) [30], by using an on-line interface to connect the capillaries [10, 11], and by introducing a SPE microcartridge into the CE capillary (in-line) [23].

The at-line SPE approach uses a robotic system or mechanic arm to transfer the analytes from the preconcentration unit to the separation unit. Mardones *et al.*

[30] used an at-line SPE-CE coupling for the analysis of some NSAIDs (ibuprofen, fenbufen, tolmetin, ketoprofen, aspirin and indomethacin). By using this approach, the LODs were between 12 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for standard solutions.

In the on-line systems, the preconcentration column is not a part of the CE system, but is coupled to this by an interface. Veraart *et al.* [10, 11] used an on-line SPE-CE coupling for the analysis of some NSAIDs (ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen and flurbiprofen). For the analysis of 8 mL of urine and 1 mL of serum samples, the LODs were lower than 80 and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively [10].

The other chromatographic approach reported for the analysis of NSAIDs is the in-line SPE-CE coupling. In this approach, the chromatographic preconcentrator is incorporated in the CE capillary. A small amount of SPE sorbent is placed directly within the uncoated fused silica capillary near the inlet side. An in-line SPE-CE was applied for the analysis of naproxen [23]. The enrichment capillary, which was home-made, contained a SPE

sorbent packed with C₁₈ particles. By using this approach, the LOD was 0.2 µg·L⁻¹ for standard solutions.

3.1.2.2 Preconcentration technique applied in CEC

The concentration sensitivity of some NSAIDs was also enhanced by applying a chromatographic preconcentration technique in CEC. Pai *et al.* [54] used an open tubular capillary with the walls coated with histidine to preconcentrate seven NSAIDs (indoprofen, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, fenoprofen, flurbiprofen and suprofen) by CEC. In this methodology, the sample was dissolved in a solvent of lower elution strength than the mobile phase. During the injection, the drugs were retained by hydrogen bonding, hydrophobic force and electrostatic force (anion exchange) so they were concentrated at the beginning of the capillary. The LODs were between 3 and 57 µg·L⁻¹ for standard solutions. The LODs obtained in this study were comparable than the ones obtained by other preconcentration techniques, such as LVSEP in CZE (10-35 µg·L⁻¹) [22] and SRMM, SRMM-ASEI and FESI-RMM in MEKC (5-75µg·L⁻¹) [32].

3.2 Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (CE-MS)

Another way for improving the concentration limits of detection is by using a sensitive detection system. Presently, MS can overcome this problem, since this detector offers the advantage of a sensitive detection together with a good selectivity, and provides information that is useful for

peak identify confirmation. In the literature, there are some methodologies where MS has been used for the analysis of NSAIDs in different CE modes, such as CZE [4, 20, 21] and CEC [39].

In order to couple CE to MS, the ESI has become the most utilized ionization technique because of its sensitivity, versatility and easy implementation, and in this sense it has been the choice, by using a sheath liquid, for the analysis of NSAIDs by CE-MS [4, 19-21, 39]. In order to achieve a good coupling performance, both the sheath liquid and its flow rate were optimised. Organic/water mixtures were used in different percentages, and the organic solvents most often used were isopropanol [4, 21] and methanol [19, 20, 39]. The composition ranged from 50% to 80% of these alcohols with water. In all these reports, NSAIDs were analysed using a negative ionisation mode. In this mode, both ammonia [19, 20, 39] and triethylamine [4, 21] were added in the sheath liquid. Its flow rate was sufficiently low to reduce dilution, and it was delivered at a flow-rate from 4 to 6 µL·min⁻¹ [4, 19-21, 39].

On the other hand, the proper choice of a suitable BGE is also essential in achieving both a successful CE separation and good quality ESI mass spectra. Generally, the best detector response is produced by volatile electrolyte systems at the lowest practical concentration and ionic strength. By the analysis of NSAIDs, both system primarily to ammonia, acetate [4, 19-21] or formate [39] were

used in CZE and CEC, respectively. The nonaqueous solvents are well-suited for hyphenation with MS. Therefore, both an aqueous [4, 19-21], nonaqueous [4, 21], and a mixed aqueous-organic solvents mixture [20, 39] BGE solutions have been used for NSAIDs.

The use of a coated capillary in CZE-ESI-MS to reverse the EOF and consequently to reduce the migration times was also reported. Ahrer *et al.* [21] and Macià *et al.* [20] used a capillary whose walls were permanently coated with hexadimethrin bromide (HDB) for the analysis of some NSAIDs. When this coating was used, the EOF was reversed leading to fast separations of anionic compounds. Under these conditions, the BGE was a nonaqueous [21] or a mixed aqueous-organic solvent medium [20], respectively.

Ahrer *et al.* [4, 21] carried out a comparative study between HPLC-ESI-MS and CZE-ESI-MS for four NSAIDs (ibuprofen, naproxen, diclofenac sodium and mefenamic acid) by using an aqueous BGE solution, as expected. The LODs obtained by HPLC-ESI-MS were lower ($0.2\text{-}2.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) than for CZE-ESI-MS ($27\text{-}93\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). However, they were similar than the obtained when naproxen was analysed by using a mixed aqueous-organic solvent BGE solution by CZE-ESI-MS [20]. These results were achieved by selected ion monitoring (SIM) acquisition mode, and a negative polarity mode. Moreover, the LODs obtained by using MS were comparable to those obtained by applying a sample stacking technique ($5\text{-}35\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [22, 32, 37, 38] or

preconcentration technique in CEC ($3\text{-}57\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [54] with UV detection.

4 Applications

As it has previously been commented, in the literature there are some CE methodologies that have been applied for the analysis of NSAIDs in water samples, pharmaceutical preparations and biological samples. Table 5 summarises the CE applications for the analysis of NSAIDs in these sample matrices.

4.1 Analysis of pharmaceutical preparations

In the literature there are some CE methodologies that have been applied for the analysis of NSAIDs in pharmaceutical preparations for the quality control in pharmaceutical industry in order to determine its degradation products and impurities. These pharmaceutical preparations included tablets [12, 16, 28, 34-36, 40-42, 50, 52] and drops [42]. The analytical methods generally involve a sample treatment, which is very simple and normally consists of weight, and dilution or centrifugation. As these drugs are present at low $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ levels in these matrices, NSAIDs were analysed directly without applying a sample preconcentration technique. The different CE modes used were CZE [12, 16], MEKC [28, 34, 41, 52], MEEKC [36, 37], CEC [40, 42] and ITP [50].

These CE methodologies reported for the analysis of NSAIDs in these matrices are presented in Table 5.

Table 5. CE applications for the analysis of NSAIDs in water samples, pharmaceutical preparations, and biological samples.

Compound	Sample matrix	Sample pretreatment		Methodology	LOD	Ref.
		Clean-up	Preconcentration			
Pharmaceutical preparations						
Sulindac, ketoprofen, indomethacin, piroxicam, nimesulide, ibuprofen, naproxen	Tablet	Centrifugation	---	CZE-UV	3-5 mg·L ⁻¹	[12]
Ketoprofen	Tablet	Dilution	---	CZE-UV	---	[16]
Ketorolac	Tablet	Dilution	---	MEKC-DAD	0.6 mg·L ⁻¹	[28]
Ketoprofen, indomethacin	Tablet	Dilution	---	MEKC-UV	1 mg·L ⁻¹	[34]
Ibuprofen, indomethacin	Tablet	Dilution	---	MEEKC-UV	---	[35]
Naproxen	Tablet	Dilution	---	MEEKC-UV	0.2 mg·L ⁻¹	[36]
Ibuprofen, naproxen	Tablet	Dilution	---	CEC-DAD	---	[42]
Ketoprofen	Drop	Dilution	---	CEC-DAD	---	[42]
Ibuprofen, naproxen	Tablet	Centrifugation and dilution	---	ITP-conductivity	0.2-0.9 mg·L ⁻¹	[50]
Ibuprofen	Tablet	Centrifugation and dilution	---	MEKC-UV	1 mg·L ⁻¹	[52]
Biological samples						
Ibuprofen	Serum	Acetonitrile precipitation		CZE-UV	10 mg·L ⁻¹	[5]
Ibuprofen	Serum	Acetonitrile precipitation		CZE-UV	300 µg·L ⁻¹	[6]
Ketoprofen	Serum	Acetonitrile precipitation		CZE-DAD	10 mg·L ⁻¹	[7]
Aceclofenac, diclofenac	Plasma	Acetonitrile precipitation		CZE-UV	30 µg·L ⁻¹	[13]
Ibuprofen, naproxen, ketoprofen	Urine		LPME	MEKC-DAD	1 µg·L ⁻¹	[9]
Ibuprofen, fenbufen, tolmotin, ketoprofen, acetylsalicylic, indomethacin	Serum		At-line SPE	MEKC-DAD	Low mg·L ⁻¹	[30]

Table 5. *Continued.*

Compound	Sample matrix	Sample pretreatment		Methodology	LOD	Ref.
		Clean-up	Preconcentration			
Biological samples						
Ibuprofen, fenbufen, tolmetin, ketoprofen, acetylsalicylic, indomethacin	Urine		At-line SPE	MEKC-DAD	Low mg·L ⁻¹	[30]
Ibuprofen, naproxen, ketoprofen, flurbiprofen	Serum		On-line SPE	CZE-UV	200-400 µg·L ⁻¹	[10]
Ibuprofen, naproxen, ketoprofen, flurbiprofen	Urine		On-line SPE	CZE-UV	40-80 µg·L ⁻¹	[10]
Aspirin, ibuprofen, naproxen, ketoprofen	Urine		Dilution	CZE-ESI-MS	---	[19]
Indoprofen, ketoprofen, naproxen, ibuprofen, fenoprofen, flurbiprofen, suprofen	Urine	Dilution	Preconcentration	CEC-UV	Low µg·L ⁻¹	[54]
Sulindac	Plasma	Centrifugation	FAEP	CZE-UV	36 µg·L ⁻¹	[15]
Sulindac	Urine	Centrifugation	Micro-SPE	MEKC-UV	2.9 µg·L ⁻¹	[31]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen, flurbiprofen	Serum	On-line dialysis	On-line SPE	CZE-UV	200-1000 µg·L ⁻¹	[11]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, ketoprofen, flurbiprofen	Urine	On-line dialysis	On-line SPE	CZE-UV	10-50 µg·L ⁻¹	[11]
Fenoprofen	Serum	No sample pre-treatment		ITP-conductivity	1.4 mg·L ⁻¹	[48]
Fenoprofen, naproxen, ibuprofen, ketoprofen	Serum	No sample pre-treatment		ITP-conductivity	0.9-1.6 mg·L ⁻¹	[49]
Ketoprofen	Serum	Ethanol precipitation		ITP-conductivity	254 µg·L ⁻¹	[49]
Water samples						
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	Mineral water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)		LVSEP-CZE-DAD	2-9 ng·L ⁻¹	[22]

Table 5. Continued.

Compound	Sample matrix	Sample pretreatment Clean-up Preconcentration	Methodology	LOD	Ref.
Water samples					
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	Mineral water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	SRMM-MEKC-DAD	70-230 ng·L ⁻¹	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	Mineral water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	SRMM-ASEI-MEKC-DAD	50-195 ng·L ⁻¹	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	Mineral water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	FESI-RMM-MEKC-DAD	700-1600 ng·L ⁻¹	[32]
Ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac, ketoprofen	Tap water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	SRMP-MEEKC-DAD	100-230 ng·L ⁻¹	[38]
Naproxen	Tap water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	In-line SPE-CZE-DAD	3 ng·L ⁻¹	[23]
Naproxen, diclofenac, ibuprofen, mefenamic acid, other drugs	Surface water	Off-line SPE (Bondesil ODS)	CZE-ESI-MS	13-16 ng·L ⁻¹	[4, 21]
Naproxen	Surface water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	CZE-ESI-MS	100 ng·L ⁻¹	[20]
^a Diclofenac, naproxen	Surface water	Off-line SPE (Bondesil ODS)	CZE-ESI-MS	13-392 ng·L ⁻¹	[4, 21]
Naproxen	Surface water	Off-line SPE (LiChrolut RP-18)	CZE-ESI-MS	230-510 ng·L ⁻¹	[20]

^a NSAID and its concentration detected.

4.2 Analysis of biological samples

NSAIDs have been analysed in biological samples to do pharmacokinetic studies in order to understand drug actions and drug distributions in living organisms [56]. Table 5 also shows the CE methodologies reported in the literature for the analysis of

NSAIDs in biological samples, such as serum [5, 7, 10, 11, 30, 48, 50], plasma [6, 13, 15], and urine [9-11, 19, 30, 31, 54]. In addition, as can be seen in this table, CZE [5-7, 9-11, 13, 15, 19], MEKC [30, 31], CEC [54] and ITP [48, 49] have been used for the analysis of these drugs in these matrices. Makino *et al.* [59] reviewed

the determination of NSAIDs in human specimens by CZE and MEKC.

Biological matrices are complex and they contain a number of compounds, such as salts, proteins and particulate matter, which can interfere the analysis. So, these compounds must be removed prior to CE analysis by applying a suitable sample preparation procedure which also has the function to preconcentrate. Up to now, the sample pre-treatment most commonly

used for the analysis of these drugs is the addition of acetonitrile into the biological sample. By this addition, acetonitrile precipitates the serum proteins and additionally it enriches the drugs by sample stacking. The sample stacking is due to the lower conductivity and higher field strength of this organic solvent than the BGE solution and therefore, larger volumes of sample can be injected. Acetonitrile stacking allows determine NSAIDs at low $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ levels [5-7, 13].

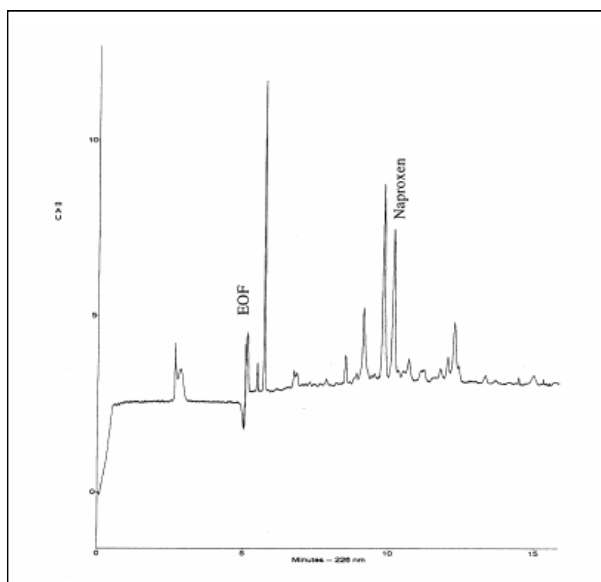


Figure 2. Electropherogram obtained when human urine sample was analysed by LPME-CE, and naproxen was spiked at $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. (From Ref. [9] with permission).

Recently, other sample pre-treatment techniques to clean-up the sample matrix and preconcentrate the drugs have successfully been used for the analysis of these drugs in biological

samples. These sample pre-treatment techniques are liquid-phase micro-extraction (LPME) [9] for the analysis of urine (electropherogram shown in Figure 2), and the at-line SPE-CE [30]

and on-line SPE-CE [10] for the analysis of serum and urine. By using these pre-treatment techniques, NSAIDs were determined at levels between low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and low $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [9, 10, 30].

Other authors used a sample pre-treatment to clean-up the sample matrix and another to preconcentrate the drugs for the analysis of NSAIDs in urine, serum and plasma. Dilution and centrifugation were used to decrease the salt concentration and remove particulate matter, respectively in urine and plasma samples. Seven NSAIDs were analysed in urine samples by dilution in combination with a preconcentration technique in CEC [54]. Sulindac was analysed by CE in urine [31] and plasma [15] samples, after a centrifugation and preconcentration by using micro-column SPE (MicroSPE) and FAEP, respectively. By using these sample pre-treatment techniques, the LODs were at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels.

In off-line sample preparation methods, such as dilution and centrifugation, time consuming and degradation of the analytes can occur because of irreversible adsorption effects and the solvent evaporation steps can not be avoided. However, in bioanalysis a large number of samples often have to be processed, which means that automated procedures are preferred. In this sense, on-line dialysis was used to remove proteins and particulate matter for the analysis of NSAIDs in serum and plasma. Veraart *et al.* [11] used on-line dialysis and on-line SPE to clean-up and preconcentrate five NSAIDs, respectively in urine and serum samples. The

LODs were below $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ when urine and serum samples were analysed, respectively.

In contrast, Sadecká *et al.* [48, 49] analysed some NSAIDs in serum samples by ITP without using a pre-treatment step. These analyses were performed with a commercially available instrument that contained two coupled capillaries. The first capillary, that it had an inside diameter (ID) longer than the second one, was the pre-separation capillary and the second one was the analytical capillary, where the separation and detection took place. The longer ID of the pre-separation capillary increased the load capacity of the system without a considerable increase in the analysis time. The matrix components were almost totally removed from the separation system prior their entrance to the analytical capillary. The detection in the first capillary ensured that the time of current switching could be adjusted accurately with respect to the actual composition of the separated sample, so that always the same size of sample could be transferred into the analytical capillary, regardless of how long the zones of matrix preceding the analytes were. Furthermore, a proper switching of the current leads the ITP analysis in the analytical capillary of a very simplified part of the sample, which eliminates interferences from the sample matrix. By using this system without sample pre-treatment, some NSAIDs (fenoprofen, naproxen, ibuprofen and ibuprofen) could be determined in serum samples at low $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. On the other, ketoprofen could be analysed at $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in serum after etha-

not precipitation of the serum proteins [49].

4.3 Analysis of water samples

With the growing use of pharmaceutical products, drug residues have become significant contaminants in environmental waters. These compounds are continuously being released in the environment mainly as the result of the manufacturing processes, the disposal of unused or expired products and the excreta. Because of the potentially dangerous consequences of the presence of pharmaceuticals in the environment, analytical methods for their determination are necessary. In the literature some of these methods are based on CE. With respect to NSAIDs, the analysed drugs are ibuprofen, fenoprofen, naproxen, diclofenac, ketoprofen and mefenamic acid [4, 20-23, 32-38].

Water samples have to be pre-treated prior to the electrophoretic analysis in order to obtain a clean sample matrix and also to concentrate the drugs. The usually way to accomplish this aim has been to perform a SPE employing suitable stationary phases, and the most commonly stationary phase used has been C₁₈ silica. For these sorbents, NSAIDs were loaded at acidic range, since at neutral pH exist largely in their ionised form (their p*K* values are between 4 and 7) in which they are poorly retained by lipophilic sorbents. Therefore, to ensure a complete retention of these compounds the sample pH was adjusted to pH 2 in order to achieve reproducible and high recoveries. Recoveries higher than 70%

were achieved by using LiChrolut RP-18 [20, 22, 23, 32, 38] and Bondesil ODS cartridges [4, 21] for the analysis of NSAIDs in mineral, tap and surface water. On the other hand, when more complex water samples were analysed, such as surface and sewage water, a liquid-liquid extraction (LLE) was used prior to the SPE as an additional clean-up step to remove some sample matrix constituents [4, 20, 21].

As LODs at the ng·L⁻¹ levels are required, since NSAIDs are present in real water samples at these levels, a strategy to enhance the concentration sensitivity was always necessary for the NSAIDs analysis by CE. Among the strategies, NSAIDs were preconcentrated by applying a preconcentration technique or by using MS as the detector in spiked [4, 20-23, 32, 38] and not spiked water samples [4, 20, 21].

NSAIDs were analysed in spiked mineral and tap water samples at low levels by applying a sample stacking technique [22, 32, 38] or by in-line coupling SPE to CE [23]. In all these studies, a SPE was included previously to the CE analysis and the sample volume was 1000 mL. The LODs were from 2 to 230 ng·L⁻¹ [22, 23, 32, 38], except when the stacking technique FESI-RMM in MEKC was used, in this case the LODs were between 700 and 1600 ng·L⁻¹ [32]. As an example, Figure 3 shows the electropherograms for the blank of mineral water (Fig. 3A) and spiked with 10 µg·L⁻¹ (Fig. 3B-D) when the sample was analysed by off-line SPE and SRMM, SRMM-ASEI, and FESI-RMM, respectively. Another strategy to

enhance the concentration sensitivity was the use of MS. In this case some NSAIDs were analysed in spiked surface water. The LODs obtained were

$16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for the analysis of 500 mL of water by off-line LLE-SPE [4, 21], and $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for the analysis of 1000 mL of water by off-line SPE [20].

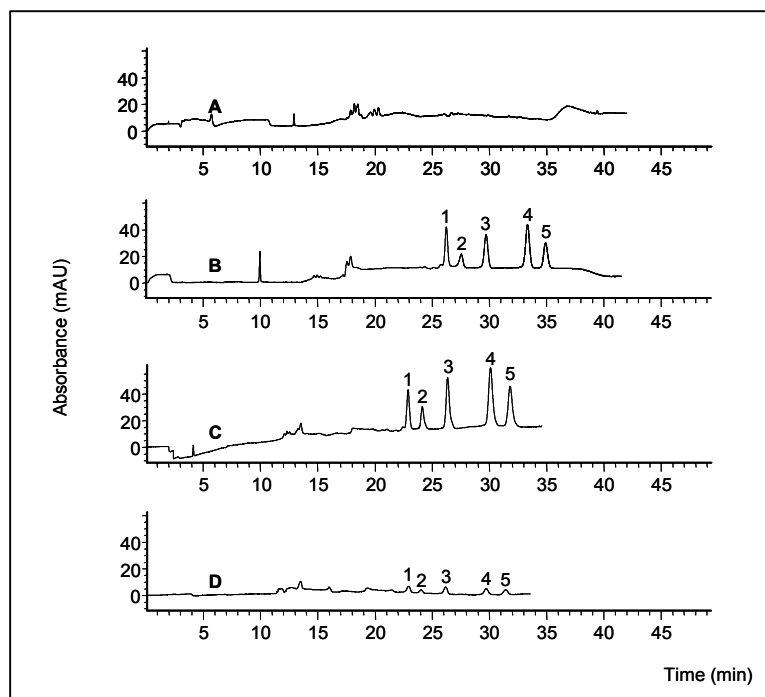


Figure 3. Electropherograms obtained from the analysis of 1000 mL of a blank of mineral water sample spiked by off-line (A) SPE-RMM and mineral water samples spiked at a concentrations of $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ by combining SPE with the on-column preconcentration technique in MEKC: (B) SRMM; (C) SRMM-ASEI; (D) FESI-RMM. Peak designation: (1) diclofenac; (2) ibuprofen; (3) fenoprofen; (4) naproxen; (5) ketoprofen. (From Ref. [32] with permission).

On the other hand, not spiked surface and sewage water sample were also analysed, and in these studies some NSAIDs were present at $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ levels. So, for instance, naproxen was found at $930 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [4, 21] and $510 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [20] in surface and sewage water, respectively. Figure 4 shows the

extraction ion electropherogram of a surface water where diclofenac was detected at a concentration of $390 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [4, 21]. In these reports, MS was always used to increase the concentration sensitivity and to confirm the presence of the drugs in these water samples. As the sample pre-

treatment, a LLE-SPE step was used for the analysis of 500 mL of surface

water [4, 21], and 250 mL [20] of sewage water.

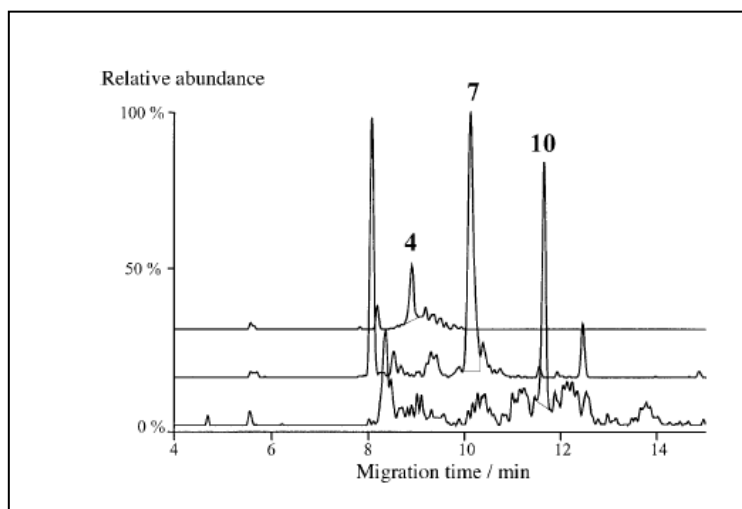


Figure 4. Extracted ion electropherogram of a river water from Austria acquired by aqueous CE-ESI-MS in the negative detection mode, and by using a sheath liquid interface. BGE solution was 20 mM ammonium acetate at pH 5.1. Peak designation: (4) bexafibrate; (7) diclofenac; (10) clofibrac acid. (From Ref. [21] with permission).

5 Concluding remarks and future trends

During the last years, CE has significantly grown as a complementary separation analytical tool to chromatographic techniques for the analysis of NSAIDs.

The low concentration sensitivity of the technique has been overcome by using different preconcentration strategies to enrich the drugs. Preconcentration techniques by electrophoretic and chromatographic approaches are powerful tools to enhance concentration sensitivity for the analysis of NSAIDs. By combining these preconcentration strategies with a sample pre-treatment

technique, these drugs can be detected in the $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels in water samples and biological samples, respectively for conventional UV detectors.

Future trends are about the in-line and on-line SPE-CE coupling. These are particularly attractive since they could allow to directly injection the sample, the preconcentration and the purification take place in an automatic way immediately before the analytical run. A considerable amount of work has still to be done in this field for these techniques to become established and widely applicable. Additionally, the selectivity

could also be improved by the use of selective SPE sorbents.

The on-line coupling of CE and MS provides an excellent analytical tool for the separation and identification of NSAIDs in water and biological samples. CE-ESI-MS proves to be a valuable alternative to other analytical techniques such as GC-MS, avoiding the necessity of derivatization of nonvolatile compounds and showing short analysis time. It is of very considerable importance in future research the combination of MS with preconcentration strategies, such as the coupled SPE-CE and sample stacking techniques. In addition, the application of CE-MS/MS will further enhance sensitivity and unknown compounds identification for the analysis of complex matrices.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) AND (PPQ2002-01276).

6 References

- [1] L. Holland, N. Chetwyn, M. Perkins, S. Lunte, *Pharm. Res.*, 14 (1997) 372.
- [2] T. Nakishan, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 28 (2005) 1115.
- [3] M. Donato, E. van den Eeckhout, W. van den Bossche, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11 (1993)
- [4] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 69.
- [5] Z. Shihabi, M. Hinsdale, *J. Chromatogr. B*, 683 (1996) 115.
- [6] S. Kang, S. Chang, K. Do, S. Chi, D. Chung, *J. Chromatogr. B*, 712 (1998) 153.
- [7] M. Friedberg, Z. Shihabi, *J. Chromatogr. B*, 695 (1997) 193.
- [8] S. Toasaksiri, D. Massart, Y. Heyden, *Anal. Chim. Acta*, 416 (2000) 29.
- [9] S. Pedersen-Bjergaard, K. Rasmussen, *Electrophoresis*, 21 (2000) 579.
- [10] J. Veraart, C. Gooijer, H. Lingeman, N. Velthorst, U. Brinkman, *J. Chromatogr. B*, 719 (1998) 199.
- [11] J. Veraart, M. Groot, C. Gooijer, H. Lingeman, N. Velthorst, U. Brinkman, *Analyst*, 124 (1999) 115.
- [12] Y. Chen, S. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 907.
- [13] A. Zinellu, C. Carru, S. Sotgia, E. Porqueddu, P. Enrico, L. Deiana, *Eur. J. Pharm. Sciences*, 24 (2005) 375.
- [14] W. Jin, J. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 868 (2000) 101.
- [15] Y. Chen, Y. Jong, S. Wu, *J. Chromatogr. A*, 1119 (2006) 176.
- [16] F. Wang, M. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 817 (1998) 121.
- [17] J. Kang, Y. Yang, J. You, Q. Ou, *J. Chromatogr. A*, 825 (1998) 81.
- [18] A. Abushoffa, M. Fillet, A. Servais, P. Hubert, J. Crommen, *Electrophoresis*, 24 (2003) 343.
- [19] S. Heitmeier, G. Blaschke, *J. Chromatogr. B*, 721 (1999) 109.
- [20] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis*, 25 (2004) 3441.

- [21] W. Ahrer, W. Buchberger, *Monatsh. Chem*, 132 (2001) 329.
- [22] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis*, 24 (2003) 2779.
- [23] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, submitted to *J. Chromatogr. A* for publication
- [24] S. Cherkaoui, J. Veuthey, *J. Chromatogr. A*, 874 (2000) 121.
- [25] M. Fillet, I. Bechet, V. Piette, J. Crommen, *Electrophoresis*, 20 (1999) 1907.
- [26] M. Donato, W. Baeyens, W. Van den Bossche, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 12 (1994) 21.
- [27] C. Maboundou, G. Pintaud, M. Bérard, P. Bechtel, *J. Chromatogr. B*, 657 (1994) 173.
- [28] S. Orlandini, S. Fanali, S. Furlanetto, A. Marras, S. Pinzauti, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004) 256.
- [29] K. Stubberund, O. Aström, *J. Chromatogr. A*, 798 (1998) 307.
- [30] C. Mardones, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis*, 22 (2001) 484.
- [31] P. Zhang, X. Guowang, J. Xiong, Y. Zheng, X. Shi, Q. Yang, F. Wei, *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 1527.
- [32] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006), 234.
- [33] J. Dey, A. Mohanty, S. Roy, D. Khatua, *J. Chromatogr. A*, 1048 (2004) 127.
- [34] M. Miola, M. Snowden, K. Altria, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 785.
- [35] K. Altria, *J. Chromatogr. A*, 844 (1999) 371.
- [36] P. Mahuzier, B. Clark, A. Crumpton, K. Altria, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 784.
- [37] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *C Electrophoresis*, 26 (2005) 970.
- [38] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Cromatographia*, 63 (2006) 149.
- [39] C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 895 (2000) 123.
- [40] M. Quaglia, E. Donati, S. Fanali, P. Catarcini, *Il Fàrmaco*, 58 (2003) 699.
- [41] S. Orlandini, S. Furlanetto, S. Pinzauti, G. Orazio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 1044 (2004) 295.
- [42] A. De Rossi, C. Desiderio, *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 283.
- [43] S. Fanali, P. Catarcini, C. Presutti, *J. Chromatogr. A*, 994 (2003) 227.
- [44] D. Mangelings, I. Tanret, N. Matthijs, M. Maftouh, D. Massart, Y. Heyden, *Electrophoresis*, 26 (2005) 818.
- [45] Y. Pai, C. Liu, *J. Chromatogr. A*, 982 (2002) 293.
- [46] G. Manetto, M. Bellini, Z. Deyl, *J. Chromatogr. A*, 990 (2003) 281.
- [47] D. Hoegger, R. Freitag, *J. Chromatogr. A*, 914 (2001) 211.
- [48] J. Sádecká, A. Hercegová, J. Polonský, *J. Chromatogr. B*, 729 (1999) 11.
- [49] A. Hercegová, J. Sádecká, J. Polonský, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2842.
- [50] J. Sádecká, M. Cakrt, A. Hercegová, J. Polonský, I. Skacani, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 881.
- [51] J. Sádecká, M. Cakrt, *J. Chromatogr. A*, 1084 (2005) 152.

- [52] K. Stubberud, O. Aström, J. Chromatogr. A, 826 (1998) 95.
- [53] Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis, 25 (2004) 428.
- [54] Y. Pai, C. Lin, C. Liu, Electrophoresis, 25 (2004) 569.
- [55] B. Kim, D. Chung, Electrophoresis, 23 (2002) 49.
- [56] W. Sung, S. Chen, Electrophoresis, 27 (2006) 257.
- [57] D. Osbourn, D., Weiss, C., Lunte, Electrophoresis, 21 (2000) 2779.
- [58] M. Breadmore, P. Haddad, Electrophoresis, 22 (2001) 2489.
- [59] K. Makino, Y. Itoh, D. Teshima, R. Oishi, Electrophoresis, 25 (2004) 1488.

1.5 BIBLIOGRAFIA

- [1] Petrovic, M., González, S., Barceló, D., Trends Anal. Chem. 22 (2003) 685.
- [2] Petrovic, M., Hernando, M.D., Díaz-Cruz, M.S, Barceló, D., J. Chromatogr. A 1067 (2005) 1.
- [3] Ternes, T.A., Trends Anal. Chem. 20 (2001) 419.
- [4] Jones, O., Voulvoulis, N., Lester, J., Environ. Technol. 22 (2001) 1383.
- [5] Heberer, T., Toxicol. Lett. 131 (2002) 5.
- [6] Richarson, S.D., Anal. Chem. 75 (2003) 2831.
- [7] Metcalfe, C., Miao, X., Koenig, B., Struger, J., Environ. Toxicol. Chem. 22 (2003) 2881.
- [8] Bruchet, A., Hochereau, C., Picard, C., Decottignies, V., Rodríguez, J., Janex-Habidi, M., Water Sci. Technol. 52 (2005) 53.
- [9] Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L., Grandjean, D., Tarradellas, J., Water Res. 39 (2005) 1761.
- [10] Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., Water Res. 39 (2005) 2219.
- [11] Gómez, M., Petrovic, M., Fernando-Alba, A., Barceló, D., J. Chromatogr. A 1114 (2006) 224.
- [12] Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 505.
- [13] Petrovic, M., Barceló, D., Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 422.
- [14] Hernando, M.D., Heath, E., Petrovic, M., Barceló, D., Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 985.
- [15] Sacher, F., Lange, F., Brauch, H., Blankenhorn, I., J. Chromatogr. A 938 (2001) 199.
- [16] Reddersen, K., Heberer, T., J. Sep. Sci. 26 (2003) 1443.
- [17] Weigel, S., Kallenborn, R., Huhnerfuss, H., J. Chromatogr. A 1023 (2004) 183.
- [18] Liu, W., Chen, H., Ding, W., J. Chromatogr. A 1065 (2005) 279.

- [19] Verenitch, S., Lowe, C., Mazumder, A., *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 193.
- [20] Miao, X., Koenig, B., Metcalfe, C., *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 139.
- [21] Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R., Pastori, F., *Chromatographia* 58 (2003) 263.
- [22] Hilton, M., Thomas, K., *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 129.
- [23] Zwiener, C., Frimmel, F., *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 851.
- [24] Hao, C., Lissemore, L., Nguyen, B., Kleywegt, S., Yang, P., Solomon, K., *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 505.
- [25] Kot-Wasik, A., Debska, J., Wasik, A., Namiesnik, J., *Chromatographia* 64 (2006) 13.
- [26] Hempel, G., *Electrophoresis* 21 (2000) 691.
- [27] Breadmore, M., Haddad, P., *Electrophoresis* 22 (2001) 2464.
- [28] Sentellas, S., Puignou, Ll., Galceran, T., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 975.
- [29] Wu, X., *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 48.
- [30] Simonet, B., Ríos, A., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 605.
- [31] Osbourn, D.M., Weiss, D.J., Lunte, C.E., *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [32] Chien, R.L., *Electrophoresis* 24 (2003) 486.
- [33] Kim, J.B., Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1625.
- [34] Smyth, W.F., *Electrophoresis* 26 (2005) 1334.
- [35] Monton, M.R.N., Terabe, S., *J. Chromatogr. B* 841 (2006) 88.
- [36] Wolfe, M., Lichtenstein, D., Singh, G., *New Engl. J. Med.* 340 (1999) 1888.
- [37] Flower, R., *Nature Rev. Drug Discov.* 2, (2003) 179.
- [38] Maurer, H., *J. Chromatogr. B* 733 (1999) 3.
- [39] Anastos N., Barnett N.W., Lewis S.W., *Talanta* 67 (2005) 269.
- [40] Klyev, N., *J. Anal. Chem.* 57 (2002) 462.
- [41] Friedberg, M., Shihabi, Z., *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 193.
- [42] Kang, S., Chang, S., Do, K., Chi, S., Chung, D., *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.

- [43] Toasaksiri, S., Massart, D., Heyden, Y., *Anal. Chem. Acta* 416 (2000) 12.
- [44] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.
- [45] Chen, Y., Wu, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 907.
- [46] Veraart, J.R., Groot, M., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *Analyst* 124 (1999) 115.
- [47] Fillet, M., Bechet, I., Piette, V., Crommen, J., *Electrophoresis* 20 (1999) 197.
- [48] Cherkaoui, S., Veuthey, J., *J. Chromatogr. A* 874 (2000) 121.
- [49] Ahrer, W., Buchberger, W., *Monatsh. Chem.* 132 (2001) 329.
- [50] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 25 (2004) 3441.
- [51] Wang, F., Khaledi, M., *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 121.
- [52] Abushoffa, A., Fillet, M., Servais, A., Hubert, P., Crommen, J., *Electrophoresis* 24 (2003) 3431.
- [53] Chen, Y., Jong, Y., Wu, S., *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 176.
- [54] Zinelli, A., Carru, C., Sotgia, S., Porqueddu, E., Enrico, P., Deiana, L., *Eur. J. Pharm. Sciences* 24 (2005) 375.
- [55] Donato, M., Baeyens, W., Van den Bossche, W., Sandra, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 21.
- [56] Stubberund, K., Aström, O., *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 307.
- [57] Zhang, P., Guowang, X., Xiang, J., Zheng, Y., Shi, X., Yang, Q., Wei, F., *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1527.
- [58] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., *Electrophoresis* 22 (2001) 484.
- [59] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 234.
- [60] Altria, K., *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 371.
- [61] Mahuzier, P., Clark, B., CRumpton, A., Altria, K., *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 784.
- [62] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 26 (2005) 970.

- [63] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Chromatographia* 63 (2006) 149.
- [64] Desiderio, C., Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 123.
- [65] Orlandini, S., Furlanetto, S., Pinzauti, S., Orazio, G., Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 1044 (2004) 295.
- [66] De Rossi, A., Desiderio, C., *J. Chromatogr. A* 984 (2003) 283.
- [67] Fanali, S., Catarcini, P., Presutti, C., *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 227.
- [68] Pai, Y., Liu, C., *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 293.
- [69] Hoegger, D., Freitag, R., *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 211.
- [70] Sadecká, J., Hercegová, A., Polonský., *J. Chromatogr. B* 729 (1999) 11.
- [71] Hercegová, A., Sadecká, J., Polonský., *J. Electrophoresis* 21 (2000) 2842.
- [72] Sadecká, J., Cakrt, M., Hercegová, A., Polonský., Skacani, I., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 881.
- [73] Sadecká, J., Cakrt, M., *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 152.
- [74] Burgi, D.S., Chien, R.L., *J. Chromatogr.* 559 (1991) 153.
- [75] Burgi, D.S., Chien, R.L., *Anal. Biochem.* 202, (1992) 306.
- [76] Chien, R.L., Burgi, D.S., *Anal. Chem.* 64 (1992) 1046.
- [77] Chien, R.L., Burgi, D.S., *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A.
- [78] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 26 (2005) 954.
- [79] Puig, P., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 196.
- [80] Safra, J., Pospíšilová, M., Kavalírová, J. *Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1022.
- [81] Wang, C., Chiou, S., Wu, S., *Electrophoresis* 26 (2005) 2637.
- [82] He, Y., Lee, H., *Anal. Chem.* 71 (1999) 995.
- [83] Quirino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 339.
- [84] Zhu, Z., Zhang, L., Marimuthu, A., Yang, Z., *Electrophoresis* 24 (2003) 2089.

