



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica

**USO DE DIFERENTES SISTEMAS DE DETECCIÓN
ACOPLADOS A LA ELECTROFORESIS CAPILAR**

David Arráez Román

Tesis Doctoral
Granada, 2004

Esta Tesis ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto BQU 2002-03418), el Plan propio de Investigación de la Universidad de Granada y los fondos del grupo FQM-297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación de la Junta de Andalucía.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autor: David Arráez Román

ISBN: 978-84-9163-087-6

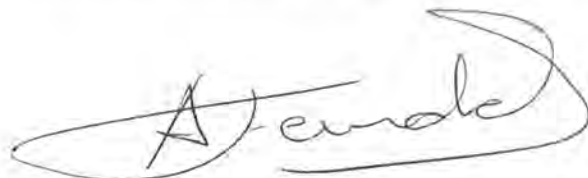
URI: <http://hdl.handle.net/10481/28803>

**USO DE DIFERENTES SISTEMAS DE DETECCIÓN ACOPLADOS A LA
ELECTROFORESIS CAPILAR**

por

David Arráez Román

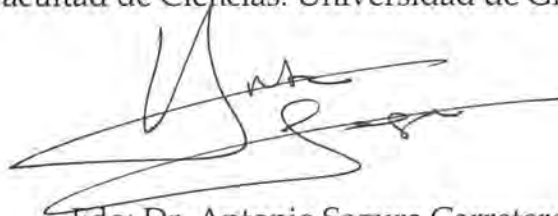
Visado en Granada a 17 de mayo de 2004



Fdo: Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

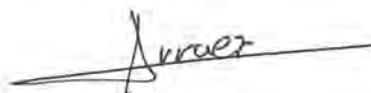


Fdo: Dra. Carmen Cruces Blanco
Profesora Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada



Fdo: Dr. Antonio Segura Carretero
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.



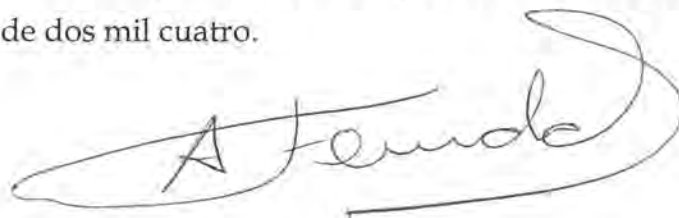
Fdo. David Arráez Román

D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y responsable del Grupo de Investigación FQM 297 "Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario"

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL con el título "USO DE DIFERENTES SISTEMAS DE DETECCIÓN ACOPLADOS A LA ELECTROFORESIS CAPILAR", ha sido realizada bajo mi dirección y la de los doctores Dña. Carmen Cruces Blanco y D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, de la Vrije Universiteit de Amsterdam (Holanda), de la Universidad Autónoma de Madrid y del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC (Madrid) la cual reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada diecisiete de mayo de dos mil cuatro.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A Fernández", with a large, sweeping flourish extending from the end of the name.

Esta, sin duda, es normalmente la primera parte que se lee, pero la última que se redacta, así que bien merece un último esfuerzo resumir mis últimos años vividos en este departamento que más que departamento lo considero ya como mi casa ya que aquí he vivido multitud de nuevas experiencias tanto en lo personal como en lo profesional de gran satisfacción. Es muy poco el espacio que tengo para agradecer a toda la gente que ha hecho posible que, paso a paso, consiga llegar hasta donde hoy estoy. Quiero que sepáis que me ha encantado estar entre vosotros, ¡¡¡sois gente estupenda!!!.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores D. Alberto Fernández Gutiérrez, D. Antonio Segura Carretero y Dña. Carmen Cruces Blanco, que me han llevado de la mano a lo largo de este recorrido. Ellos han sido mis segundos padres, a los que iba con mis problemas durante "el cacharreo", preguntaba mis dudas y con los que compartía los momentos de indecisión. Quiero daros las gracias por tutelar esta memoria, por confiar en mí, por vuestra ayuda, apoyo y por ofrecerme realizar una investigación que como decís "va con mi forma de ser", os estaré siempre agradecidos.

Vamos por partes:

In the first place I wanted to thank to the doctors Cees Gooijer and Freek Ariese from the Vrije Universiteit of Amsterdam by its support, aid and interest in my stay in that marvellous city as is Amsterdam in which I have development a great part of my thesis. Also thank to Koos and Evtim who they taught me in their expertise fields, in the coupling of CE- phosphorescence and CE-Raman spectroscopy, thanks gentlemen for all. I finalize to thank to all the people of the department Mirka, Jeroen, Johannes, Junko, Carmen, Alois, Diego, Eva, Reyer, Arjen.....we will see ourselves again!!!