- [85] Kaneta, T., Ueda, T., Hata, K., Imasaka, T., *J. Chromatogr. A*, 2006, (1106) 52.
- [86] Lee, J., Choi, O., Jung, H., Kim, K., Chung, D., *Electrophoresis* 21 (2000) 21 930.
- [87] Chun, M., Kang, D., Kim, Y., Chung, D., *Microchem. J.* 70 (2001) 247.
- [88] Xu, Y., Qin, W., Lau, Y., Li, S., *Electrophoresis* 26 (2005) 3507.
- [89] Burgi, D.S., *Anal. Chem.* 65 (1993) 3726.
- [90] Maeso, N., Cifuentes, A., Barbas, C., *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 147.
- [91] Tábi, T., Magyar, K., Szökoo, E., *Electrophoresis* 26 (2005) 1940.
- [92] Albert, M., Debusschere, L., Demesmay, C., Rocca, J., *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 291.
- [93] Hsieh, M., Tseng, W., Chang, H., *Electrophoresis* 21 (2000) 2904.
- [94] Baryla, N., Lucy, C., *Electrophoresis* 22 (2001) 52.
- [95] Kim, B., Chung, D., *Electrophoresis* 23 (2002) 49.
- [96] Blanco, E., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 189.
- [97] Blanco, E., Casais, M., Mejuto, M., Cela, R., *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 205.
- [98] Han, J., Chun, M., Ríaz, A., Chung, D., *Electrophoresis* 26 (2005) 480.
- [99] Quirino, J., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. B* 714 (1998) 29.
- [100] Liu, X., Chu, S., Fu, S., Ma, L., Liu, X., Xu, X., *Chromatographia* 61 (2005) 161.
- [101] Otsuka, K., Hayashibara, H., Yamanchi, S., Quirino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 413.
- [102] Quirino, J., Terabe, S., Otsuka, K., Bryant, J., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 3.
- [103] Urger, M., Stöckigt, J., *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 323.
- [104] Zhu, L., Lee, H., *Anal. Chem.* 73 (2001) 3065.
- [105] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 25 (2004) 428.

- [106] Zhang, C., Thormann, W., *Anal. Chem.* 70 (1998) 540.
- [107] Zhu, L., Tham, S., Yap, A., Lee, H., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 328.
- [108] Martínez, D., Borrull, F., Calull, M., *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 185.
- [109] He, H., *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 21 (1998) 725.
- [110] Qurino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 251.
- [111] Huang, Y., Shi, Y., Duan, J., Chen, G., *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1026.
- [112] Buchberger, W., Ferding, M., Sommer, R., Vo, T., *Electrophoresis* 26 (2005) 161.
- [113] Xu, L., *Electrophoresis* 26 (2005) 428.
- [114] Liu, S., Li, Q., Chen, X., Hu, Z., *Electrophoresis* 23 (2002) 3392.
- [115] Wang, S., Wu, Y., Ju, Y., Chen, X., Zheng, W., Hu, Z., *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 27.
- [116] Zhu, L., Tu, C., Lee, H., *Anal. Chem.* 73 (2001) 5655.
- [117] Zhang, Z., He, Y., Hu, Yu., *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 285.
- [118] Urban, P., García-Ruiz, C., García, A., Marina, L., *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2200.
- [119] Hadwiger, M., Torchia, S., Park, S., Biggin, M., Lunte, C., *J. Chromatogr. B* 681 (1996) 241.
- [120] Zhao, Y., Lunte, C., *Anal. Chem.* 71 (1999) 3985.
- [121] Weiss, D., Saunders, K., Lunte, C., *Electrophoresis* 22 (2001) 59.
- [122] Arnett, S., Lunte, C., *Electrophoresis* 24 (2003) 1745.
- [123] Ward, E., Smyth, M., O'Kennedy, R., Lunte, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 813.
- [124] Hoque, M., Arnett, S., Lunte, C., *J. Chromatogr. B* 827 (2005) 51.
- [125] Shihabi, Z., Hinsdale, M., *J. Chromatogr. B* 683 (1996) 115.
- [126] Friedberg, M., Shihabi, Z., *J. Chromatogr. B* 695 (1997) 193.
- [127] Shihabi, Z., *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 27.
- [128] Shihabi, Z., Friedberg, M., *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 129.
- [129] Shihabi, Z., *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 107.
- [130] Chang, S., Wang, F., *J. Chromatogr. B* 799 (2004) 265.
- [131] Yu, K., *J. Liq. Chromatogr. R.T.* 29 (2006) 1561.
- [132] Britz-Mckibbin, P., Chen, D., *Anal. Chem.* 72 (2000) 1242.

- [133] Britz-Mckibbin, P., Bebault, G., Chen, D., *Anal. Chem.* 72 (2000) 1729.
- [134] Britz-Mckibbin, P., Ichihashi, T., Tsubota, K., Chen, D., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1013 (2003) 65.
- [135] Ptolemy, A., Le Brian, Britz-Mckibbin, P., *Electrophoresis* 26 (2005) 4206.
- [136] Wang, S., Tseng, W., Lin, Y., Chang, H., *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 261.
- [137] Su, A., Chang, Y., Lin, C., *Talanta* 64 (2004) 970.
- [138] Fan, L., Liu, L., Chen, H., Chen, X., Hu, Z., *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 133.
- [139] Monton, M., Imami, K., Nakanishi, M., Kim, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 1079 (2005) 266.
- [140] Li, W., Fries, D., malik, A., *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2153.
- [141] Reinhoud, N., Tjaden, U., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* 641 (1993) 155.
- [142] Reinhoud, N., Tjaden, U., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* 653 (1993) 303.
- [143] Reinhoud, N., Tjaden, U., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 239.
- [144] Reinhoud, N., Tjaden, U., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 151.
- [145] Hernández, M., Aguilar, C., Borrull, F., Calull, M., *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 163.
- [146] Cugat, M.J., Aguilar, C., Marcé, R., Borrull, F., Calull, M., *Electrophoresis* 23 (2002) 2279.
- [147] Okamoto, H., Timerbaev, A., Hirokawa, T., *J. Sep. Sci.* 28 (2000) 522.
- [148] Hirokawa, T., Yoshioka, M., Okamoto, H., Timerbaev, A., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* 811 (2004) 165.
- [149] Fukushi, K., Nakayama, Y., Tsujimoto, J., *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 197.
- [150] Tu, C., Lee, H., *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 205.

- [151] Huang, Z., Ito, K., Hirokawa, T., *J. Chromatogr. A* 1055 (2004) 229.
- [152] Yokota, K., Ishio, N., Sasayama, N., Nakayama, Y., Takeda, S., Wakida, S., *Electrophoresis* 24 (2003) 2244.
- [153] Ishio, N., Fukushi, K., Michiba, K., Takeda, S., Wakida, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 1165.
- [154] Fukushi, K., Ishio, N., Sumida, M., Takeda, S., Wakida, S., Hiroyama, K., *Electrophoresis* 21 (2000) 2866.
- [155] Fukushi, K., Miyado, T., Ishio, N., Nishio, H., Saito, K., Takeda, S., Wakida, S., *Electrophoresis* 23 (2002) 1928.
- [156] Yokota, K., Fukushi, K., Takeda, S., Wakida, S., *J. Chromatogr. A* 1035 (2004) 145.
- [157] Hirokawa, T., Ichihara, T., Ito, K., Timerbaev, A., *Electrophoresis* 24 (2003) 2328.
- [158] Huang, Z., Ito, K., Timerbaev, A., Hirokawa, T., *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1836.
- [159] Krivánková, L., Pantucková, P., Gebauer, P., Bocek, P., Caslavská, J., Thormann, T., *Electrophoresis* 24 (2003) 505.
- [160] Shim, S., Riaz, A., Choi, K., Chung, D., *Electrophoresis* 24 (2003) 1603.
- [161] Krivánková, L., Pantucková, P., Bocek, P., *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 55.
- [162] Danková, M., Kaniánsky, D., Fanali, S., Iványi, F., *J. Chromatogr. A* 838 (1999) 31.
- [163] Krivánková, L., Voldrich, M., *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 175.
- [164] Danková, M., Strásík, S., Molnárová, M., Kaniánsky, D., Marák, J., *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 143.
- [165] Urbánek, M., Blechtová, L., Pospíšilová, M., Polásek, M., *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 261.
- [166] Hamoudová, R., Urbánek, M., Pospíšilová, M., Polásek, M., *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 281.
- [167] Flottmann, D., Hins, J., Meissner, T., Dietrich, C., Rettenmaier, C., *Chromatographia* 60 (2004) S253.
- [168] Praus, P., *Talanta* 62 (2004) 977.

- [169] Kvasnicka, F., Sevcík, R., Voldrich, M., *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 255.
- [170] Quirino, J., Terabe, S., *Science* 282 (1998) 465.
- [171] Quirino, J., Terabe, S., *Anal. Chem.* 71 (1999) 1638.
- [172] Quirino, J., Kim, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 965 (2003) 357.
- [173] Quirino, J., Kim, J., Terabe, S., *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 367.
- [174] Taylor, R., Reid, R., Low, A., *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 201.
- [175] Wang, C., Wang, Z., Han, D., Wu, Q., Zhang, X., *Anal. Lett.* 39 (2006) 1927.
- [176] Kruyasawat, J., Marriott, P., Hughes, J., *Electrophoresis* 24 (2003) 2180.
- [177] Takagai, Y., Akiyama, R., Igarashi, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 888.
- [178] Shen, H., Lin, C., *Electrophoresis* 27 (2006) 1255.
- [179] Sun, S., Tseng, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 39.
- [180] Hsieh, M., Lin, C., *Electrophoresis* 25 (2006) 677.
- [181] Kim, J., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 129.
- [182] Zhu, L., Tu, C., Kee, H., *Anal. Chem.* 74 (2002) 5820.
- [183] Britz-McKibbin, P., Markuszewski, M., Iyanagi, T., Matsuda, K., Nishioka, T., Terabe, S., *Anal. Biochem.* 313 (2003) 89.
- [184] Britz-McKibbin, P., Otsuka, P., Terabe, S., *Anal. Chem.* 74 (2002) 3736.
- [185] Britz-McKibbin, P., Terabe, S., *Chem. Rec.* 2 (2002) 397.
- [186] Stead, D., Reid, R., Taylor, R., *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 259.
- [187] Veraart, J., Lingeman, H., Brinkman, U., *J. Chromatogr.* 856 (1999) 483.
- [188] Hinsmann, P., Arce, L., Ríos, A., Valcárcel, M., *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 137.
- [189] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., *Electrophoresis* 22 (2001) 484.
- [190] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., *Electrophoresis* 20 (1999) 2922.

- [191] Veraart, J.R, Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *J. Pharm. Biom. Anal.* 17 (1998) 1161.
- [192] Veraart, J.R, Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *J. Chromatogr. B* 719 (1998) 199.
- [193] Veraart, J.R., Groot, M., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *Analyst* 124 (1999) 115.
- [194] Tempels, A., Underberg, W., Somsen, G., de Jong, G., *Anal. Chem.* 76 (2004) 4432.
- [195] Zacharis, C.K., Tampels, F.W.A., Theodoris, G.A., Voulgaropoulos, A.N., Underberg, W.J.M., Somsen, G.W., de Jong, G., *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 297.
- [196] Bonneil, E., Waldron, K., *Talanta* 53 (2000) 687.
- [197] Tempels, A., Teeuwssen, J., Kyriakou, I., Theodoridis, G., Underberg, W., Somsen, G., de Jong, G., *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263.
- [198] Tempels, A., Wiese, G., Underberg, W., Somsen, G., de Jong, G., *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 30.
- [199] Swartz, M., Merion, M., *J. Chromatogr. A* 632 (1993) 209.
- [200] Beattie, J., Self, R., Richards, M., *Electrophoresis* 16 (1995) 322.
- [201] Strausbauch, M., Xu, S., Fergusson, J., Nunez, M., Machacek, D., Lawson, G., Wettstein, P., Landers, J., *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 279.
- [202] Strausbauch, M., Landers, J., Wettstein, P., *Anal. Chem.* 68 (1996) 306.
- [203] Knudsen, C., Beattie, J., *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 463.
- [204] Vizioli, N., Rusell, M., Carducci, C., *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 167.
- [205] Sandra, K., Lynen, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Sandra, P., *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 671.
- [206] Zhang, L.H., Zhang, C.J., Chen, X., Feng, Y.Q., Wu, X.Z., *Electrophoresis* 27 (2006) 3224.
- [207] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C., *J. Chromatogr. A* (pendent de publicació).

- [208] Cai, J., El Rassi, Z., *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 1179.
- [209] Tomlinson, A., Naylor, S., *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 384.
- [210] Naylor, S., Tomlinson, A., *Biomed. Chromatogr.* 10 (1996) 235.
- [211] Naylor, S., Benson, L., Tomlinson, A., *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 415.
- [212] Benson, L., Tomlinson, A., Mayeno, A., Gleich, G., Wells, D., Naylor, S., *J. High Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 291.
- [213] Rohde, E., Tomlinson, A., Johnson, K., Naylor, S., *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 301.
- [214] Naylor, S., Ji, Q., Johnson, K., Tomlinson, A., Kieper, W., Jameson, S., *Electrophoresis* 19 (1998) 2207.
- [215] Rohde, E., Tomlinson, A., Johnson, K., Naylor, S., *Electrophoresis* 19 (1998) 2361.
- [216] Naylor, S., Tomlinson, A., *Talanta* 45 (1998) 603.
- [217] Yang, Q., Tomlinson, A., Naylor, S., *Anal. Chem.* 1 (1999) 183A.
- [218] Waterval, J., Hommels, G., Teeuwesen, J., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W., *Electrophoresis* 21 (2000) 2851.
- [219] Waterval, J., Bestebreurtje, P., Lingeman, H., Versluis, C., Heck, A., Bult, A., Underberg, W., *Electrophoresis* 22 (2001) 2701.
- [220] Waterval, J., Hommels, G., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W., *Electrophoresis* 22 (2001) 2709.
- [221] Baryla, N., Tolti, N., *Analyst* 138 (2003) 1009.
- [222] Hutchinson, J., Zakaria, P., Bowie, A., Macka, M., Avdalovic, N., Haddad, P., *Anal. Chem.* 77 (2005) 407.
- [223] Armenta, J., Gu, B., Humble, P., Thulin, C., Lee, M., *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 171.
- [224] Vizioli, N., Rusell, M., Carbajal, M., Carducci, C., Grasselli, M., *Electrophoresis* 26 (2005) 2942.
- [225] Hutchinson, J., Macka, M., Avdalovic, N., Haddad, P., *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 43.
- [226] Breadmore, M., *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 121.

- [227] Kannamkumarath, S., Wuilloud, R., Jayasinghe, S., Caruso, J., *Electrophoresis* 25 (2004) 1843.
- [228] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M., García-Montelongo, F., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 25 (2004) 2065.
- [229] Hernández-Borges, J., Cifuentes, A., García-Montelongo, F., Rodríguez-Delgado, M., *Electrophoresis* 26 (2005) 980.
- [230] Zhou, X., Li, X., Zeng, Z., *J. Chromatogr. A* 1104 (2006) 359.
- [231] Nguyen, A., Luong, J., *Anal. Chem.* 69 (1997) 1726.
- [232] Whang, C., Pawliszyn, J., *Anal. Commun.* 35 (1998) 353.
- [233] Liu, Z., Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 77 (1997) 165.
- [234] Liu, Z., Pawliszyn, J., *Analyst* 131 (2006) 522.
- [235] Jinno, K., Kawazoe, M., Saito, Y., Takeichi, T., Hayashida, M., *Electrophoresis* 22 (2001) 3785.
- [236] Guzman, N.A., *Electrophoresis* 24 (2003) 3718.
- [237] Liu, Z., Pawliszyn, J., *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 366.
- [238] Tegeler, T., El Rassi, Z., *Anal. Chem.* 73 (2001) 3365.
- [239] Yang, C., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 20 (1999) 2337.
- [240] Yang, C., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 21 (2000) 1977.
- [241] Hilhorst, M., Somsen, G., de Jong, G., *Chromatographia* 53 (2001) 190.
- [242] Tegeler, T., El Rassi, Z., *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 267.
- [243] Quirino, J., Dulay, M., Zare, R., *Anal. Chem.* 73 (2001) 5557.
- [244] Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, L., Zhang, W., *Anal. Chem.* 72 (2000) 5744.
- [245] Ping, G., Zhang, Y., Zhang, W., Zhang, L., Zhang, L., Schmitt-Kopplin, P., Kettrup, A., *Electrophoresis* 25 (2004) 421.
- [246] Pai, Y., Lin, C., Liu, C., *Electrophoresis* 25 (2004) 569.
- [247] Olgemöller, J., Hempel, G., Boss, J., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B* 726 (1999) 261.
- [248] Cugat, M.J., Borrull, F., Calull, M., *Analyst* 126 (2001) 1313.
- [249] Matyska, M., Pesek, J., Boysen, R., Hearn, M., *Anal. Chem.* 73 (2001) 5116.
- [250] Liu, B., Zhang, X., Lu, Y., *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 257.

- [251] Lin, W., Huang, C., Chang, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 379.
- [252] Mrestani, Y., Claussen, S., Neubert, R., *Chromatographia* 59 (2004) 759.
- [253] Herrero-Martínez, J., Schoenmakers, P., Kok, W., *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 227.
- [254] Lara, F., García-Campaña, A., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J., *Electrophoresis* 26 (2005) 2418.
- [255] Petsch, M., Mayer-Helm, B., Sawermann, R., Joukhadan, C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 55.
- [256] Law, W., Zhao, J., Li, S., *Electrophoresis* 26 (2005) 3486.
- [257] Moring, S., Reel, R., van Soest, R., *Anal. Chem.* 65 (1993) 3454.
- [258] Callao, A., Chattaraj, S., Kanfer, I., *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 333.
- [259] Mrestani, Y., Neubert, R., *Electrophoresis* 19 (1998) 3022.
- [260] He, Q., Fang, Q., Du, W., Huang, Y., Fang, Z., *Analyst* 130 (2005) 1052.
- [261] Swinney, K., Bornhop, D., *Electrophoresis* 21 (2000) 1239.
- [262] Van Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* 22 (2001) 1251.
- [263] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 24 (2003) 3837.
- [264] Huck, C.W., Stecher, G., Scherz, H., Bonn, G., *Electrophoresis* 26 (2005) 1319.
- [265] Ohnesorge, J., Neusüß, C., Wätzig, H., *Electrophoresis* 26 (2005) 3973.
- [266] Schmitt-Kopplin, P., Englmann, M., *Electrophoresis* 26 (2005) 1209.
- [267] Polesello, S., Valsecchi, S., *J. Chromatogr. A* 834 (1999) 103.
- [268] Baldwin, R., *Electrophoresis* 21 (2000) 4017.
- [269] Zemmann, A., *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 346.
- [270] Holland, L., Leigh, A., *Electrophoresis* 23 (2002) 3649.
- [271] García, C., Henry, C., *Anal. Chem.* 75 (2003) 4778.
- [272] Poinot, V., Bayle, C., Conderc, F., *Electrophoresis* 24 (2003) 4047.

- [273] Wang, J., Mannino, S., Camera, C., Chatrathi, C., Scampicchio, M., Zuma, J., *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 177.
- [274] Samcova, E., Tuma, P., *Electroanalysis* 18 (2006) 152.
- [275] Psurek, A., Maysik, M., Scriba, G., *Electrophoresis* 27 (2006) 1199.
- [276] Lacher, N., Garrison, K., Lunte, S., *Electrophoresis* 23 (2002) 1577.
- [277] Luong, J., Hilmi, A., Nguyen, A., *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 323.
- [278] Scampicchio, M., Wang, J., Mannino, S., Chatrathi, M., *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 189.
- [279] Muna, G., Quaiserova-Mocko, V., Swain, G., *Anal. Chem.* 77 (2005) 6542.
- [280] Johson, M., Landers, J., *Electrophoresis* 25 (2004) 3513.
- [281] Yang, X., Wang, X., Zhang, X., *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 677.
- [282] Sluszny, C., He, Y., Yeung, E., *Electrophoresis* 26 (2005) 4197.
- [283] Lacroix, M., Poinot, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 26 (2005) 2608.
- [284] Orejuela, E., Silva, M., *Electrophoresis* 26 (2005) 4478.
- [285] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Hernández, E., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 68.
- [286] Monton, M.R.N., Terabe, S., *J. Chromatogr.* 1032 (2004) 203.
- [287] Gennaro, L.A., Sals-Solano, O., Ma, S., *Anal. Biochem.* 355 (2006) 249.
- [288] Aguilar, C., Hofte, A.J.P., Tjaden, U.R., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 57.
- [289] Simó, C., Elvira, C., González, N., San Román, J., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 25 (2004) 2056.
- [290] Safarpour, H., Asiaie, R., Katz, S., *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 217.
- [291] Nuñez, O., Moyano, E., Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 243.
- [292] Arráez-Román, D., Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1648.

- [293] Takeda, S., Tanaka, Y., Yamane, M., Siroma, Z., Wakida, S., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 415.
- [294] Deterding, L., Tomer, K., Wellemans, J., Cerny, R., Gross, M., *Eur. Mass. Spectrom.* 5 (1999) 33.
- [295] Nesuss, C., Pelzing, M., Macht, M., *Electrophoresis* 23 (2002) 3149.
- [296] Bindila, L., Zaufir, A., Peter-Katalinic, J., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1101.
- [297] De Boni, S., Neususs, C., Pelzing, M., Scriba, G., *Electrophoresis* 2003, 24, 874-882.
- [298] Soga, T., Kakazu, Y., Robert, M., Tamita, M., Nishioka, T., *Electrophoresis* 25 (2004) 1964.
- [299] Ge, L., Yong, L.W.H., Tan, S.N., Yang, X.H., Ong, E.S., *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 322.
- [300] Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., *Electrophoresis* 26 (2005) 1550.

2 PART EXPERIMENTAL I RESULTATS



Tal com s'ha comentat en el capítol anterior, l'aplicació de l'CE a la determinació d'analits a baixos nivells de concentració és limitada degut a la baixa sensibilitat que presenta aquesta tècnica. No obstant, en els darrers anys s'han desenvolupat i aplicat diferents estratègies per augmentar la seva sensibilitat, el qual és l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral.

En aquest capítol s'inclou la part experimental i els resultats obtinguts en els estudis realitzats durant la present Tesi Doctoral. Aquests resultats han estat publicats en diferents revistes científiques, els quals es presenten en format d'articles. Prèviament a cada treball o agrupació de treballs s'inclou una introducció en la qual s'indiquen els objectius de l'estudi, així com la innovació en el moment de la seva realització i es comenten els resultats més importants.

La part experimental es divideix en cinc apartats. Els tres primers inclouen l'estudi, l'optimització i l'aplicació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques emprant les tècniques d'CZE, MEEKC i MEKC, respectivament. En el quart apartat hi ha un estudi en què s'aplica una tècnica de preconcentració cromatogràfica, basada en l'acoblament *in-line* de l'SPE a l'CE, i una posterior comparació dels resultats obtinguts prèviament amb les tècniques de preconcentració electroforètiques; i el cinquè apartat inclou un estudi sobre l'ús de l'MS com a sistema de detecció per millorar la capacitat de detecció dels analits.

Els analits que s'han analitzat en tots aquests treballs són fàrmacs antiinflamatoris (naproxèn, ibuprofèn, fenoprofèn, diclofenac sòdic i ketoprofèn), exceptuant el treball que es presenta en el cinquè apartat, en què s'han inclòs també dos fàrmacs que pertanyen a la família dels reguladors de lípids (bezafibrat i àcid clofíbric).

Les diferents metodologies desenvolupades s'han aplicat a la determinació d'aquests fàrmacs en mostres aquoses, com aigua mineral, de l'aixeta, de riu o aigües procedents d'estacions EDAR. En tots aquests estudis ha estat

necessari un pretractament previ de les mostres que s'ha realitzat emprant la tècnica d'SPE en mode *off-line*. No obstant, en l'anàlisi d'aigües residuals procedents de les estacions EDAR, s'ha utilitzat com a tècnica de pretractament una LLE prèvia a la SPE *off-line*, degut a la complexitat de la matriu de la mostra.

Els capil·lars emprats en el treball que es presenta en el quart apartat, en el que s'ha acoblat *in-line* l'SPE a l'CE, s'han preparat en els laboratoris del grup d'investigació "Bioanàlisi" del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona dirigit pel Catedràtic José Barbosa.

**2.1 Aplicació de diferents tècniques de
preconcentració electroforètiques en
electroforesi capil·lar per zones**

Generalment, els estudis que es troben a la bibliografia sobre la determinació de NSAIDs per CE es basen en la separació de dos o tres d'aquests fàrmacs en solucions estàndard. Per tal d'ampliar el camp d'aplicació de l'CE sobre els NSAIDs, en aquest estudi es va optimitzar la determinació d'aquests fàrmacs a baixos nivells de concentració per CZE.

Amb aquest objectiu, en primer lloc es va aprofundir en l'estudi de la separació electroforètica de sis NSAIDs, sent aquests l'aspirina, l'ibuprofèn, el fenoprofèn, el naproxèn, el diclofenac sòdic i el ketoprofèn. Per a la separació d'aquests compostos es varen optimitzar les variables més importants que afecten a una separació per CZE com són la composició i la concentració de l'electròlit, i les condicions de separació com voltatge i temperatura. Com a medi de separació es va emprar una solució electrolítica aquosa formada per borat sòdic per ser la solució més emprada a la bibliografia per la determinació d'aquests fàrmacs en solucions estàndard.

En l'interval de concentració del tampó i pH estudiats no es va obtenir una bona resolució dels sis fàrmacs, ja que aquests tenen una estructura i unes velocitats electroforètiques molt semblants entre sí i migren a la mateixa velocitat que l'EOF. Per tal de millorar aquesta separació es va recórrer a l'addició de solvents orgànics ja que aquests modifiquen la velocitat de l'EOF. Fillet *et al.* [1] i Cherkaoui *et al.* [2] van emprar una solució electrolítica totalment no aquosa per la separació de fins a tretze NSAIDs. En el nostre treball, amb una addició del 70% de metanol a la solució electrolítica, els sis fàrmacs es van separar completament.

Posteriorment a l'estudi de la separació, es va aplicar una tècnica de preconcentració electroforètica en CZE amb l'objectiu de determinar aquests fàrmacs a baixos nivells de concentració en una mostra d'aigua mineral. La tècnica de preconcentració electroforètica que es va emprar va ser la LVSEP, que es va seleccionar perquè el metanol era el solvent de la solució electrolítica i és un supressor de l'EOF [3]. El principal avantatge d'aquesta tècnica de preconcentració és que aplicant un sol voltatge negatiu, després

d'haver injectat un gran volum de mostra, es duu a terme de manera consecutiva la preconcentració i la separació electroforètica. Per tal d'obtenir el màxim factor de preconcentració, es va optimitzar el volum de mostra introduït en el capil·lar i la matriu en què es dissol la mostra. Ambdós paràmetres a més d'estar relacionats amb el factor de preconcentració també afecten a la separació electroforètica i a l'eixamplament dels pics. Les condicions òptimes es van obtenir omplint tot el capil·lar de mostra i preparant aquesta amb una matriu de baixa conductivitat, com és metanol:acetona (40:60 v/v). Emprant aquestes condicions, es va obtenir un factor de preconcentració de fins a 100, respecte la injecció hidrodinàmica normal, i els LODs van ser entre 10 i 35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard.

El mètode desenvolupat es va validar amb l'anàlisi d'aigua mineral. Prèviament a l'aplicació d'aquesta tècnica de preconcentració es va utilitzar la tècnica d'SPE *off-line* per netejar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits. Emprant un sorbent de C₁₈ i pretractant 1000 mL d'aigua mineral, els LODs obtinguts van ser entre 2 i 9 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Aquest treball va suposar la primera aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica en la determinació d'aquests fàrmacs, i a més, també va suposar la primera aplicació de la tècnica de LVSEP a l'anàlisi de mostres aquoses.

Després dels prometedors resultats obtinguts en aplicar la tècnica de preconcentració de LVSEP, es va plantejar un segon estudi amb l'objectiu d'aprofundir i comparar diferents tècniques de preconcentració electroforètiques per la determinació de NSAIDs a baixos nivells de concentració. En aquest segon treball es van aplicar les tècniques LVSEP-ASEI i FAEP emprant la mateixa solució electrolítica que en el cas anterior. En aquest estudi, aquestes dues tècniques de preconcentració es van aplicar per primera vegada per la determinació d'aquests fàrmacs i, addicionalment, la tècnica FAEP es va aplicar per primera vegada emprant metanol com a supressor de l'EOF.

Amb la finalitat d'obtenir el màxim factor de preconcentració es van optimitzar alguns paràmetres d'aquestes dues tècniques de preconcentració. La tècnica LVSEP-ASEI és una combinació de la tècnica estudiada en el treball anterior LVSEP seguida d'una injecció electrocinètica de la mostra anomenada ASEI. Per tant, en aquesta tècnica es van investigar el temps d'injecció hidrodinàmica i electrocinètica de la mostra. D'altra banda, en la tècnica FAEP s'introdueix hidrodinàmicament un solvent de baixa conductivitat anomenat *solvent plug* i posteriorment la mostra electrocinèticament. Per tant, es van optimitzar el tipus de *solvent plug* i el temps d'injecció hidrodinàmica del mateix, i el temps d'injecció electrocinètica de la mostra.

El potencial d'aquestes dues tècniques es va observar a través dels elevats factors de preconcentració que es van obtenir, 1200 i 1800, respectivament, en comparació amb la injecció hidrodinàmica normal. Els LODs van ser de centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. En aquestes dues tècniques els factors de preconcentració són més elevats ja que inclouen una injecció electrocinètica de la mostra i, en canvi amb la tècnica LVSEP la mostra s'injecta hidrodinàmicament. Per mostrar l'aplicabilitat de la tècnica de preconcentració FAEP, es va analitzar una mostra de 25 mL d'aigua de l'aixeta fortificada amb $4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mitjançant la tècnica *off-line* SPE-FAEP-CZE.

Els dos treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball (apartat 2.1.1) ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 24 (2003) 2779, i el segon treball (apartat 2.1.2) ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 25 (2004) 428.

Bibliografia

- [1] Fillet, M., Bechet, I., Piette, V., Crommen, J., *Electrophoresis* 20 (1999) 1907.
- [2] Cherkaoui, S., Veuthry, J., *J. Chromatogr. A.* 874 (2005) 121.
- [3] Kim, B., Chung, D., *Electrophoresis* 23 (2002) 49.

**2.1 Aplicació de diferents tècniques de
preconcentració electroforètiques en
electroforesi capil·lar per zones**

Generalment, els estudis que es troben a la bibliografia sobre la determinació de NSAIDs per CE es basen en la separació de dos o tres d'aquests fàrmacs en solucions estàndard. Per tal d'ampliar el camp d'aplicació de l'CE sobre els NSAIDs, en aquest estudi es va optimitzar la determinació d'aquests fàrmacs a baixos nivells de concentració per CZE.

Amb aquest objectiu, en primer lloc es va aprofundir en l'estudi de la separació electroforètica de sis NSAIDs, sent aquests l'aspirina, l'ibuprofèn, el fenoprofèn, el naproxèn, el diclofenac sòdic i el ketoprofèn. Per a la separació d'aquests compostos es varen optimitzar les variables més importants que afecten a una separació per CZE com són la composició i la concentració de l'electròlit, i les condicions de separació com voltatge i temperatura. Com a medi de separació es va emprar una solució electrolítica aquosa formada per borat sòdic per ser la solució més emprada a la bibliografia per la determinació d'aquests fàrmacs en solucions estàndard.

En l'interval de concentració del tampó i pH estudiats no es va obtenir una bona resolució dels sis fàrmacs, ja que aquests tenen una estructura i unes velocitats electroforètiques molt semblants entre sí i migren a la mateixa velocitat que l'EOF. Per tal de millorar aquesta separació es va recórrer a l'addició de solvents orgànics ja que aquests modifiquen la velocitat de l'EOF. Fillet *et al.* [1] i Cherkaoui *et al.* [2] van emprar una solució electrolítica totalment no aquosa per la separació de fins a tretze NSAIDs. En el nostre treball, amb una addició del 70% de metanol a la solució electrolítica, els sis fàrmacs es van separar completament.

Posteriorment a l'estudi de la separació, es va aplicar una tècnica de preconcentració electroforètica en CZE amb l'objectiu de determinar aquests fàrmacs a baixos nivells de concentració en una mostra d'aigua mineral. La tècnica de preconcentració electroforètica que es va emprar va ser la LVSEP, que es va seleccionar perquè el metanol era el solvent de la solució electrolítica i és un supressor de l'EOF [3]. El principal avantatge d'aquesta tècnica de preconcentració és que aplicant un sol voltatge negatiu, després

d'haver injectat un gran volum de mostra, es duu a terme de manera consecutiva la preconcentració i la separació electroforètica. Per tal d'obtenir el màxim factor de preconcentració, es va optimitzar el volum de mostra introduït en el capil·lar i la matriu en què es dissol la mostra. Ambdós paràmetres a més d'estar relacionats amb el factor de preconcentració també afecten a la separació electroforètica i a l'eixamplament dels pics. Les condicions òptimes es van obtenir omplint tot el capil·lar de mostra i preparant aquesta amb una matriu de baixa conductivitat, com és metanol:acetona (40:60 v/v). Emprant aquestes condicions, es va obtenir un factor de preconcentració de fins a 100, respecte la injecció hidrodinàmica normal, i els LODs van ser entre 10 i 35 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard.

El mètode desenvolupat es va validar amb l'anàlisi d'aigua mineral. Prèviament a l'aplicació d'aquesta tècnica de preconcentració es va utilitzar la tècnica d'SPE *off-line* per netejar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits. Emprant un sorbent de C₁₈ i pretractant 1000 mL d'aigua mineral, els LODs obtinguts van ser entre 2 i 9 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Aquest treball va suposar la primera aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica en la determinació d'aquests fàrmacs, i a més, també va suposar la primera aplicació de la tècnica de LVSEP a l'anàlisi de mostres aquoses.

Després dels prometedors resultats obtinguts en aplicar la tècnica de preconcentració de LVSEP, es va plantejar un segon estudi amb l'objectiu d'aprofundir i comparar diferents tècniques de preconcentració electroforètiques per la determinació de NSAIDs a baixos nivells de concentració. En aquest segon treball es van aplicar les tècniques LVSEP-ASEI i FAEP emprant la mateixa solució electrolítica que en el cas anterior. En aquest estudi, aquestes dues tècniques de preconcentració es van aplicar per primera vegada per la determinació d'aquests fàrmacs i, addicionalment, la tècnica FAEP es va aplicar per primera vegada emprant metanol com a supressor de l'EOF.

Amb la finalitat d'obtenir el màxim factor de preconcentració es van optimitzar alguns paràmetres d'aquestes dues tècniques de preconcentració. La tècnica LVSEP-ASEI és una combinació de la tècnica estudiada en el treball anterior LVSEP seguida d'una injecció electrocinètica de la mostra anomenada ASEI. Per tant, en aquesta tècnica es van investigar el temps d'injecció hidrodinàmica i electrocinètica de la mostra. D'altra banda, en la tècnica FAEP s'introdueix hidrodinàmicament un solvent de baixa conductivitat anomenat *solvent plug* i posteriorment la mostra electrocinèticament. Per tant, es van optimitzar el tipus de *solvent plug* i el temps d'injecció hidrodinàmica del mateix, i el temps d'injecció electrocinètica de la mostra.

El potencial d'aquestes dues tècniques es va observar a través dels elevats factors de preconcentració que es van obtenir, 1200 i 1800, respectivament, en comparació amb la injecció hidrodinàmica normal. Els LODs van ser de centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. En aquestes dues tècniques els factors de preconcentració són més elevats ja que inclouen una injecció electrocinètica de la mostra i, en canvi amb la tècnica LVSEP la mostra s'injecta hidrodinàmicament. Per mostrar l'aplicabilitat de la tècnica de preconcentració FAEP, es va analitzar una mostra de 25 mL d'aigua de l'aixeta fortificada amb $4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mitjançant la tècnica *off-line* SPE-FAEP-CZE.

Els dos treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball (apartat 2.1.1) ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 24 (2003) 2779, i el segon treball (apartat 2.1.2) ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 25 (2004) 428.

Bibliografia

- [1] Fillet, M., Bechet, I., Piette, V., Crommen, J., *Electrophoresis* 20 (1999) 1907.
- [2] Cherkaoui, S., Veuthry, J., *J. Chromatogr. A.* 874 (2005) 121.
- [3] Kim, B., Chung, D., *Electrophoresis* 23 (2002) 49.

2.1.2 *Application of capillary electrophoresis with different sample stacking strategies for the determination of a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range*

**APPLICATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH DIFFERENT
SAMPLE STACKING STRATEGIES FOR THE DETERMINATION OF A GROUP
OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN THE LOW $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
CONCENTRATION RANGE**

Alba Macià, Francesc Borrull, Carme Aguilar, Marta Calull
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

Several on-column sample preconcentration modes –large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP), LVSEP with anion-selective exhaustive injection (LVSEP-ASEI) and field-amplified sample injection with sample matrix removal using the EOF pump (FAEP)– were used to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by capillary electrophoresis, and then compared. Methanol was the background electrolyte solvent to suppress EOF. The effect of the type and length of the solvent plug, and the sample injection time were investigated in FAEP to determine the conditions that provided the best response. LVSEP, LVSEP-ASEI and FAEP improved the sensitivity of the peak area 100-, 1200- and 1800-fold, respectively. The methodology developed, in combination with solid-phase extraction (SPE), was applied to the analysis of water samples.

Keywords: Capillary electrophoresis / Large-volume sample stacking using the EOF pump / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Water samples

1 INTRODUCTION

In recent years a considerable interest to improve concentration sensitivity in capillary electrophoresis by the development of on-line concentration techni-

ques has developed. These techniques include solid-phase extraction (SPE) inside the capillary [1], SPE at-line with the capillary [2, 3], on-line coupling of isotachopheresis with CE [4, 5], transient isotachopheresis [6, 7], and

field-amplified methods [8-13]. Field-amplified methods are based on conductivity differences between the sample and the CE medium. As a result, the electric field in the sample zone is much higher than the field in the background electrolyte. When a separation voltage is applied across the capillary, the ions in the sample matrix migrate faster in the sample zone than in the separation medium and slow down when they enter the background electrolyte. This causes a narrow zone of analytes at this boundary. Separation is then performed by reversing the polarity of the voltage (with polarity switching) or by suppressing the electroosmotic flow (EOF) (without polarity switching).

Burgi *et al.* [9-13] developed a technique, known as large-volume sample stacking (LVSS), which involves the injection of a large-volume of sample into the capillary and removing the sample matrix immediately after stacking so that there is no broadening effect. The sample is removed by applying a temporary reverse polarity and in this way the EOF pushes the matrix plug out of the capillary. A variation of this technique consists on suppressing the EOF by adding an EOF modifier to the background electrolyte [15-21]. Under these conditions, the sample matrix leaves the capillary by itself under a reverse potential at the same time as the EOF is reduced. This technique is known as large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP). The prerequisite for LVSEP of anionic analytes is that their absolute electrophoretic mobilities should be greater than the electroosmotic mobi-

lity. In the literature, several ways of suppressing the EOF have been reported, which lead to a significant enhancement in sensitivity. For example, when an EOF modifier such as tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) was added to analyze arsenious acids, sensitivity was enhanced by 30-40 fold [16]. When coated capillaries were used to determine protein [20] and nonprotein amino acid [21], the enhancement was 100-fold and 250-500-fold, respectively. Or using background electrolyte at the acidic range, sensitivity was enhanced by 300-fold to analyze small organic and inorganic anions [18]. And recently, when methanol was used as the background electrolyte solvent to suppress the EOF, the sensitivity was enhanced by 80-100-fold [19] and 100-150-fold [17] in the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and weakly acidic organic compounds, respectively.

Another mode of operation, known as field-amplified sample injection (FASI) has been described by Chien *et al.* [9-13, 22], and is characterized by injecting a short plug of low-conductivity solvent before the sample is loaded electrokinetically. This solvent plug establishes a high electric field at the injection point and, consequently, stacking factors can be high. When the sample is injected, the ions stack at the interface between the short plug of low-conductivity solvent and the background electrolyte solution, and the plug is immediately pumped out of the capillary inlet by the EOF. Then, the separation is performed by reversing

the polarity of the voltage or by suppressing the EOF.

Kim *et al.* [17] stacked weakly acidic organic compounds by LVSS using EOF (LVSEP) and electrokinetically injected an additional amount of sample into the capillary (anion-selective exhaustive injection, ASEI) while the sample matrix was removed. They used methanol as the background electrolyte solvent to suppress the EOF and they found that sensitivity was enhanced by 300-400-fold. Zhu *et al.* [23] combined FASI with LVSS using the EOF (LVSEP). They called this procedure FAEP. Before the electrokinetic sample loading, a long plug of low-conductivity solvent was hydrodynamically injected into the capillary. Because of the length of the solvent plug, the number of ions injected electrokinetically into the capillary was greatly increased. When a pH at the acidic range was used to suppress the EOF, the sensitivity for the analysis of a group of phenoxy acid herbicides increased by over 3000-fold.

The aim of this study is to compare the sensitivities obtained by using different on-column sample stacking modes to preconcentrate a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). The stacking modes that have been compared are LVSEP, LVSEP-ASEI and FAEP. We use methanol as the background electrolyte solvent to reduce the EOF, which has been applied for the first time in FAEP. The various parameters affecting the stacking process were optimized. To show the applicability of the method developed, a water sample was analyzed by FAEP-CE, after it had been

pretreated by solid-phase extraction (SPE).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and CE analysis

Standards of the five NSAIDs—ibuprofen (Ibu), fenoprofen (Fen), naproxen (Nap), diclofenac sodium (Dicl) and ketoprofen (Ket)— were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); sodium hydroxide and sulfuric acid (95%) were from Prolabo (Bois, France); sodium tetraborate anhydrous was from Fluka (Buch, Switzerland); methanol, acetone and acetonitrile were from SDS (Peypin, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). A stock standard solution of 1000 mg·L⁻¹ of each compound was prepared in methanol, except the solution of diclofenac sodium, which was prepared in methanol:water (80:20 v/v). All solutions were stored in a dark-glass flask at 4°C. A stock standard solution of the five NSAIDs was prepared weekly at a concentration of 100 mg·L⁻¹ in methanol. The working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with methanol:acetone (40:60 v/v). CE analysis was performed on a Hewlett-Packard ^{3D}CE instrument (Palo Alto, CA, USA) system equipped with a UV diode-array detector operating at 214 nm. The capillaries, from Beckman (USA), were uncoated fused-silica capillaries with a total length of 52 cm (43.5 cm effective length) and 75 µm I.D. The capillaries were thermostatted

using a Peltier system at 20°C. The background electrolyte solution was 30 mM sodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) prepared in methanol:water (70:30 v/v). The pH of the solution measured after methanol had been added to the background electrolyte solution was 9.8. This solution was daily freshly prepared, sonicated for at least 5 min and filtered through a 0.22 μm nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) before use. The capillary wall must be treated if EOF is to be consistent and repeatable. At the beginning of each day, the capillary was flushed with 0.1 N NaOH for 5 min, then with water for 10 min and finally with the background electrolyte for 30 min. Between analyses, the capillary was rinsed for 5 min with background electrolyte. The inlet and outlet of the capillary were kept overnight in methanol.

2.2 Sample preparation

An off-line solid-phase extraction (SPE) step was used to clean-up and preconcentrate the samples before analysis. Samples were filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before the SPE to eliminate particulate matter. We used SPE cartridge columns from Merck packed with 500 mg of LiChrolut[®] RP-18 sorbent. The LiChrolut[®] RP-18 cartridges were conditioned by passing 6 mL of methanol and 6 mL of Milli-Q water at a flow-rate of 1 mL \cdot min⁻¹. Then 25 mL of filtered water sample acidified at pH 3 with sulfuric acid was loaded at a flow-rate of 10 mL \cdot min⁻¹ through the cartridge. The cartridge was washed with 5 mL of Milli-Q water

and then air-dried under vacuum for about 5 min. The analytes trapped on the column were eluted with 10 mL of methanol:acetonitrile (30:70 v/v) solution and this was then evaporated under a nitrogen flow to dryness. The residue was dissolved with 10 mL of methanol:acetone (40:60 v/v). The clean-up step was carried out using a SPE manifold system connected to a vacuum pump (Teknokroma, Barcelona, Spain).

2.3 LVSEP

All analytes were dissolved in methanol:acetone (40:60 v/v) and introduced into the capillary hydrodynamically with a pressure of 50 mbar for 300 s. In this way, the whole capillary column was filled with the sample solution. After sample injection, a voltage of -30KV was applied for both sample stacking and subsequent separation. Fresh sample solutions were always used for each injection. The compounds, which are present in the anionic form at the pH of the background electrolyte (9.8), migrate to the detection window by their own electrophoretic mobility while the EOF moves in the opposite direction because they were injected on the cathodic side [19].

2.4 LVSEP-ASEI

All the analytes were dissolved in methanol:acetone (40:60 v/v) and they were injected into the capillary with a pressure of 50 mbar for 300 s. After the hydrodynamic sample injection, a voltage of -10KV was applied to electrokinetically load more analytes for

12 min whereas the sample matrix was removed. Then, with the inlet of the capillary switched to the background electrolyte vial, a voltage of -30KV was applied for both sample stacking and subsequent separation. For each run a new sample solution was used.

2.5 FAEP

A long plug of solvent, acetonitrile:water (50:50; v/v) was introduced into the capillary by hydrodynamic injection, at 50 mbar for 120 s (units of length: 285 mm), before the sample injection. Then, a voltage of -10KV was applied to electrokinetically inject the sample into the solvent plug for 170 s. After sample injection, with the inlet of the capillary switched to the background electrolyte vial, a voltage of -30KV was applied for both sample stacking and subsequent separation. For each run a fresh sample solution was used.

3 Results and discussion

3.1 LVSEP

In a previous report, we analysed a group of NSAIDs by large-volume sample stacking using methanol as the background electrolyte solvent to suppress the EOF [19]. We filled all the capillary hydrodynamically with the sample solution and applied a pressure of 50 mbar for 300 s to achieve a maximum concentration factor. Figure 1A shows an electropherogram of the analytes with this on-column sample preconcentration technique, with a concentration of $200\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ibuprofen and $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the other

analytes. With this stacking mode, the sensitivity was enhanced 80-100-fold in comparison with the normal hydrodynamic injection [19]. The enhancement of sensitivity is evaluated through the area of the peaks.

Table 1 shows the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs_1) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs_2), the detection limits and the sensitivity enhancement factor of standard solutions. The linear responses were excellent in the $25\text{-}1000\ \mu\text{g}\ \text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.998 for all compounds. The RSDs of the corrected peak area and the migration times in terms of reproducibility for LVSEP-CE were below 7% and 0.7%, respectively. The detection limits calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the $10\text{-}35\ \mu\text{g}\ \text{L}^{-1}$ range.

3.2 LVSEP-ASEI

The procedure that combines two stacking modes, LVSEP and ASEI, was studied for the first time by Kim *et al.* [17]. It consisted of filling all the capillary with the sample by hydrodynamic injection (at 50 mbar for 300 s). Then, an additional amount of sample was electrokinetically injected into the capillary by applying a voltage of -10KV for 12 min. As the capillary was filled with the high-conductivity background electrolyte from the outlet vial, the overall EOF of the solution in the capillary was further reduced because of the greater ionic strength of the background electrolyte. When the

electroosmotic flow and the effective mobilities of the analytes were balanced, the inlet vial of the capillary was switched to the background electrolyte vial. At this moment the current value was 95% of its original value (that of the capillary filled with the background electrolyte solution), and the separation of the stacked sample took place by applying a voltage of -30KV .

In this technique, the sample injection time has a considerable effect on the enrichment. Sensitivity enhancement is proportional to the sample injection time or to the percentage of the original current. For times longer than 12 min or percentages of the original current greater than 95% the enrichment decreased because analytes were lost. Figure 1B shows an electropherogram of the analytes with this on-column sample preconcentration mode.

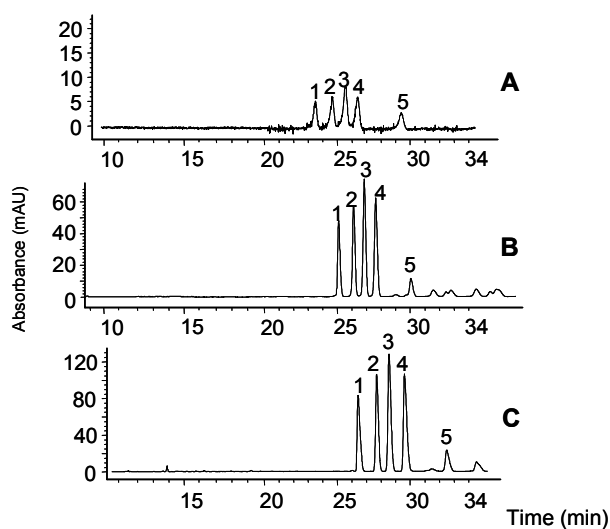


Figure 1. Electropherograms of a standard solution of the five NSAIDs in non-aqueous separation medium or background electrolyte in three stacking modes FAEP, LVSEP-ASEI and LVSEP. (A) LVSEP: hydrodynamic sample injection at 50 mbar for 300 s. (B) LVSEP-ASEI: hydrodynamic sample injection at 50 mbar for 300 s and then additional analytes were loaded electrokinetically for 12 min under a voltage of -10KV . (C) FAEP: acetonitrile:water (50:50 v/v) as a solvent plug was hydrodynamically injected into the capillary at 50 mbar for 120 s and then the sample was loaded electrokinetically for 170 s under a voltage of -10KV . CE conditions: bare fused-silica capillary 52 cm x 75 μm ID (43.5 cm from the detector); 20°C ; detection at 214 nm; 30 mM tetraborate sodium (pH 9.8) separation medium or background electrolyte in methanol:water (70:30 v/v); separation voltage of -30KV . The analytes were dissolved in methanol:acetone (40:60 v/v) with a concentration of $200\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ibuprofen and $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the other analytes. Peak designation: (1) ibuprofen; (2) fenoprofen; (3) naproxen; (4) diclofenac sodium; and (5) ketoprofen.

Comparing the electropherograms obtained in Figures 1A and 1B, few differences in the migration times can be observed. These are due to the time taken to remove the sample matrix from the capillary. In LVSEP-ASEI, the migration times are longer than LVSEP because the time taken to balance the electrosmotic flow and the effective mobilities of the analytes is greater. By

using LVSEP-ASEI, the sensitivity was enhanced by about 700 to 1200-fold in comparison with the normal hydrodynamic injection. The reported differences in sensitivity enhancement for the LVSEP and LVSEP-ASEI stacking modes are due to the additional amount of sample loaded selectively by electrokinetic injection.

Table 1. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, LODs and sensitivity enhancement for LVSEP

Compound	Linearity ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Calibration curves	%RSD ₁ ($n=4$) (peak area)	%RSD ₂ ($n=4$) (migration times)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Sensitivity enhancement
Ibuprofen	50-1000	$y = 0.138x + 0.825$	6	0.6	35	85
Fenoprofen	25-500	$y = 0.379x + 1.329$	6	0.4	10	100
Naproxen	25-500	$y = 0.582x + 1.236$	5	0.6	16	100
Diclofenac sodium	25-500	$y = 0.414x + 1.790$	5	0.4	19	90
Ketoprofen	25-500	$y = 0.118x + 1.422$	6	0.4	14	90

Other CE conditions as in Fig. 1

Table 2 shows the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs₁) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs₂), the detection limits and the sensitivity enhancement factor. The linear responses were excellent in the 0.5-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation

coefficients were greater than 0.999 for all compounds. The RSDs of the corrected peak area and the migration times in terms of reproducibility for LVSEP-ASEI-CE were below 16% and 5%, respectively. The detection limits calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 0.2-1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range.

Table 2. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, LODs and sensitivity enhancement for LVSEP-ASEI

Compound	Linearity ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Calibration curves	%RSD ₁ ($n=4$) (peak area)	%RSD ₂ ($n=4$) (migration times)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Sensitivity enhancement
Ibuprofen	1-1000	$y = 4.929x + 1.777$	14	3	0.6	800
Fenoprofen	0.5-250	$y = 12.141x + 4.138$	15	3	0.2	1000
Naproxen	0.5-250	$y = 16.277x + 7.348$	15	3	0.2	1150
Diclofenac sodium	0.5-250	$y = 15.940x - 0.754$	14	4	0.2	1200
Ketoprofen	2-250	$y = 4.200x - 4.410$	15	4	1.0	700

Other CE conditions as in Fig. 1

3.3 FAEP

3.3.1 Procedure

Zhu *et al.* [23] proposed a procedure that combines field-amplified sample injection and sample matrix removal using the EOF pump, which they called FAEP. Using a long plug of acetonitrile:water (50:50 v/v) solvent and a background electrolyte solution at the acidic range to suppress the EOF, they found that sensitivity was enhanced by more than 3000-fold for the analysis of a group of phenoxy acid herbicides. The procedure of this technique is as follows. Firstly, a long plug of low-conductivity solvent is loaded into the capillary by hydrodynamic injection. In this way, the electrical field established across the solvent plug is several hundred times higher than that in the background electrolyte. This permits charged analytes to be injected at high velocity. After this solvent plug has been injected, the inlet end of the capillary is transferred to the reservoir containing the sample. A negative

voltage is applied to inject NSAIDs into the solvent plug for a period of time. The anions undergo a field-amplified enrichment and concentrate at the boundary between the low-conductivity solvent plug and the background electrolyte. This is the first stacking process. During the injection, the solvent plug moves out of the capillary very slowly from the injection end under the effect of the EOF. At the end of the injection, there still remains a long solvent plug within the capillary. After sample injection, the inlet end of the column is transferred to the high-concentration background electrolyte vial and a separation voltage is applied to remove the sample matrix using the EOF pump. This is the second stacking.

Initially, the μ_{eof} is mainly controlled by the solvent plug, which is quickly pumped out of the inlet, at the cathodic end. Because the solvent plug moves out continuously, the μ_{eof} decreases quickly, whereas the effective mobility of anions in the background electrolyte increases slowly because it partially

mixes with the sample. Once the entire solvent plug has been completely removed from the capillary, the applied field drops across the whole capillary, which is filled with background electrolyte. Then, the separation of the stacked sample takes place.

3.3.2 Factors influencing the performance of FAEP

We optimized several factors that affect the stacking process. We tested different solvent plugs, and we also optimized the hydrodynamic injection time of the solvent plug and the electrokinetic injection time of the analytes, which gave maximum enhancement of sensitivity.

3.3.2.1 Effect of the nature of the solvent plug

The introduction of a long plug of low-conductivity solvent before the analytes were electrokinetically injected provides a higher electric field at the injection point, which improves stacking efficiency. This solvent plug also acted as a medium to hold the injected anions [24]. Several solvents were used as solvent plugs in the literature before the sample injection in FASI technique (the separation was performed with switching). For example, Chien *et al.* [25] used a short plug of water as a solvent plug. Later, Unger *et al.* [26] introduced a short plug of 70% methanol to analyse alkaloids in crude plant extracts. Several water:methanol mix-

tures were tested by Grard *et al.* [27] to analyse adrenoreceptor antagonist enantiomers. Recently, Zhu *et al.* [23, 28] have used acetonitrile:water as a solvent plug without polarity switching.

Taking into account the solvents used by other authors, we also decided to test different solvent plugs (water, methanol:water (70:30 v/v), methanol:acetone (40:60 v/v), acetonitrile and acetonitrile:water (50:50 v/v)). These solvents were selected for their conductivities, which are lower than that of the background electrolyte. Experimentally, each solvent plug was hydrodynamically injected at 50 mbar for 60 s and the sample, dissolved in methanol:acetone (40:60 v/v) solvent, was then injected at -10KV until the intensity was 95% of its original value.

Figure 2 shows the enhancement in sensitivity for the different solvent plugs tested. For all analytes, results on sensitivity were best when a long plug of acetonitrile:water (50:50 v/v) was introduced into the capillary before the sample injected. Therefore, low-conductivity acetonitrile:water (50:50 v/v) solvent was used as the solvent plug in further experiments, which demonstrates that the low-conductivity of the solvent is a key parameter if sensitivity is to be high. For convenience, this acetonitrile:water (50:50; v/v) plug is referred to as the "solvent plug" in the discussion below.

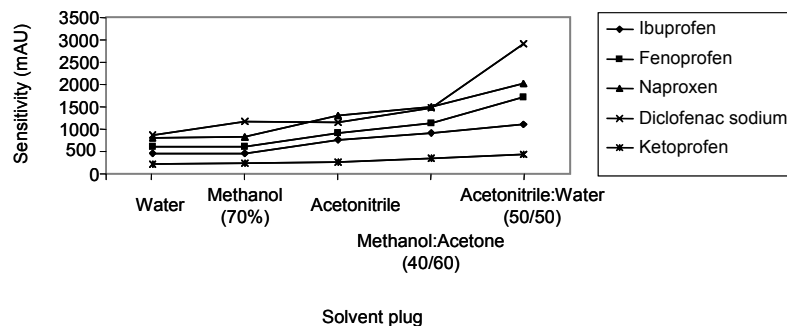


Figure 2. Effect of the composition of the solvent plug on sensitivity using the FAEP stacking mode. The solvent plugs were hydrodynamically injected at 50 mbar for 60 s and the sample was injected electrokinetically at -10KV until the current was 95% of its original value. Other CE conditions as in Fig. 1.

3.3.2.2 Effect of the hydrodynamic injection time of the solvent plug

To study how the injection time of the solvent plug affects the response of the analytes several times between 60 and 150 s were tested. The solvent plug was injected hydrodynamically at 50 mbar. Then, the sample was injected at -10KV until the intensity

reached 95% of the original current. Figure 3 shows that the sensitivity for all the compounds studied increases up at 120 s that was selected for further work. The decrease in sensitivity enhancement at higher injection times can be attributed to the fact that was too long, which meant that the analytes injected overloaded the capillary, and peaks were broader in the corresponding electropherograms.

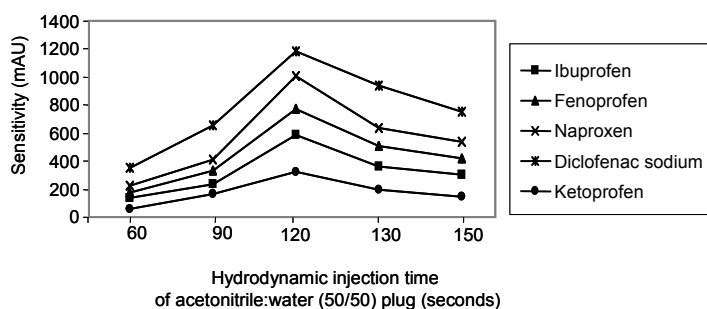


Figure 3. Effect of the hydrodynamic injection time of acetonitrile:water (50/50 v/v), as a solvent plug, on the peak area using the FAEP stacking mode. The solvent plug used was hydrodynamically injected at 50 mbar for different times and the sample was injected electrokinetically at -10KV for the time it took for the current to be 95% of the original current when the capillary was full of background electrolyte solution. Other CE conditions as in Figure 1.

3.3.2.3 Effect of sample injection time

When FAEP is used and the solvent plug is long, the sample injection time can be longer than with ordinary FASI. If the length of the solvent plug was kept constant, the enhancement in sensitivity was proportional to the electrokinetic sample injection time or to the percentage of the original current. To determine how this parameter affected sensitivity we

monitored the electrophoretic current until it was 50 to 95% of the original current. Figure 4 shows the enhancement in sensitivity for different percentages of the original current. Sensitivity was higher for all analytes when the sample was introduced into the capillary by electrokinetic injection with a voltage of -10KV for 170 s. Under these conditions the intensity was 95% of the original current.

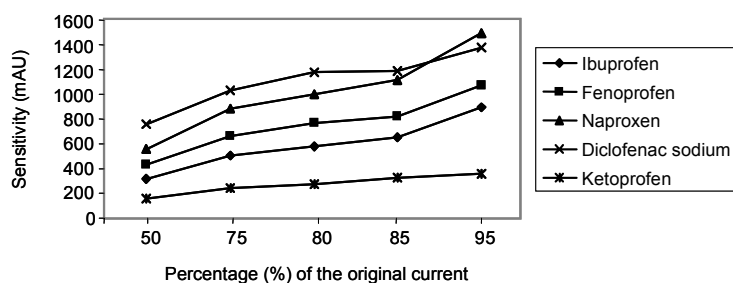


Figure 4. Effect of field-amplified sample injection time on peak area using the FAEP stacking mode. Acetonitrile:water (50:50 v/v), as solvent plug, was hydrodynamically injected at 50 mbar for 120 s. The sample was injected electrokinetically at -10KV for 170s. Other CE conditions as in Figure 1.

The time take to pump the solvent plug out of the inlet during the stacking process depends on the length of the solvent plug and on the FASI duration. If the percentage of the original current or injection time was longer than 95% or 170 s, respectively, the solvent plug was pumped out of the inlet of the capillary during the FASI stage, and the analytes were lost.

Once the FAEP parameters had been optimised, the method was tested by analysing a standard sample solution. Figure 1C shows an electropherogram

of the analytes studied with this on-column sample preconcentration mode. Comparing the electropherograms obtained for the different preconcentration modes under study (see Figure 1), some differences in the migration times can be observed. These differences are due to the time taken to remove the solvent plug or the sample matrix from the capillary during the stacking process. In this stacking mode, the sensitivity was enhanced 1200-1800-fold in comparison with normal hydrodynamic injection.

Table 3 shows the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs₁) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs₂), the detection limits and the sensitivity enhancement factor obtained when FAEP was used. Linear responses were excellent in the 0.5-200 µg·L⁻¹ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.999 for all compounds. The RSDs in terms of reproducibility of the corrected peak area and the migration times for FAEP-CE were below 19% and 6%, respectively. The detection limits calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 0.1-0.4 µg·L⁻¹ range.

In this stacking technique, the sample concentration is a parameter that must

be taken into consideration. Zhu *et al.* [23] reported that when the solvent plug length and sample injection time were fixed, the peak areas were proportional to the concentration only across one order of magnitude. In our case, however, the linearity range was higher than one order (*i.e.* 0.5-100 µg L⁻¹) and peaks were not broader due to sample overloading in the concentration range evaluated. Some authors have also analysed these compounds by HPLC, using both mass spectrometry and UV detection. The detection limits obtained were between 0.3-0.8 µg L⁻¹ [29] and 11.5-75 µg L⁻¹ [30], respectively. So, these values were slightly higher than those obtained when we used FAEP-CE to analyse NSAIDs.

Table 3. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, LODs and sensitivity enhancement for FAEP

Compound	Linearity (µg·L ⁻¹)	Calibration curves	%RSD ₁ (n=4) (peak area)	%RSD ₂ (n=4) (migration times)	LOD (µg·L ⁻¹)	Sensitivity enhancement
Ibuprofen	1-200	y = 5.571x + 7.598	17	5	0.4	1400
Fenoprofen	0.5-100	y = 16.913x + 4.538	15	5	0.1	1600
Naproxen	0.5-100	y = 20.013x + 10.438	18	5	0.1	1800
Diclofenac sodium	0.5-100	y = 29.148x - 3.406	14	5	0.1	1800
Ketoprofen	0.5-100	y = 4.135x + 6.876	19	5	0.2	1200

Other CE conditions as in Fig. 1

3.4 Analysis of real samples

To test the applicability of the developed method based on FAEP-CE real water sample were analysed. This method, which involves an electrokinetic injection of the sample, has

some difficulties in stacking the anions in real water samples because of their constituents. It discriminates against low mobility ions and therefore introduces and stacks more high mobility ions. So ions that can interfere with the stacking process should be removed so

that the extract produced is clean. Since this preconcentration technique is highly dependent on the sample matrix, an off-line solid-phase extraction (SPE) step was used to clean-up and preconcentrate the samples before the stacking process. The method was tested by analysing water samples. Figure 5A shows the analysis of a blank water sample, and Figure 5B shows an electropherogram obtained for 25 mL of water sample spiked with $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ibuprofen and $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the other analytes. After the concentration process by SPE, the concentration was $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ibuprofen and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the other analytes, respectively.

The difference in the migration times in Figures 1C and 5B is due to the sample

matrix and the sample concentration. Even that for water sample SPE was done before the stacking process, the final sample extract should have still high mobility anions. So, shorter times were required to balance the electro-osmotic flow and the effective mobilities. Consequently, the migration times are also shorter. The combination between off-line SPE and on-column FAEP provides a rapid and selective approach for concentrating NSAIDs in water samples at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels prior to CE analysis. With a suitable internal standard the real water sample may be analysed after an off-line sample clean-up step to remove interfering and high mobility ions. This will be the aim of study for further investigations.

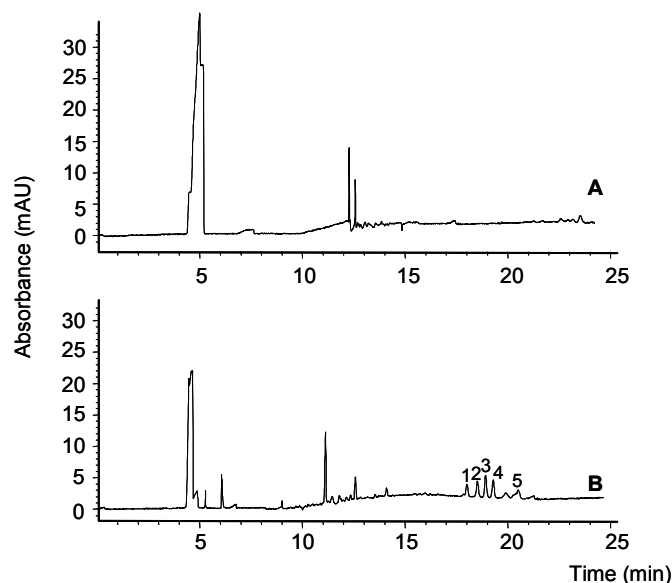


Figure 5. Electropherograms obtained from the analytes of 25 mL of water sample (A) and water sample spiked at a concentration of $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for ibuprofen and $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the other analytes after the SPE-FAEP enrichment procedure (B). Other CE conditions as in Fig. 1.

In conclusion, three different stacking modes for the on-line concentration of a group of NSAIDs have been compared. Field-amplified sample injection with sample matrix removal and methanol as the background electrolyte solvent to suppress the electroosmotic flow (FAEP) can concentrate charged species on-line and gives detection limits at low parts-per-billion levels. Adding acetonitrile to the water plug further improves the enhancement factor, which was between 1200-1800 fold higher than for normal hydrodynamic injection.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) and (PPQ2002-01276).

4 References

- [1] Cai J., Rassi, Z.E.I., *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 1179-1192.
- [2] Veraart J.R., Gooijer C., Lingeman H., Velthorst N.H., Brinkman U.A.T., *J. Chromatogr. B* 1998, 719, 199-208.
- [3] Veraart J.R., Gooijer C., Lingeman H., Velthorst N.H., Brinkman U.A.T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 1161-1166.
- [4] Beckers J.L., Everaerts F.M., *J. Chromatogr.* 1990, 508, 3-17.
- [5] Shihabi Z.K., *Electrophoresis* 2000, 21, 2872-2878.
- [6] Krivankova L., Pantuckova P., Bocek P., *J. Chromatogr. A* 1999, 838, 55-70.
- [7] Larsson M., Lutz E.S.M., *Electrophoresis* 2000, 21, 2859-2865.
- [8] Chien R.L., Burgi D.S., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 141-152.
- [9] Quirino, L.P., Terabe S., *J. Chromatogr. A* 2000, 22, 119-135.
- [10] Chien R. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 486-497.
- [11] Urbánek M., Krivánková L., Bocek P., *Electrophoresis* 2003, 24, 466-485.
- [12] Osbourn D. M., Weiss D. J., Lunte C.E., *Electrophoresis* 2000, 21, 2768-2779.
- [13] Shihabi Z. K., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 107-117.
- [14] Chien R.L., Burgi D.S., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1046-1050.
- [15] Burgi D.S., *Anal. Chem.* 1993, 64, 3726-3729.
- [16] Albert M., Debusschere L., Demesmay C., Rocca J.L., *J. Chromatogr. A* 1997, 757, 291-296.
- [17] Kim B., Chung D.S., *Electrophoresis* 2002, 23, 49-55.
- [18] He Y., Lee H., *Anal. Chem.* 1999, 71, 995-1001.
- [19] Macià A., Borrull F., Aguilar C., Calull M., *Electrophoresis* 2003, 24, 2779-2787.
- [20] Chun M., Kang D., Kim Y., Chung D., *Microchem. J.* 2001, 70, 247-253.
- [21] Lee J., Choi O., Jung H., Kim K., Chung D., *Electrophoresis* 2000, 21, 930-934.

- [22] Chien R.L., Burgi D.S., *J. Chromatogr.* 1991, *559*, 141-152.
- [23] Zhu L., Lee H.K., *Anal Chem*, 2001, *73*, 3065-3072.
- [24] Chien R.L., Burgi D.S., *Anal. Chem.* 1992, *64*, 489A-496A.
- [25] Chien R.L., Burgi D.S., *J. Chromatogr.* 1991, *559*, 153-161.
- [26] Unger M., Stöckigt J., *J. Chromatogr. A* 1997, *791*, 323-331.
- [27] Grard S., Morin P., Ribet J., *Electrophoresis* 2002, *23*, 2399-2407.
- [28] Zhu L., Tu C., Lee H.K., *Anal. Chem.* 2002, *974*, 5820-5825.
- [29] Ahrer W., Scherwenk E., Buchberger W., *J. Chromatogr. A* 2001, *910*, 69-78.
- [30] Sun Y., Yakaba K., Kido H., Nakashima M.N., Nakashima K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, *30*, 1611-1619.

**2.2 Aplicació de diferents tècniques de
preconcentració electroforètiques en
cromatografia capil·lar de microemulsió
electrocinètica**

Com a conseqüència dels bons resultats obtinguts en el treball anterior, on emprant les tècniques de preconcentració electroforètiques LVSEP, LVSEP-ASEI i FAEP en CZE va ser possible determinar un grup de NSAIDs a baixos nivells de concentració, en aquest estudi es va proposar l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica en el mode electroforètic MEEKC. Aquest mode ha sorgit en els darrers anys com un mode complementari a MEKC per la determinació d'analits tant neutres com iònics.

Els fàrmacs analitzats en aquest estudi van ser cinc NSAIDs, l'ibuprofèn, el fenoprofèn, el diclofenac sòdic, el ketoprofèn i el naproxèn. Alguns d'aquests fàrmacs ja s'havien separat prèviament per MEEKC per Altria *et al.* [1-3]. La solució electrolítica emprada en aquests estudis i la generalment emprada per MEEKC degut a la seva elevada estabilitat és l'anomenada microemulsió típica que consisteix en 0.8% p/p n-heptà (oli), 1.6% p/p butanol (cosurfactant), 3.3% p/p SDS (surfactant) i 94.3% p/p 10 mM borat sòdic a pH 9.2 (tampó).

Com a punt de partida del nostre estudi es va emprar aquesta microemulsió típica per determinar els cinc fàrmacs esmentats. En aquestes condicions, els fàrmacs es van separar completament, però el temps d'anàlisi va ser massa llarg com a conseqüència de l'elevada concentració de surfactant. Per tal de disminuir el temps d'anàlisi de la separació i obtenir també una elevada eficàcia de pics, es va investigar la composició de la microemulsió. Els constituents que es van optimitzar van ser l'oli, el tampó, la concentració del surfactant i l'addició de solvents orgànics.

L'ús d'acetat d'etil enlloc de n-heptà com a oli permet disminuir la concentració de surfactant (fins 1.0% p/p) i, en conseqüència, aplicar voltatges més elevats de manera que el temps d'anàlisi disminueix considerablement. En aquestes condicions la microemulsió també és estable degut a la petita tensió superficial de l'acetat d'etil [3]. No obstant, en aquestes condicions, la separació dels cinc fàrmacs no va ser possible i per això es va estudiar afegir un solvent orgànic a la solució electrolítica.

L'addició d'un 6.0% p/p d'acetonitril o de 17% p/p de metanol va permetre la total separació dels analits en 8 i en 14 minuts, respectivament.

Una altra manera de disminuir el temps d'anàlisi en CE és emprant la *short-end-injection*. En aquesta injecció s'introdueixen els analits per l'extrem de detecció del capil·lar, on la longitud efectiva és molt més petita, i s'aplica una diferència de potencial negativa. Malgrat la disminució considerable del temps d'anàlisi, no és possible introduir un gran volum de mostra en el capil·lar tot mantenint-se l'eficàcia de la separació i, en conseqüència, no és una alternativa útil per preconcentrar els analits.

Posteriorment a l'estudi de la separació electroforètica, es va aplicar la tècnica de preconcentració electroforètica anomenada REPSM. Per tal d'obtenir el màxim factor de preconcentració, en aquesta tècnica es va optimitzar el temps d'injecció hidrodinàmica de la mostra i el temps durant el qual s'aplica una diferència de potencial en sentit contrari, per tal d'eliminar la matriu de la mostra, a la que s'aplica durant la separació electroforètica.

La tècnica REPSM es va estudiar emprant tant la microemulsió típica com la que contenia un 17% p/p de metanol, i els resultats es van comparar. Tot i injectar una quantitat de mostra més petita en la segona microemulsió, per tal de mantenir l'eficàcia i la resolució dels fàrmacs, els LODs que es van obtenir en les dues microemulsions van ser similars, entre 5 i 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. Aquest fet és degut a l'elevada eficàcia dels pics que s'obté en la segona microemulsió, ja que aquesta conté una quantitat més petita de SDS i els fàrmacs migren en un temps d'anàlisi més curt. Aquest treball va suposar la primera aplicació en què la tècnica de preconcentració electroforètica REPSM s'aplica en MEEKC.

Com a conseqüència dels bons resultats obtinguts en aquest primer treball i a l'escassa bibliografia que hi ha referent a la millora de la sensibilitat en MEEKC, es va plantejar un segon estudi basat en l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica eliminant la matriu de la mostra mitjançant la

supressió de l'EOF. Tal com s'ha comentat al llarg de la present Tesi Doctoral, utilitzant una tècnica de preconcentració electroforètica suprimint l'EOF presenta l'avantatge que aplicant un sol voltatge negatiu es duu a terme d'una manera consecutiva la preconcentració i la separació electroforètica.

Per suprimir l'EOF es va escollir una microemulsió àcida, utilitzant fosfat sòdic a pH 2.5 com a tampó. Primerament, es van investigar les variables més importants que afecten a la separació, com el tipus d'oli, la concentració de surfactant i l'addició de solvents orgànics. La microemulsió òptima, en eficàcia de separació, eixamplament de pics i temps d'anàlisi va ser la formada per 0.8% p/p n-heptà, 1.6% p/p butanol, 3.3% p/p SDS, 15% p/p d'acetonitril i 74.3% p/p 25 mM fosfat sòdic a pH 2.5.

Posteriorment a l'estudi de la separació electroforètica, es va aplicar la tècnica de preconcentració SRMM. A diferència de la tècnica de preconcentració anterior, REPSM, en SRMM només és necessari optimitzar el temps d'injecció hidrodinàmica de la mostra amb la finalitat d'obtenir el màxim factor de preconcentració.

Quan es va omplir tot el capil·lar de mostra, la sensibilitat va augmentar 40 vegades, en comparació amb la injecció hidrodinàmica normal, i els LODs van ser entre 5 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. Tal com es pot observar, els LODs obtinguts emprant aquesta tècnica de preconcentració són similars amb els obtinguts emprant la tècnica REPSM. La metodologia desenvolupada es va aplicar a l'anàlisi d'aigua de l'aixeta fortificada amb els fàrmacs. Prèviament a l'aplicació d'aquesta tècnica de preconcentració es va utilitzar la tècnica d'SPE *off-line* per netejar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits. Emprant un sorbent de C_{18} i pretractant 1000 mL d'aquesta aigua, els LODs que es van obtenir van ser entre 100-230 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquest treball va suposar la primera aplicació d'una tècnica de preconcentració en MEEKC que s'empra per l'anàlisi d'una mostra d'aigua.

Els dos treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts en aquests estudis. El primer treball (apartat 2.2.1) ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 26 (2005) 970, i el segon treball (apartat 2.2.2) a la revista *Chromatographia* 63 (2006) 149.

Bibliografia

- [1] Miola, M., Snowden, M., Altria, K., J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 785.
- [2] Altria, K., J. Chromatogr. A 844 (1999) 371.
- [3] Mahuzier, P., Clark, B., Crumpton, A., Altria, K., J. Sep. Sci. 24 (2001) 784.

***2.2.1 Separation and on-column preconcentration of
some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by
microemulsion electrokinetic capillary
chromatography using high-speed separations***

**SEPARATION AND ON-COLUMN PRECONCENTRATION OF SOME
NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS BY MICROEMULSION
ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY USING HIGH-SPEED
SEPARATIONS**

Alba Macià, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
C/ Marcel·lí Domingo s/n, 43007 TARRAGONA, Spain

Abstract

Various strategies have been investigated for separating a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) using high-speed separations. The parameters that affect the separation, such as the nature of the oil droplet and the buffer, and the surfactant concentration have been studied. In addition, several organic solvents were used to decrease the retention of the analytes in the oil droplet phase and to improve the resolution of the NSAIDs. The optimum microemulsion background electrolyte (BGE) solution made of 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 6.0% w/w acetonitrile, 1.0% w/w sodium dodecyl sulfate (SDS), and 85.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate at pH 9.2 resolved the drugs within 8 min. The short-end-injection procedure is an alternative for reducing the analysis time. When this procedure was used, the microemulsion BGE solution consisted of 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17.0% w/w methanol, 1.0% w/w SDS, and 74.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2, and the NSAIDs were separated within 3 min. The reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) technique was applied to the on-line concentration of the NSAIDs. In this technique, the sample matrix was pumped out of the capillary using a polarity-switching step. When this technique was applied, the sensitivity was enhanced up to 40-fold and the limits of detection (LODs) were in the low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ levels.

Keywords: Capillary electrophoresis / High-speed separations / Microemulsion electrokinetic capillary chromatography / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs / Short-end-injection

1 INTRODUCTION

In the last few years, microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) has become an important field of research in capillary electrophoresis (CE) and provides a wide range of applications. MEEKC is an electro-separation technique which uses an aqueous buffer containing minute oil droplets, a surfactant and a cosurfactant to form a microemulsion BGE solution [1-7]. MEEKC separates solutes on the basis of their hydrophobicities and electrophoretic mobilities. The uncharged analytes are separated by a partitioning equilibrium according to their degree of hydrophobicity, between the aqueous buffer and the pseudostationary phase constituted of oil droplets stabilized by both a surfactant and a cosurfactant. Alternatively, the ionized analytes have their own electrophoretic mobility, so the separation observed will be the result of both partitioning between the oil droplets and the aqueous phase and their electrophoretic mobility [8].

The most frequently used microemulsion BGE solution uses a water-immiscible solvent (oil), such as *n*-heptane or *n*-octane, and a surfactant, such as sodium dodecyl sulfate (SDS) in an aqueous buffer like borate or phosphate. A cosurfactant, such as butan-1-ol, is often added to improve the microemulsion stability. Under these conditions the microemulsion droplet is negatively charged because of its coating with anionic SDS molecules. The small oil droplets of the microemulsion have a moderate electrophoretic mobility in the direction

opposite to that of the electroosmotic flow (EOF) and they attempt to move towards the anode. However, the EOF is sufficiently strong to eventually sweep the oil droplets through the detector to the cathode. Then, the analytes are separated according to their differential partitioning between the oil droplet phase and the aqueous buffer.

One of the advantages of the technique is that it can be applied to a wider range of analytes than micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) since solutes penetrate the surface of the microemulsion droplet more easily than the surface of a micelle, which is more rigid [9, 10]. However, the typical microemulsion does not usually allow fast separations because of the high concentration of SDS, since it leads to high operating currents. In order to reduce the surfactant concentration, oil droplets with a relatively low surface tension oil, such as ethyl acetate [11-13] and di-*n*-butyl tartrate [12, 14], have been used. Under these conditions a higher voltage can be applied and faster separations can be achieved. The use of zwitterionic buffers, such as tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) and 2-[(2-amino-2-oxoethyl)amino] ethanesulfonic acid (ACES), is another alternative that reduces the level of current and allows higher voltages to be applied so that analysis time can be decreased [4, 6, 12, 13].

Analysis time can also be reduced using the short-end-injection procedure [12, 15-18]. When this injection procedure is applied, the capillary length used for

separation is decreased by injecting the sample from the end of the capillary closest to the detector. Then, a negative voltage is applied so that the analytes migrate backwards to the detector. Mahuzier *et al.* [12] applied this injection procedure in MEEKC to determine parahydroxybenzoate preservatives. Under these conditions, the analytes were separated within 1 min.