En Segundo lugar agradecer al Dr. D Alejandro Cifuentes del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC por las enseñanzas recibidas en CE-

espectrometría de masas, la verdad es que algún truco que otro aprendí!! y por darme ánimos cuando "aquello no salía", pero al final se consiguió. De la misma manera agradecer a todo el grupo y la gente con la que me tropecé en la hora del café y en los pasillos, Elena Ibáñez, Miguel, Mario (el chileno), Javier (me dio las primeras nociones en el masas), Carolina (aunque la conocí los últimos días), José Ángel (aupá Atletíiii!!!), Juanma (Er otro Granaino).....es que erais muchos y tantos nombres y a estas alturas de la tesis como que se me olvidan, pero gracias a todos. Upsss!!!! Se me olvidaba...señora García Cañas!!!! Muchas gracias por todo Virgi, tu fuiste la primera que me guiaste por el consejo y por los bares de la capital, nos veremos pues.

Y en tercer lugar agradecer a los doctores D. Manuel Chicharro, Esperanza Bermejo y Alberto Sánchez (ya sé que eres doctor y mereces estar donde te corresponde) y a la doctoranda Mónica Moreno (tranquila, no te agobies) de la Universidad Autónoma y al doctor D. Antonio Zapardiel de la UNED por su constante apoyo, ayuda, dedicación y enseñanzas en el acoplamiento de CE con detección electroquímica que también forman parte de esta tesis y por esas escapadas los viernes al "Ortega Cano", muchas gracias.

Agradecer a mis compañeros de mi grupo de investigación FQM 297, Ale, Soni, Alfonso (tú eres el siguiente), Miguel, Silvia, Jordi y Bea (gracias por tu ayuda y paciencia conmigo Trix) y a los nuevos fichajes Ana y María Luisa que espero que aprovechen y saquen rendimiento en su camino investigador, a todos gracias por vuestra simpatía, risas, cafés, salidas nocturnas compartidas.....¿sigo?, con vosotros se me han hecho más llevadero el tiempo durante este camino, gracias por vuestra ayuda y haber tenido paciencia conmigo en los momentos difíciles, aunque sé que a veces terminabais hasta el gorro de mis nervios, pero lo bueno es que os reláis.

A todos aquellos del Departamento de Química Analítica, Laura, Jorge, Fefo, José Manuel, Francisco y a los de la tercera, Lapre, López, Younes.....gracias por los momentos compartidos.

A mis amigos que, aunque debido a la falta de espacio no puedo nombrar, siempre me estaban preguntando ¿Dónde te vas ahora?, ¿Te vas otra vez?, ¿Cuándo terminas?.

A mi familia, que aunque es la última en nombrar siempre es la primera, por haberme apoyado, aconsejado y haber tomado como vuestras mis decisiones, aunque espero que me perdonéis el tiempo que no he pasado con vosotros y que me necesitabais debido a las estancias y al trabajo diario de la investigación, pero no olvidéis que siempre estaré con vosotros.

Y por último deseo dar las gracias al grupo de investigación FQM 297, al Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada, al Centro de Instrumentación Científica, al proyecto BQU 2002-03418 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y al contrato 2006 de la Consejería de Agricultura y Pesca que han hecho posible la realización de esta memoria.

A todos muchas gracias por ello.

A mis Abuelos

*“La investigación científica consiste en ver
lo que todo el mundo ha visto,
pero pensando
en lo que nadie ha pensado.”*