MEEKC, like other CE modes, is limited by its low sensitivity. To overcome this problem, an on-column preconcentration technique can be used. So far in the literature, only one study has applied on-column preconcentration techniques in MEEKC. Quirino *et al.* [19] compared several on-column techniques for preconcentrating a group of steroids in MEEKC. The techniques, such as stacking with a reverse-migrating pseudo-stationary phase (SRMP) and sweeping, used phosphate as the aqueous buffer phase to suppress the EOF in acidic conditions. In this report, the reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) has been used to on-line preconcentrate the nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in a high-pH microemulsion solution. These techniques have been previously applied to preconcentrate analytes in MEKC, where the pseudophase consists of micelles [20, 21].

The study described in this paper was performed with five acidic drugs (NSAIDs): ibuprofen, naproxen, fenoprofen, diclofenac sodium, and ketoprofen. Some of these compounds have been individually analyzed using a microemulsion BGE solution [1, 2, 22].

Since at low pH these drugs are water-insoluble compounds, they are more likely a part of the oil droplet than the aqueous buffer phase. Therefore, in a high-pH microemulsion BGE solution, the NSAIDs will be separated on the basis of their degree of hydrophobicity and their electro-phoretic mobility.

The aim of this study is to develop various strategies to separate a group of NSAIDs rapidly and efficiently using high-pH MEEKC. The concentration of the surfactant, the nature of the oil droplet phase, the buffer and the organic solvent in the microemulsion BGE solution are systematically studied. To improve the sensitivity and enhance the detection limits, an on-column preconcentration technique, REPSM, has been used. For the first time, this on-column preconcentration technique has been applied in MEEKC.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals

Standards of the five NSAIDs (ibuprofen, fenoprofen, naproxen, diclofenac sodium, and ketoprofen) and SDS were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide (98%) was from Prolabo (Bois, France); sodium tetraborate anhydrous was from Fluka (Buchs, Switzerland); *n*-octane, methanol and acetonitrile were from SDS (Peypin, France). Ethyl acetate, butan-1-ol, and isopropanol were from Merck (Darmstadt, Germany). Tris was from Aldrich (St. Louis, MO, USA), and *n*-heptane was from Probus (Badalona, Barcelona, Spain). Ultrapure water was

obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). A stock standard solution of $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of each compound was prepared in methanol. The only exception was the solution of diclofenac sodium, which was prepared in methanol:water (80:20 v/v). A mixed standard solution of the five drugs was prepared weekly at a concentration of $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in methanol. The working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with Milli-Q water. All solutions were stored in a dark-glass flask at 4°C .

2.2 Preparation of microemulsion

The microemulsion BGE solution was prepared by weighing in a flask 0.8 g ethyl acetate, 6.6 g butan-1-ol, 6.0 g acetonitrile, 1.0 g SDS, and 85.6 g 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. The final solution was sonicated for 20 min to aid dissolution and then an optically transparent microemulsion was formed. The microemulsion was filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) to remove particulate matter. The other microemulsions used during the optimization studies were prepared in a similar manner. When organic solvents were used, these were added after the cosurfactant butan-1-ol.

2.3 Capillary electrophoresis

CE analyses were performed on a Hewlett-Packard 3^{D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) system equipped with a UV diode-array detector operating at 214 nm. The capillaries, from Beckman (Palo

Alto, CA, USA), were uncoated fused-silica capillaries with a total length of 45 cm (36.5 cm effective length) and $75 \mu\text{m}$ ID. The capillary temperature was set at 20°C . In all cases, hydrodynamic injection was used at 50 mbar for 5 s at the capillary inlet to optimize the separation. The separation voltages applied were positives. To speed up the analyses, the short-end-injection procedure was used. In this case, the analytes were loaded at the anodic end of the capillary at -10 mbar for 2 s and the separation was carried out with a voltage of -20 KV. Each new capillary was conditioned for 10 min at 50°C with 1.0 N NaOH before it was first used. The new capillaries were equilibrated by rinsing with 0.1 N NaOH for 8 min, then with Milli-Q water for 10 min, and finally with the microemulsion BGE solution for 15 min. Between analyses, the capillary was rinsed for 3 min with the microemulsion BGE solution. When not in use, the capillaries were flushed with 0.1 N NaOH for 15 min, rinsed with Milli-Q water for 20 min and flushed in air for 30 min and finally stored.

2.4 Reversed electrode polarity stacking mode

The analytes were on-column preconcentrated using REPSM. The analytes were dissolved in Milli-Q water. When *n*-heptane was used as the oil droplet, a very large volume of sample was loaded into the capillary by hydrodynamic injection (50 mbar for 200 s); after sample injection, the sample vial was changed for the microemulsion BGE solution vial and a

voltage with a reverse polarity (–5 KV) was applied to cause the preconcentration of the oil droplets while the sample matrix was pumped out of the capillary by the EOF. When the current reached approximately 95% of the original value (when capillary is full of microemulsion BGE solution), the voltage applied was stopped. In this step, careful monitoring of the current was essential to avoid losing the preconcentrated NSAIDs into the microemulsion BGE solution vial. Afterwards, the polarity of the electrodes was switched back to normal position, and MEEKC analysis was started to +10 KV. Alternatively, when ethyl acetate was used as the oil droplet, the analytes were loaded into the capillary at a pressure of 50 mbar for 100 s. After the sample matrix had been removed of the capillary by applying a negative voltage of 5 KV, the separation was carried out with a voltage of +20 KV.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 High-pH microemulsion medium

Initial experiments were carried out with a typical microemulsion BGE solution, using both *n*-octane and *n*-heptane as the oil droplet, since some of the studied compounds had already been analyzed successfully with these solutions [1, 2, 22]. Thus initially, 0.8% w/w *n*-heptane was used as the oil droplet phase, 6.6% w/w butan-1-ol was added as cosurfactant, 3.3% w/w SDS was added as surfactant to stabilize the micro-emulsion droplets, and 89.3% w/w 10 mM sodium

tetraborate, pH 9.2, was used as the aqueous buffer medium. The effect of such parameters as the oil droplet (*n*-octane, *n*-heptane, or ethyl acetate), the SDS concentration, the buffer (borate or Tris), the organic solvents, and the capillary temperature were systematically investigated. First, we studied the effect of the capillary temperature in the range between 40 and 20°C. A temperature of 20°C was adopted as it gave better resolution than 40°C, but the excessive current generated meant that the voltages applied had to be reduced and the analysis time extended. The effect of capillary temperature is due to a decrease in EOF as a result of the increase in viscosity [4]. The solubility of the analytes therefore decreases in the aqueous phase at lower temperatures because their partitioning into the oil droplet phase increases.

3.1.1 Oil droplet phase

In general, *n*-octane and *n*-heptane are used to generate the oil droplet phase in microemulsion BGE solution [3, 4, 6]. These oil droplets have been shown to give similar selectivity and migration times for the separation of a range of neutral compounds [23]. In order to compare the selectivity and the migration times for the separation of the five NSAIDs obtained when *n*-heptane was used, *n*-octane was also tested. Figure 1 shows the electropherograms obtained when *n*-octane (A) and *n*-heptane (B) were used as the oil droplet phase. The NSAIDs were separated in order of increasing hydrophobicity. Thus, ketoprofen is the least hydrophobic compound whereas

diclofenac sodium is the most hydrophobic. The separations using both *n*-heptane and *n*-octane as the oil droplet phase were similar due to the fact that they are homologues. The migration

times using *n*-octane as the oil droplet were slightly longer than the ones using *n*-heptane because of the higher carbon content in *n*-octane [23, 24].

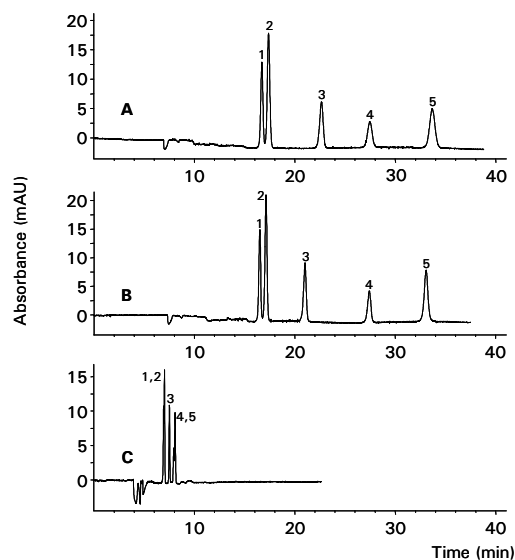


Figure 1. Electropherograms of a standard mixture of the NSAIDs in a concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dissolved in Milli-Q water by MEEKC. Hydrodynamic sample injection for 5 s at 50 mbar. Separations conditions: (A) 0.8% w/w *n*-octane, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. Voltage applied, +10 KV. (B) 0.8% w/w *n*-heptane, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. Voltage applied, +10 KV. (C) 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. Voltage applied, +15 KV. Peak designation: (1) ketoprofen; (2) naproxen; (3) fenoprofen; (4) ibuprofen; (5) diclofenac sodium. For experimental conditions, see text.

Under the conditions studied, the long migration times were attributed to the preferential partitioning of the analytes into the oil droplet as opposed to the surrounding aqueous microemulsion phase. In addition, lower voltages must be applied due to the high concentration of SDS (3.3%) used to form a

stable microemulsion BGE solution. A reduction in the concentration of SDS would have decreased the analysis time but was not considered, because the surfactant concentration used is generally 3% or greater so that the stability of the microemulsion BGE solution can be maintained [13]. In

conclusion, the commonly used microemulsion BGE does not allow fast separations because of the high concentration of SDS. One way of decreasing the migration times in MEEKC is to use an oil with a lower surface tension such as di-*n*-butyl tartrate [12, 14] or ethyl acetate [9, 12, 13]. Consequently separations can be faster, because a lower concentration of surfactant can be used which makes it possible to apply higher voltages across the capillary without generating excessive current levels. Ethyl acetate was chosen as the oil droplet phase for this study. In the literature, ethyl acetate percentages between 0.5% and 3.2% have been used to form the microemulsion BGE solution [11-13]. The changes in migration times are only minor when the amount of the oil droplet is changed [9, 10]. In this study, 0.8% was chosen as the ethyl acetate percentage, so the percentage is the same as that used for the other oils tested. It has been reported that when oils with a lower surface tension are used the SDS concentration can decrease from 3.3% to 0.6%, since the amount of surfactant needed to form oil droplets is relative to the surface tension of the oil [12, 13]. In this study, microemulsions with an SDS concentration of 1.0% w/w were used. The composition of the microemulsion BGE was 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 1.0% w/w SDS, and 91.6% w/w 10 mM borate, pH 9.2. Figure 1C shows the electropherogram of the five drugs carried out with this microemulsion BGE at a voltage of +15KV. Even though the migration times were considerably shorter

(reduced from 35 to 8 min) the separation was incomplete and some drugs coeluted (for example, ketoprofen-naproxen and ibuprofen-diclofenac sodium). It should be pointed out that the decrease in the SDS concentration meant that the current in the system decreased from 75 μ A (when *n*-heptane and *n*-octane were used) to 47 μ A (when ethyl acetate was used).

3.1.2 Organic solvents

The poor separation shown in Fig. 1C suggested that the analytes were strongly associated with the oil droplets and migrated toward the detector at almost the same velocity as the pseudostationary phase. In an attempt to improve the separation efficiency and enhance the selectivity, the effect of adding an organic solvent was investigated. The addition of organic solvents to the microemulsion BGE solution diminishes the interactions between analytes and the pseudostationary phase, and increases their solubility in the aqueous phase [4, 11, 25, 26].

The organic solvent can only be added to the microemulsion BGE solution in quantities that keep the solution stable. When these quantities are exceeded, the microemulsion BGE solution disintegrates into a cloudy two-phase system, which cannot be used for separation. This is not the case, however, with isopropanol because it can act in a similar way to a cosurfactant and help to stabilize the system. Consequently, it can be added at much higher concentrations (greater

than 50% w/w) without disturbing the microemulsion BGE solution [4]. Nevertheless, the amount of acetonitrile and methanol that can be added to the microemulsion BGE solution depends on the oil droplet phase used, and the capillary length and inner diameter [4,

3.1.2.1 Methanol

Firstly, we studied how the percentage of methanol affected the resolution of the analytes. The concentration of methanol ranged from 0 to 20% w/w. In this case, the microemulsion BGE solutions were prepared by adding various volumes of methanol to the microemulsion BGE solution so that any increase in the content of organic solvent meant a reduction in the amount of sodium tetraborate buffer. Figure 2 shows the effect of adding different percentages of methanol. As the concentration of methanol in the

11, 27]. We studied how the nature and the percentage of some organic solvents affected the separation of the analytes. The analysis time was an important parameter to take into account.

microemulsion BGE solution increases, the solubility of the analytes in the aqueous phase increases and their affinity for the oil droplet phase decreases. As can be seen in Fig. 2, the migration order of the NSAIDs studied is apparently affected by adding methanol to the microemulsion BGE solution. As the methanol concentration increases, the polarity of the microemulsion BGE solution decreases and the solubilities of the hydrophobic compounds in the aqueous phase increase. Consequently, their effective mobilities also change and a reversed migration order between diclofenac sodium-ibuprofen is observed [11].

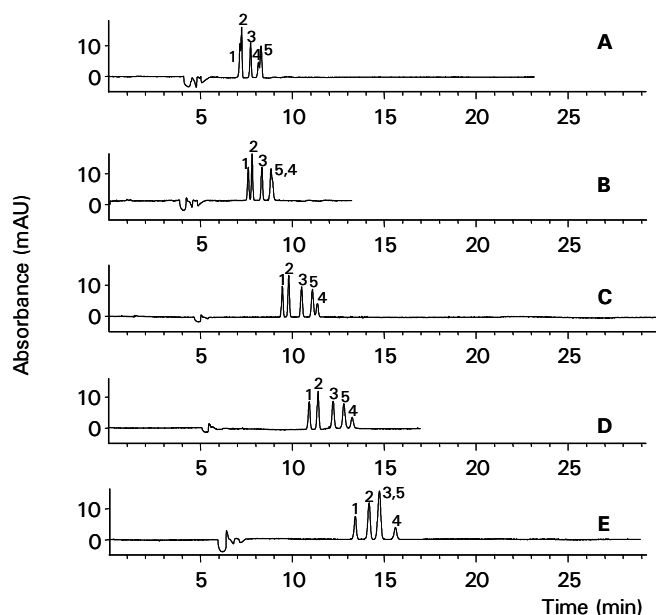


Figure 2. The electropherogram of the five NSAIDs with different percentages of methanol in the microemulsion solution. Separation conditions: 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, methanol, 1.0% w/w SDS, and 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2; voltage applied, +20 KV. Methanol percentages: (A) 0%; (B) 7.0%; (C) 15.0%; (D) 17.0% and (E) 20.0%. For experimental conditions, see text; and for peak designation, see Fig. 1.

In addition, the migration times increased with higher percentages of methanol. Although the solubility of the analytes in the aqueous phase was increased, shorter migration times should be obtained. These were increased because the EOF was slow due to the reduction of the zeta potential. This is explained due to changes in the dielectric properties of the electric double layer and in the charge generation on the fused-silica surface [28]. Figure 2D shows a complete separation of the analytes, corresponding to the addition of 17%. Although lower percentages reduce the analysis time, there is no resolution between the last peaks, whereas at

percentages higher than 17% the resolution between fenoprofen-diclofenac sodium is lost. Changes in the methanol percentage alter the partition coefficients by competitive equilibria between methanol molecules and the most hydrophobic analytes in the oil droplet phase. Therefore, adding 17% methanol to the microemulsion BGE solution was the optimum value for obtaining a good separation.

3.1.2.2 Isopropanol

Afterwards, we studied how the percentage of isopropanol added to the microemulsion BGE solution affected the resolution of the analytes. The

concentration of isopropanol ranged from 0 to 10% w/w. Isopropanol percentages higher than 10% were not studied because the separation gradually improved as the content of isopropanol increased from 0 to 6.5% w/w. Figure 3B shows a complete separation of the analytes for an addition of 6.5% w/w of isopropanol. The migration order of the NSAIDs studied was also affected by adding isopropanol to the microemulsion BGE solution. As can be seen in Figs. 3A and B, methanol and isopropanol have a similar effect on the migration times as they both slow down the EOF by changing the viscosity and the permittivity of the microemulsion BGE solution. The oil droplet can then migrate more effectively against the lower EOF, which leads to a longer migration time. In addition, the current in the system decreases from 48 μA (0%) to 32.5 μA (6.5%).

3.1.2.3 Acetonitrile

Finally, the effect of adding acetonitrile to the microemulsion BGE solution was also studied. The concentration of acetonitrile ranged from 0 to 15% w/w. The separation gradually improved as the content of acetonitrile increased from 0 to 6% w/w. Figure 3C shows a complete separation of the analytes in 8 min when 6% w/w acetonitrile was added. The short migration times obtained when acetonitrile was added can be explained by the fact that the EOF velocity was faster (because of high permittivity and low viscosity) than that of methanol and isopropanol, due to the changes in the dielectric properties of the electric double layer

[28, 29]. The migration order of the NSAIDs studied was also affected by adding acetonitrile to the microemulsion BGE solution.

It can be concluded, therefore, that the compounds studied can be resolved using methanol, isopropanol or acetonitrile. Small amounts of these organic solvents improve the separation efficiency, increase the solubility of hydrophobic compounds in the aqueous phase, modify the selectivity and change the elution order. Moreover, when organic solvents are added to the microemulsion BGE solution, ibuprofen, not diclofenac sodium, is the most hydrophobic compound. The electropherograms in Fig. 3 show that the microemulsion BGE solution formed with 6% of acetonitrile provides the fastest separation.

3.1.3 The buffer

MEEKC has generally been performed using borate buffer [23, 30-34]. In the literature, however, zwitterionic buffers, such as Tris [12] and ACES [13], have also been used to reduce the amount of current produced which makes it possible to apply higher voltages and achieve faster separations [4, 6, 12, 13].

In a subsequent test, Tris buffer was used instead of tetraborate sodium buffer. The microemulsion BGE composition was 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 1.0% w/w SDS, and 91.6% w/w 100 mM Tris, pH 8.1. The five drugs were separated by applying a voltage of +15KV. Under these conditions, the

separation was incomplete and some drugs coeluted (for example, ketoprofen-naproxen and ibuprofen-diclofenac sodium). Nevertheless, when this micro-emulsion was used, the current decreased slightly from 48 μA (tetraborate sodium) to 30 μA (Tris). As previously reported, Tris microemulsion BGE solution has the advantage that the voltage can be increased because the operating current is lower.

Organic solvents were also added to the Tris microemulsion solution to improve the resolution and reduce the retention of the analytes in the oil droplet phase. Methanol, isopropanol, and acetonitrile were also used to enhance the selectivity of the method. We also studied how the percentage of these organic solvents added to the microemulsion BGE solution affected the separation of the analytes.

We studied the effect of adding methanol percentages between 0 and 12% to the microemulsion BGE solution since this disintegrated into a cloudy two-phase system when higher percentages of methanol were added. These results allowed us to conclude that the amount of the organic solvent that can be added to the microemulsion BGE solution also depends on the buffer. Figure 4A shows a complete separation of the analytes

corresponding to the addition of 10% w/w of methanol. Afterwards, we studied the addition of 0-10% w/w of isopropanol. Figure 4B shows a complete separation of the analytes corresponding to the addition of 7% w/w isopropanol. Finally, we studied the addition of 0-11% w/w of acetonitrile. Figure 4C shows a separation of the analytes corresponding to the addition of 7% w/w acetonitrile.

The electropherograms obtained when borate and Tris were used as buffers with their corresponding organic solvents additions were compared (see Figs. 3 and 4). The two buffers gave the same selectivity but, in contrast, the migration times with Tris were shorter for all the NSAIDs, except when acetonitrile was added, for which the migration times were similar. In addition, the fast separations with Tris may also be due to the fast EOF as the ionic strength of Tris is lower than that of borate. The separations with Tris buffer were completed in 11 min but the resolution between some NSAIDs was slightly reduced. In conclusion, it should be pointed out that the NSAIDs were baseline-separated when 17% w/w methanol (Fig. 3A) and 6% w/w aceto-nitrile (Fig. 3C) were added to the micro-emulsion BGE solution with tetraborate sodium as the buffer.

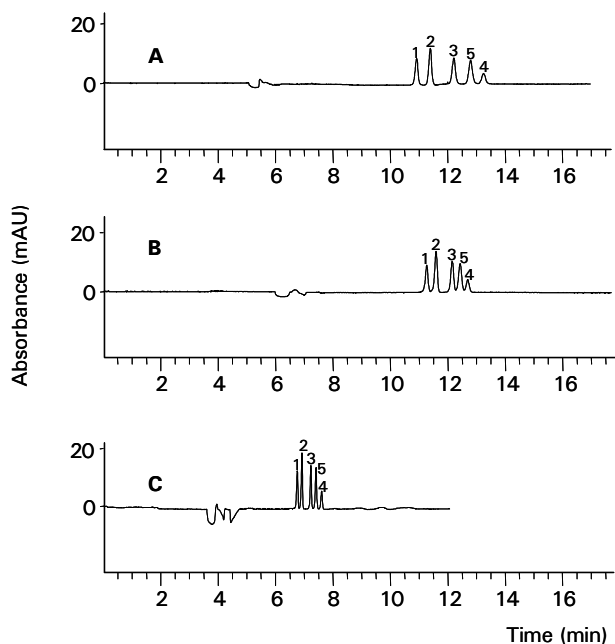


Figure 3. Electropherogram of the five NSAIDs obtained in optimum conditions. Separation conditions: 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, organic solvent, 1.0% w/w SDS, and 10 mM borate, pH 9.2. Organic solvent: (A) 17.0% w/w methanol; voltage applied, +20 KV; (B) 6.5% w/w isopropanol; voltage applied, +15 KV; 6.0% w/w acetonitrile; voltage applied, +20 KV. For peak designation, see Fig. 1.

The NSAIDs have also been analyzed by other authors using both capillary zone electrophoresis (CZE) and MEKC. The five acidic drugs studied here could not be baseline-separated using sodium tetraborate aqueous BGE in CZE. The separation was incomplete and some drugs coeluted, since they have very similar electrophoretic mobilities in aqueous media [35, 36]. Nevertheless, the drugs were baseline-separated in the mixed aqueous-organic solvent medium in 22 min [35]. When a completely nonaqueous medium was used to analyze these analytes, they were resolved within 15 min [36-38].

When the MEKC mode was used, the separations were obtained within 7 min when only ibuprofen was analyzed [39], and within 18 min when naproxen, ibuprofen and ketoprofen were analyzed with an addition of 10% w/w acetonitrile to the micellar BGE medium [40]. The analysis times obtained when the NSAID compounds were analyzed by MEKC and MEEKC were similar, but the number of NSAIDs analyzed in MEEKC is higher than in MEKC. To extend the range of CE applicability to the analysis of NSAIDs, this paper shows that these drugs can be resolved in fast separations (analysis

time between 8 to 14 min) using microemul-sion BGE solution.

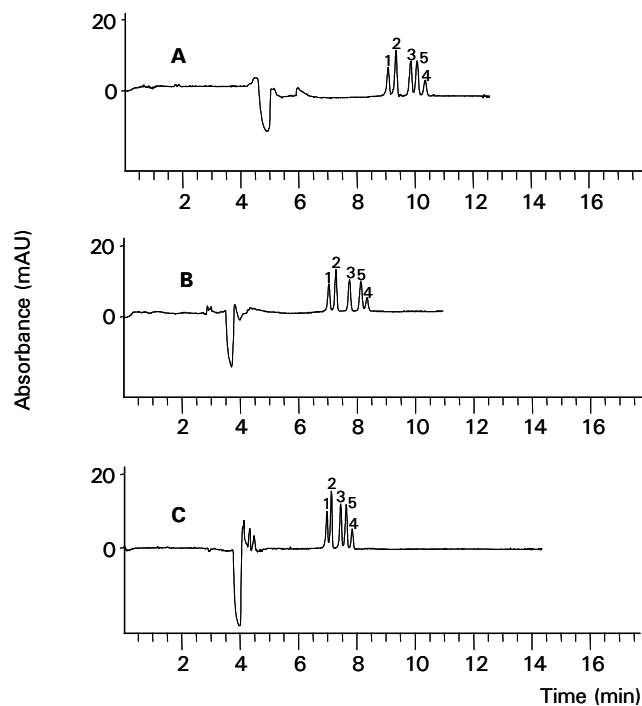


Figure 4. Electropherogram of the five NSAIDs obtained in optimum conditions. Separation conditions: 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, organic solvent, 1.0% w/w SDS, and 100 mM Tris, pH 8.1. Organic solvent: (A) 10.0% w/w methanol; voltage applied, +25 KV; (B) 7.0% w/w isopropanol; voltage applied, +20 KV; (C) 7.0% w/w acetonitrile; voltage applied, +20 KV. For experimental conditions, see text; and for peak designation, see Fig. 1.

3.2 Short-end-injection

Speed is often an important factor in research so reducing analysis time is a matter of considerable interest. In this respect, short-end-injection is an attractive alternative. In this case, injection was from the outlet side of the capillary and the analytes moved through the short end (8.5 cm) to the detector with

a strong EOF. With this type of injection, the effective capillary length was reduced from 36.5 cm to 8.5 cm, and the polarity of the applied voltage was reversed.

The short-end-injection procedure was applied first to the microemulsion BGE formed by 6% w/w acetonitrile. As a consequence of both the short analysis

time and the short capillary length, the analytes were not resolved. Only three peaks were obtained. Subsequently, short-end-injection was also applied to the microemulsion formed by 17% w/w methanol and the peak resolution was greater than 6% w/w acetonitrile, so all the NSAIDs could be separated.

So, 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17.0% w/w methanol, 1.0% w/w SDS, and 74.6% (w/w) 10 mM tetraborate sodium, pH 9.2, was used for the high-speed separations. Figure 5 shows the electropherogram obtained when the analytes were loaded into the capillary by the short-end-injection procedure. The electropherograms obtained using identical MEEKC conditions for the standard injection (Fig. 3A) and the

short-end-injection (Fig. 5) show that the analysis time is considerably shorter, as expected. As can be seen, the analysis time was reduced fourfold, from 13 minutes to 3. Although the response was faster, the sensitivity was low when short-end-injection was used because the amount of sample injected at the outlet end of the capillary, 3.4 nl (percentage of capillary filled, 0.17%), was smaller than the sample volume injected in standard injection, 43 nl (percentage of capillary filled, 2.2%). When a higher sample volume was injected into the capillary, the sample length was also higher, and the analytes were not separated when they arrived at the detector window because of the short capillary length (8.5 cm).

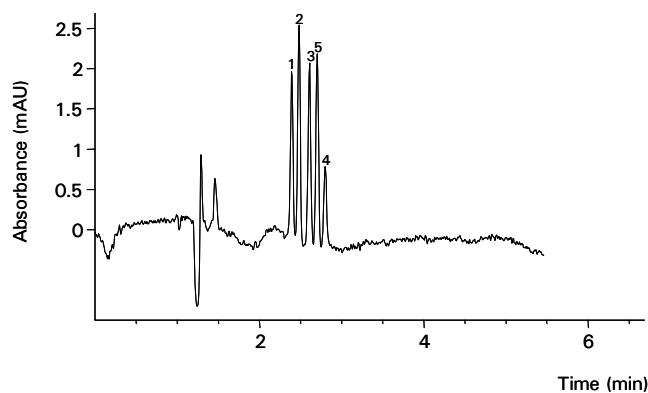


Figure 5. The electropherogram of a standard mixture of the NSAIDs in a concentration of $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obtained when the short-end injection procedure was used. Separation conditions: 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17.0% w/w methanol, 1.0% w/w SDS, and 74.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2; hydrodynamic sample injection for 2 s at -10 mbar ; voltage applied, -20 KV . For experimental conditions, see text; and for peak designation, see Fig. 1.

3.3 Reversed electrode polarity stacking mode

REPSM is an on-column sample preconcentration technique, used in MEKC, in which the sample matrix is pumped out of the capillary using the polarity-switching step [20, 21]. The on-column stacking of the NSAIDs was carried out with the typical microemulsion BGE solution (using *n*-heptane) and with ethyl acetate as the oil droplet phase so that the results could be compared.

When the typical microemulsion BGE solution was used (0.8% w/w *n*-heptane, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2), the capillary was filled beyond the detector window (86%) by injecting the sample solution hydrodynamically and applying a pressure of 50 mbar for 200 s. The analytes were dissolved in Milli-Q water. A voltage (-5 KV) is then applied at negative polarity. This is to electrokinetically inject oil droplets from the inlet vial and to remove the sample matrix. Oil droplets from the cathodic vial stacked the analytes. The current was monitored carefully, and once the measured current reached 95% of the original value, the polarity was switched from negative to positive. At positive polarity (+10 KV), the stacked analytes were separated by MEEKC. Figure 6A shows an electropherogram of the five stacked NSAIDs with this on-column sample preconcentration technique at a concentration of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The sensitivity was enhanced 40-fold in comparison with normal hydrodynamic injection.

Table 1 shows the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs^a) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs^b), and the detection limits (LODs) for standards solutions. Linear responses were excellent in the 10-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.9997 for all compounds. In terms of reproducibility (between days), the analysis of four replicates at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ showed that the RSDs of the corrected peak area and the migration times for REPSM-MEEKC were below 6% and 7%, respectively. The LODs calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 5-20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range.

The analytes were also preconcentrated using ethyl acetate as the oil droplet phase so that the sensitivities obtained could be compared. When the microemulsion consisting of 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 6.0% w/w acetonitrile, 1.0% w/w SDS and 85.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2, was used to preconcentrate the NSAIDs, the resolution of the separation was not preserved. In order to preconcentrate them, the analytes were injected into the capillary for longer times than the normal hydrodynamic injection but the resolution was lost. The sample diluents tested were both Milli-Q water and diluted microemulsion BGE (1/10). The preconcentration technique was applied when another microemulsion BGE solution obtained in a short analysis time was used. Thus, the fast microemulsion BGE solution consisted

of 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17.0% w/w methanol, 1.0% w/w SDS and 74.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. When this microemulsion BGE solution was used, the capillary could only be filled up to the middle (43%) by injecting the sample solution hydrodynamically and applying a pressure of 50 mbar for 100 s. The analytes were also dissolved in

Milli-Q water. In this case, the sample injected time is limited by the broadening of the peaks and consequently the peaks co-eluted and negatively affected the separation efficiency. Therefore, when the sample injected volume was reduced from 200 s to 100 s, the separation efficiency was preserved.

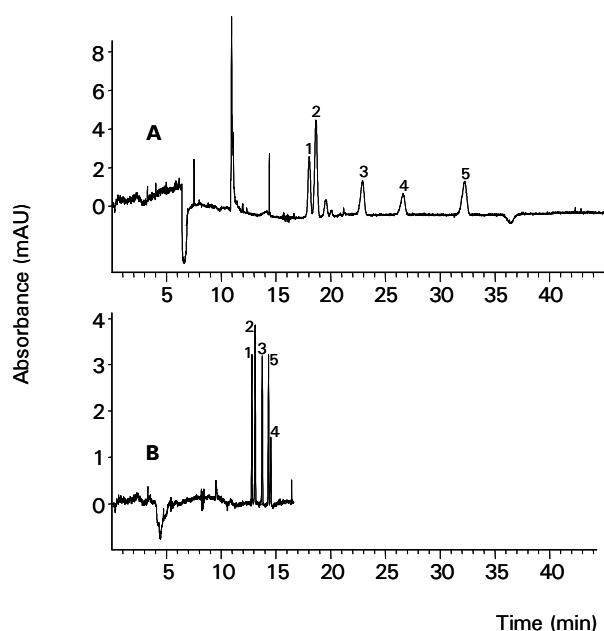


Figure 6. Electropherogram of a standard mixture of the NSAIDs at a concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in Milli-Q water applying a preconcentration technique REPSM. Separation conditions: (A) 0.8% w/w *n*-heptane, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2; hydrodynamic sample injection for 200 s at 50 mbar; voltage applied, +10 KV; (B) 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17.0% w/w methanol, 1.0% w/w SDS, and 74.6% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2; hydrodynamic sample injection for 100 s at 50 mbar; voltage applied, +20 KV. For experimental conditions, see text; and for peak designation, see Fig. 1.

A voltage (−5 KV) was also then applied at negative polarity. When the sample matrix was removed from the

capillary, a positive polarity (+20 KV) was applied and the stacked analytes were separated by MEEKC. Figure 6B

shows an electro-pherogram of the five stacked NSAIDs with this on-column sample preconcentration technique at a concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The sensitivity was enhanced by 20 times that of the normal hydrodynamic injection. The half-preconcentration factor obtained in this case was because the capillary was only filled up to the middle in order to preserve the separation.

Table 2 shows the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs^a) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs^b), and the LODs for standard solutions. Linear responses were excellent in the 10-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.9997 for all compounds. In terms of reproducibility (between days), the RSDs of the corrected peak area and

the migration times for REPSM-MEEKC were below 5% and 6%, respectively, when four replicates were analysed at $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The LODs calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 6-15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range. Although the amount of sample injected into the capillary was smaller when ethyl acetate was used than when *n*-heptane was used (see Table 1 and 2), the LODs obtained were similar. This was because the peaks were narrower which compensated for the smaller preconcentration factor obtained. The LODs obtained in this study were similar to those obtained by other authors who also analyzed NSAIDs by CZE [35, 38] and HPLC [41, 42] in standard solutions. When these drugs were analyzed by CZE, an on-column preconcentration technique [35] or mass spectrometry detection [38] was used to obtain LODs at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Table 1. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, sensitivity enhancement, and LODs for standard samples by REPSM-MEEKC-DAD using *n*-heptane as the oil droplet

Compound	Linearity ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Calibration curves	%RSD ^a ($n=4$) (peak area)	%RSD ^b ($n=4$) (migration times)	Enhancement sensitivity	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Ketoprofen	10-1000	$y = 0.645x + 0.584$	6	5	43	5
Naproxen	10-1000	$y = 0.461x + 0.579$	2	5	40	5
Fenoprofen	20-1000	$y = 0.381x + 0.123$	2	6	39	15
Ibuprofen	25-1000	$y = 0.236x + 0.339$	2	6	38	20
Diclofenac sodium	20-1000	$y = 0.176x - 2.107$	4	7	39	15

Separation conditions: 0.8% w/w *n*-heptane, 6.6% w/w butan-1-ol, 3.3% w/w SDS, and 89.3% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. For conditions, see text

^a Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

^b Relative standard deviation (RSD) of the migrations times ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Table 2. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, sensitivity enhancement, and LODs for standard samples by REPSM-MEEKC-DAD using ethyl acetate as the oil droplet

Compound	Linearity ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Calibration curves	%RSD ^{a)} ($n=4$) (peak area)	%RSD ^{b)} ($n=4$) (migration times)	Enhancement sensitivity	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Ketoprofen	10-1000	$y = 0.124x + 0.408$	5	5	20	7
Naproxen	10-1000	$y = 0.150x + 0.194$	2	6	20	7
Fenoprofen	10-1000	$y = 0.132x + 0.028$	3	5	20	7
Ibuprofen	25-1000	$y = 0.062x + 0.259$	2	5	20	15
Diclofenac sodium	10-1000	$y = 0.137x + 0.109$	4	5	20	9

Separation conditions: 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 17% w/w methanol, 1.0% w/w SDS, and 74.6% w/w of 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2. For conditions, see text

^{a)} Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

^{b)} Relative standard deviation (RSD) of the migrations times ($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

4 CONCLUDING REMARKS

We have described several high-speed separations, using ethyl acetate as the oil droplet, and different organic solvents and buffers, to analyze five NSAIDs in MEEKC. When the microemulsion BGE solution consisted of 0.8% w/w ethyl acetate, 6.6% w/w butan-1-ol, 6.0% w/w acetonitrile, 1.0% w/w SDS, and 85.6% w/w 10 mM sodium tetraborate, pH 9.2, the five NSAIDs were resolved within 8 min. We have also shown that the short-end-injection procedure can reduce the analysis time to only 3 min with an effective length of 8.5 cm to resolve the drugs. Sensitivity increased at low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ when the on-column preconcentration technique REPSM was used. The preconcentration factor obtained was up to 40 times greater than with hydrodynamic normal injection. These results are similar to those obtained with CZE and HPLC in standard solutions. Thus, MEEKC is an attractive alternative for analyzing these drugs.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) and (PPQ2002-01276).

5 REFERENCES

- [1] Miola, M., Snowden, M., Altria, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, **18**, 785-797.
- [2] Altria, K., *J. Chromatogr. A* 1999, **844**, 371-386.
- [3] Altria, K., *J. Chromatogr. A* 2000, **892**, 171-186.
- [4] Altria, K., Clark, B., Mahuzier, P., *Chromatographia* 2000, **52**, 758-768.
- [5] Hansen, S., Gabel-Jensen, C., El-Sherbiny, D., Pedersen-Bjergaard, S., *Trends Anal. Chem.* 2001, **20**, 614-619.
- [6] Altria, K., Mahuzier, P., Clark, B., *Electrophoresis* 2003, **24**, 315-324.
- [7] Hansen, S., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3900-3907.

- [8] Strasters, J., Khaledi, M., *Anal. Chem.* 1991, **63**, 2503-2508.
- [9] Pedersen-Bjergaard, S., Gabel-Jensen, C., Hansen, S., *J. Chromatogr. A* 2000, **897**, 375-381.
- [10] Gabel-Jensen, C., Hansen, S., Pedersen-Bjergaard, S., *Electrophoresis* 2001, **22**, 1330-1336.
- [11] Li, G., Chen, X., Liu, M., Hu, Z., *Analyst* 1998, **123**, 1501-1505.
- [12] Mahuzier, P., Clark, B., Bryant, S., Altria, K., *Electrophoresis* 2001, **22**, 3819-3823.
- [13] Pascoe, R., Foley, J., *Analyst* 2002, **127**, 710-714.
- [14] Aiken, J., Huie, C., *Chromatographia* 1993, **35**, 448-450.
- [15] Altria, K., Kelly, M., Clark, B., *Chromatographia* 1996, **43**, 153-158.
- [16] Euerby, M., Johnson, C., Cikalo, M., Bartle, K., *Chromatographia* 1998, **47**, 135-140.
- [17] Melin, V., Perret, D., *Electrophoresis* 2004, **25**, 1503-1510.
- [18] Zinellu, A., Carru, C., Usai, M., Sotgia, S., Deiana, L., *Electrophoresis* 2004, **25**, 1096-1101.
- [19] Quirino, J., Terabe, S., Otsuka, K., Vincent, J., Vigh, G., *J. Chromatogr. A* 1999, **838**, 3-10.
- [20] Quirino, J., Terabe, S., *J. Cap. Elec.* 1997, **4**, 223-245.
- [21] Kim, J., Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, **30**, 1625-1643.
- [22] Mahuzier, P., Clark, B., Crumpton, A., Altria, K., *J. Sep. Sci.* 2001, **24**, 784-788.
- [23] Fu, X., Lu, J., Zhu, A., *J. Chromatogr. A* 1996, **735**, 353-356.
- [24] Fu, X., Lu, J., Zhu, A., Fogarty, B., Dempsey, E., Regan, F., *J. Chromatogr. A* 2003, **1014**, 129-139.
- [25] Rodríguez, M., Sánchez, M., González, V., García, F., *Anal. Chim. Acta* 1994, **298**, 423-430.
- [26] Frías, S., Sánchez, M., Rodríguez, M., *Anal. Chim. Acta* 2004, **503**, 271-278.
- [27] Pedersen-Bjergaard, S., Naess, O., Moestue, S., Rasmussen, K., *J. Chromatogr. A* 2000, **876**, 201-211.
- [28] Schwer, C., Kenndler, E., *Anal. Chem.* 1991, **63**, 1801-1807.
- [29] Takeda, S., Wakida, S., Yamane, M., Kawahara, A., Higashi, K., *Anal. Chem.* 1993, **65**, 2489-2492.
- [30] Perrett, D., Melin, V., Jennings, M., Alfazema, L., *Chromatographia* 2000, **52**, S14-S18.
- [31] Altria, K., *Chromatographia* 1999, **49**, 457-464.
- [32] Cahours, X., Cherkaoui, S., Rozing, G., Veuthey, J., *Electrophoresis* 2002, **23**, 2320-2326.
- [33] Bo, T., Yang, X., Li, K., Xu, L., Liu, H., *J. Sep. Sci.* 2003, **26**, 133-136.
- [34] Klampfl, C., Leitner, T., *J. Sep. Sci.* 2003, **26**, 1259-1262.
- [35] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2003, **24**, 2779-2787.
- [36] Fillet, M., Bechet, I., Piette, V., Crommen, J., *Electrophoresis* 1999, **20**, 1907-1915.
- [37] Cherkaoui, S., Veuthey, J., *J. Chromatogr. A* 2000, **874**, 121-129.