A. Szent-Györgyi

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Índice | 17 |
| Objeto de la Memoria | 25 |
| Introducción | 29 |
| 1 La electroforesis capilar como técnica de separación | 31 |
| 1.1 Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar | 34 |
| 1.2 Principios de separación | 36 |
| 1.3 Modalidades de electroforesis capilar | 39 |
| 1.3.1 Electroforesis capilar en zona (CZE) | 39 |
| 1.3.2 Cromatografía electrocinética (EKC) | 41 |
| 1.3.2.1 <i>Separación por MEKC</i> | 44 |
| 1.3.2.2 <i>Separación por CD-EKC</i> | 47 |
| 1.3.2.3 <i>Separación por MEKC modificado con CD (CD-MEKC)</i> | 51 |
| 2 Sistemas de detección en electroforesis capilar | 53 |
| 2.1 Detección por técnicas ópticas | 55 |
| 2.1.1 Absorción UV-Visible | 55 |
| 2.1.2 Fluorescencia | 57 |
| 2.1.3 Fosforescencia | 57 |
| 2.1.4 Quimioluminiscencia | 58 |
| 2.1.5 Termoópticos | 59 |
| 2.1.6 Índice de refracción | 59 |
| 2.1.7 Dispersión Raman | 60 |
| 2.2 Detección por espectrometría de masas | 60 |
| 2.3 Detectores electroquímicos | 61 |
| 2.3.1 Detectores Conductimétricos | 61 |
| 2.3.2 Detectores Potenciométricos | 62 |
| 2.3.3 Detectores Amperométricos | 62 |

| | |
|---|----|
| Capítulo I. Determinación de los pesticidas aldicarb, carbofurano y sus metabolitos, en aguas de riego mediante cromatografía electrocinética micelar con detección por batería de diodos y uso de extracción en fase sólida | 65 |
| 1 Objetivo | 67 |
| 2 Antecedentes | 67 |
| 2.1 Potencial de la detección espectrofotométrica en CE | 67 |
| 2.2 Técnicas de preconcentración | 71 |
| 2.3 Los pesticidas un problema ambiental | 72 |
| 3 Parte experimental..... | 73 |
| 3.1 Materiales y métodos | 73 |
| 3.1.1. Analitos, disoluciones y cartuchos de extracción en fase sólida | 73 |
| 3.1.2. Instrumentación..... | 75 |
| 3.1.3. Preacondicionamiento del capilar | 75 |
| 3.2 Resultados y discusión..... | 75 |
| 3.2.1 Desarrollo de la separación electroforética | 75 |
| 3.2.2 Cuantificación mediante MEKC | 78 |
| 3.2.3 Extracción en fase sólida | 78 |
| 3.2.4 Aplicación a muestras ambientales | 79 |
| 4 Conclusiones, ventajas e inconvenientes del acoplamiento | 80 |
| Capítulo II. Determinación del neurotransmisor serotonina en muestras biológicas mediante electroforesis capilar en zona y detección por fluorescencia inducida por láser | 83 |
| 1 Objetivo..... | 85 |
| 2 Antecedentes | 85 |
| 2.1 La fluorescencia inducida por láser como sistema de detección en CE | 85 |
| 2.2 La serotonina como analito de interés | 90 |
| 3 Experimental | 91 |

| | |
|--|------------|
| 3.1 Materiales e instrumentación | 91 |
| 3.1.1 Analito y disoluciones | 91 |
| 3.1.2 Instrumentación..... | 92 |
| 3.1.3 Procedimiento de derivatización | 92 |
| 3.1.4 Procedimiento electroforético | 92 |
| 3.2 Optimización del método propuesto | 93 |
| 3.2.1 Optimización de las condiciones de derivatización..... | 93 |
| 3.2.2 Elección de las condiciones electroforéticas | 95 |
| 3.2.3 Curvas de calibrado | 96 |
| 3.2.4 Aplicación a muestras de orina | 98 |
| 4 Conclusiones, ventajas y desventajas del acoplamiento | 99 |
| | |
| Capítulo III. Determinación de nitrocompuestos de interés ambiental mediante cromatografía electrocinética con ciclodextrinas con detección por fosforescencia atenuada. | 105 |
| 1 Objetivo | 107 |
| 2 Antecedentes | 107 |
| 2.1 Acoplamiento electroforético de la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución..... | 107 |
| 2.2 Importancia del análisis de los nitro-HAPs | 109 |
| 3 Parte experimental..... | 110 |
| 3.1 Materiales y métodos | 110 |
| 3.1.1 Reactivos..... | 110 |
| 3.1.2 Equipo de electroforesis capilar y sistema de detección | 111 |
| 3.2 Resultados y discusión..... | 112 |
| 3.2.1 Desoxigenación de la disolución reguladora/mecanismo de inyección de muestra y separación..... | 112 |
| 3.2.2 Determinación del factor de capacidad | 115 |
| 3.2.3 Separación de los analitos en estudio..... | 118 |
| 3.2.4 Mecanismo de atenuación y sensibilidad | 122 |
| 4 Conclusiones, ventajas e inconvenientes del acoplamiento | 127 |

| | |
|--|------------|
| Capítulo IV. Determinación de colorantes mediante electroforesis capilar en zona acoplada a la espectroscopía Raman resonante con superficie aumentada..... | 131 |
| 1 Objetivo | 133 |
| 2 Antecedentes | 133 |
| 2.1 La detección Raman y la CE..... | 133 |
| 2.2 Interés de los compuestos estudiados..... | 137 |
| 3 Parte experimental..... | 139 |
| 3.1 Materiales y métodos | 139 |
| 3.1.1 Reactivos, analitos y disoluciones..... | 139 |
| 3.1.2 Instrumentación..... | 141 |
| 3.2 Resultados y discusión..... | 142 |
| 3.2.1 Condiciones electroforéticas..... | 142 |
| 3.2.2 Procedimiento de deposición (interfase) | 144 |
| 3.2.3 Estudio comparativo de coloides para registro de espectros Raman | 146 |
| 3.2.4 CE-SERRS | 148 |
| 4 Conclusiones, ventajas e inconvenientes del acoplamiento | 149 |
| Capítulo V. Determinación de herbicidas en aguas mediante cromatografía electrocinética micelar con detección amperométrica | 155 |
| 1 Objetivo | 157 |
| 2 Antecedentes | 157 |
| 2.1 La detección electroquímica y la CE | 157 |
| 2.1.1 Modos de detección electroquímica | 158 |
| 2.2 Interés del análisis de pesticidas..... | 164 |
| 3 Parte experimental..... | 165 |
| 3.1 Materiales y métodos | 165 |
| 3.1.1 Analitos, reactivos y disoluciones..... | 165 |
| 3.1.2 Aparatos y electrodos | 166 |
| 3.2 Resultados y discusión..... | 168 |

| | |
|---|------------|
| 3.2.1 Voltamperogramas cíclicos e hidrodinámicos | 168 |
| 3.2.2 Condiciones analíticas de separación y cuantificación | 169 |
| 3.2.3 Aplicación y recuperación en muestras ambientales de agua.... | 177 |
| 4 Conclusiones, ventajas e inconvenientes del acoplamiento | 179 |
| Capítulo VI. Caracterización de extractos de romero mediante electroforesis capilar en zona con detección por espectrometría de masas... | 189 |
| 1 Objetivo | 191 |
| 2 Antecedentes | 191 |
| 2.1 La espectrometría de masas y la CE..... | 191 |
| 2.1.1 Sistemas de ionización o interfases..... | 192 |
| 2.1.1.1 <i>Ionización por electrospray</i> | 193 |
| 2.1.2 Analizadores | 198 |
| 2.2 Análisis de compuestos funcionales en romero | 201 |
| 3 Experimental | 202 |
| 3.1 Materiales y métodos | 202 |
| 3.1.1 Analitos, reactivos y disoluciones..... | 202 |
| 3.1.2 Extracción acelerada mediante disolventes (ASE) | 203 |
| 3.1.3 Condiciones de HPLC | 204 |
| 3.1.4 Electroforesis capilar..... | 204 |
| 3.1.5 Espectrometría de masas..... | 205 |
| 3.2 Resultados y Discusión | 205 |
| 3.2.1 Desarrollo de un método de CE-ESI-MS para el análisis de extractos de romero | 205 |
| 3.2.2 Comparación entre CE-ESI-MS y HPLC-UV | 210 |
| 3.2.3 Caracterización de los extractos-ASE de romero mediante CE-ESI-MS | 213 |
| 4 Conclusiones, ventajas e inconvenientes del acoplamiento | 215 |
| Conclusiones | 221 |
| Publicaciones derivadas | 229 |