- [38] Ahrer, W., Buchberger, W., *Monatsh. Chem.* 2001, *132*, 329-337.
- [39] Donato, M., Baeyens, W., Van den Bossche, W., Sandra, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1994, *12*, 21-26.
- [40] Donato, M., Van den Eeckhout, E., Van den Bossche, W., Sandra, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, *11*, 197-201.
- [41] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 2001, *910*, 69-78.
- [42] Sun, Y., Takaba, K., Kido, H., Nakashima, M., Nakashima, K., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, *30*, 1611-1619.

2.2.2 Analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water samples using microemulsion electrokinetic capillary chromatography under pH-suppressed electroosmotic flow with an on-column preconcentration technique

**ANALYSIS OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN WATER
SAMPLES USING MICROEMULSION ELECTROKINETIC CAPILLARY
CHROMATOGRAPHY UNDER pH-SUPPRESSED ELECTROOSMOTIC FLOW
WITH AN ON-COLUMN PRECONCENTRATION TECHNIQUE**

Alba Macià, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
C/ Marcel·lí Domingo s/n, 43007 TARRAGONA, Spain

Abstract

Microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) in a suppressed electroosmotic flow (EOF) strategy was investigated for analysing a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in water samples. The EOF was effectively suppressed with an acidic buffer as the aqueous phase. Four water immiscible solvents, oils (*n*-heptane, *n*-octane, ethyl acetate and di-*n*-butyl tartrate) and three organic solvents (methanol, 2-propanol and acetonitrile) were tested to optimise the pseudostationary phase and to obtain efficient separations. The optimum microemulsion background electrolyte (BGE) solution consisted of 0.8% (*w/w*) *n*-heptane, 6.6% (*w/w*) butan-1-ol, 15.0% (*w/w*) acetonitrile, 3.3% (*w/w*) sodium dodecyl sulfate (SDS), and 74.3% (*w/w*) of 25 mM sodium phosphate at pH 2.5. Stacking with reverse migrating pseudostationary phase (SRMP) was applied to enhance the concentration sensitivity of the NSAIDs. When this preconcentration technique was used, the sample stacking and the separation processes took place successively with the same voltage without an intermediate polarity switching step. Detection limits (LODs) in the order of 5-15 $\mu\text{g L}^{-1}$ for the NSAIDs were obtained using SRMP for standard solutions. The developed method was validated for the analysis of NSAIDs in tap water samples by combining an off-line solid-phase extraction (SPE) step and the on-column preconcentration technique SRMP. The LODs were in the 100-230 ng L^{-1} range.

Keywords: Capillary electrophoresis / Microemulsion electrokinetic capillary chromatography / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs / On-column preconcentration techniques / Water samples

1 INTRODUCTION

In the last few years microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) has become an important field of research in capillary electrophoresis (CE) because it can efficiently separate both charged and neutral solutes covering a wide range of water solubilities [1,2,3,4,5,6].

MEEKC, just like the other modes of CE, suffers from poor concentration sensitivity with UV detector as a consequence of small injection volumes and short optical path length. To overcome this short-coming, different on-column preconcentration techniques have been applied to enhance sensitivity in CE. These techniques are based on injecting a large volume of sample dissolved in a low-conductivity solvent into the capillary. Then, in order to preserve high resolution, the sample matrix must be pumped out of the capillary. Chien et al. [7] showed that the removal of the sample matrix from the capillary by reversing the polarity of the applied voltage (with polarity switching) was a powerful tool for sensitivity enhancement in CE. However, this process is complex, and lead to irreproducible results if the current is not monitored correctly. Later, this method was simplified by suppressing the electroosmotic flow (EOF) and then, under a reverse voltage, the sample matrix was removed from the capillary by itself and the anionic analytes were separated without polarity switching. Different strategies have been reported to suppress the EOF, such as adding an EOF suppressor [8,9,10], using a low

pH background electrolyte (BGE) [11,12,13], coating the capillary wall [14,15,16], using methanol as the BGE solvent [17,18], or using pH hysteresis [19].

In order to use these strategies, the electrophoretic mobility of the sample ions must be greater than and opposite to the EOF during both the sample stacking and the subsequent separation so that the two processes can proceed consequently under the same voltage.

In this paper the potential of applying the on-column preconcentration technique stacking with reversed migrating pseudo-stationary phase (SRMP) in MEEKC was investigated. This technique was applied for the first time by Terabe et al. [20] in micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC). In order to apply this on-column enrichment technique without polarity switching, the microemulsion BGE was adjusted at the acidic range. Generally, in MEEKC, high-pH aqueous buffers such as borate or phosphate (pH=7-9) are used because they generate a high EOF when a voltage is applied across the capillary filled with the microemulsion BGE solution. On the other hand, in the literature there is little research done on low-pH buffers in MEEKC [21,22,23,24,25,26]. In this sense, phosphate buffer at pH 2.5 has been used. When the solution pH is below 5, the EOF is reduced because the silanol groups on the capillary walls are not fully ionised. Under these conditions, the effective mobility of the oil is greater than the EOF and the microemulsion will migrate towards the

anode because of their electrophoretic mobility.

With the aim of studying the capability of SRMP, in combination with MEEKC, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in water samples have been analysed. Different studies have reported that these drugs are not totally biodegraded or eliminated in the sewage treatment plants (STPs) and variable concentrations from low ng L^{-1} to low $\mu\text{g L}^{-1}$ levels in the aquatic environment have been detected [27,28,29,30,31]. In this way, different analytical methods have been developed to analyse them in wastewater and surface water in the ng L^{-1} range. NSAID residues in surface water have mainly been analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [32], although often requiring derivatization, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) [30,33], and HPLC tandem MS [32]. Recently, CE has also been used to analyse NSAIDs in water samples. In this case, in order to determine them at low levels an on-column preconcentration technique was applied [18], or MS as the detector was used [30,31]. As well as the analytical separation technique, water samples have to be pretreated in order to clean-up the sample matrix and preconcentrate the drugs, since these are found at trace levels in the aquatic environment. The usually way to accomplish this aim has been to perform a solid-phase extraction (SPE). To our knowledge, this is the first time that a method that combines off-line SPE and an on-column preconcentration technique in MEEKC is validated for

water samples. The validation was done in terms of linearity, reproducibility (RSD), and detection limits (LODs).

2 EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentation

CE analyses were performed on a Hewlett-Packard ^{3D}CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) system equipped with a UV diode-array detector (DAD) operating at 214 nm. The uncoated fused-silica capillaries (Beck-man, Palo Alto, CA, USA) had a total length of 45 cm (36.5 cm effective length) and 75 μm ID. The capillary temperature was set at 20°C.

Hydrodynamic injection was used at 50 mbar for 5 s at the capillary inlet to optimise the separation. The separation voltages applied were negatives because analyses were carried out with the anode at the capillary outlet.

New capillaries were flushed with a 1.0 N NaOH solution at 50°C for 10 min, with purified water for 15 min until the temperature reached 20°C, and with the acidic microemulsion BGE solution for 15 min. The capillaries were equilibrated every day by rinsing with 0.1 N NaOH for 8 min, then with purified water for 10 min, and finally with the acidic microemulsion BGE solution for 15 min. Between analyses the capillary was rinsed for 3 min with the microemulsion BGE solution. When not in use, the capillaries were flushed with 0.1 N NaOH for 15 min, rinsed with purified water for 20 min

and flushed in air for 20 min, and finally stored.

2.2 Reagents

Standards of the five NSAIDs – ibuprofen, fenoprofen, naproxen, diclofenac sodium, and ketoprofen–, sodium dodecyl sulfate (SDS), and di-*n*-butyl tartrate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide (98%) and hydrochloric acid (HCl) (95%) were from Prolabo (Bois, France). *n*-octane, methanol, acetonitrile, acetone, and hexane were from SDS (Peypin, France). Ethyl acetate, butan-1-ol and 2-propanol were from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium dihydrogenphosphate (NaH₂PO₄) and *n*-heptane were from Probus (Badalona, Barcelona, Spain).

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

A stock standard solution of 1000 mg L⁻¹ of each compound was prepared in methanol, except the solution of diclofenac sodium, which was prepared in methanol:water (80:20 v/v). A mixed standard solution of the five drugs was prepared weekly at a concentration of 100 mg L⁻¹ in methanol. The working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with purified water. All solutions were stored in a dark-glass flask at 4°C.

2.3 Preparation of Microemulsion

The microemulsion BGE solution was prepared by weighing subsequently in a

flask 0.8 g *n*-heptane, 6.6 g butan-1-ol, 3.3 g SDS, and 89.3 g of 25 mM sodium phosphate adjusted to pH 2.5 with HCl. The final solution was sonicated for 20 min in a bath to aid dissolution. A transparent microemulsion was formed, and then this was filtered through a 0.22 μm nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) to remove particulate matter. The other microemulsions used during the optimisation studies were prepared in a similar manner. When organic solvents were used, they were added after the cosurfactant butan-1-ol.

2.4 Stacking with Reverse Migrating Pseudostationary Phase (SRMP)

A very large volume of sample dissolved in purified water was loaded at a pressure of 50 mbar for 200 s into the electrophoretic system. In this way, 86% of the capillary column was filled with the sample solution. After sample injection, the sample vial was changed for the acidic microemulsion BGE solution vial and a negative voltage (–10 KV) was applied both for sample stacking and subsequent separation. Injection was carried out on the cathodic side. Fresh sample solutions were always used for each injection. Under these conditions, the oils migrated to the detection window by their own electrophoretic mobility, while the weak EOF moved in the opposite direction.

2.5 Sample Preparation

Tap water sample was analysed. An off-line SPE was used to clean-up and

preconcentrate the samples. Before it was analysed, the water sample was filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK). The SPE cartridge columns used were from Merk (Darmstadt, Germany) and packed with 500 mg LiChrolut[®] RP-18 sorbent. The LiChrolut[®] RP-18 cartridges were preconditioned by passing 6 mL hexane, 6 mL acetone, and 6 mL purified water at pH 2 with HCl at a flow rate of 2 mL min⁻¹. Then, 1000 mL of filtered tap water acidified to pH 2 with HCl was loaded at a flow rate of 10 mL min⁻¹ through the cartridge. After preconcentration, the retained NSAIDs were eluted using the following elution procedure: 1 mL of acetone, 2 mL of methanol, and 2 mL of acetone [33]. One mL of this eluted extract was dissolved in 10 mL of purified water, and this solution was injected into the CE instrument.

The clean-up step was carried out using an SPE manifold system connected to a vacuum pump (Teknokroma, Barcelona, Spain).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Separation of NSAIDs using an Acidic Microemulsion BGE Solution

In order to apply SRMP to preconcentrate the NSAIDs, the acidic microemulsion BGE solution for the separation was firstly studied and optimised. A microemulsion BGE solution is formed by an aqueous buffer containing an oil, a surfactant and a cosurfactant.

The effect on the separation of such parameters as the oil (*n*-heptane, *n*-octane, ethyl acetate and di-*n*-butyl tartrate), and the addition of organic solvents (methanol, 2-propanol and acetonitrile) in the acidic microemulsion BGE solution were investigated.

Oil phase

In the literature, *n*-heptane [34,35], *n*-octane [21,22,23,25], and ethyl acetate [35,36] have been used to generate the oil in acidic microemulsion BGE solution. In this study, *n*-heptane and *n*-octane were the first to be tested as the oil. The initial experiments were carried out with the following microemulsion BGE solution: 0.8% (*w/w*) *n*-heptane or *n*-octane were used as the oil, 6.6% (*w/w*) butan-1-ol was added as cosurfactant, 3.3% (*w/w*) SDS was added as surfactant to stabilise the microemulsion, and 89.3% (*w/w*) 25 mM sodium phosphate at pH 2.5 was used as the aqueous buffer medium. With these acidic microemulsion BGE solutions, the EOF was effectively suppressed. The separation polarity was reversed with the positive electrode at the detector outlet of the separation capillary. This ensured that the negatively charged oil migrated in the direction of the detector.

The separations obtained were incomplete and some drugs (ibuprofen, diclofenac, and fenoprofen) coeluted when a separation voltage of -8 KV was applied. On the other hand, when *n*-octane was used, the migration times were slightly higher than for *n*-heptane.

In order to obtain faster separations, SDS concentration (3.3%, w/w) could be reduced up to 0.6% (w/w) when oils with low interfacial surface tension, such as ethyl acetate [35,36,37,38,39] and di-*n*-butyl tartrate [36,40] were used. Under these conditions, lower voltages could be applied. In this study, both ethyl acetate and di-*n*-butyl tartrate were tested to reduce the analysis time. In the literature, only ethyl acetate has been tested at low-pH MEEKC, with a percentage of 0.5% (w/w) [36]. In our case we proved a percentage of 0.8% (w/w) for both oil phases to keep the same amount of oil used for *n*-heptane and *n*-octane, and the SDS concentration was 1.0% (w/w).

Therefore, the composition of the microemulsion BGE solution was 0.8% (w/w) ethyl acetate or di-*n*-butyl tartrate, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 1.0% (w/w) SDS, and 91.6% (w/w) 25 mM phosphate at pH 2.5. The obtained migration times were lower than the ones obtained for *n*-heptane and *n*-octane, as expected, since the SDS content was lower and, in consequence, the current also was lower thus allowing the application of higher voltages. In this case, the separation voltage applied was -15 KV. In addition, with the lower surface tension oils, the separations improved although two of the drugs (ibuprofen and diclofenac) co-eluted. Moreover, when di-*n*-butyl tartrate was tested the baseline was very noisy.

The separations were incomplete under all the tested conditions because some drugs coeluted and this suggests that

most NSAIDs were strongly associated with the oil phase and migrated to the detector at almost the same velocity as the pseudostationary phase.

Organic solvents

We studied how the nature and the percentage of these organic solvents added to the acidic microemulsion BGE solution affected the separation of the NSAIDs. These solvents can improve the resolution, reduce the retention of the analytes in the oil phase and increase their solubility in the aqueous phase [3,35,37,41,42]. The concentration of methanol, 2-propanol and acetonitrile ranged between 0 and 25% (w/w), 0 and 20% (w/w), and 0 and 15% (w/w), respectively, when both *n*-heptane and ethyl acetate were used as the oil.

As the concentration of these organic solvents in the acidic microemulsion BGE solution increased, the solubility of the analytes in the aqueous phase also increased and their affinity for the oil phase decreased. Consequently, the migration times were increased and the resolution was improved.

The best results were obtained when methanol and acetonitrile were added in the microemulsion BGE solution, since with these solvents the electrophoretic mobilities of the oils increased with respect to 2-propanol. The lower viscosity of methanol ($\eta=0.545$ mPa·s) and acetonitrile ($\eta=0.341$ mPa·s) compared to 2-propanol ($\eta=2.073$ mPa·s) can yield higher electrophoretic mobilities [17]. As a result, the oils can migrate towards the detector more

rapidly with methanol and acetonitrile than with 2-propanol, leading to shorter analysis times. Over all the results obtained for the study of the organic solvents, the microemulsion BGE solution which provides the optimum separation with higher separation efficiency and stable baseline is the formed

by 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15.0% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM phosphate at pH 2.5 (see Fig. 1). This microemulsion was used in the rest of this study to on-column preconcentrate the NSAIDs.

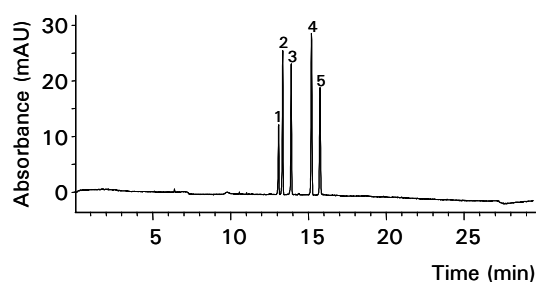


Figure 1. Electropherogram of a standard mixture of the NSAIDs at a concentration of 10 mg L⁻¹ dissolved in purified water by MEEKC. Separation conditions: 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM phosphate, pH 2.5. Hydrodynamic sample injection for 5 s at 50 mbar; voltage applied, -10 KV. Peak designation: (1) ibuprofen; (2) diclofenac; (3) fenoprofen; (4) naproxen; (5) ketoprofen. For experimental conditions, see text

3.2 Stacking with Reverse Migrating Pseudostationary Phase (SRMP)

In order to enhance the sensitivity and decrease the LODs, an on-column preconcentration technique was used. SRMP is an on-column enrichment technique in which the sample matrix is pumped out of the capillary by itself under a reverse potential at the same time as the EOF is reduced.

To use SRMP without polarity switching, the electrophoretic mobility of the oils should be greater than, and

opposite to, the EOF during both the sample stacking and the subsequent separation so that the two processes can proceed consecutively under the same voltage. The advantage of this technique is that it removes the sample matrix automatically and then the analytes are separated without the intermediate polarity switching step.

Initially, 86% of the capillary was filled with the sample dissolved in purified water by hydrodynamic injection at 50 mbar for 200 s. The sample matrix was then removed from the capillary

under a reverse potential (-10 KV) during sample stacking at the concentration boundary, which moves backward to the inlet. As the capillary is approximately filled with the acidic microemulsion BGE solution from the outlet vial, the overall EOF of the solution in the capillary is further reduced because of the low pH and resistivity of the acidic microemulsion BGE solution. When the EOF and the effective mobilities of the oils are balanced, the direction of migration of the stacked oils switches towards the detector because of their effective

mobilities and then the preconcentrated NSAIDs are separated by MEEKC.

Fig. 2 shows an electropherogram of the five NSAIDs stacked with this on-column preconcentration technique at a concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$. The differences in the migration times between the electropherograms in Figs. 1 and 2 are due to the time needed to remove the sample matrix from the capillary. The sensitivity, evaluated by the area of the peaks, was enhanced 51-54-fold in comparison with normal hydrodynamic injection.

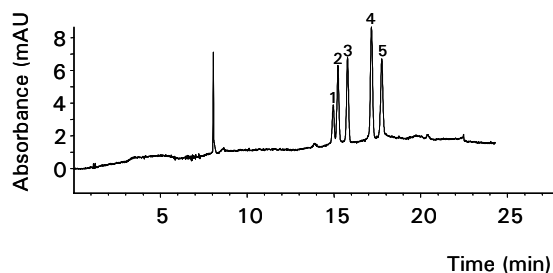


Figure 2. Electropherogram of a standard mixture of the NSAIDs at a concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in purified water applying the preconcentration technique, SRMP. Separation conditions: 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM phosphate, pH 2.5. Hydrodynamic sample injection for 200 s at 50 mbar; voltage applied, -10 KV. For experimental conditions, see text; for peak designation, see Fig. 1

The improvement in sensitivity with this stacking technique (SRMP) was comparable with results reported in the literature when these drugs were also preconcentrated by other CE modes. For capillary zone electrophoresis (CZE), when methanol was used as the BGE solvent to suppress the EOF, an 80-100-fold enhancement in concentration

sensitivity was obtained [18]. Pai et al. [43] obtained 10-45-fold sample enrichment when a wall-coated open tubular capillary was used in CEC. On the other hand, when the sample matrix was removed from the capillary by reversing the polarity of the applied voltage, a 20 and 38-43-fold improvement in concentration

sensitivity were obtained using *n*-heptane and ethyl acetate, respectively in MEEKC [35].

Table 1 shows the linearity and equations of the calibration curves, the relative standard deviations (RSDs¹) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs²), the LODs and the sensitivity enhancement factor of standard solutions. The linear responses were excellent in the 20-1000 µg L⁻¹ concentration range for

ibuprofen and 10-1000 µg L⁻¹ for the other drugs. The correlation coefficients were greater than 0.9990 for all compounds. The RSDs of the corrected peak areas and the migration times in terms of reproducibility for SRMP-MEEKC were below 10% and 7%, respectively, when four replicates were analysed at 100 µg L⁻¹. LODs calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 5-15 µg L⁻¹ range.

Table 1. Linearity, calibration curves, reproducibility (RSD) of corrected peak area and the migration times, sensitivity enhancement and LODs for standard samples by SRMP-MEEKC-DAD in low-pH microemulsion BGE solution

Compound	Linearity (µg L ⁻¹)	Calibration curves ⁽¹⁾	%RSD ⁽²⁾ (n=4) (peak area)	%RSD ⁽³⁾ (n=4) (migration times)	Enhancement sensitivity	LOD (µg L ⁻¹)
Ibuprofen	20-1000	y = 0.200x - 2.154	2	6	54	15
Diclofenac	10-1000	y = 0.410x - 4.956	10	5	52	7
Fenoprofen	10-1000	y = 0.403x - 1.696	2	6	51	7
Naproxen	10-1000	y = 0.634x - 3.888	7	7	54	5
Ketoprofen	10-1000	y = 0.452x - 2.758	5	7	53	7

Separation conditions: 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM sodium phosphate, pH 2.5. For conditions, see text.

⁽¹⁾ In the calibration curves, "y" represents the corrected peak area, and "x" represents the concentration (µg L⁻¹)

⁽²⁾ Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas (100 µg L⁻¹)

⁽³⁾ Relative standard deviation (RSD) of the migration times (100 µg L⁻¹)

The LODs obtained with this preconcentration technique (SRMP) by MEEKC under pH-suppressed EOF were similar with results reported in the literature [18,35,43]. So, when large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP) was applied to preconcentrate these drugs by CZE, the LODs were in the 10-35 µg L⁻¹ range [18]. Sample stacking in CEC was used to enrich some NSAIDs, and the LODs ranged from 3 to 57 µg L⁻¹ [43]. Alternatively, the LODs were in the 5-20 µg L⁻¹ and 7-15 µg L⁻¹ range when

reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) was applied to analyse these drugs in high-pH MEEKC using *n*-heptane and ethyl acetate, respectively [35]. Moreover, these results were also comparable when these drugs were analysed by CZE-MS [30,31], and HPLC-UV [44]. In conclusion, MEEKC under pH-suppressed EOF can be an attractive alternative to other CE modes and to other techniques to analyse these drugs at low levels.

4 ANALYSIS OF REAL SAMPLES

The method developed was validated by the analysis of tap water. In order to increase the concentration sensitivity of the method and clean-up the water sample for its application to real water samples, an off-line SPE preconcentration procedure was applied prior the SRMP technique.

We use the SPE process described by Farré et al. [33] with some modifications. In their process the eluted extract with methanol:acetone (40:60 v/v) was evaporated with a gentle stream of nitrogen and reconstituted with methanol. In our

case, an extract dissolved in purified water was needed in order to apply the on-column preconcentration SRMP. Firstly, we tested to reconstitute the residue, after being evaporated, with purified water instead of methanol. But the recoveries achieved were lower than 60%. Then, in order to improve the recoveries, 1 mL of the eluted extract (methanol:acetone, 40:60 v/v) was dissolved in 10 mL of purified water, and this solution was injected into the CE system. When this extraction procedure was carried out with 1000 mL of tap water sample spiked with the NSAIDs at different levels, the recoveries were higher than 75%, see Table 2.

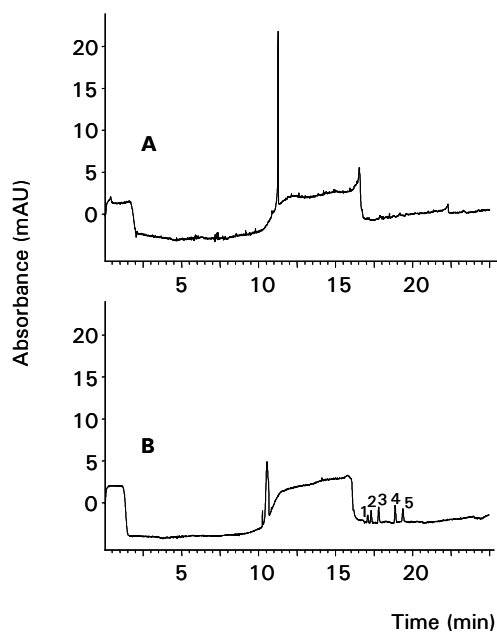


Figure 3. Electropherogram obtained from the analytes of 1000 mL of (A) tap water sample, and (B) tap water sample spiked at a concentration of 1 $\mu\text{g L}$ after the SPE-SRMP enrichment procedure. For experimental conditions, see text; for peak designation, see Fig. 1

Comparing the electropherograms obtained in Fig. 2, and 3B, few differences in migration times can be observed. These are due to the time taken to remove the sample matrix from the capillary, since the sample matrix is different. In order to confirm the presence of the analytes, the water sample was spiked with them. In addition, the drugs were also identified by the match value obtained with DAD; this value represents the concordance value between the spectra obtained for

a standard and the one for the real sample. The LODs of NSAIDs in water samples obtained in this study were similar than those obtained in other studies in which these drugs were analysed by CZE-DAD in mineral water [18], and CZE-MS in surface water [30,31]. In addition, these results were also comparable than those obtained when these drugs were analysed by HPLC-MS in groundwater [33,45], surface water [30], and STP [46].

Table 2. Recovery, linearity, calibration curves, reproducibility (RSD) of corrected peak area and the migration times, and LODs by off-line SPE and SRMP-MEEKC-DAD for spiked tap water sample

Compound	Recovery (%)	Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibration curves ⁽¹⁾	%RSD ⁽²⁾ ($n=4$) (peak area)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ibuprofen	95	0.5-5	$y = 3.527x + 0.328$	7	15
Diclofenac	75	0.2-5	$y = 5.958x + 0.421$	10	7
Fenoprofen	92	0.2-5	$y = 7.483x + 2.091$	6	7
Naproxen	75	0.2-5	$y = 8.556x + 1.407$	7	5
Ketoprofen	95	0.2-5	$y = 8.350x + 0.303$	7	7

Separation conditions: 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM sodium phosphate, pH 2.5. For conditions, see text.

⁽¹⁾ In the calibration curves, "y" represents the corrected peak area, and "x" represents the concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$)

⁽²⁾ Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas ($1 \mu\text{g L}^{-1}$)

5 CONCLUSIONS

This paper shows the potential of the on-column preconcentration technique SRMP in MEEKC under pH-suppressed EOF when some NSAIDs were analysed in water samples. The optimum BGE solution consisted of 0.8% (w/w) *n*-heptane, 6.6% (w/w) butan-1-ol, 15.0% (w/w) acetonitrile, 3.3% (w/w) SDS, and 74.3% (w/w) 25 mM sodium phosphate at pH 2.5. SRMP was applied without polarity switching by adjusting the microemulsion BGE pH in the acidic range. Therefore, the preconcentration and separation steps were successively carried out under the

same voltage without losing the stacked NSAIDs. The LODs were in the 5-15 $\mu\text{g L}^{-1}$ range in standard solutions. Moreover, the use of off-line SPE in combination with SRMP, the NSAIDs could be determined in tap water at ng L^{-1} levels. This work shows that MEEKC could be an alternative technique to analyse these drugs at low concentration levels in environmental samples.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) and (PPQ2002-01276).

6 REFERENCES

- [1] Altria K (2000) *J Chromatogr A* 892:171-186
- [2] Hansen S (2003) *Electrophoresis* 24:3900-3907
- [3] Marsh A, Clark B, Broderick M, Power J, Donegan S, Altria K (2004) *Electrophoresis* 25:3970-3980
- [4] Altria K, Mahuzier P, Clark B (2003) *Electrophoresis* 24:315-324
- [5] Hansen S, Gabel-Jensen C, El-Sherbing D, Pedersen-Bjergaard S (2001) *Trends in Anal Chem* 20:614-619
- [6] Marsh A, Clark B, Altria K (2005) *J Sep Sci* 28:2023-2032
- [7] Chien R, Burgi D (1992) *Anal Chem* 64:489A-496
- [8] Burgi D (1993) *Anal Chem* 64:3726-2729
- [9] Albert M, Debusschere L, Demesmay C, Rocca J (1997) *J Chromatogr A* 757:291-296
- [10] Baryla N, Lucy C (2001) *Electrophoresis* 22:52-58
- [11] He Y, Lee H (1999) *Anal Chem* 71:995-1001
- [12] Quirino J, Terabe S (1999) *J Chromatogr A* 850:339-344
- [13] Zhu L, Lee H (2001) *Anal Chem* 73:3065-3072
- [14] Lee J, Choi O, Jung H, Kim K, Chung D (2000) *Electrophoresis* 21:930-934
- [15] Hsieh M, Tseng W, Chang H (2000) *Electrophoresis* 21:2904-2910
- [16] Chun M, Kang D, Kim Y, Chung D (2001) *Microchem J* 70:247-253
- [17] Kim B, Chung D (2002) *Electrophoresis* 23:49-55
- [18] Macià A, Borrull F, Aguilar C, Calull M (2003) *Electrophoresis* 24:2779-2787
- [19] Han J, Chun M, Riaz A, Chung D (2005) *Electrophoresis* 26:480-486
- [20] Quirino J, Terabe S (1998) *Anal Chem* 70:149-157
- [21] Pedersen-Bjergaard S, Gronhaug Halvorsen T (2000) *Chromatographia* 52:593-598
- [22] Pedersen-Bjergaard S, Naess O, Moestue S, Rasmussen K (2000) *J Chromatogr A* 876:201-211
- [23] Mahuzier P, Altria K, Clark B (2001) *J Chromatogr A* 924:465-470
- [24] Quirino J, Terabe S, Otsuka K, Vincent J, Vigh G (1999) *J Chromatogr A* 838:3-10
- [25] Fogarty B, Dempsey E, Regan F (2003) *J Chromatogr A* 1014:129-139
- [26] Pomponio R, Gotti R, Fiori J, Cavrini V (2005) *J Chromatogr A* 1081:24-30
- [27] Richardson S (2003) *Anal Chem* 75:2831-2857
- [28] Petrovic M, Gonzalez S, Barceló D (2003) *Trends in Anal Chem* 22:685-696
- [29] Tixier C, Singer H, Öllers S, Müller S (2003) *Environ Sci Technol* 37:1061-1068
- [30] Ahrer W, Scherwenk E, Buchberger W (2001) *J Chromatogr A* 910:69-78
- [31] Macià A, Borrull F, Calull M, Aguilar C (2004) *Electrophoresis* 25:3441-3449

- [32] Petrovic M, Hermando M, Diaz-Cruz M, Barceló D (2005) *J Chromatogr A* 1067:1-14
- [33] Farré M, Ferrer I, Ginebreda A, Figueras M, Olivella L, Tirapu LI, Vilanova M, Barceló D (2001) *J Chromatogr A* 938:187-197
- [34] Huang H, Lai Y, Chiu C, Yeh J (2003) *J Chromatogr A* 993:153-164
- [35] Macià A, Borrull F, Calull M, Aguilar C (2005) *Electrophoresis* 26:970-979
- [36] Mahuzier P, Clark B, Bryant S, Altria K (2001) *Electrophoresis* 22:3819-3823
- [37] Li G, Chen X, Liu M, Hu Z (1998) *Analyst* 123:1501-1505
- [38] Prado M, Silva C, Tavares M, Altria K (2004) *J Chromatogr A* 1051:291-296
- [39] Pascoe R, Foley J (2002) *Analyst* 127:710-714
- [40] Aiken J, Huie C (1993) *Chromato-graphia* 35:448-450
- [41] Rodríguez M, Sánchez M, González V, García F (1994) *Anal Chim Acta* 298:423-430
- [42] Frías S, Sánchez M, Rodríguez M (2004) *Anal Chim Acta* 503:271-278
- [43] Pai Y, Lin C, Liu C (2004) *Electrophoresis* 25:569-577
- [44] Sun Y, Takaba K, Kido H, Nakashima M, Nakashima K (2003) *J Pharm Biomed Anal* 30:1611-1619
- [45] Ternes T, Bonerz M, Schmidt T (2001) *J Chromatogr A* 938:175-185
- [46] Miao W, Koenig B, Metcalfe C (2002) *J Chromatogr A* 952:139-147

2.3 Aplicació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques en cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica

El treball que es presenta en aquest apartat es va plantejar amb l'objectiu de mostrar el potencial d'aplicar diferents tècniques de preconcentració electroforètiques en MEKC. Degut a l'avantatge que presenten les tècniques de preconcentració electroforètiques suprimint l'EOF, es va escollir un medi electrolític àcid amb aquest objectiu per a la preconcentració dels mateixos NSAIDs inclosos en l'estudi anterior, l'ibuprofèn, el ketoprofèn, el fenoprofèn, el naproxèn i el diclofenac sòdic.

Fins al moment, a la bibliografia no s'havia descrit cap metodologia basada en MEKC que separés aquests fàrmacs en condicions àcides, i per això, es va estudiar la separació electroforètica utilitzant un electròlit a pH àcid. Com a medi de separació es va utilitzar una solució electrolítica aquosa formada per fosfat sòdic a pH 2.5, per ser el tampó més emprat a la bibliografia en condicions àcides, i SDS com a surfactant. Utilitzant aquesta solució electrolítica els cinc NSAIDs no es van separar completament, i va ser necessària l'addició d'un solvent orgànic al medi electrolític per tal de disminuir l'afinitat dels analits vers la fase pseudoestacionària per tal d'obtenir una bona separació. No obstant, en MEKC, l'eficàcia d'una tècnica de preconcentració depèn tant de la diferència de conductivitat entre la zona de la mostra i de l'electròlit, com d'una elevada afinitat dels analits vers la fase pseudestacionària [1]. Així, l'addició d'un solvent orgànic a la solució electrolítica és un paràmetre important i ha de ser un compromís entre obtenir una completa resolució i un elevat factor de preconcentració. La solució electrolítica òptima va ser la formada per 75 mM de SDS, 40% d'acetonitril i 25 mM de fosfat sòdic a pH 2.5 amb la qual els cinc NSAIDs es van separar en 20 minuts.

Després de l'estudi de la separació electroforètica, es va investigar la potencialitat de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques, com la SRMM, la SRMM-ASEI i la FESI-RMM. El fonament d'aquestes és el mateix que el de les tècniques que prèviament es van aplicar per a la preconcentració d'aquests fàrmacs per CZE (apartat 2.1.2) [2]. En la tècnica SRMM es va investigar el temps d'injecció hidrodinàmica de la mostra. En la

tècnica SRMM-ASEI, que és una combinació de les tècniques SRMM i ASEI, i que es va aplicar per primera vegada emprant una solució electrolítica àcida, es va estudiar el temps d'injecció tant hidrodinàmica com electrocinètica de la mostra. D'altra banda, en la tècnica FESI-RMM es va optimitzar el tipus de *solvent plug* i el temps d'injecció hidrodinàmica d'aquest, i el temps d'injecció electrocinètica de la mostra.

En les condicions òptimes trobades per a cada tècnica de preconcentració electroforètica, es van calcular i comparar les seves eficàcies i els LODs obtinguts per solucions estàndard. L'eficàcia d'una tècnica de preconcentració es refereix a l'augment de senyal que s'obté en injectar un gran volum de mostra en el capil·lar respecte l'obtingut amb la injecció hidrodinàmica normal. En aquest estudi, l'eficàcia de cada tècnica de preconcentració es va calcular respecte l'augment d'àrea, d'alçada i de concentració. Es va observar que la tècnica SRMM ofería l'eficàcia més gran en àrea (300 vegades), i la tècnica SRMM-ASEI l'ofería en alçada (263 vegades) i en concentració (250 vegades). Tot i això, els LODs que es van obtenir amb aquestes dues tècniques van ser similars, de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquest fet és degut a l'elevada eficàcia dels pics que s'obté amb la tècnica SRMM-ASEI, ja que l'augment de senyal respecte l'alçada i la concentració donen una millor idea sobre la capacitat de detecció que pot oferir un mètode per un analit en concret, ja que el LOD es calcula com 3 vegades la relació senyal (alçada)-soroll. D'altra banda, la tècnica FESI-RMM va ser la que va oferir l'eficàcia més baixa en àrea, alçada i concentració, obtenint-se LODs de desenes de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aquest fet és degut a la petita diferència de conductivitat entre la matriu de la mostra i l'electròlit, ja que en aquesta tècnica de preconcentració com la mostra s'injecta electrocinèticament s'ha de preparar amb una solució electrolítica diluïda, perquè emprant un electròlit a pH àcid els NSAIDs estan en la seva forma neutra.

Seguidament, les metodologies desenvolupades es van validar amb l'anàlisi d'aigua mineral fortificada amb els fàrmacs. Prèviament a l'aplicació de cada tècnica de preconcentració es va utilitzar la tècnica d'SPE *off-line* per netejar

la matriu de la mostra i preconcentrar els analits. Emprant un sorbent de C₁₈ i pretractant 1000 mL d'aigua mineral, els LODs que es van obtenir per aquest tipus d'aigua van ser de centenars de ng·L⁻¹ per les tècniques de SRMM i SRMM-ASEI i de baixos µg·L⁻¹ per la tècnica de FESI-RMM.

Els resultats obtinguts en aquest estudi s'inclouen en el treball que s'adjunta a continuació i que ha estat publicat a la revista J. Chromatogr. A 25 (2006) 234.

Bibliografia

- [1] Zhu, L., Tu, C, Lee, H., Anal. Chem. 74 (2002) 5820.
- [2] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., Electrophoresis 25 (2004) 428.

2.4 Aplicació de l'acoblament *in-line* entre l'extracció en fase sòlida i l'electroforesi capil·lar com a tècnica de preconcentració cromatogràfica

En els treballs desenvolupats fins al moment s'han estudiat diferents tècniques de preconcentració electroforètiques per a la determinació de NSAIDs en mostres d'aigua. Apart d'aquestes, les tècniques de preconcentració cromatogràfiques acoblades a l'CE també permeten disminuir els LODs.

Les tècniques de preconcentració cromatogràfiques es basen majoritàriament en l'acoblament de l'SPE a l'CE emprant diferents modes, com *off-line*, *at-line*, *on-line* i *in-line* SPE-CE. D'entre aquestes alternatives, les emprades a la bibliografia per la determinació de NSAIDs han estat el mode SPE *off-line* per l'anàlisi de mostres aquoses [4-8], i el mode SPE *at-line* per l'anàlisi de mostres biològiques, com sèrum i orina [1-3].

Amb l'objectiu d'aprofundir en les tècniques de preconcentració cromatogràfiques, es va proposar un estudi sobre l'aplicació de l'acoblament *in-line* SPE-CE per la determinació del fàrmac naproxèn en una mostra d'aigua. Posteriorment, es va realitzar un estudi comparatiu sobre els resultats obtinguts aplicant aquesta tècnica de preconcentració cromatogràfica, amb els obtinguts prèviament aplicant diferents tècniques de preconcentració electroforètiques.

Aquest estudi es va realitzar conjuntament amb el grup de Bioanàlisi de la Facultat de Química de Barcelona que està dirigit pel Dr. José Barbosa. Els capil·lars emprats en aquest acoblament es van preparar en els laboratoris d'aquest grup d'investigació i la seva aplicació es va realitzar a l'Àrea de Química Analítica de la nostra universitat. La Figura 2.4.1 mostra una representació esquemàtica dels capil·lars emprats en aquest estudi. Aquests contenen un microcartutx que està format per un petit fragment de capil·lar de sílice fosa que té un ID de 250 μm i una longitud d'1 cm. Aquest capil·lar està empaquetat amb un sorbent de C₁₈ que té un diàmetre de partícula de 40 μm . El sorbent queda retingut dins del capil·lar emprant dos fritats d'estructura polimèrica. Finalment, el microcartutx es connecta en línia a dos capil·lars de separació (*inlet* i *outlet*) de ID de 75 μm , que prèviament

s'han condicionat, mitjançant l'ús d'un tros de tub de polietilè de ID de 280 μm .