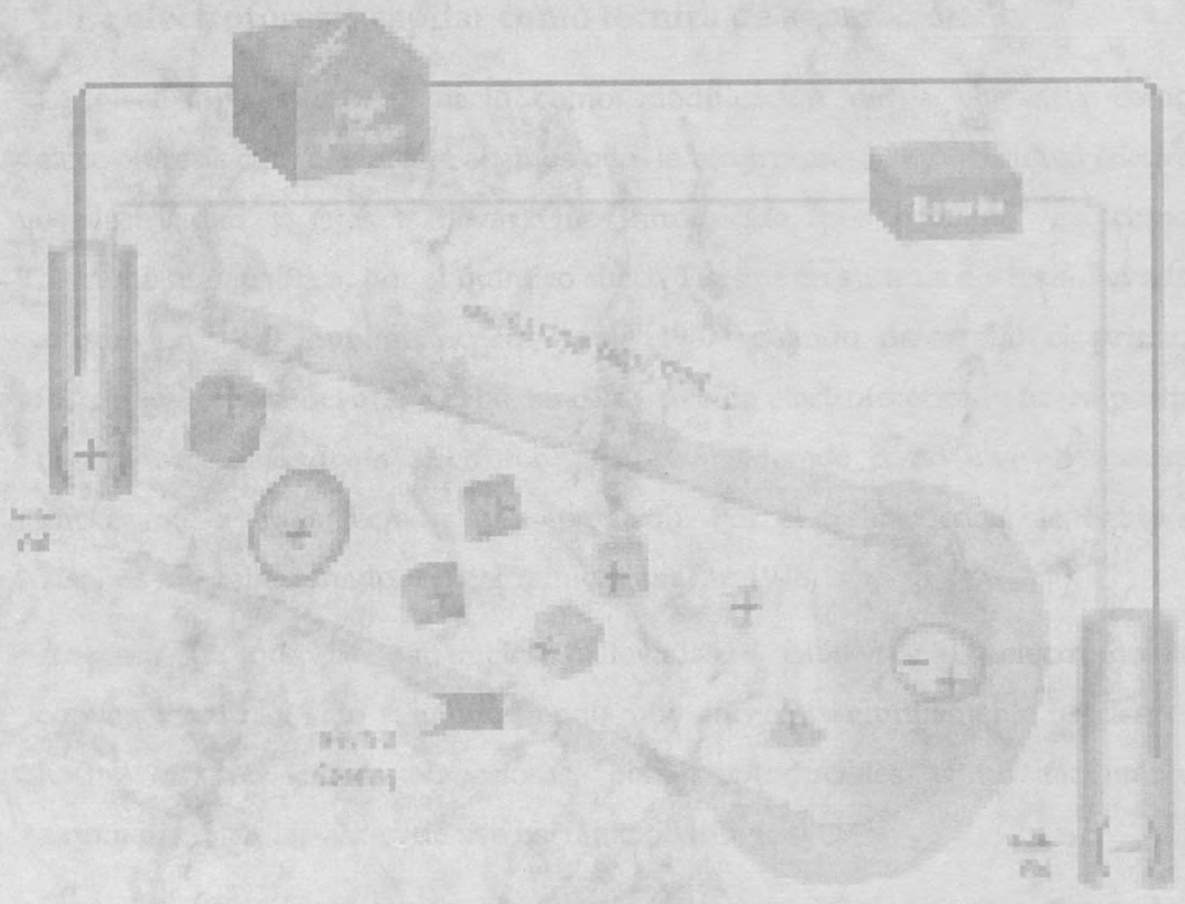
OBJETO DE LA MEMORIA

Objeto de la memoria

El desarrollo de la electroforesis capilar (CE) constituye un campo de investigación fundamental y aplicada muy importante que se está realizando en diferentes grupos de investigación dentro del área de la Química Analítica. Esta técnica puede llevar a cabo la separación de sustancias de diferente naturaleza con tiempos de análisis cortos además de una elevada eficiencia y alta resolución. El empleo de detectores on-line permite realizar análisis empleando cantidades de muestra muy pequeñas y de manera totalmente automatizada. Además, se pueden utilizar diferentes sistemas de detección como los que se mostraran en esta memoria de investigación, y que son: espectroscopía de absorción molecular UV-Visible (UV-Vis), fluorescencia inducida por láser (LIF), fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido (RTPL), la espectroscopía Raman resonante de superficie aumentada (SERRS), detección electroquímica (ED) y espectrometría de masas (MS).

Hoy en día la mayoría de los estudios realizados con técnicas separativas acopladas a diferentes detectores han sido llevados a cabo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC). Teóricamente las diferencias fundamentales entre éstas y la CE radica en el perfil del flujo, siendo laminar y sin gradiente en CE, por presión y con gradiente en HPLC y en los principios de separación. Esta primera diferencia es la que da lugar a las altas eficacias obtenidas por CE, donde se obtienen picos estrechos y, por tanto, una resolución mucho mejor.

El objetivo global de la presente memoria es demostrar la potencialidad de la electroforesis capilar como técnica analítica mediante el acoplamiento a diversos sistemas de detección (UV-Vis, LIF, RTPL, SERRS, ED, MS), estudiar las características y condiciones óptimas de estos acoplamientos y en cada uno de los casos poner a punto métodos analíticos de gran resolución y sensibilidad.



INTRODUCCIÓN

1. La electroforesis capilar como técnica de separación

La electroforesis capilar nació como modificación de la conocida como electroforesis convencional. Sabemos que, la electroforesis convencional (*electro* = electricidad y *foros* = llevar) fue introducida, por primera vez, como herramienta analítica, por el químico sueco Tiselius en su tesis doctoral llevada a cabo en 1930, aunque no fue hasta 1937¹ cuando desarrolló el primer instrumento para llevarla a cabo, su célebre celda electroforética, y fue, a partir de entonces, cuando la electroforesis fue considerada como una alternativa importante a otras técnicas de separación. Por el trabajo con este equipo, Tiselius fue galardonado con el Premio Nobel en 1948.

A pesar de que las separaciones llevadas a cabo por la electroforesis convencional han sido y siguen siendo muy eficaces y ampliamente usadas, el hecho de ser técnicas laboriosas, poco reproducibles y no fácilmente automatizables, las hacen de uso bastante restringido.

Estos inconvenientes de la electroforesis convencional fueron subsanados gracias a la aparición de una alternativa a la celda electroforética que consistió en el empleo de tubos capilares de diámetros muy pequeños. El empleo de estos capilares dio lugar a una nueva forma de electroforesis, denominada Electroforesis Capilar (CE) cuyo fundamento es el mismo que el de la electroforesis convencional, es decir: "las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad en sentido y velocidad en un medio electroforético contenido, en este caso, en pequeños capilares, bajo la acción de un campo eléctrico"²⁻⁵.

La CE fue descrita originalmente como electroforesis libre a finales de los años 60, concretamente en 1967 por Hjertén⁶ cuando empleó capilares de 3 mm de

[1] A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.* 33 (1937) 524

[2] A.G. Ewing, R.A. Wallingford, T.M. Olefirowicz, *Anal. Chem.* 61 (1989) 292.

[3] N.A. Guzmán, L. Y. Hernández, B.G. Hoebel, *BioPharm.* 2 (1989) 22.

[4] B.L. Karger, A.S. Cohen, A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, 492 (1989) 585.

[5] R.A. Wallingford, A.G. Ewing, *Adv. Chromatogr.* 29 (1989) 1.

[6] S. Hjertén, *Chromatogr. Review.* 9 (1989) 122.

diámetro interno, aunque no fue hasta 1974 con Virtanen⁷, y más tarde con Mikkers *y col.* en 1979⁸, cuando se demostraron las ventajas de emplear capilares con diámetros internos de 200 μm para la electroforesis libre. Estos capilares evitaban los fenómenos de convección del medio electroforético, pudiendo trabajar con campos eléctricos mayores y, por tanto, obteniendo mejores eficacias.

A pesar de las ventajas que parecía presentar el empleo de capilares, estas publicaciones no despertaron gran interés y no fue hasta los trabajos de Jorgenson *y col.* en 1981^{9,10} cuando se puede considerar el comienzo de la electroforesis capilar. Así los primeros estudios sobre los principios de funcionamiento de la técnica no aparecieron hasta 1983¹¹, y no se dispuso del primer equipo comercial hasta 1989.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica relativamente reciente, en cuanto a su implantación en los laboratorios, el desarrollo experimentado en los últimos años ha sido espectacular. Las razones para el tremendo interés que ha despertado esta técnica de separación se debe a que presenta enormes posibilidades¹²⁻²⁰ puesto que permite separaciones rápidas y eficaces de componentes cargados y no cargados que se encuentren presentes en cantidades muy pequeñas en la muestra problema. Además de estas

[7] R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.* 123 (1974) 1.

[8] F. Mikkers, F. Everaersts, T. Verheggen, *J. Chromatogr. A*, 169 (1979) 1.

[9] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *J. Chromatogr.* 218 (1981) 209.

[10] J.W. Jorgenson, K.D. Luckacs, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298.

[11] T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.* 264 (1983) 385.

[12] M.V. Davrío, G.P. Blanch, A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, M. de Frutos, M. Herráiz, I.

Martínez Castro, J. Sanz Perucha, *Cromatografía y Electroforesis en Columna*, Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 2000.

[13] A. Cifuentes, J.L. Bernal, J.C. Díez-Masa, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4271.

[14] P. Camilleri, *Chemical Comm.* 16 (1996) 1851.