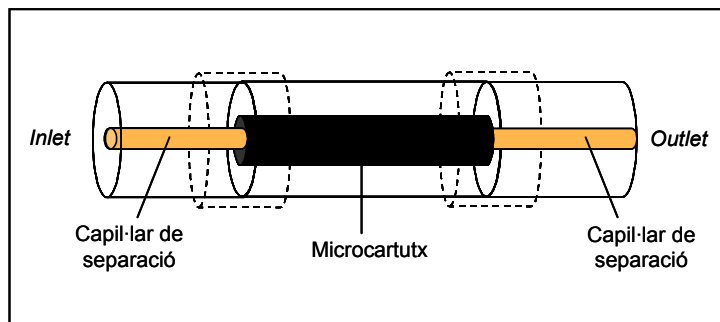


Figura 2.4.1. Representació esquemàtica del capil·lar que s'ha emprat en aquest estudi.

En aquest estudi, el primer pas va ser l'optimització de les variables més importants que afecten a la preconcentració per tal d'obtenir la màxima sensibilitat. Aquestes variables són el solvent emprat per condicionar i activar el sorbent, la matriu de la mostra, el temps d'injecció de la mostra, la composició i el volum d'elució, i el solvent emprat per netejar i regenerar el sorbent. Com a medi de separació es va emprar una solució electrolítica aquosa que estava formada per acetat amònic, ja que d'aquesta manera es podia garantir l'estabilitat del sorbent i la presència de la forma aniònica del fàrmac naproxèn, condició necessària per la seva anàlisi per CZE.

L'etapa més crítica d'aquesta tècnica de preconcentració és l'elució de l'analit, que es realitza habitualment mitjançant una petita quantitat d'un solvent orgànic. No obstant, en el nostre estudi no s'aconseguia l'elució del naproxèn amb metanol o acetonitril. Desafortunadament, si s'augmentava la quantitat d'aquest solvent (per sobre de 50 nL) es perdia el corrent degut a la formació de bombolles a l'interior del microcartutx.

Per tal de solucionar aquesta problemàtica es va pensar en l'addició d'una quantitat, entre un 20 i un 80% (v/v), de metanol a la solució electrolítica, i

es va observar que emprant un percentatge de metanol més gran del 50% (v/v) ja no era necessària la injecció del solvent d'elució, ja que aquesta solució podia actuar com a solvent d'elució i com a medi electrolític de separació. Les condicions òptimes en temps d'anàlisi i eficàcia del pic es van obtenir amb una solució electrolítica amb un 70% (v/v) de metanol. En aquestes condicions, la μ_e del naproxèn és més gran que la mobilitat de l'EOF, i per aquest motiu, per a que l'analit arribi al detector és necessari aplicar una diferència de potencial negativa (càtode al punt d'injecció) [5] i el naproxèn migrava en 14 minuts.

Després de l'estudi de l'etapa de la elució, es van investigar les millors condicions de retenció del naproxèn en el sorbent. Com més gran és l'afinitat del fàrmac vers el sorbent, més mostra es pot introduir en el capil·lar i, conseqüentment, es pot obtenir un factor de preconcentració més gran. Per augmentar aquesta afinitat es va investigar l'ús d'aigua àcida a pH 3 com a matriu de la mostra, ja que en aquestes condicions l'analit està en la seva forma neutra i s'augmenta la seva hidrofobicitat. Emprant aquesta solució àcida per condicionar el capil·lar i com a matriu de la mostra, es va poder introduir un volum de mostra de 480 μL . En les condicions òptimes trobades, la sensibilitat de la tècnica va augmentar 1820 vegades i el LOD va ser de $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard. L'augment de la sensibilitat es va calcular respecte la injecció hidrodinàmica normal emprant un capil·lar de la mateixa longitud però sense el microcartutx.

Seguidament, la metodologia desenvolupada es va aplicar a la determinació del naproxèn en una mostra d'aigua de l'aixeta fortificada amb aquest fàrmac. Prèviament a la tècnica de preconcentració *in-line* SPE-CE, es va realitzar una neteja de la matriu de la mostra i la preconcentració de l'analit mitjançant la tècnica d'SPE *off-line*. Emprant un sorbent de C_{18} i pretractant només 500 mL d'aquesta aigua, el LOD que es va obtenir va ser de $3 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

Posteriorment a l'aplicació d'aquesta tècnica de preconcentració cromatogràfica, es va realitzar un estudi per comparar els resultats obtinguts

en aquest treball amb els obtinguts prèviament aplicant diferents tècniques de preconcentració electroforètiques per a la determinació del naproxèn. El resultat d'aquest estudi serà discutit en l'apartat de Resultats i Discussió de la present Tesi Doctoral.

Els resultats obtinguts en aquest estudi s'inclouen en el treball que s'adjunta a continuació i que ha estat enviat a la revista *J. Chromatogr. A* per a la seva publicació.

Bibliografia

- [1] Veraart, J.R., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *J. Chromatogr. B* 719 (1998) 199.
- [2] Veraart, J.R., Groot, M., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U.A.Th., *Analyst* 124 (1999) 115.
- [3] Mardones, C., Ríos, A., Valcárcel, M., *Electrophoresis* 22 (2001) 484.
- [4] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.
- [5] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 23 (2003) 2779.
- [6] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 25 (2004) 3441.
- [7] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Chromatographia* 63 (2006) 149.
- [8] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 234.

2.4.1 *In-line strategies to enhance the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of naproxen in water samples. Chromatographic versus electrophoretic approaches*

IN-LINE STRATEGIES TO ENHANCE THE SENSITIVITY IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR THE ANALYSIS OF NAPROXEN IN WATER SAMPLES. CHROMATOGRAPHIC VERSUS ELECTROPHORETIC APPROACHES

Alba Macià^a, Francesc Borrull^a, Marta Calull^a, Fernando Benavente^b, Elena Hernández^b, Victòria Sanz-Nebot^b, José Barbosa^b, Carme Aguilar^a

^aDepartament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.

c/ Marcel·lí Domingo s/n, 43007 TARRAGONA, Spain

^bDepartament de Química Analítica. Universitat de Barcelona

c/ Martí i Franquès 1-11, 08028 BARCELONA, Spain

Abstract

Solid phase extraction (SPE) coupled in-line to capillary electrophoresis (CE), as the strategy to enhance the concentration sensitivity in CE has been used to enrich naproxen in water samples. A microcartridge containing an octadecyl silica (C₁₈) sorbent was placed near the inlet within the separation capillary column. After studying the influence of the different parameters over the SPE process, the optimum conditions were obtained when the enrichment microcartridge was conditioned with acidic water at pH 3.5, cleaned-up with 20 mM ammonium acetate in water, and when 20 mM ammonium acetate in methanol:water (70:30, v/v) was used as both elution solution and separation background electrolyte (BGE). By using these conditions, a large volume of dilute naproxen solution, prepared in acidic water at pH 3.5, was loaded at 930 mbar for 30 min. The sensitivity was enhanced 1820-fold with respect to normal hydrodynamic injection, and the detection limit (LOD) achieved was 0.2 µg/l. To show the applicability of the SPE-CE developed method, tap water samples were analysed by combining off-line SPE with in-line SPE-CE. Under these conditions, naproxen could be detected at 3 ng/l demonstrating the potential of the procedure for the sensitive analysis of this type of drugs in water samples. These results have been compared with those previously obtained for naproxen in water samples using different sample stacking techniques.

Keywords: Capillary electrophoresis / In-line SPE / Naproxen / Sample preconcentration / Water samples

1 INTRODUCTION

In modern analytical chemistry, trace analysis has been a very active area because of the increasing sensitivity requirements, especially in environmental and biological analyses. The application of capillary electrophoresis (CE) for the analysis at these concentration levels is restricted due to the high concentration limits of detection (LOD) achieved with this technique. In order to expand the use of CE for trace analysis in complex samples, the research into the enhancement of sensitivity and the development of novel approaches to obtain and alter selectivity are very important [1-3].

Several strategies have been reported in order to enhance concentration sensitivity in CE. Among them, the most populars have been based on the use of more selective or sensitive detection systems, such as mass spectrometry (MS) [4-6], or on the in-line electrophoretic preconcentration of the analytes using sample stacking [2, 3, 7-9] or transient isotachopheresis [10, 11] after the injection of a large volume of sample into the capillary.

Another strategy to enhance the concentration sensitivity in CE is using a chromatographic preconcentration before the analysis by CE. Solid-phase extraction (SPE) has been combined with CE following different approaches

[1, 12-15]. At-line [16, 17] and on-line [18, 19] SPE-CE involve the automatic transfer of the analytes from the SPE cartridge to the CE system by means of robotics and on-line interfaces, respectively. In both cases, the SPE cartridge and the CE are housed in separated devices. In general, accurate results are expected because there is no sample manipulation between the analyte extraction step and the electrophoretic separation. Nevertheless, a significant disadvantage exists in the complexity and cost of the system. An alternative and simpler combination between SPE and CE is the in-line approach [4, 20-26]. This combination shows the same advantages of at-line and on-line SPE-CE because the SPE microcartridge is placed within the CE capillary. In addition, allows the combination with off-line chromatographic or in-line electrophoretic preconcentration methods in order to further enhance the detection sensitivity.

Naproxen is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) widely used to treat inflammation and fever. During the last years, different studies have reported that these pharmaceutical compounds are not totally biodegraded or eliminated in the sewage treatment plants (STPs), and variable concentrations from $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ to low $\mu\text{g}/\text{l}$ levels in the aquatic environment have been detected [27-30]. The aim of this study is to develop an in-line SPE-CE

procedure employing a microcartridge containing an octadecyl silica (C_{18}) sorbent to analyse naproxen at the low concentration levels found in water samples. To show the capability of the new in-line SPE-CE method, tap water samples were analysed. An off-line SPE, using a C_{18} silica sorbent, was necessary before the in-line SPE-CE analysis to clean-up the sample matrix and preconcentrate the drug from the tap water. The method was validated in terms of linearity, reproducibility, accuracy and LOD. The results obtained have been compared with those reported for naproxen in water samples in our previous investigations when in-line electrophoretic preconcentration techniques were employed [8, 31-34]. To the best of our knowledge, for the first time, the potential of in-line preconcentration using chromatographic and electro-phoretic approaches is directly compared for the analysis of a trace component of real water samples.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and standards

Naproxen and ammonium acetate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); sodium hydroxide and hydrochloric acid (HCl) (95%) were from Prolabo (Bois, France); hexane was from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany); and methanol and acetone were from SDS (Peypin, France). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). A stock standard solution of 1000 mg/l of

naproxen was dissolved in methanol. The solution was stored in a dark-glass flask at 4°C. A solution of this drug was prepared weekly at a concentration of 100 mg·L⁻¹ in methanol. The working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solution with Milli-Q water.

The aqueous background electrolyte (aBGE) solution was 20 mM of ammonium acetate prepared in water and the separation background electrolyte (sBGE) solution was 20 mM of ammonium acetate prepared in methanol:water (70:30, v/v). The pH of the first solution was 6.8 and the apparent pH (pH^{*}) of the hydroorganic solution measured after the addition of methanol was 7.5. These solutions were freshly prepared daily, sonicated for at least 5 min and filtered through a 0.22 μm nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) before use.

2.2 Instrumentation

CE analyses were performed on a HP ^{3D}CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) system equipped with a UV diode-array detector (DAD) operating at 214 nm. The capillary temperature was 20°C. Tap water samples were pretreated off-line using a SPE manifold supplied by Teknokroma (Barcelona, Spain) connected to a vacuum pump.

2.3 Construction of a microcartridge for in-line SPE-CE

The enrichment microcartridges which contained the SPE sorbent were home

made [26]. Figure 1 shows a schematic representation of the SPE-CE capillary column used in this work. A 36 cm length bare fused-silica capillary (365 μm OD x 75 μm ID) was conditioned with 1N sodium hydroxide for 20 min and Milli-Q water for 15 min at 930 mbar. Then, it was cut in two pieces of 8 cm and 27 cm, respectively, in order to insert the SPE microcartridge. A polyethylene frit (0.1 cm), obtained from small pieces of the original filters found in a commercial Sep-Pak[®] cartridge (Millipore, Marlborough, MA, USA), was introduced in a 1 cm piece of another bare fused-silica capillary (365 μm O.D. x 250 μm I.D.). This 1 cm microcartridge was connected to the 8 cm piece of fused-silica capillary activated before, using a

0.5 cm polyethylene sleeve "Intramedic" PE 10 (610 cm OD x 250 μm ID) (Clay Adams division of Becton and Dickinson, NJ, USA). Then, it can be easily vacuum-packed with the C₁₈ sorbent obtained from a Sep-Pak[®] cartridge (40 μm particles). When the microcartridge was almost completely full, a second in-column frit was inserted in the end side. The SPE-CE capillary column was extended to full-length with the 27 cm piece of activated fused silica using another polyethylene sleeve. Finally, it was checked for blockage by rising with the separation BGE solution at 930 mbar for 10 min. Voltage was immediately applied and a stable current meant that the SPE-CE system was ready to use.

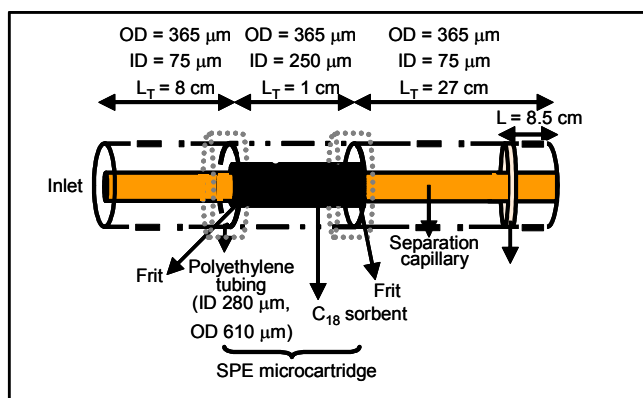


Figure 1. Schematic representation of the SPE-CE capillary column with the microcartridge used in this study.

2.4 In-line SPE-CE procedure

A conventional in-line SPE-CE procedure consists of the following steps: wetting to activate the SPE sorbent, conditioning to remove the

excess of the activation solvent, sample loading, clean-up, elution of the retained analyte after injection of a nanolitre volume of an appropriate solution (elution plug), electrophoretic separation using an appropriate voltage

and regeneration of the enrichment microcartridge [26].

In our study, under optimum conditions, several modifications were made to the conventional procedure. The most important modification was that no elution plug was injected. The mechanism for the elution of the retained naproxen will be discussed later in detail.

Figure 2 shows the schematic representation of the in-line SPE-CE procedure optimised in our study. First, the enrichment capillary was wetted with water and methanol at 930 mbar for 2 min each one. Then, it was conditioned with water and water acidified with HCl (pH 3.5), at 930 mbar for 2 min each one. The sample prepared in acidic water at pH 3.5 was loaded at 930 mbar for 30 min (360 μ l). The enrichment capillary was cleaned-up at 930 mbar for 3 min with aBGE solution (20 mM of ammonium acetate in water) to remove any possible interferences. Immediately, after the clean-up step, the inlet and the outlet of the SPE-CE capillary column were submerged in two vials containing sBGE (20 mM of ammonium acetate prepared in methanol:water, 70:30, v/v) and a voltage of -20 KV was applied. In this step, naproxen was first eluted from the C_{18} sorbent and then it was separated by electrophoresis. The enrichment microcartridge was regenerated after each analysis by flushing methanol at 930 mbar for 2 min. Overnight, it was stored at room temperature, with the inlet and the outlet ends submerged in

two vials filled with methanol and sealed to avoid evaporation.

In order to evaluate the sensitivity enhancement of the in-line SPE-CE procedure, a bare fused-silica capillary with the same dimensions (75 μ m ID x 36 cm) but without the SPE microcartridge was used to analyse naproxen. The capillary was conditioned with 1N sodium hydroxide for 20 min, Milli-Q water for 15 min at 930 mbar, and finally with the sBGE solution for 10 min at 930 mbar. Under these conditions, a solution of 10 mg/l of naproxen, prepared in Milli-Q water, was hydrodynamically injected at 50 mbar for 5 s (54 nl).

2.5 Tap water

The tap water samples were filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, England). An off-line SPE manifold was used to clean-up and preconcentrate the filtered samples. We used SPE cartridges from Merck packed with 500 mg of LiChrolut[®], a reversed-phase C_{18} sorbent. These cartridges were conditioned by passing at a flow-rate of 2 ml/min 6 ml of hexane, 6 ml of acetone and 6 ml of Milli-Q water acidified at pH 2 with HCl. 500 ml of filtered water samples were spiked with naproxen at different concentrations and acidified at a pH of 2 with HCl. They were loaded into the SPE cartridge at a flow-rate of 10 ml/min. After preconcentration, retained naproxen was desorbed using the following elution steps: 400 μ l of acetone, 800 μ l of methanol and 800 μ l of acetone [31]. One millilitre of the

eluted extract was dissolved in 10 ml of Milli-Q water acidified at pH 3.5 with HCl, and this solution was analysed by in-line SPE-CE. Between analyses, the C₁₈ sorbent from the off-line SPE cartridge was regenerated with 10 ml of methanol.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Analysis of naproxen by in-line SPE-CE

In this study, a C₁₈ was chosen as the SPE sorbent to enrich naproxen because it has been reported that good recoveries can be obtained for the analysis of this drug by off-line SPE and CE [27-29, 31, 33, 34]. This sorbent has been a universal extraction

sorbent for many years, it is stable in the pH range from 2 to 8 and its retention mechanism is primarily governed by hydrophobic interactions between the analyte and the carbonaceous moieties of the C₁₈ alkyl chains [13].

The aBGE of 20 mM of ammonium acetate in water (pH 6.8) and the sBGE of 20 mM of ammonium acetate in methanol:water (70:30, v/v) (pH* 7.5) were selected because they were compatible with the C₁₈ sorbent and the extraction mechanism. Furthermore, both solutions allow a great versatility for the electrophoretic separations when naproxen is in its anionic form, since its pK value is 4.2 [31].

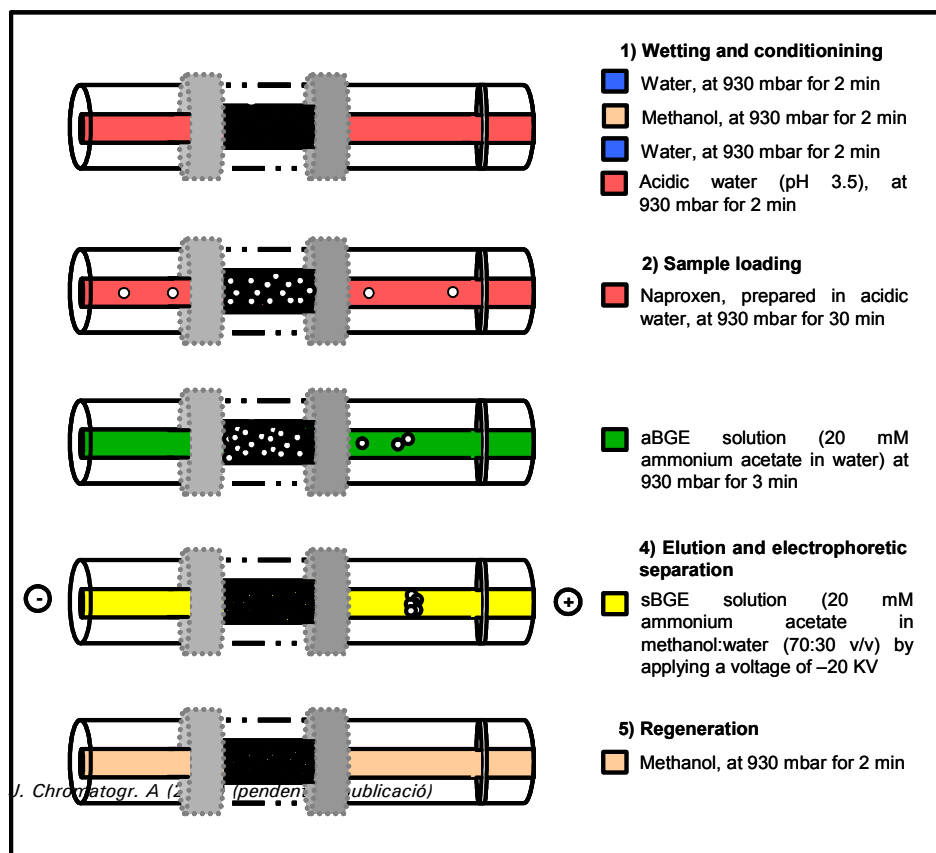


Figure 2. Schematic illustration of the in-line SPE-CE procedure under optimum conditions. (1) The SPE microcartridge was wetted for activation of the C₁₈ sorbent, and afterwards, it was conditioned to remove of excess of the activation solvent and retain the drug. (2) The sample was hydrodynamically loaded into the capillary, and the drug was retained into the SPE sorbent. (3) The enrichment microcartridge was cleaned-up to remove interferences. (4) The retained naproxen was eluted from the C₁₈ sorbent and the electrophoretic separation was produced after applying a negative voltage. (5) Finally, the SPE sorbent was regenerated.

Initial experiments were carried out with the following the directions of a conventional in-line SPE-CE procedure [26]. The enrichment microcartridge was wetted with water and methanol for 2 min at 930 mbar. Then, it was conditioned by flushing water for 2 min at 930 mbar, and aBGE solution at 930 mbar for 2 min. A standard solution of naproxen in water at a concentration of 1 mg/l was then loaded into the capillary at 930 mbar for 1 min. Afterwards, the SPE microcartridge was cleaned-up by flushing with the aBGE solution for 2 min at 930 mbar. Finally, after the drug was eluted, the electro-phoretic separation took place at +20 KV, with the inlet and the outlet of the SPE-CE capillary column submerged in two vials containing the aBGE solution.

In order to test the potential of improving detection sensitivity of CE by in-line SPE-CE, several parameters were studied in order to obtain the maximum peak area for the eluted naproxen. Once the elution of the drug from the SPE microcartridge was optimised, the wetting step, the conditioning step, the sample matrix, the sample loading time,

the clean-up step, and the regeneration step were also studied to verify its influence over the preconcentration of naproxen.

3.1.1 Composition and volume of the elution plug

In the elution step, the retained naproxen is removed from the C₁₈ sorbent and it is returned to the BGE solution for the electrophoretic separation. The most important issue is to select a liquid that will elute the analyte quantitatively from the solid sorbent using the smallest volume in order to achieve the maximum concentration enhancement and the minimum band broadening [14].

For these preliminary experiments, we used methanol:acetone (40:60, v/v) because it has been reported that when this solution was used in off-line SPE to elute naproxen from a C₁₈ sorbent high recoveries and high enrichment factors were obtained after CE analysis [27, 31]. However, by using an injection plug of 50 mbar for 5 s, naproxen did not eluted even after 60 min. In order to really confirm that the compound

was still retained in the SPE sorbent a flux of methanol was performed immediately until a peak of naproxen appeared.

Acetonitrile and methanol were alternatively tested as elution plugs due to their high elution strength. Unfortunately, when they were injected at 50 mbar for 5 s, the drug was not eluted either. When the amount of the elution plug introduced into the capillary was enlarged by increasing the duration time from 5 to 10 s, the current was unstable. The SPE-CE capillary column was vulnerable to current failure, probably due to the formation of bubbles inside the capillary.

Another alternative that we explored was to add methanol into the BGE solution. When a percentage of methanol higher than 50% (v/v) was used, the electro-osmotic flow (EOF) was suppressed and the effective electrophoretic mobility (μ_{eff}) of naproxen was increased with respect to the values observed in the aBGE [31, 35]. In this case, naproxen migrated towards the detector only if a negative voltage was applied. This was due to the fact that the apparent electrophoretic mobility of naproxen was higher than the cathodic EOF when a BGE solution of pH around 7 and containing a high percentage of methanol was used [31]. In addition, in this case, no elution plug was injected, because we observed that the hydroorganic BGE solution that contained methanol could act as both the elution solution and the electrophoretic medium for the separation. Specifically, we test

hydroorganic solutions containing different percentages of methanol ranging from 20% to 80% (v/v) and 20 mM of ammonium acetate. The optimum conditions in terms of shorter analysis time, peak efficiency and no bubble formation were obtained when a solution of 20 mM ammonium acetate in methanol:water (70:30, v/v) was used as elution solution and separation BGE solution (sBGE). Under these conditions, naproxen was eluted in 14 min.

Figure 3 shows the mechanism that we propose to explain the elution of naproxen from the C_{18} sorbent. After the clean-up step (Fig. 3A), a reverse voltage was applied and the SPE-CE capillary column originally filled with aBGE started to be filled with sBGE from the outlet. As a result, the overall EOF in the capillary was gradually reduced because of the increasing presence of methanol from the sBGE solution (Fig. 3B, C). When the sBGE passed through the SPE sorbent, the retained naproxen was rapidly eluted due to the high percentage of methanol (Fig. 3D). Furthermore, within the eluted zone there was a stacking phenomenon, because the naproxen molecules in contact with the sBGE migrate much faster than the naproxen molecules on the opposite side that were in contact with the aBGE [36]. Once naproxen was eluted, it migrated as a discrete zone towards the detector in the outlet end because its apparent electrophoretic mobility overcome the reduced EOF that was directed towards the opposite direction (Fig. 3E, F). Meanwhile the entire SPE-CE capillary

column was completely filled with separation BGE (Fig. 3F).

In order to verify that naproxen was not retained in the C₁₈ sorbent once the sorbent was wetted with the sBGE solution (Fig. 3E), we compared the results of the analysis of naproxen in two capillary columns, one of them containing the SPE microcartridge, and the other one not. Both capillaries were conditioned with the sBGE and 10 mg/l naproxen solution was injected at 50 mbar for 5 s. In both cases, naproxen migrated at the same time. Therefore, we confirmed that naproxen was not retained again in the C₁₈ sorbent when the drug migrated towards the detector (Fig. 3E).

Once the elution and the separation mechanism were elucidated, the other SPE-CE steps were optimised in order to obtain the maximum peak area for the eluted naproxen.

3.1.2 Effect of wetting and conditioning steps and sample matrix

Before the extraction of the analyte, the SPE sorbent must be prepared so that it may allow an intimate and effective surface contact with the sample solution. Most commonly, the wetting of the C₁₈ sorbents is accomplished by passing through the C₁₈ microcartridge, water and a small volume of organic solvent, such as methanol, acetonitrile, or acetone. This activation step improves the surface contact by opening the C₁₈ hydrophobic chains and thus increasing the effective hydrophobic surface area [37]. It also serves to elute any adsorbed organic impurities from the SPE sorbent. In general, it is broadly accepted that methanol produces the desired effect [12-15, 25].

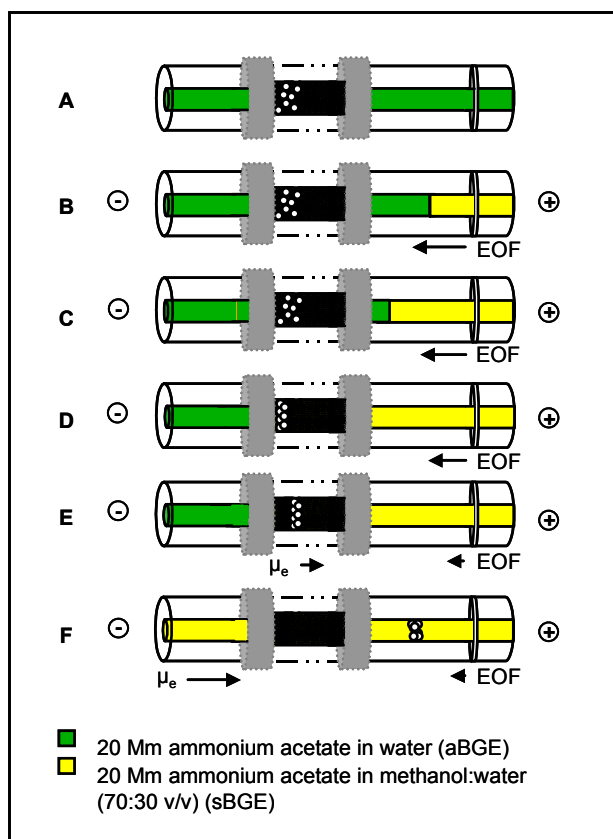


Figure 3. Schematic illustration of the mechanism to preconcentrate naproxen by in-line SPE-CE using the sBGE solution as both the elution solution and the electrophoretic medium for the separation. For details see the text.

After methanol, the microcartridge was flushed with an appropriate solution to remove the excess of the activation solvent, and in this way increase the retention of naproxen. Water and a solution similar to the sample matrix were subsequently employed to condition the SPE microcartridge. Thus, two experiments were tested and compared in order to optimise the conditioning steps and the sample matrix composition. In the first, water

followed with aBGE solution were used to condition the capillary and aqueous samples were loaded. In the second, water followed with water acidified at pH 3.5 were used to condition the capillary and acidic aqueous samples were loaded. The corrected peak area, the peak height, and the peak efficiency for the eluted naproxen were slightly higher after the conditioning of the C₁₈ microcartridge and the loading of the sample at pH 3.5. Probably, because at

pH 3.5, naproxen was fully protonated and strongly retained in the C₁₈ sorbent. Thus, the extraction would be more efficient and the stacked naproxen zone narrower.

3.1.3 Effect of sample loading time

In order to load the maximum sample volume and establish the maximum capacity of the C₁₈ sorbent, the sample loading time at 930 mbar was investigated using a solution of 10 µg/l of naproxen. Figure 4 shows the corrected peak area of the eluted naproxen as a function of the sample loading time or the sample volume loaded which were increased from 5 to 40 min or 60 to 480 µl, respectively. As

can be observed, the corrected peak area showed a linear relationship versus sample loading time until 30 min. For sample loading times higher than 30 min the corrected peak area was only slightly increased with time. In addition, the peak efficiency was slightly decreased when the sample was loaded during more than 30 min, since the naproxen peak was broader and more asymmetric. Both facts were indicative of the overloading of the C₁₈ microcartridge, and a sample loading time of 30 min at 930 mbar was selected for further work. Under these conditions, 360 µl of sample were loaded into the SPE-CE capillary column.

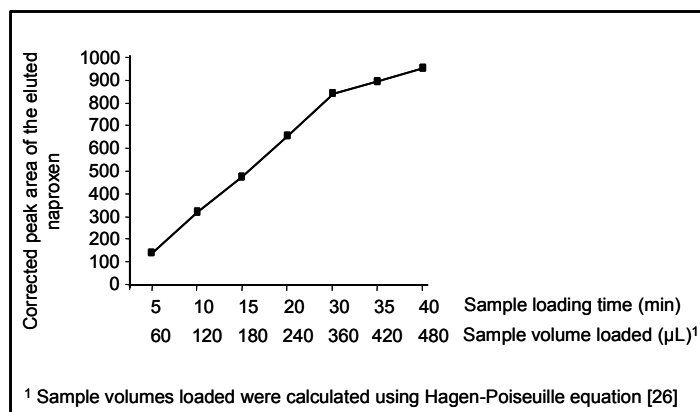


Figure 4. Effect of the sample loading time or sample volume loaded on corrected peak area of the eluted naproxen by using the optimum conditions for in-line SPE-CE. The concentration of naproxen was 10 µg/l. Other experimental conditions as in the text.

3.1.4 Effect of clean-up step

The clean-up step was used to remove any possible interference from the

sample matrix without eluting the retained analyte. In this study, the clean-up step was also used in order to have a more homogeneous system, since the sample matrix was water acidified at pH 3.5 and the sBGE solution was 20 mM of ammonium acetate in methanol:water (70:30, v/v). We washed the SPE-CE capillary column after the sample loading with aBGE solution for different periods of times ranging between 0 and 3 min. In all cases, we confirmed that naproxen was still retained in the C₁₈ sorbent because no peak corresponding to naproxen appeared during the washing of the SPE-CE capillary column. When the clean-up step was not used the SPE-CE capillary column remained filled with the sample solution at pH 3.5 and naproxen migrated at a longer time. This can be explained because the aBGE has a higher conductivity than water acidified at pH 3.5, and consequently promoted a lower EOF. As lower is the cathodic EOF, less time is necessary for naproxen to migrate towards the detector in the anodic end. When the clean-up step was extended for 3 min, the peak efficiency and the corrected peak area were slightly higher than when 1 min was used. Therefore, 3 min were chosen for further analysis.

3.1.5 Effect of regeneration step

In the literature, different solutions have been used to regenerate the C₁₈ sorbents before they can be reused. In our study, a 2 min flush with methanol at 930 mbar was used and no carry over was observed between analysis.

Figure 5A shows the electropherogram obtained when a 10 mg/l standard solution of naproxen was analysed by CE with normal hydrodynamic injection (50 mbar for 5 s). Figure 5B shows the electropherogram obtained under optimum in-line SPE-CE conditions when a 5 µg·L⁻¹ standard solution of naproxen acidified at pH 3.5 was loaded at 930 mbar for 30 min. As it can be observed from comparison of both electropherograms, a considerable enhancement of the concentration sensitivity is achieved using in-line SPE-CE. On the other hand, the presence of an in-line SPE microcartridge promoted longer migration times and lower peak efficiencies than those obtained in CE (see Fig. 5B) [26]. In general, the presence of the in-line SPE microcartridge could affect the EOF, induce backpressure or promote spreading of the analyte zone during elution with the hydroorganic solution.

3.2 Validation parameters

Under the optimum conditions, standard solutions of naproxen were analysed by in-line SPE-CE in order to determine the linearity, the reproducibility, the sensitivity enhancement and the LOD. The results are shown in Table 1. Linear response was excellent in the 0.5-250 µg/l concentration range, and the correlation coefficient (R²) was higher than 0.996. The reproducibility, as the relative standard deviation (%RSD), was determined at three concentration levels (1, 5 and 10 µg/l) on three different days, after one injection of each solution each day. It was evaluated in terms of concentration, corrected peak area, and

migration time. Results were good and, for example, when a standard solution of 5 $\mu\text{g/l}$ was analysed, the %RSDs

were 1.1%, 1.2% and 1.3% for the concentration, corrected peak area, and migration time, respectively.

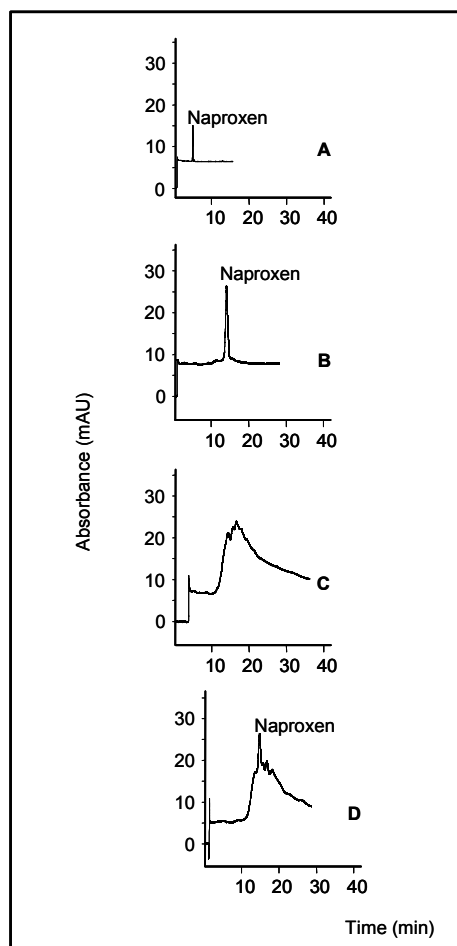


Figure 5. Electropherograms obtained under optimum conditions by after analysing (A) naproxen by CE (a 10 mg/l standard solution was injected at 50 mbar for 5 s); (B) naproxen by in-line SPE-CE (a 5 $\mu\text{g/l}$ standard solution was loaded at 930 mbar for 30 min); (C) a blank of tap water sample by combining off-line SPE with in-line SPE-CE (the tap water sample was loaded at 930 mbar for 30 min); and (D) a tap water sample spiked with 250 ng/l of naproxen by combining off-line SPE with in-line SPE-CE (the spiked

tap water sample was loaded at 930 mbar for 30 min). Other experimental conditions as in the text.

Table 1. Linearity, calibration curve, reproducibility, sensitivity enhancement, and LOD by SPE-CE to enrich naproxen in standard solutions. For details, see text.

Naproxen	
Linearity ($\mu\text{g/l}$)	0.5-250
Calibration curve	$y = 52.82x + 7.25$
R^2	0.996
%RSD (N = 3) (concentration)	
C ¹	1.3
C ²	1.1
C ³	1.0
%RSD (N = 3) (corrected peak area)	
C ¹	3.0
C ²	2.0
C ³	1.0
%RSD (N = 3) (migration time)	
C ¹	1.6
C ²	1.3
C ³	1.0
Sensitivity enhancement⁴	1820
LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.2

¹ Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 1 $\mu\text{g/l}$

² Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 5 $\mu\text{g/l}$

³ Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 10 $\mu\text{g/l}$

⁴ A 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ solution was loaded at 930 mbar for 30 min in in-line SPE-CE and a 10 mg/l solution was injected at 50 mbar for 5 s in CE. A 36 cm x 75 μm (L_r x ID) was used in both cases.

The great potential of the technique was shown by the enrichment factor

obtained after analysing a 10 mg/l and a 10 $\mu\text{g/l}$ of naproxen by CE and in-line SPE-CE, respectively. The sensitivity was improved by 1820-fold when corrected peak area for eluted naproxen in in-line SPE-CE was compared with corrected peak area for naproxen obtained with a normal hydrodynamic injection in CE (50 mbar, 5 s). The LOD, calculated using the signal-to-noise criterion of 3, was 0.2 $\mu\text{g/l}$. Both values were in agreement with the results reported in the literature for in-line SPE-CE of different analytes, where the LODs ranged between 0.2 and 5 $\mu\text{g/l}$ [23-25]. Sensitivity enhancements between 10 and 380-fold have been reported for heterocyclic aromatic amines [24], peptides [22, 25] and doxepin [20] using a C₁₈ sorbent. Better results were obtained for methallothionein [21] and terbutaline [23] where 7000-fold and 1000-10000-fold sensitivity enhancements were achieved, respectively.

3.3 Comparison between the chromatographic and electrophoretic approaches for standard solutions

The results obtained for naproxen by SPE-CE following an in-line chromatographic approach to enhance sensitivity of CE, were compared to those obtained following different in-line electrophoretic approaches based on

sample stacking techniques. Table 2 shows the results reported in our previous works for the analysis of standard solutions of naproxen using different sample stacking techniques [8, 31-34]. The LOD obtained by in-line SPE-CE (0.2 µg/l) was lower than when naproxen was preconcentrated using different sample stacking techniques in micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) (5-40 µg/l) [34], microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC) (5-7 µg/l) [32, 33], and when large-volume sample stacking using the EOF pump (LVSEP) was applied in CZE (16 µg/l) [31]. Only when LVSEP with anion-selective exhaustive injection (LVSEP-

ASEI) and field-amplified sample injection with sample matrix removal using the EOF pump (FAEP) were used in CZE, the LODs obtained were similar to those obtained in this work (0.1-0.2 µg/l) [8]. Probably, because the peak efficiency was higher when these sample stacking techniques were used. In general, as we observed before, from comparison with CE electropherograms, lower peak efficiency is expected in SPE-CE due to the presence of the microcartridge. In contrast, reproducibility using these sample stacking techniques (LVSEP-ASEI and FAEP) was lower (RSD, 15%) because the sample was electrokinetically injected.

Table 2. Results reported in the literature for the analysis of naproxen using different electrophoretic approaches for naproxen stacking in standard solutions and in real water samples

CE mode	Sample stacking technique	Capillary length, 75 µm ID	Standard solutions		Real water samples ¹		Ref.
			Sensitivity enhancement	LOD (µg/l)	Water sample	LOD (ng/l)	
CZE	LVSEP	52 / 43.5 cm	100	16	1000 mL mineral water	2	[31]
	LVSEP-ASEI	52 / 43.5 cm	1150	0.2	---	---	[8]
	FAEP	52 / 43.5 cm	1800	0.1	---	---	[8]
MEKC	SRMM	45 / 36.5 cm	300	7	1000 mL mineral water	70	[34]
	SRMM-ASEI	45 / 36.5 cm	270	5	1000 mL mineral water	50	[34]
	FESI-RMM	45 / 36.5 cm	112	40	1000 mL mineral water	700	[34]
MEEKC	REPSM	45 / 36.5 cm	54	5	---	---	[32]
	SRMP	45 / 36.5 cm	20	7	1000 mL tap water	100	[33]

¹ An off-line SPE pretreatment was used before the analysis by CE.