[15] C. Cruces-Blanco, *Electroforesis Capilar*. Servicio de Publicaciones, Universidad de Almería, (1998).

[16] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc. (1995).

[17] K.D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook*, Vol 52, Humana Press (1996).

[18] H. Poppe, *Theory of Capillary Electrophoresis*, Marcel Dekker, Inc. (1998).

[19] H. Sorensen, S. Sorensen, C. Bjerregard, S. Michaelsen, *Chromatography and electrophoresis in Food Analysis*, RSC Food Analysis Monograph. P.E. Belton (ed.) Norwich (Reino Unido).

[20] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de Separación en Química Analítica*, Ed. Síntesis (2002).

características, quizás las más sobresalientes sean la rapidez, versatilidad y bajo coste derivado de requerir poca cantidad de reactivos y disolventes, lo que constituye un considerable abaratamiento de los análisis, sobre todo, cuando se trata de análisis de rutina.

Estas últimas características, junto con ser una técnica fácilmente automatizable en las distintas etapas del proceso de separación, la hace especialmente atractiva en campos de aplicación tan diversos como la industria alimentaria²¹⁻²⁸, en la determinación de especies de interés en biología molecular como son los péptidos y las proteínas²⁹⁻³³, en análisis clínicos y farmacéuticos³⁴⁻⁴⁰ y en el control ambiental⁴¹⁻⁴⁶. A la vista del número de publicaciones relacionadas con esta técnica en los últimos años, se puede

-
- [21] P.F. Cancalon, *Food Technology* 49 (1995) 52.
 [22] D. Blanco Gomis, L. Laviana González, D. Gutiérrez Álvarez, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 55.
 [23] J.J. Berzas Nevado, C. Guiberteau Cabanillas, A.M. Contento Salcedo, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 63.
 [24] J. Schiewe, Y. Mrestani, R. Neubert, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 255.
 [25] M. Arellano, F. Couderec, P. Puig, *Am. J. Enol. Vitic.* 48 (1997) 408.
 [26] C. Pakin, M. Bergaentzle, V. Hubscher, D. Aoude-Werner, C. Hasselmann, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 87.
 [27] A.L. Cinquina, F. Longo, A. Cali, L. De Santis, R. Baccelliere, R. Cozzani, *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004) 79.
 [28] R.A. Frazier, A. Papadopoulou, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 4095.
 [29] R.T. Kennedy, M.D. Oates, B.R. Cooper, B. Nickerson, J.W. Jorgenson, *Science* 246 (1989) 57.
 [30] L. Hernández, P. Hernández, O. Nieto, *Anal. Comm.* 33 (1996) 425.
 [31] C.A. Monning, R. T. Kennedy, *Anal. Chem.* 66 (1994) 280R.
 [32] R. T. Kennedy, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 163.
 [33] Q.L. Liang, G. Luo, Y.M. Wang, *Chinese J. Anal. Chem., Review*, 31 (2003) 1514.
 [34] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 371.34
 [35] A.G. Espartero, J.A. Pérez-López, A. Zapardiel, E. Bermejo, L. Hernández, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 355.
 [36] J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, J.C. Díez-Masa, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 423.
 [37] S.P. Wang, C.L. Chang, *Anal. Chim. Acta* 377 (1998) 85.
 [38] M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, J.A. Pérez, L. Hernández, *J. Chromatogr. Biom. Appl.* 622 (1993) 103.
 [39] G.K.E. Scriba, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 2409.
 [40] G.K.E. Scriba, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Review*, 27 (2002) 373.
 [41] G. Dinelli, A. Vicari, P. Catizone, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 337.
 [42] Z. El Rassi, *Electrophoresis* 18 (1997) 2465.
 [43] G. M. McLaughlin, A. Weston, K. D. Hauffe, *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 123.
 [44] L. Arce, A. Segura Carretero, A. Ríos, C. Cruces, A. Fernández, M., Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 243.
 [45] A. Fernández-Gutiérrez, C. Cruces-Blanco, S. Cortacero-Ramírez, A. Segura-Carretero, *Chromatographia* 52 (2000) 413.
 [46] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Biergaard, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 1.

afirmar que es una de las técnicas de separación que tiene una mayor expansión actualmente en los laboratorios analíticos y que además dispone de un campo de investigación muy amplio.