4 Analysis of tap water samples

In order to show the applicability of the in-line SPE-CE method, we analysed tap

water samples spiked with naproxen at low ng/l levels. In-line SPE-CE was difficult to use directly with these water samples because some of the sample constituents were also retained in the C₁₈ microcartridge and they appeared in the electropherogram as interferences. The water sample was pretreated to produce a clean extract. We used off-line SPE to clean-up the sample matrix and preconcentrate the drug before in-line SPE-CE. A C₁₈ sorbent from a different manufacturer was selected according to our previous results concerning the extraction of naproxen and other NSAIDs from water samples [27, 31, 33, 34]. The extraction process was carried out with 500 ml of tap water, and the recovery achieved was higher than 80%. A blank of the water sample was run first by in-line SPE-CE to verify the absence of peaks at the same migration time of naproxen and no interference was found, see Figure 5C. Figure 5D shows the electropherogram for the tap water sample spiked with 250 ng/l of naproxen when the sample was analysed by off-line SPE followed by in-line SPE-CE. An electrophoretic peak corresponding to the eluted naproxen appears around 14 min as in the electropherogram corresponding to the in-line SPE-CE analysis of a standard of naproxen (Fig. 5B).

The method was used to analyse spiked tap water sample with the drug at different concentrations in order to determine the linearity, the reproducibility, the accuracy, and the LOD. The results are shown in Table 3. The linearity was good, between 20 and 500 ng/l and the correlation

coefficient (R^2) was over 0.98. Reproducibility, expressed as %RSD, was evaluated in terms of concentration, corrected peak area, and migration times. Again, these values were determined at three concentration levels (100, 250, and 400 ng/l) on three different days after the injection of each solution each day. Results were good and similar to those obtained before for the standard solutions by in-line SPE-CE, for example, when a tap water sample spiked with 100 ng/l was analysed, the %RSDs were 1.7%, 4.0% and 2.2%, for the concentration, the corrected peak area, and the migration time, respectively.

The accuracy of the developed method was calculated from the ratio between the concentration of the drug found and the spiked concentration, and then the quotient was multiplied by 100. The accuracy calculated in this way was 99% when a tap water sample spiked with 100 ng·L⁻¹ of naproxen was analysed, see Table 3. The LOD, calculated using a signal-to-noise criterion of 3, was 3 ng/l.

4.1 Comparison between the chromatographic and electrophoretic approaches for tap water samples

The results obtained for naproxen in tap water samples by off-line SPE followed by in-line SPE-CE, were compared to those obtained by off-line SPE followed by different in-line electrophoretic approaches based on sample stacking techniques. Table 2 shows the results reported in our previous works for the analysis of naproxen in real water samples using off-line SPE followed by

different sample stacking techniques [8, 31-34]. Mineral [31, 34] or tap [33] water samples were analysed at that time, and a sample volume of 1000 ml was treated by off-line SPE using the same C₁₈ cartridge employed in this work. In general, the LODs obtained after analysing the clean extract by in-line SPE-CE (3 ng/l, Table 3) were lower than the LOD obtained after using sample stacking techniques (between 50 and 700 ng/l). This is indicative of the limited performance of in-line electrophoretic techniques when samples with complex matrices are analysed. In general, the electrokinetic injection mode makes more difficult the stacking of the anions from real samples because of the different matrix constituents. Thus, it discriminates against low mobility ions and preferentially introduces and stacks higher mobility ions. Only, when the clean extracts were analysed in CZE by LVSEP the LOD was similar (2 ng/l) to that obtained now with in-line SPE-CE [31]. However, in that case 1000 ml of water sample were pretreated by off-line SPE instead of using 500 ml as in this work. Hence, LOD for off-line SPE followed by in-line SPE-CE could be further decreased if a higher volume of sample was used. Anyway, the LOD obtained was low enough to determine naproxen at the concentration found in environmental waters [27-30].

Table 3. Linearity, calibration curve, reproducibility, accuracy, and LOD for the analysis of naproxen by off-line SPE and in-line SPE-CE in spiked tap water samples. For details, see text.

Naproxen	
Linearity (ng/l)	20-500

Calibration curve	$y = 1.66x - 19.30$
R²	0.98
%RSD (N = 3) (concentration)	
C ¹	1.7
C ²	1.5
C ³	1.5
%RSD (N = 3) (corrected peak area)	
C ¹	4.0
C ²	3.0
C ³	3.0
%RSD (N = 3) (migration time)	
C ¹	2.2
C ²	2.0
C ³	1.5
Accuracy (%)⁴	99
LOD (ng·L⁻¹)	3

¹ Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 100 ng/l

² Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 250 ng/l

³ Relative standard deviation (RSD) at a concentration of 400 ng/l

⁴ Tap water sample spiked at 100 ng/l, $n = 3$. Accuracy = 100 [found concentration / spiked concentration]

5 CONCLUDING REMARKS

This paper demonstrates the great potential of in-line SPE-CE using C₁₈ microcartridges for lowering the LOD of CE for the analysis of naproxen in water samples. Once the experimental parameters were optimised, sensitivity for naproxen was enhanced 1820-fold with respect CE and a LOD of 0.2 µg/l was obtained for standard solutions. These great results were mainly due to the large volume of sample loaded into the SPE-CE capillary column. To show the applicability of the in-line chromatographic preconcentration, tap water samples were analysed and

naproxen could be determined at low ng/l levels by using an off-line SPE followed by in-line SPE-CE. Reproducibility in terms of migration times and corrected peak areas of in-line SPE-CE and off-line SPE followed by in-line SPE-CE methodologies were good. Linearity was excellent over approximately three orders of magnitude. In general, slightly better LODs were obtained for naproxen in standard solutions using in-line SPE-CE instead of sample stacking techniques. In addition, as the in-line SPE-CE preconcentration process is less dependent on the sample matrix components, differences with the LODs achieved with sample stacking techniques increased when real water samples were analysed. Only, LOD obtained with LVSEP-CZE were similar to those obtained for naproxen with SPE-CE in standard solutions and real water samples. Using either this in-line electro-phoretic approach or the in-line chromatographic approach developed in this work, naproxen could be determined by CE at the low concentration levels expected in the aquatic environmental samples.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) and (PPQ2002-01276).

6 REFERENCES

- [1] Schweitz, L., Petersson, M., Johansson, T., Nilsson, S., *J. Chromatogr. A* 2000, **892**, 203-217.
- [2] Breadmore, M., Haddad, P., *Electrophoresis* 2001, **22**, 2464-2489.
- [3] Simonet, B., Ríos, A., Valcárcel, M., *Trends in Anal. Chem.* 2003, **22**, 605-613.
- [4] Guzman, N., Phillips, T., *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 61A-68A.
- [5] Smyth, W., *Electrophoresis* 2005, **26**, 1334-1357.
- [6] Klampft, C., *Electrophoresis* 2006, **27**, 3-34.
- [7] Osbourn, D., Weiss, D., Lunte, C., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2768-2779.
- [8] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2004, **25**, 428-436.
- [9] Lin, C., Kaneta, T., *Electrophoresis* 2004, **25**, 4058-4073.
- [10] Larsson, M., Lutz, E., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2859-2865.
- [11] Timerbaev, A., Hirokawa, T., *Electrophoresis* 2006, **27**, 323-340.
- [12] Veraart, J., Lingeman, H., Brinkman, U., *J. Chromatogr. A* 1999, **856**, 483-514.
- [13] Pichon, V., *J. Chromatogr. A* 2000, **885**, 195-215.
- [14] Fritz, J., Macka, M., *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 137-166.
- [15] Poole, C., *Trends in Anal. Chem.* 2003, **22**, 362-373.
- [16] Veraart, J., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U., *J. Chromatogr. B* 1998, **719**, 199-208.

- [17] Mardones, C., Rios, A., Valcarcel, M., *Electrophoresis* 2001, 22, 484-490.
- [18] Veraart, J., Groot, M., Gooijer, C., Lingeman, H., Velthorst, N., Brinkman, U., *Analyst* 1999, 124, 115-118.
- [19] Hinsmann, P., Arce, L., Rios, A., Valcarcel, M., *J. Chromatogr. A* 2000, 866, 137-146.
- [20] Swartz, M., Merion, M., *J. Chromatogr. A* 1993, 632, 209-213.
- [21] Beattie, J., Self, R., Richards, M., *Electrophoresis* 1995, 16, 322-328.
- [22] Dong, M., Oda, R., Strausbauch, M., Wettstein, P., Landers, J., Miller, R., *Electrophoresis* 1997, 18, 1767-1774.
- [23] Petersson, M., Wahlund, W., Nilsson, S., *J. Chromatogr. A* 1999, 841, 249-261.
- [24] Viberg, P., Nilsson, S., Skog, K., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1729-1734.
- [25] Vizioli, N., Rusell, M., Carducci, C., *Anal. Chim. Acta* 2004, 514, 167-177.
- [26] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N. A., *J. Chromatogr. A* 2006, submitted for publication.
- [27] Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, Ll., Vilanova, M., Barceló, D., *J. Chromatogr. A* 2001, 938, 187-197.
- [28] Miao, X., Koenig, B., Metcalfe, C., *J. Chromatogr. A* 2002, 952, 139-147.
- [29] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3441-3449.
- [30] Verenitch, S., Lowe, C., Mazumder, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1116, 193-203.
- [31] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 2779-2787.
- [32] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2005, 26, 970-979.
- [33] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Chromatographia* 2006, 63, 149-154.
- [34] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 234-245.
- [35] Kim, B., Chung, D., *Electrophoresis* 2002, 23, 49-55.
- [36] Tegeler, T., El Rassi, Z., *Anal. Chem.* 2001, 73, 3365-3372.
- [37] Huch, C., Bonn, G., *J. Chromatogr. A* 2000, 885, 51-72.

**2.5 Acoblament de l'electroforesi
capil·lar a l'espectrometria de
masses**

Una altra alternativa per millorar la sensibilitat de la tècnica d'CE és l'ús d'un sistema de detecció més sensible per millorar la capacitat de detecció dels analits. En els últims anys, l'acoblament de l'MS a l'CE està sent una alternativa força estesa perquè aquest detector, apart de proporcionar una elevada sensibilitat, permet obtenir informació tant estructural com del pes molecular dels analits a analitzar i, per això possibilita la identificació dels analits presents en una mostra complexa.

L'estudi que es mostra en aquest apartat es basa en l'ús d'aquest sistema de detecció per la determinació de tres contaminants orgànics emergents en mostres d'aigua de riu i d'aigua procedent d'estacions EDAR. Els analits que es van analitzar van ser el naproxèn, un antiinflamatori, i el bezafibrat i l'àcid clofíbric, que són reguladors de lípids.

A la bibliografia només hi ha un treball on s'empra l'MS acoblada a l'CE per la determinació d'aquests fàrmacs en una mostra d'aigua. Ahrer *et al.* [1] van determinar diferents fàrmacs, com l'àcid clofíbric, el naproxèn, el bezafibrat, el diclofenac sòdic, l'ibuprofèn i l'àcid mefenàmic en aigua de riu realitzant el pretractament de la mostra mitjançant les tècniques LLE i SPE *off-line*, i posterior anàlisi per CE-MS, i els LODs van ser de desenes de ng·L⁻¹.

En el nostre estudi es pretenia determinar tres contaminants orgànics emergents en mostres d'aigua més complexes i per això es van analitzar aigües tant d'entrada com de sortida d'EDAR. L'anàlisi d'aigües de sortida de plantes EDAR permet avaluar l'eficàcia d'aquestes en l'eliminació de diferents tipus de compostos que es poden transferir al medi ambient aquàtic.

Amb aquest objectiu, en primer lloc es va aprofundir en l'estudi dels paràmetres que afecten la resposta de l'MS per tal d'obtenir la màxima sensibilitat i eficàcia, com són la composició i el flux del líquid auxiliar, la temperatura i el flux del gas assecant, la pressió del gas nebulitzador, el

voltatge del capil·lar i el voltatge del fragmentador. L'ESI va ser la tècnica d'ionització emprada. Com a medi de separació es va emprar una solució electrolítica aquosa formada per acetat amònic per la seva compatibilitat amb l'MS i perquè permetia una bona separació dels analits. Emprant aquesta solució electrolítica aquosa, el temps d'anàlisi per la determinació dels tres fàrmacs va ser una mica llarg, de 22 minuts. Amb l'objectiu de disminuir aquest temps, es va addicionar a la solució electrolítica el policatió bromur d'hexadimetrina (HDB) com a modificador de l'EOF. La selecció d'aquest es va fer en base a estudis previs en els que s'observava que no produïa cap efecte negatiu a l'MS [2]. Amb l'addició del HDB, que recobreix les parets internes dels capil·lars de sílice mitjançant la interacció d'aquest amb les càrregues negatives dels analits, s'inverteix el sentit de l'EOF i com a resultat aquest i els fàrmacs migren en el mateix sentit. En aquest cas, la solució electrolítica contenia un 60% de metanol. Emprant aquesta solució electrolítica i optimitzant els paràmetres de l'MS, el temps d'anàlisi va disminuir fins a 14 minuts. Els valors òptims dels diferents paràmetres del MS utilitzant aquest nou electròlit van ser els mateixos que els obtinguts emprant l'electròlit totalment aquós, exceptuant el voltatge del fragmentador. Els LODs que es van obtenir van ser de desenes de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ amb solucions estàndard i utilitzant el mode SIM per l'adquisició de dades.

La metodologia desenvolupada es va validar amb l'anàlisi d'aigua de riu. Prèviament a l'anàlisi d'aquesta aigua, aquesta es va pretractar emprant la tècnica d'SPE *off-line* per netejar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits. Utilitzant un sorbent de C_{18} i pretractant 1000 mL d'aquesta aigua, els LODs que es van obtenir van ser de $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ pels tres fàrmacs. Comparant aquesta metodologia amb la desenvolupada per Ahrer *et al.* [1], es va observar que tot i obtenir LODs similars, en la nostra metodologia el sistema de pretractament de la mostra va ser més senzill i les recuperacions obtingudes van ser lleugerament superiors (70-89%).

Posteriorment, per mostrar l'aplicabilitat del mètode desenvolupat, es van analitzar aigües procedents d'estacions EDAR tant d'entrada com de sortida

amb l'objectiu d'investigar la possible presència d'aquests fàrmacs en aquestes aigües. Es va observar que emprant l'SPE *off-line* i analitzant 1000 mL d'aquestes aigües, les recuperacions eren molt baixes, inferiors al 20%, probablement degut a la complexitat de la matriu de la mostra. Per eliminar o minimitzar les interferències, es va incloure una etapa d'LLE prèvia a l'SPE *off-line*. En aquest cas, analitzant un volum de 250 mL les recuperacions van augmentar fins al 50%. En els electroferogrames corresponents a algunes de les mostres d'aigua analitzades van sortir pics en els mateixos temps de migració que els analits estudiats. Degut a que es treballava en el mode SIM ja que amb full-scan la sensibilitat no era adequada, i que per això no es disposava de suficient informació estructural dels analits presents en aquestes aigües es va realitzar una addició dels fàrmacs en estudi per confirmar realment la seva presència. Així va ser possible detectar i determinar el naproxèn i l'àcid clofibríc a nivells de centenars de ng·L⁻¹. Aquest treball va suposar la primera aplicació en què una aigua tan complexa com les procedents d'estacions EDAR s'analitza per CE.

Els resultats obtinguts en aquest estudi s'inclouen en el treball que s'adjunta a continuació i que ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 25 (2004) 3441.

Bibliografia

- [1] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., J. Chromatogr. A 910 (2001) 69.
- [2] Ahrer, W., Buchberger, W., Monatsh. Chem. 132 (2001) 329.

2.5.1 *Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis – electrospray ionization – mass spectrometry*

DETERMINATION OF SOME ACIDIC DRUGS IN SURFACE AND SEWAGE TREATMENT PLANT WATERS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS-ELECTROSPRAY IONIZATION-MASS SPECTROMETRY

Alba Macià, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar
Departament de Química Analítica i Química Orgànica. Universitat Rovira i Virgili.
Imperial Tàrraco 1, 43005 TARRAGONA, Spain

Abstract

We describe an analytical method involving solid-phase extraction (SPE) and capillary zone electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry (CZE-ESI-MS) for determining some pharmaceutical compounds –naproxen, clofibrac acid and bezafibrate– in real water samples. The electrospray parameters were optimized to maximize sensitivity. When a mixed aqueous-organic solvent and CZE-ESI-MS were used to analyze these drugs in water samples, the capillary was coated with hexadimethrin bromide (HDB) to permanently reverse the EOF. The method was developed from off-line SPE-CZE-MS and was validated with surface water. The detection limits were in the $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for all analytes. The method was applied to analyze water samples from the influent and effluent of a sewage treatment plant. A liquid-liquid extraction step was required before SPE, and the compounds studied were found, some of them between detection and quantification limits.

Keywords: Capillary electrophoresis / Dynamic coated capillaries / Mass spectrometry / Water samples

1 INTRODUCTION

The growing use of pharmaceutical products in general is becoming a new environmental problem. Drug residues, as well as other micropollutants, have become a noteworthy contamination

factor in surface water in recent years. High concentrations of pharmaceutical products can reach sewage treatment plants (STPs), *via* human urinary or fecal excretion, and from pharmaceutical manufacturing discharges. Pharmaceu-tical compounds

are not totally removed in the STPs so variable concentrations can reach surface and groundwater waters [1-3]. The widespread use of these compounds and their potential adverse effects have increased the interest in their determination. The analysis of pharmaceuticals in wastewater and surface water requires new methods to be developed with detection limits in the low $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Drug residues in surface water have mainly been analyzed by GC-MS, despite often requiring derivatization [4-7], LC-MS [8, 9] and LC-MS/MS [10-13]. The analytical methods usually include a preconcentration technique so that the compounds can be determined at low concentrations. Solid phase extraction (SPE) is the most commonly used technique. The compounds were detected in a concentration range from low $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ to low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in STP effluent and rivers [7, 8, 10, 12, 14-16], and $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ in lakes [7, 12]. For example, in Canada some nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), analgesics, and lipid regulators were found in different STP effluents. Naproxen and bezafibrate were detected at a concentration range of a hundred $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and low $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively; whereas clofibrac acid was not observed [10].

In recent years, capillary zone electrophoresis (CZE) has been increasingly used for separating complex mixtures, providing different selectivities and higher efficiencies. Its short analysis time makes it a powerful alternative to chromatographic separations. When CZE is coupled to electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)

more information is obtained because MS detection provides molecular weight and structural information, which is useful for confirmatory purposes. Furthermore, the selectivity and specificity of MS compensate for variations in the migration times of the analytes, a problem frequently encountered in CZE. In general, if a separation technique is coupled with MS, the detection limits are better than those of UV detection, and the interpretation of the analytical results is more straightforward [17, 18].

Recently, CZE applications in non-aqueous solvents (NACE) and a mixed aqueous-organic solvent medium have received considerable attention because the solvents generate a relatively low current and are volatile, which leads to a stable electrospray operation. These facts suggest that CZE-MS experiments will be promising [19-21]. Up to now, only one study has been carried out using CZE-MS to analyze these compounds in water samples. Ahrer *et al.* [22] analyzed different analgesics, anti-inflammatories, and lipid regulators in real water samples with detection limits in the low $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ range. On the other hand, when these compounds were analyzed by LC-MS and LC-MS/MS, the detection limits were below $56 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [8, 9] and below $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ [10-13], respectively.

The water samples have to be pretreated before the analysis to get rid of matrix components and to enrich the analytes. Since these pharmaceutical compounds are detected in a low concentration range in the environmental water, an enrichment

step is needed for determination. The usual technique is to include a SPE step [23-26]. Sometimes, liquid-liquid extraction (LLE) is combined with SPE in particularly complex samples [26].

The aim of our study is to develop a CZE-ESI-MS method for determining a group of acidic drugs in real water samples using SPE as the preconcentration technique. To test the applicability of the method developed, real water was analyzed by LLE and SPE-CZE-MS. For the first time, these compounds were analyzed in STPs (influent and effluent) by CZE-ESI-MS. The drugs analyzed are analgesics/anti-inflammatory agents (na-proxen) and lipid regulators (bezafibrate and clofibrac acid).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and standards

The compounds studied, naproxen, bezafibrate, and clofibrac acid, and hexadimethrin bromide (HDB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sodium hydroxide (98%), hydrochloric acid (95%), and acetic acid (99-100%) were from Prolabo (Bois, France); ammonium acetate was from Sigma-Aldrich; hexane was from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany) and methanol and acetone were from SDS (Peypin, France). Sodium sulfate and ammonia were from Panreac (Barcelona, Spain). Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) was from Fluka (Buchs, Switzerland). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system

(Millipore, Bedford, MA, USA). Individual standard solutions of 1000 mg·L⁻¹ were prepared in methanol. A mixed standard solution of the three drugs was prepared weekly at a concentration of 100 mg·L⁻¹ in methanol. Working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with water:background electrolyte (BGE) (80:20 v/v) for aqueous CZE and methanol:water (60:40 v/v) for mixed aqueous-organic solvent medium to the appropriate concentrations. All solutions were stored in a dark-glass flask at 4°C. The BGEs were daily freshly prepared and filtered through a 0.22 µm nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) before use.

2.2 Equipment

Capillary electrophoresis analyses were performed on a Hewlett-Packard ^{3D}CZE instrument (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) system equipped with a UV diode-array detector operating at 214 nm. The uncoated fused-silica capillaries (Beckman, Palo Alto, CA, USA), had a total length of 100 cm (64.5 cm effective length) and 75 µm I.D. and were thermostatted using a Peltier system at 30°C. MS detection was performed in a single quadrupole HP series 1100 MSD (Agilent Technologies, Barcelona, Spain) equipped with an electrospray interface from Agilent. The interface consisted of a triaxial flow arrangement whereby the CZE eluted was mixed with a suitable sheath liquid at the probe tip and then nebulized using nitrogen gas.

2.3 Procedures

2.3.1 Capillary pretreatments

The capillary wall had to be treated to obtain a consistent and repeatable EOF. At the beginning of each day, for the aqueous CZE system, the capillary was flushed with 0.1 N NaOH for 15 min, then with water for 15 min and finally with the aqueous BGE for 35 min. The BGE solution was 20 mM ammonium acetate (NH_4AcO) adjusted to pH 4.5 with acetic acid. The analytes were dissolved in water:BGE (80:20 v/v). The separation voltage applied was +25 KV. The analysis was carried out in cathodic mode (anode at the inlet). Under these conditions, the anionic compounds migrated to the detection window by the EOF mobility, while their own electrophoretic mobility was in the opposite direction. When the mixed aqueous-organic solvent medium was used, at the beginning of each day the capillary was flushed with 0.1 N NaOH for 15 min, with water for 15 min, then with a solution of 0.001% m/v HDB in methanol for 10 min (to coat the capillary permanently and reverse the EOF), followed by a flush with methanol and water, each for 10 min. Finally it was flushed with the mixed aqueous-organic medium. The BGE solution used was 20 mM ammonium acetate (NH_4AcO) prepared in methanol:water (60:40 v/v). The analytes were dissolved in methanol:water (60:40 v/v). The separation voltage applied was -25 KV. Injection was carried out on the cathodic side; under these conditions, the anionic compounds migrated to the detection window by their own

electrophoretic mobility and EOF mobility (co-electro-osmotic). The electrophoretic mobility was greater than the EOF mobility. Between analyses, the capillaries of both systems (aqueous and mixed aqueous-organic medium) were rinsed for 5 min with BGE. When not in use, the capillaries were flushed with 0.1 N NaOH for 15 min, rinsed with water for 20 min, and flushed and stored in air for 30 min.

2.3.2 ESI-MS

Mass spectra in the full-scan mode were collected by scanning between 80 and 400 m/z . In selected-ion monitoring (SIM) acquisition, the most abundant ions for each compound were monitored. The main ions obtained for each compound, corresponding to the pseudomolecular $[\text{M}-\text{H}]^-$, were 229, 360 and 213 for naproxen, bezafibrate and clofibric acid, respectively. MS was operated in the negative polarity mode by applying a voltage of 4000 V to the ESI needle. For ESI operation, the outlet or exit tip of the capillary was inserted into the interface or sprayer assembly and was allowed to protrude approximately 0.2 mm from the electrospray needle. A mixture of 0.1% ammonia in methanol:water (80:20 v/v) was used as sheath liquid and delivered at $6 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by a Hewlett Packard 1100 series binary pump (Agilent Technologies) equipped with a 1:100 flow splitter. Nitrogen was used as the drying gas at a flow-rate of $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ and as the nebulization gas at a pressure of 15 psi (1 psi = 6894.76 Pa). The temperature was set at 175°C. These conditions were for both

aqueous and mixed aqueous-organic solvent mediums CZE-ESI-MS. The fragmentation voltage was set at 40 V and 50 V in aqueous and mixed

aqueous-organic solvent mediums, respectively. Details of the instrument parameters of CZE-ESI-MS are listed in Table 1.

Table 1. Instrumental conditions for CZE and ESI-MS in aqueous and mixed aqueous-organic solvent medium BGE CZE-ESI-MS conditions

	Aqueous medium	Mixed aqueous-organic solvent medium
CZE		
Background electrolyte	20 mM NH ₄ AcO, pH 4.5 (HAcO)	20 mM NH ₄ AcO dissolved in MeOH:water (60:40 v/v)
Temperature		30°C
Voltage	+ 25 KV	-25 KV
injection	P = 50 mbar, t = 20 s	
MS		
Polarity		Negative
Sheath liquid composition	(MeOH:water, 80:20 v/v)	0.1% NH ₄ OH
Sheath liquid flow rate		6 μL·min ⁻¹
Drying gas flow		10 L·min ⁻¹
Drying gas temperature		175°C
Nebulization gas pressure		15 psi
Voltage		4000 V
Fragmentation voltage	40 V	50 V

2.4 Sample preparation

Samples were collected in dark glass bottles, which were stored at 4°C. Samples (surface water and STP) were filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before the SPE or LLE to eliminate particulate matter. Surface water was preconcentrated and cleaned-up by off-line SPE. The SPE cartridge columns used were from Merck (Darmstadt, Germany) and packed with 500 mg of LiChrolut[®] RP-18 sorbent. The LiChrolut[®] RP-18 cartridges were preconditioned with 6 mL of hexane, 6

mL of acetone and 6 mL of Milli-Q water at pH 2 with hydrochloric acid at a flow-rate of 2 mL·min⁻¹. Then 1000 mL of filtered surface water was loaded at a flow-rate of 10 mL·min⁻¹ through the cartridge. The pH of the sample was adjusted to 2 with hydrochloric acid. The analytes trapped on the column were eluted with 5 mL of methanol. The extract was concentrated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was then redissolved with 500 μL methanol:water (60:40 v/v). When STP samples were analyzed, LLE was used before SPE to preconcentrate and

clean-up the sample. 250 ml STP of influent and effluent waters sample were brought to pH 2 with concentrated hydrochloric acid. After the addition of 25 g sodium sulfate, the samples were extracted twice with 15 mL of a mixture of hexane:MTBE (50:50 v/v). The organic phase was re-extracted twice with 25 mL 2 mM sodium hydroxide solution, brought to pH 2 with hydrochloric acid, and diluted to 100 mL with water, pH 2 [22]. Then, the sample was cleaned-up and pre-concentrated by SPE. The SPE cartridge columns and the procedure used were the same as those for surface water. The clean-up step was carried out using an SPE manifold system connected to a vacuum pump (Teknokroma, Barcelona, Spain).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Aqueous and mixed aqueous organic solvent medium CZE-ESI-MS

To ensure that the CZE system was compatible with MS, ammonium acetate was used as electrolyte in both aqueous and mixed aqueous-organic solvent medium CZE. Because of its volatility, it does not contaminate the CZE-MS interface. First, we analyzed these compounds in the aqueous CZE medium and with MS as the detection system. The electrospray parameters were optimized so that the MS signal was optimal for each compound. ESI parameters were optimized in full-scan mode (scanning from m/z 80-400) by infusing $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ standard solution of each of the analytes in the negative mode through the CZE capillary at a

pressure of 50 mbar for 20 s. The capillary voltage was set at 4000 V. The parameters to be optimized were the sheath liquid composition and flow rate, the drying gas flow rate and temperature, the nebulization gas pressure, the electrospray voltage and the fragmentation voltage. The optimum parameters were considered to be those that gave the best peak sensitivity.

The sheath liquid closes the CZE electrical contact and also increases the liquid flow rate at the CZE outlet so that it is suitable for ESI. An appropriate sheath liquid and flow rate are essential for good coupling performances. The choice of these variables is a compromise between maintaining an efficient electrophoretic separation and improving the ionization performance (*i.e.*, to assisting droplet formation and spray stability). A high content of organic solvent in the sheath liquid has been reported to improve the efficiency of ionic evaporation [27, 28]. Therefore, we optimized this by varying the type (methanol and isopropanol) and percentage (50-80%) of organic solvent. With methanol, we got a better response than with isopropanol. When 80% of methanol was used, the signal was highest, so this percentage of solvent was selected for further experiments. Since the negative mode was used, ammonia was added to the sheath liquid to facilitate the electric contact. Thus, a mixture of water:methanol (20:80 v/v) with 0.1% of ammonia was selected. The sheath liquid was expected to dilute the CZE sample zone as it passed concentrically around the CZE column effluent and

mixed with it but no significant differences were observed in the range from 4-8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Finally, 6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ was selected as optimum in terms of signal response and stability because a sheath liquid flow rate lower than 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ produced an un-stable spray.

The drying gas in ESI is generally used to accelerate buffer desolvation and to increase sensitivity. This parameter was tested in the interval from 5 to 13 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Since the drying gas flow mostly affected the stability of the CZE-MS signal and also slightly affected the intensity, high flow rates were considered to be optimal [29]. In our case, results were best for 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. A drying gas temperature of 175°C was suitable for water desolvation.

In ESI systems, the solvent evaporation process is assisted by a high-voltage system in combination with a nebulization gas. The nebulization gas has been reported to have an aspirating effect, which influences the quality of the separation of the analytes because of a pressure-induced flow [27, 28, 30]. This parameter was tested in the interval from 5 to 15 psi. Increasing the pressure of the nebulization gas improved the ion evaporation process and sensitivity. Thus, the pressure of the nebulization gas was set at 15 psi. We found that the nebulization gas pressure did not affect the migration time or the resolution of these compounds during the CZE separation. Some authors have observed that the migration times were lower and that the resolution was lost when the nebulization gas pressure increased because of decreasing pressure at the

capillary tip, which caused an undesirable hydrodynamic flow inside the capillary [29].

The fragmentation voltage was optimized between 40-200 V. When it was higher than 40 V, more structural information was obtained but the sensitivity was lower. Finally, it was set at 40 V. In these conditions, the most abundant ion for all the compounds was $[\text{M}-\text{H}]^+$. Although the mass spectrometer was used in the full-scan and the SIM modes simultaneously for the optimization purposes, one of the main objectives was to determine these analytes at low concentration levels so the SIM mode was used for purposes of quantification.

Figure 1A shows the CZE-MS electropherogram obtained under SIM acquisition mode when 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of standard mixture was hydrodynamically injected for 20 s at 50 mbar under these optimum conditions. The separation obtained shows that migration times are relatively long. In CZE, there are various ways of reducing migration times, the main ones being the use of organic solvents, EOF modifiers or a buffer system that dynamically coats the inner wall of fused-silica capillaries with a double layer. In this study, a permanent coating of the capillary wall was proposed to reduce migration times. HDB was used as EOF modifier since it is reported to coat the capillary wall permanently but not contaminate the CZE-ESI-MS interface [22]. When this coating was used, the EOF was reversed, which led to fast separations of anionic compounds. HDB strongly

interacts with the negatively charged silica capillary wall due to the presence of many positive charges. The concentration of HDB was 0.001% w/v in methanol because the dynamic coating was found to be stable and reproducible in these conditions [31]. When HDB was used, the BGE was a mixed aqueous-organic solvent medium. In this medium, the electrospray parameters were also optimized so that the MS signal was best for each compound. The optimum parameters were found to be the same

as those for the aqueous medium, except the fragmentation voltage, which was 50 V because at this value sensitivity was better. The mass spectrum of each compound obtained under full-scan mode was similar to that obtained for aqueous medium. Figure 1B shows the CZE-MS electropherogram obtained under SIM acquisition mode when 50 mg·L⁻¹ of standard mixture was hydrodynamically injected for 20 s at 50 mbar in the best experimental conditions.

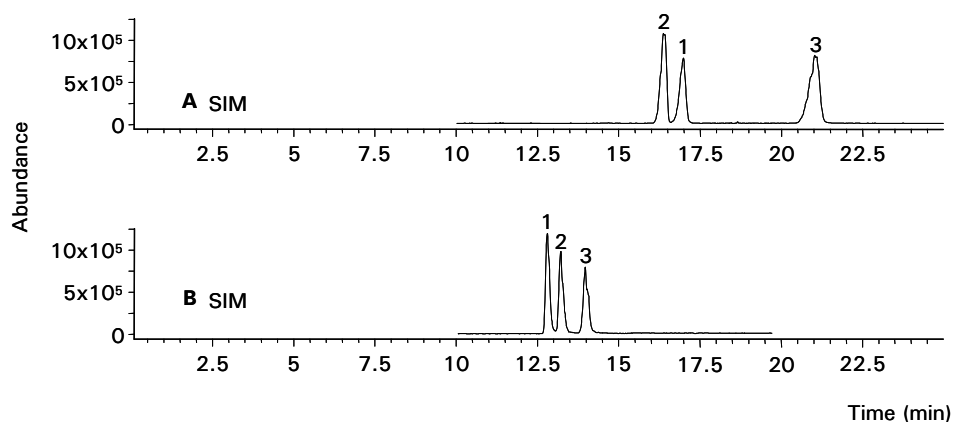


Figure 1. Electropherograms in SIM acquisition mode in (A) aqueous and (B) mixed aqueous-organic solvent mediums CZE-MS of a standard solution of three drugs of 50 mg·L⁻¹. For experimental conditions see text. Peak designation: (1) clofibric acid; (2) naproxen; and (3) bezafibrate

Figures 1A and 1B show considerable differences in the migration times and the migration orders of the analytes. In the aqueous CZE system, the analytes migrate by electroosmotic mobility (see Fig. 1A) and naproxen is the fastest analyte. In mixed aqueous-organic solvent medium, the analytes migrate

by their own effective mobility (see Fig. 1B) and clofibric acid is the fastest analyte. Bezafibrate is the slowest analyte in both mediums. Since migration times are shorter in the mixed aqueous-organic solvent medium, further experiments were carried out under these conditions. Table 2 shows

the linearity and equations of calibration curves, the relative standard deviations (RSDs¹) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs²) and the detection limits (LODs) for standard solutions. Linear responses were excellent in the 100-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.999 for the three compounds. In terms of reproducibility (between days), the

RSDs of the corrected peak area and the migration times were below 10% and 2%, respectively, by analyzing four replicates at 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The LODs calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the 25-70 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ range. The results (LODs) were similar to those of other authors who also analyzed these compounds by HPLC-MS [8] and CZE-MS [22].

Table 2. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, and LODs of mixed aqueous-organic solvent medium CZE-MS in standard solutions

Compound	Linearity ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Calibration curves	%RSD ¹ ($n=4$) (peak area)	%RSD ² ($n=4$) (migration times)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Naproxen	100-1000	$y = 153.3x - 496.3$	8	2	58
Clofibric acid	100-1000	$y = 218.2x - 2221.2$	6	2	70
Bezafibrate	100-1000	$y = 127.4x - 1471.5$	10	2	25

¹ Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas (500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

² Relative standard deviation (RSD) of the migration times (500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

For conditions see text.

Figure 2 shows the electropherogram obtained in the SIM acquisition mode and the extracted ion electropherograms corresponding to the ions selected (molecular ions) for the quantification for each compound. The

standard solution concentration injected was 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Because its sensibility, the MS detector in SIM mode may increase CZE's potential for quantification.

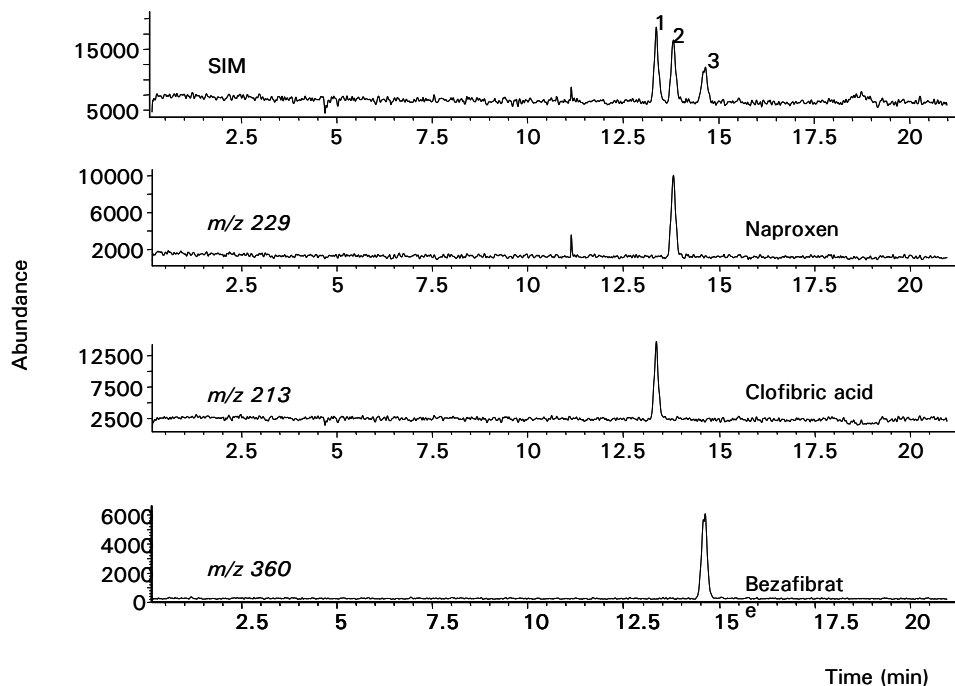


Figure 2. Electropherogram in SIM acquisition mode and extracted ion electropherograms when a standard solution of $500 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was analyzed in mixed aqueous-organic solvent medium capillary electrophoresis. For conditions see text.

3.2 Analysis of real samples

The method developed was validated by the analysis of surface water. In these samples, a pretreatment is necessary before the analytical separation to get rid of matrix components and to enrich the analytes, usual performed by SPE. LiChrolut® RP-18 sorbent was used because of sufficient recoveries for the compounds studied [32]. The recoveries, with their RSDs, were higher than 70% and lower than 4% ($n=4$) (see Table 3). Table 4 shows the linearity and equations of the calibration curves, the relative

standard deviations (RSDs^1) of the corrected peak areas and the migration times (RSDs^2) and the LODs. Linear responses were excellent in the $200\text{--}1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range. The correlation coefficients were greater than 0.998 for the three compounds. Reproducibility, expressed as RSD, was obtained by analyzing four replicates of 1000 mL spiked samples at $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. RSDs^1 were lower than 5% and the RSDs^2 of the corrected peak area were below 13%. The LODs calculated using a signal-to-noise criterion of 3 were in the $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ for all compounds. The LODs obtained for these compounds in

waters samples were similar to those obtained by other authors [7-10,22].

Figure 3 shows an electropherogram of the SIM mode (A), and the extracted ion electropherograms (B) obtained by

spiking 1000 mL of surface water sample with $500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ of the analytes. The differences in the migration times between Figs. 2 and 3 are due to the sample matrix.

Table 3. Recoveries (RSDs in parentheses) obtained by SPE-CZE-MS and LLE-SPE-CZE-MS of surface water and STP influent and effluent water samples

Compound	Surface water	Recoveries (%)	
		STP influent	STP effluent
Naproxen	89 (4)	55 (5)	58 (6)
Clofibric acid	80 (2)	53 (4)	55 (5)
Bezafibrate	70 (3)	50 (4)	51 (5)

Water collected from the effluent and influent of STPs was used to test the applicability of the method. The method was applied to determine these drugs in STP influents and effluents so that its suitability for analyzing environmental samples could be evaluated. Wastewater often carries high amounts of organic carbon in the form of humic acids or similar compounds, which makes the sample pretreatment more difficult, especially when enrichment factors need to be high. When 1000 mL STP water was analyzed by SPE-CZE-MS, the recoveries were lower than 20% because of the complexity of the sample. Hence, it was essential to include further clean-up steps to minimize interferences, which could act as ion suppressors for MS. Therefore, LLE was introduced as a clean-up step before SPE to remove some sample matrix constituents. The sample volume analyzed was reduced to 250 mL. In this way, when the STP influent and

effluent water samples were analyzed by LLE-SPE-CZE-MS, the recoveries with their relative standard deviations were higher than 50% and lower than 6% ($n=4$), respectively (see Table 3). Although recoveries were low, the aim of this study was to show the applicability of the method developed. The STPs were in Reus (Catalonia), and the influent was collected in February 2004 and the effluent in October 2003.

The analysis of various samples revealed that some of the studied analytes (naproxen and clofibric acid) were present. As an example, Fig. 4 shows an electropherogram obtained in the SIM acquisition mode and the extracted ion electropherograms when an STP effluent water sample was analyzed. From these results it can be concluded that pharmaceutical residues are not totally eliminated from STPs and are thus discharged into the environment.

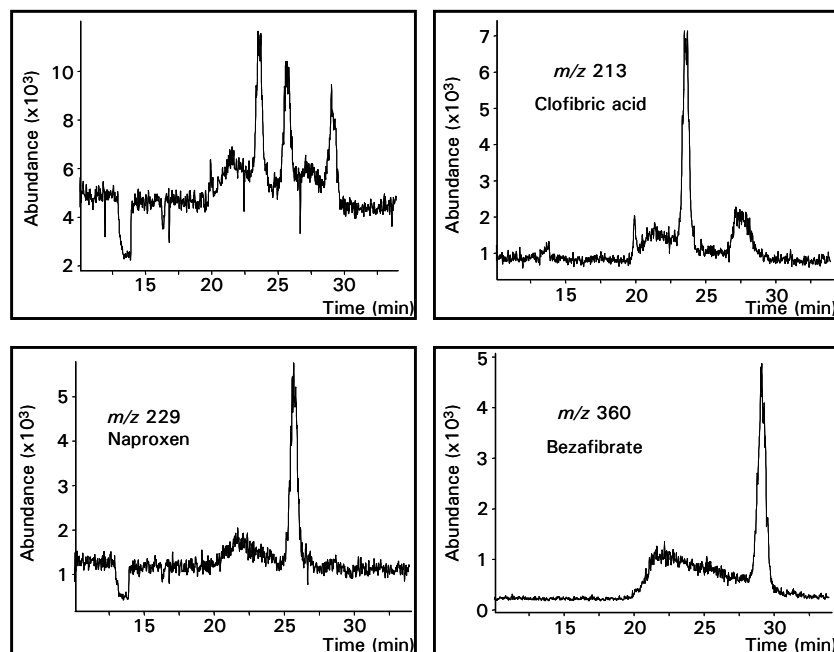


Figure 3. Electropherogram obtained under SIM acquisition mode (A) and extracted ion electropherograms (B) when 1000 mL surface water sample spiked at a concentration of 500 ng·L⁻¹ was analyzed after the SPE enrichment procedure. For condition see text.

Because the sensitivity of the full-scan acquisition mode is low, the presence of the analytes was confirmed by means of their migration times and the extracted ion electropherograms corresponding to the ions selected for quantification. Also, to really confirm their presence, the water sample was spiked with the analytes. The concentrations detected for naproxen and clofibric acid were 232 and 248

ng·L⁻¹, respectively (see Table 5). The RSDs were lower than 13% ($n=3$). Clofibric acid was not quantified in STP influent because the concentration found was below its limit of quantification (LOQ). Bezafibrate was not detected because, although a peak appeared at the same migration time, the concentration found was below its LOD. Thus, bezafibrate could not be quantified.

Table 4. Linearity, calibration curves, reproducibilities (RSD) of peak area and the migration times, and LODs of mixed aqueous-organic solvent medium CZE-MS in standard solutions

Compound	Linearity (ng·L ⁻¹)	Calibration curves	%RSD ¹ ($n=4$) (peak area)	%RSD ² ($n=4$) (migration times)	LOD (ng·L ⁻¹)
Naproxen	200-1000	$y = 236.3x + 23553$	10	4	100
Clofibric acid	200-1000	$y = 402.6x - 10.1$	8	2	100
Bezafibrate	200-1000	$y = 316.3x - 1529.1$	13	5	100

¹ Relative standard deviation (RSD) of the corrected peak areas (500 ng·L⁻¹)

² Relative standard deviation (RSD) of the migration times (500 ng·L⁻¹). For conditions see text.

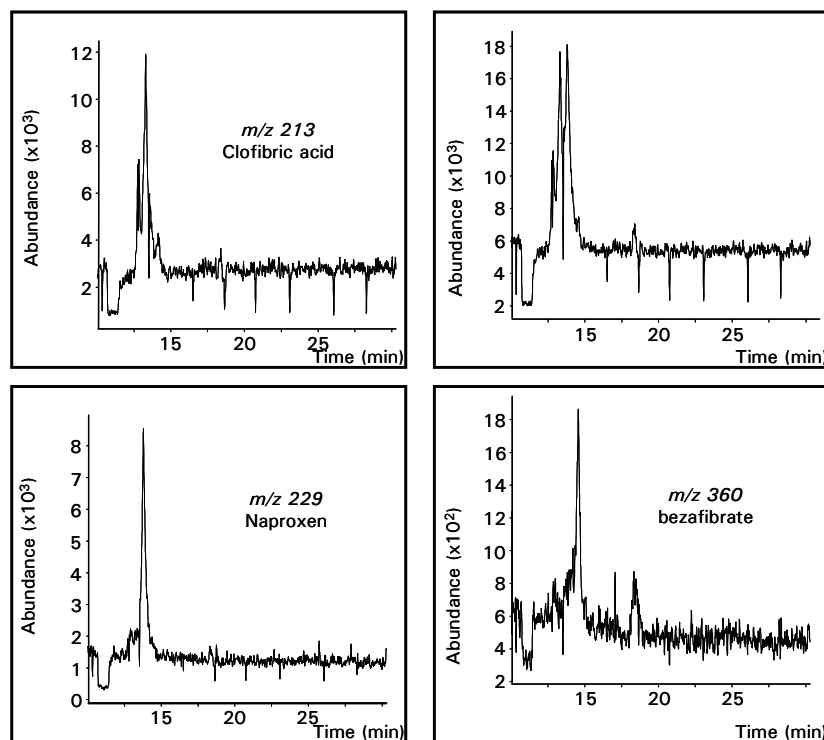


Figure 4. Electropherogram in SIM acquisition mode and extracted ion electropherograms when an STP effluent water sample was analyzed by LLE-SPE-CZE-MS. For conditions see text.

Table 5. Concentration of selected acidic drugs found in STP influent and effluent water in $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ collected in February 2004 and October 2003

Compound	STP influent ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	STP effluent ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
Naproxen	510	232
Clofibric acid	n.q.	248
Bezafibrate	n.d.	n.d.

n.d., not detected
n.q., not quantified (below the quantification limit)

4 CONCLUDING REMARK

In conclusion, off-line SPE-CZE-ESI-MS using HDB to reverse permanently the EOF is proposed for determining acidic drugs in real water samples. When mixed aqueous-organic solvent medium was used with HDB, the migration times were shorter than with aqueous CZE. Once the electrospray parameters had been optimized, the acidic drugs were determined in water samples in the low $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ and the developed method was suitable for analyzing

environmental samples. When STP was analyzed, LLE prior to SPE had to be included to clean-up and preconcentrate the water samples. This method can be an alternative to HPLC-MS for determination of these sorts of drugs in real water samples.

This study was supported by the Spanish Interministerial Commission for Science and Technology (CYCYT) (PPQ2001-1805-CO3-02) and (PPQ2002-01276).

5 REFERENCES

- [1] Stumpf, M., Ternes, T., Wilken, R., Rodriguez, S., Baumann W., *Sci. Total Environ.*, 1999, **225**, 135-141.
- [2] Richardson, S., *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 2831-2857.
- [3] Petrovic, M., Gonzalez, S., Barceló, D., *Trends. Anal. Chem.*, 2003, **22**, 685-696.
- [4] Maurert, H., Tauvel, F, Kraemer, T., *J. Anal. Toxicol.*, 2001, **25**, 237-245.
- [5] Sacher, F., lange, F., Brauch, H., Blankenhorn, I., *J. Chromatogr. A*, 2001, **938**, 199-210.
- [6] Reddersen, K., Heberer, T., *J. Sep. Sci.*, 2003, **26**, 1443-1450.
- [7] Öllers, S., Singer, H., Fässler, P., Müller, S., *J. Chromatogr. A*, 2001, **911**, 225-234.
- [8] Ahrer, W., Scherwenk, E., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 2001, **910**, 69-78.
- [9] Farré, M., Ferrer, I., Ginebreda, A., Figueras, M., Olivella, L., Tirapu, Ll., Vilanova, M., Barceló, D., *J. Chromatogr. A*, 2001, **938**, 187-197.
- [10] Miao, X., Koenig, B., Metcalfe, C., *J. Chromatogr. A* 2002, **952**, 139-147.
- [11] Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T., *J. Chromatogr. A* 2001, **938**, 175-185.
- [12] Marchese, S., Perret, D., Gentili, A., Curini, R., Pastori, F., *Chromatographia* 2003, **58**, 263-269.
- [13] Marchese, S., Gentili, A., Perret, D., Ascenzo, G., Pastori, F., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, **17**, 879-886.
- [14] Ternes, T., *Water Res.*, 1998, **32**, 3245-3260.
- [15] Garrison, A., Pope, J., Allen, F., in: C.H. Keith (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*, ANN Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Michigan 1976, pp. 517-566.
- [16] Hignite, D., Azarnoff, D., *Life Sci.* 1977, **20**, 337-341.
- [17] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3837-3867.
- [18] Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* 2001, **22**, 1251-1266.
- [19] Lu, W., Yang, G., Cole R., *Electrophoresis*, 1995, **16**, 487-492.
- [20] Steiner, F., Hassel, M., *Electrophoresis* 2000, **21**, 3994-4016.
- [21] Riekkola, M., Jussila, M., Porras, S., Valkó, I., *J. Chromatogr. A* 2000, **892**, 155-170.
- [22] Ahrer, W., Buchberger, W., *Monatsh. Chem.*, 2001, **132**, 329-337.

- [23] Poole, C., *Trends. Anal. Chem.*, 2003, 22, 362-373.
- [24] Ternes, T., *Trends. Anal. Chem.*, 2001, 20, 419-434.
- [25] Koester, C., *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2813-2829.
- [26] Wu, X., *Trends. Anal. Chem.*, 2003, 22, 48-58.
- [27] Sheppard, R., Tong, X., Cai, J., Henion, J., *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2054-2058.
- [28] Geiser, L., Cherkaoui, S., Veuthey, J., *J. Chromatogr. A* 2000, 895, 111-121.
- [29] Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1562-1568.
- [30] Severs, J., Smith, R., in: Cole R. (Ed), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry; Fundamentals, Instrumentation and Applications*, Wiley, New York 1997.
- [31] Tjornelund, J., Bazzanella, A., Lochmann, H., Bächmann, K., *J. Chromatogr. A*, 1998, 811, 211-217.
- [32] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2779-2787.

3 RESULTATS I DISCUSSIÓ



Tot i que prèviament a la introducció de cada treball de la Part Experimental de la present Tesi Doctoral s'han presentat els resultats obtinguts, en aquest apartat es pretén comparar i discutir els resultats més importants d'una manera global.

Un primer aspecte important de la discussió dels resultats s'ha centrat en els LODs i els factors de preconcentració que s'han obtingut en aplicar diferents estratègies per millorar la sensibilitat de la tècnica d'CE per la determinació de NSAIDs en solucions estàndard i en mostres reals d'aigua. Un segon aspecte fa referència a l'aplicabilitat de les diferents tècniques de preconcentració estudiades.

El factor de preconcentració s'ha calculat respecte l'augment de l'àrea dels pics en comparació amb l'obtingut en la injecció hidrodinàmica normal, 50 mbar i 5 s. Cal destacar, que la comparació dels resultats s'ha realitzat en termes generals, ja que en tots els treballs la longitud total (L_T) dels capil·lars emprats no ha estat la mateixa.

La Taula 3.1 recull els resultats que s'han obtingut en els diferents treballs, presentats en la Part Experimental d'aquesta Tesi, per l'anàlisi de NSAIDs en solucions estàndard. De manera general, els LODs varien entre desenes i baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, i el factor de preconcentració varia en un interval ben ampli, entre 20 i 1820 vegades. Els LODs més baixos i els factors de preconcentració més elevats s'han obtingut per dues de les tècniques de preconcentració electroforètiques estudiades LVSEP-ASEI i FAEP, i per la tècnica de preconcentració cromatogràfica *in-line* SPE-CE.

Els bons resultats obtinguts en emprar la tècnica LVSEP-ASEI, en la que la mostra s'introdueix hidrodinàmicament i electrocinèticament, i FAEP, en què la mostra s'introdueix electrocinèticament, són deguts a la injecció electrocinètica de la mostra i a la preparació d'aquesta en una matriu de baixa conductivitat com metanol:acetona (40:60 v/v). D'altra banda, la possibilitat d'introduir un volum molt gran de mostra en el

microcartutx, en l'acoblament *in-line* SPE-CE, i realitzar l'elució amb el mateix electròlit de separació electroforètica ha permès l'obtenció d'un LOD similar a l'obtingut amb la tècnica FAEP

Taula 3.1. Resultats obtinguts emprant diferents estratègies per disminuir els LODs per l'anàlisi de NSAIDs en solucions estàndard.

CE mode	Estratègia per disminuir els LODs	Longitud del capil·lar, ID 75 µm	%RSD (àrea)	Factor de preconcentració	LODs (µg·L ⁻¹)
Tècniques de preconcentració electroforètiques					
CZE	LVSEP	52 cm (43.5 cm)	6	85-100	10-35
	LVSEP-ASEI	52 cm (43.5 cm)	15	700-1200	0.2-1.0
	FAEP	52 cm (43.5 cm)	19	1200-1800	0.1-0.4
MEKC	SRMM	45 cm (36.5 cm)	5	146-300	7-25
	SRMM-ASEI	45 cm (36.5 cm)	15	109-270	5-15
	FESI-RMM	45 cm (36.5 cm)	17	37-112	40-65
MEEKC	REPSM	45 cm (36.5 cm)	6	20-43	5-20
	SRMP	45 cm (36.5 cm)	7	51-54	5-15
Tècnica de preconcentració cromatogràfica					
CZE	<i>in-line</i> SPE-CE	36 cm (27.5 cm)	3	1820	0.2
Ús de l'MS com a sistema de detecció					
CZE	CE-ESI-MS	100 cm (64.5 cm)	8	---	58

No obstant, tal i com s'observa a la Taula 3.1, no sempre hi ha una relació directa entre el factor de preconcentració i el LOD obtingut. En aquest fet hi té molta influència l'eficàcia del pic electroforètic, ja que en el cas de pics amb baixa eficàcia, tot i tenir un factor de preconcentració elevat, el LOD pot ser gran. Un exemple de l'esmentat s'observa quan es comparen les tècniques de preconcentració electroforètiques SRMM i SRMP aplicades en MEKC i MEEKC,

respectivament; quan es comparen les tècniques REPSM i SRMP aplicades les dues en MEEKC; i quan es comparen les tècniques LVSEP i SRMM aplicades en CZE i MEKC, respectivament.

Quan es comparen les tècniques SRMM i SRMP s'observa, que tot i obtenir factors de preconcentració més elevats en la tècnica SRMM, els LODs que s'obtenen emprant les dues tècniques són similars. L'elevada eficàcia de la tècnica SRMP s'explica per l'inferior temps d'anàlisi en què els fàrmacs migren respecte la tècnica SRMM, i aquest fet és degut a la més petita quantitat de surfactant SDS necessària per formar una microemulsió en MEEKC respecte a la necessària per formar una micel·la en MEKC.

Un altre exemple és quan es comparen les tècniques de preconcentració electroforètiques REPSM i SRMP, les dues aplicades en MEEKC. Tot i obtenir factors de preconcentració lleugerament més elevats en SRMP que en REPSM, els LODs que s'obtenen emprant les dues tècniques són similars. En aquest cas, l'elevada eficàcia de la tècnica REPSM va lligada a que la banda de l'analit preconcentrada és més estreta que la que s'obté amb la tècnica SRMP. La diferència d'aquestes dues tècniques varia en la manera en què la matriu de la mostra s'elimina del capil·lar. En la tècnica REPSM, la matriu de la mostra s'elimina del capil·lar mitjançant la inversió del sentit de l'EOF fins al punt en què el 95% del capil·lar està ple d'electròlit, moment que es pot controlar fàcilment observant el valor del corrent, i s'obté així una completa eliminació de la matriu de la mostra. En canvi, en la tècnica SRMP la matriu de la mostra s'elimina d'una manera automàtica, mitjançant la supressió de l'EOF, fins el moment en què la μ_e dels analits es fa superior a l'EOF. És possible que en aquest moment hi hagi encara una petita quantitat de matriu de la mostra, la qual pot portar a un lleuger eixamplament de la banda de l'analit preconcentrada. No obstant, tot i aquest lleuger eixamplament, aquesta tècnica presenta l'avantatge que

aplicant un sol voltatge negatiu, es duu a terme d'una manera consecutiva la preconcentració i la separació electroforètica.

L'altre exemple és quan es comparen les tècniques de preconcentració electroforètiques LVSEP i SRMM aplicades en CZE i MEKC, respectivament. Tot i obtenir factors de preconcentració més elevats en SRMM que en LVSEP, els LODs que s'obtenen emprant les dues tècniques són similars. La inferior eficàcia de la tècnica SRMM en comparació amb la tècnica LVSEP pot ser deguda a l'addició d'un solvent orgànic a l'electròlit per tal de millorar la resolució dels fàrmacs. Aquesta addició porta a una disminució de l'afinitat dels analits vers la fase pseudoestacionària i, en conseqüència, a un eixamplament de la banda de l'analit preconcentrada i a una inferior eficàcia del pic.

Tal com s'ha comentat anteriorment, els LODs més petits o els factors de preconcentració més elevats s'han obtingut aplicant les tècniques de LVSEP-ASEI i FAEP en CZE. Contràriament, emprant les mateixes tècniques de preconcentració però aplicades en MEKC, SRMM-ASEI i FESI-RMM, s'obtenen LODs més alts i factors de preconcentració més baixos. Al realitzar aquesta comparació cal tenir en compte que en les tècniques aplicades en MEKC no es pot suprimir l'EOF utilitzant metanol com a solvent de l'electròlit per dos motius, per la destrucció de la micel·la i per la disminució de l'afinitat dels analits vers la fase micel·lar fent disminuir els factors de preconcentració. En el fet d'obtenir LODs alts i factors de preconcentració baixos hi té molta influència la matriu de la mostra, ja que en aquestes tècniques de preconcentració electroforètiques com més gran és la diferència de conductivitat entre la zona de la mostra i de l'electròlit s'obtenen factors de preconcentració més elevats. En emprar les tècniques SRMM-ASEI i FESI-RMM, aquesta diferència de conductivitat és més petita degut a que la mostra s'ha de preparar amb una solució electrolítica diluïda per tal d'injectar electrocinèticament els analits. En aquest cas, en utilitzar un electròlit a pH àcid, pH 2.5, per suprimir l'EOF, els fàrmacs es troben en la seva

forma neutra i per això és necessària l'addició d'una petita quantitat de fase pseudoestacionària a la matriu de la mostra per introduir els analits en el capil·lar emprant aquest tipus d'injecció.

Emprant la tècnica de preconcentració cromatogràfica *in-line* SPE-CE també s'han obtingut LODs baixos, del mateix ordre que l'obtingut amb les tècniques LVSEP-ASEI i FAEP, tal com s'ha comentat anteriorment. Aquest fet és degut a l'elevada quantitat de mostra que s'ha introduït en el capil·lar emprant aquest acoblament *in-line* SPE-CE, 360 μL , en comparació amb 1 μL de mostra que s'ha injectat emprant la tècnica de preconcentració electroforètica LVSEP. No obstant, una dificultat important d'aquest acoblament és la fabricació del microcartutx, que és un procediment laboriós. Addicionalment, degut a la presència d'aquest, l'eficàcia dels pics no és molt elevada i pot portar a una inestabilitat del corrent degut a la formació de bombolles en el seu interior.

L'acoblament de l'MS a l'CE ha permès l'anàlisi de tres compostos orgànics emergents amb LODs de desenes de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sense haver d'injectar un gran volum de mostra en el capil·lar. Mitjançant l'ús d'aquest sistema de detecció, els LODs que es van obtenir van ser similars als obtinguts emprant algunes de les tècniques de preconcentració electroforètiques estudiades.

Després d'aquesta discussió sobre els resultats obtinguts en emprar una estratègia per disminuir els LODs per l'anàlisi de solucions estàndard, es farà el mateix en l'anàlisi de mostres reals d'aigua. En aquestes anàlisis, prèviament a l'aplicació d'una estratègia per disminuir els LODs s'ha emprat la tècnica d'SPE *off-line* per preconcentrar els analits i netejar la matriu de la mostra.

La Taula 3.2 recull els resultats que s'han obtingut en la determinació d'aquests fàrmacs en mostres reals d'aigua. Per algunes tècniques de preconcentració no s'ha realitzat la validació amb mostra d'aigua sinó

que només s'ha mostrat l'aplicabilitat del mètode, i per aquest motiu no es disposa de dades dels LODs. Les mostres d'aigua que s'han preconcentrat són aigua mineral, aigua de l'aixeta, aigua de riu i aigua procedent d'estacions EDAR. Amb l'objectiu d'obtenir LODs baixos, s'han analitzat entre 500 i 1000 mL d'aquestes aigües, exceptuant en l'anàlisi d'aigües d'estacions EDAR en què el volum tractat va ser de 250 mL.

De manera general, els LODs que s'han obtingut, combinant la tècnica d'SPE *off-line* amb una estratègia de preconcentració electroforètica o cromatogràfica, o emprant l'MS en l'anàlisi d'aquestes aigües, varien entre centenars i baixos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Els LODs més baixos s'han obtingut emprant la tècnica de preconcentració electroforètica LVSEP i la tècnica de preconcentració cromatogràfica *in-line* SPE-CE.

Contràriament al que s'observa a la Taula 3.1 en què els LODs emprant una tècnica de preconcentració electroforètica varien dins d'un interval estret, en el cas dels LODs per mostres reals d'aigua hi ha diferències significatives com s'observa a la Taula 3.2. Els LODs emprant la tècnica LVSEP en l'anàlisi de mostres reals d'aigua són entre un i dos ordres inferiors als obtinguts amb les altres tècniques de preconcentració electroforètiques. En aquest fet té molta influència la matriu de l'extracte que s'ha eluït de l'SPE, ja que posteriorment aquest s'ha d'injectar en el capil·lar. A diferència de la tècnica LVSEP aplicada en CZE, en les tècniques aplicades en MEKC i MEEKC la matriu de la mostra ha de ser aigua o una solució electrolítica diluïda. Desafortunadament, aquestes solucions aquoses no es poden utilitzar com a solvent per eluir els analits del sorbent en l'SPE *off-line*. Per aquest motiu, per tal d'obtenir un extracte aquós amb bones recuperacions en les aigües fortificades, es va diluir la solució orgànica eluïda deu vegades en aigua i, com a resultat, els LODs també van ser deu vegades superiors.

En l'aplicació de la tècnica de preconcentració cromatogràfica *in-line* SPE-CE també es van obtenir LODs baixos, del mateix ordre que els obtinguts amb la tècnica LVSEP, si bé en aquesta primera tècnica només cal pretractar 500 mL d'aigua per obtenir els mateixos LODs. Aquest acoblament *in-line* SPE-CE és menys dependent dels components de la matriu de la mostra, ja que les diferències entre els LODs emprant aquesta tècnica de preconcentració i les tècniques de preconcentració electroforètiques augmenten quan s'analitzen mostres d'aigua. Desafortunadament, tot i els bons resultats obtinguts emprant aquest acoblament, aquest presenta les dificultats ja comentades anteriorment.

Taula 3.2. Resultats obtinguts emprant diferents estratègies per disminuir els LODs en la determinació de NSAIDs en mostres reals d'aigua.

CE mode	Estratègia per disminuir els LODs	Longitud del capil·lar, ID 75 µm	%RSD àrea	SPE <i>off-line</i>	LODs (ng·L ⁻¹)
Tècniques de preconcentració electroforètiques					
CZE	LVSEP	52 cm (43.5 cm)	9	1000 mL aigua embotellada	2-9
	SRMM	45 cm (36.5 cm)	10	1000 mL aigua embotellada	70-230
MEKC	SRMM-ASEI	45 cm (36.5 cm)	16	1000 mL aigua embotellada	50-195
	FESI-RMM	45 cm (36.5 cm)	16	1000 mL aigua embotellada	700-1600
MEEKC	SRMP	45 cm (36.5 cm)	10	1000 mL aigua d'aixeta	100-230
Tècnica de preconcentració cromatogràfica					
CZE	<i>in-line</i> SPE-CE	36 cm (27.5 cm)	4	500 mL aigua d'aixeta	3
Ús de l'MS com a sistema de detecció					
CZE	CE-ESI-MS	100 cm (64.5 cm)	10	1000 mL aigua de riu	100
		100 cm (64.5 cm)	---	250 mL aigua EDAR ^a	250-500

^a Determinació de NSAIDs en mostres d'aigua EDAR sense fortificar. S'ha emprat l'extracció LLE previ a la tècnica d'SPE *off-line* per preconcentrar la mostra i netejar la matriu d'aquesta.

D'altra banda, l'acoblament de l'MS a l'CE ha permès la identificació i la determinació de diferents contaminants orgànics emergents en aigua de riu i en aigües procedents d'estacions EDAR a nivells de centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Addicionalment, mitjançant l'ús d'aquest sistema de detecció és possible l'anàlisi d'aquestes aigües més complexes emprant un simple pretractament de la matriu de la mostra com és la tècnica d'SPE *off-line* en l'anàlisi d'aigües de riu, o combinant les tècniques d'LLE i d'SPE *off-line* en l'anàlisi d'aigües procedents d'estacions EDAR.

La present Tesi ha demostrat que l'aplicació d'una estratègia per augmentar la sensibilitat de la tècnica d'CE, combinada prèviament amb la tècnica d'SPE *off-line*, ha permès la determinació d'aquests fàrmacs fins a baixos $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en l'anàlisi de mostres d'aigua, sent aquests resultats comparables amb els obtinguts amb les tècniques cromatogràfiques de HPLC i GC.

4 CONCLUSIONS



Les conclusions derivades dels estudis realitzats en la present Tesi Doctoral són les següents:

1. Diferents tècniques electroforètiques, com l'CZE, la MEKC i la MEEKC han permès la separació de diferents fàrmacs antiinflamatoris NSAIDs.
2. Les tècniques de preconcentració electroforètiques permeten augmentar considerablement la sensibilitat de la tècnica d'CE, solucionant així una de les principals limitacions d'aquesta tècnica de separació.
3. En l'aplicació de les diferents tècniques de preconcentració electroforètiques, les variables més importants a tenir en compte són el mode electroforètic de separació, el solvent de la mostra i el tipus d'injecció.
4. D'entre les diferents tècniques de preconcentració electroforètiques estudiades, les tècniques LVSEP-ASEI i FAEP, aplicades en CZE, que inclouen la injecció electrocinètica de la mostra i la diferència de conductivitat entre l'electròlit i el solvent de la mostra, ofereixen els factors de preconcentració més grans, i també els LODs més baixos.
5. Els LODs de la tècnica d'CE, emprant la injecció hidrodinàmica normal, són de l'ordre de baixos $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, però mitjançant l'aplicació de tècniques de preconcentració electroforètiques i cromatogràfiques és possible l'anàlisi de NSAIDs a nivells de baixos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ i centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard.
6. Tot i l'avantatge de les tècniques de preconcentració electroforètiques basades en la supressió de l'EOF per eliminar la matriu de la mostra del capil·lar, aquestes poden donar un lleuger

eixamplament de la banda de l'analit preconcentrada i, consegüentment, de l'eficàcia del pic, degut a que la matriu de la mostra no s'elimina completament en comparació amb les tècniques de preconcentració electroforètiques basades en la no supressió de l'EOF.

7. Les tècniques de preconcentració electroforètiques aplicades en MEEKC i MEKC no poden augmentar significativament la sensibilitat de la tècnica en l'anàlisi de compostos que tenen una estructura semblant entre sí, com és el cas dels NSAIDs. Aquest fet és degut a la necessitat d'addicionar una quantitat de solvent orgànic a l'electròlit per tal d'obtenir una bona separació que, desafortunadament, fa disminuir l'afinitat dels analits vers la fase pseudoestacionària i, en consegüència, l'eficàcia del pic i el factor de preconcentració.
8. Mitjançant l'aplicació de les tècniques de preconcentració electroforètiques en MEKC i MEEKC basades en l'ús d'un electròlit a pH àcid, per suprimir l'EOF, i en la injecció electrocinètica de la mostra, s'obtenen factors de preconcentració inferiors respecte les mateixes tècniques aplicades per CZE. Aquest fet és degut a la menor diferència de conductivitat existent entre la zona de la mostra i la de l'electròlit, ja que en aquest tipus d'injecció és necessari preparar la mostra en una solució electrolítica diluïda.
9. Un inconvenient de les tècniques de preconcentració electroforètiques basades en la injecció electrocinètica de la mostra, com LVSEP-ASEI i FAEP, són les baixes reproduïbilitats que s'obtenen degut a aquest tipus d'injecció.
10. La tècnica de preconcentració cromatogràfica *in-line* SPE-CE té menys dependència de la matriu de la mostra que les tècniques de preconcentració electroforètiques, ja que una variable important en

la preconcentració d'aquestes últimes es basa en una diferència de conductivitat entre la matriu de la mostra i la de l'electròlit. No obstant, una dificultat d'aquest l'acoblament és la laboriositat en la preparació del microcartutx i en les petites eficàcies dels pics que s'obtenen degut a la presència d'aquest.

11. En l'acoblament *in-line* SPE-CE, emprant una solució electrolítica que conté un elevat percentatge de metanol s'evita l'ús d'un solvent d'elució. En aquest cas, la pròpia solució electrolítica és la responsable d'eluir els analits del microcartutx, apart de ser el medi de separació i, s'evita així, l'ús d'un solvent d'elució incompatible amb el sistema electroforètic. Addicionalment, emprant aquesta solució electrolítica és possible la separació d'analits que tenen un mobilitat electroforètica molt semblant entre sí sent difícil la seva separació en un medi totalment aquós.
12. La combinació de la tècnica d'SPE *off-line* tant a una tècnica de preconcentració electroforètica com a una tècnica de preconcentració cromatogràfica ha permès la determinació de NSAIDs a nivells de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ en mostres aquoses.
13. L'optimització dels diferents paràmetres experimentals de l'MS, com el voltatge del fragmentador, la pressió del nebulitzador, o la composició i el flux del líquid auxiliar han permès la determinació de tres contaminants orgànics emergents a nivells de desenes de $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en solucions estàndard.
14. L'acoblament de l'CE a l'MS, en combinació amb la tècnica d'SPE *off-line*, ha permès la determinació de tres contaminants orgànics emergents en aigua de riu a nivells de centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Addicionalment, combinant aquest acoblament amb l'LLE i l'SPE *off-line* ha permès la identificació i determinació del naproxèn i de

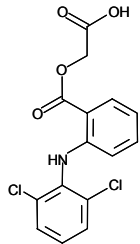
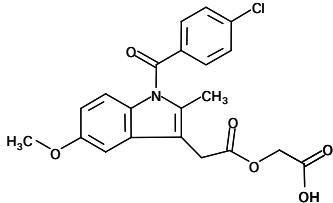
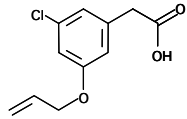
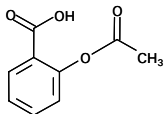
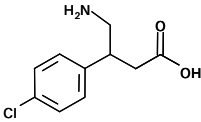
l'àcid clofbric en aigües procedents d'estacions EDAR a nivells de centenars de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

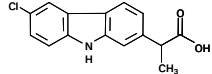
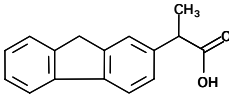
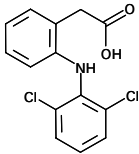
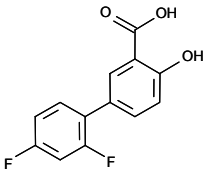
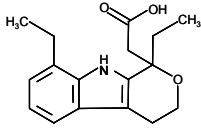
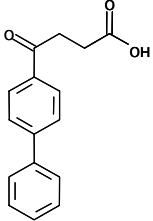
ANNEXOS

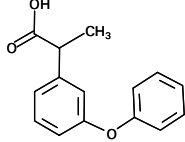
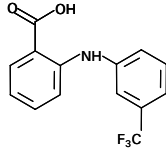
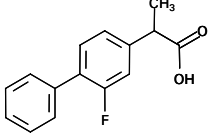
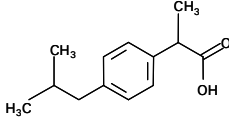
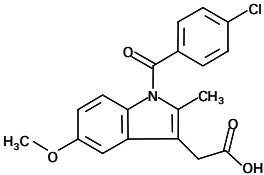
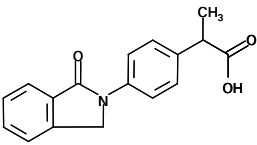
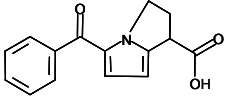


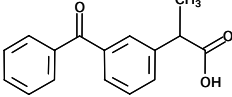
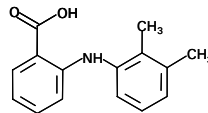
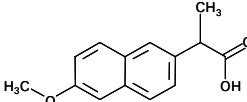
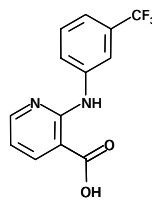
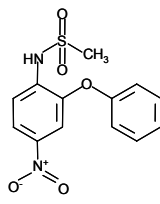
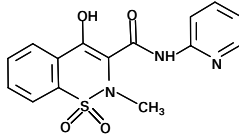
ANNEX I

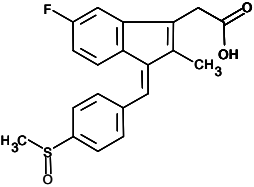
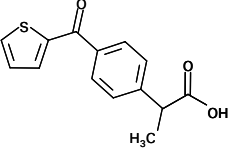
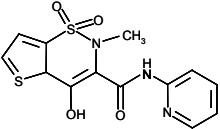
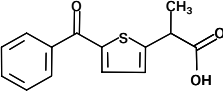
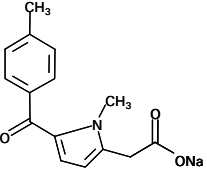
Estructura química i número CAS dels fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (NSAIDs):

NSAID	Número CAS	Estructura
Aceclofenac	89796-99-6	
Acemetacin	53164-05-9	
Alclofenac	22131-79-9	
Aspirin	50-78-2	
Baclofen	1134-47-0	

NSAID	Número CAS	Estructura
Carprofen	53716-49-7	
Cicloprofen	36950-96-6	
Diclofenac sodium	15307-79-6	
Diflunisal	22494-42-4	
Etodolac	41340-25-4	
Fenbufen	36330-85-5	

NSAID	Número CAS	Estructura
Fenoprofen	53746-45-5	
Flufenamic acid	530-78-9	
Flurbiprofen	5104-49-4	
Ibuprofen	15687-27-1	
Indomethacin	53-86-1	
Indoprofen	31842-01-0	
Ketorolac	74103-07-04	

NSAID	Número CAS	Estructura
Ketoprofen	22071-15-4	
Mefenamic acid	61-68-7	
Naproxen	22204-53-1	
Niflumic acid	4394-00-7	
Nimesulide	51803-78-2	
Piroxicam	36322-90-4	

NSAID	Número CAS	Estructura
Sulindac	38194-50-2	
Suprofen	40828-46-4	
Tenoxicam	59804-37-4	
Tiaprofenic acid	033005-95-7	
Tolmetin sodium	64490-92-2	

ANNEX II

Abreviatures utilitzades en la present Tesi:

APCI	tècnica d'ionització a pressió atmosfèrica
APTES	3-aminopropiltriètoxí silà
ASEI	injecció selectiva d'anions
CE	electroforesi capil·lar
CEC	electrocromatografia capil·lar
CG	cromatografia de gasos
cITP-CE	acoblament ITP-CE
CTAC	clorur de cetiltrimetilamoni
CZE	electroforesi capil·lar per zones
C ₂	etilsilica
C ₄	butilsilica
C ₈	octilsilica
C ₁₈	octadecilsilica
DETA	dietilentriamina
EOF	flux electroosmòtic
ESI	ionització d'electrosprai
FAEP	<i>field-amplified sample injection with matrix removal using the EOF pump</i>
FASI	<i>field-amplified sample injection</i>
FESI	<i>field-enhanced sample injection</i>
FESI-RMM	<i>field-amplified sample injection with reversed migrating micelles</i>
FESI-RMP	<i>field-amplified sample injection with reversed migrating pseudostationary phase</i>
HDB	bromur d'hexadimetrina
HPLC	cromatografia de líquids d'alta resolució
ID	diàmetre intern
ITP	isotacoforesi capil·lar
EF	electròlit frontal

ET	electròlit terminal
LLE	extracció líquid-líquid
LVSEP	<i>large volume sample stacking using the EOF pump</i>
LVSS	<i>large volume sample stacking</i>
LOD	límit de detecció
L _T	longitud total
MEEKC	cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica
MES	àcid 2-(N-morfolino)etanesulfònic
MEKC	cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica
MS	espectrometria de masses
MS/MS	MS en tàndem
NSAIDs	<i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i>
PA	poliacrilat
PAA	poliacrilamida
PDMS	polidimetilsiloxà
PEO	òxid de polietilè
PAHs	hidrocarburs aromàtics policíclics
PPY	polipirrol
PS	poliestirè-divinilbenzè
REPSM	<i>reversed electrode polarity stacking mode</i>
SDS	sulfat de dodecil sòdic
SIM	<i>selected-ion monitoring</i>
SPME	microextracció en fase sòlida
SPE	extracció en fase sòlida
SRMM	<i>stacking with reversed migrating micelles</i>
SRMP	<i>stacking with reversed migrating pseudostationary phase</i>
SRW	<i>stacking using reverse migrating micelles and a water plug</i>
tITP	<i>transient ITP</i>
ET	electròlit terminal
Tris	(hidroximetil)aminometà
TTAB	bromur de tetradeciltrimetilamoni
μ _e	mobilitat electroforètica efectiva

μEOF mobilitat electroosmòtica

ANNEX III

Els treballs que han sorgit de la present Tesi Doctoral, inclosos en els capítols 1 i 2, que s'han publicat o estan pendents de publicació en revistes científiques, són els següents:

- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Capillary electroforesis for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, Trends Anal. Chem., (acceptat) (apartat 1.3).
- Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Improving sensitivity by large-volume sample stacking using the electroosmotic flow pump to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis in water samples*, Electrophoresis 24 (2003) 2779 (apartat 2.1.1).
- Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Application of capillary electrophoresis with different sample stacking strategies for the determination of a group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the low $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration range*, Electrophoresis 25 (2004) 428 (apartat 2.1.2).
- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Separation and on-column preconcentration of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by microemulsion electrokinetic capillary chromatography using high-speed separations*, Electrophoresis 26 (2005) 970 (apartat 2.2.1).

- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water samples using microemulsion electrokinetic capillary chromatography under pH-suppressed electroosmotic flow with an on-column preconcentration technique*, *Chromatographia* 63 (2006) 149 (apartat 2.2.1).
- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Different sample stacking strategies to analyze some nonsteroidal anti-inflammatory drugs by micellar electrokinetic capillary chromatography in mineral waters*, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 234 (apartat 2.3.1).
- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *In-line strategies to enhance the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of naproxen in water samples. Chromatographic versus electrophoretic approaches*, *J. Chromatogr. A* (pendent de publicació) (apartat 2.4.1).
- Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*, *Electrophoresis* 25 (2004) 3441 (apartat 2.5.1).