1.1. Componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar

Como se ha indicado anteriormente, la CE se basa en el movimiento bajo la acción de un campo eléctrico en un medio electroforético, normalmente acuoso, de las especies cargadas de una muestra. Por ello, los componentes básicos de un equipo de CE (Figura 1) son los siguientes:

- ✓ Generador de alto voltaje
- ✓ Viales fuente, destino y muestra
- ✓ Capilar
- ✓ Sistema de termostatación
- ✓ Sistema de inyección de la muestra
- ✓ Sistema de detección
- ✓ Sistema de registro

Este conjunto de componentes básicos puede ser ampliado con otros como muestreadores automáticos, colectores de fracciones, software diferentes, que son los que marcan las diferencias entre unos instrumentos y otros⁴⁷.

El proceso de separación consiste en introducir los extremos del capilar, lleno de un medio electroforético, que suele ser una disolución reguladora, en unos viales de entrada (fuente) y salida (destino) que se llenan de la misma disolución reguladora, donde se encuentran sumergidos el electrodo positivo (ánodo) y negativo (cátodo), en polaridad normal y al revés en polaridad

[47] R.P. Oda, T.C. Spelsberg, J.P. Landers, *LC-GC* 12 (1994) 50.

reversa, que, a su vez, están conectados a un generador de alto voltaje. En el vial muestra, se coloca la muestra objeto del análisis a su vez una pequeña alícuota de dicha muestra se introduce en el capilar.



Figura 1. Componentes básicos de un equipo de CE.

Para empezar el proceso de separación en la modalidad electroforética más sencilla, la electroforesis capilar en zona (CZE), el ánodo se dispone en el vial muestra y en él se introduce el capilar; se introduce la muestra por alguno de los sistemas de inyección (hidrodinámica o electrocinética) y posteriormente se vuelve a sumergir en el vial fuente y se aplica un campo eléctrico. Los cationes migran hacia el cátodo y los aniones hacia el ánodo, con velocidades que dependen de sus relaciones carga/tamaño. El sistema de detección suele estar colocado junto al cátodo y los diferentes analitos se determinan a su paso por la “ventana” de detección.

1.2. Principios básicos de separación

De forma básica y sin entrar aún en las diferentes metodologías posibles, se puede decir que la migración de las especies químicas dentro del capilar se rige por dos fenómenos, que tienen lugar simultáneamente:

- Electromigración
- Electroósmosis

La electromigración consiste en el movimiento neto de las especies que forman la muestra a través de la disolución reguladora dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico, es decir, afecta de forma individual a cada uno de los analitos que se encuentran en dicho capilar y el resultado es la aparición de la llamada movilidad electroforética directamente proporcional a la relación carga/tamaño de los analitos. El fenómeno de la electromigración se caracteriza por:

- Velocidad electroforética ($v_e = \mu_e V/L$): que es directamente proporcional al campo eléctrico, es decir, cuanto mayor sea el voltaje aplicado, mayor es la velocidad con la que se mueven las especies cargadas e inversamente proporcional a la longitud total del capilar (L).
- Movilidad electroforética ($\mu_e = e/6\pi\eta r$): que no depende del campo eléctrico aplicado sino de una serie de factores relacionados con el medio electroforético, como es la viscosidad (η) y, sobre todo, de la relación carga/tamaño de los analitos presentes en la muestra.
- Tiempo de migración ($t_m = L/v_e = L^2/\mu_e V$): es el tiempo que tarda un analito en moverse desde el punto de inyección a través del capilar hasta el detector y será tanto menor cuanto mayor sea el voltaje aplicado.

Las expresiones que relacionan las tres variables indican que, conociendo parámetros experimentales como el tiempo de migración (t_m), voltaje aplicado (V) y longitud del capilar (L), se puede conocer la velocidad y movilidad

electroforética aparente, es decir, aquella que sólo tiene en cuenta el fenómeno de la electromigración.

La electroósmosis, sin embargo, es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida), dando como resultado un movimiento del conjunto de la disolución reguladora tanto de especies cargadas como no cargadas, que se conoce con el nombre de movilidad electroosmótica. De la existencia del flujo electroosmótico, se derivan una velocidad electroosmótica y una movilidad electroosmótica, de expresiones similares a las obtenidas por electromigración.

Un esquema de la existencia de estos dos fenómenos sobre el movimiento neto de las especies contenidas en una muestra se representa en la Figura 2.

Al existir los dos fenómenos de migración, la velocidad, movilidad y tiempo de migración real de una especie dada, va a ser la suma de las dos contribuciones y en capilares de sílice, el movimiento de los analitos está influenciado por la naturaleza del medio electroforético.

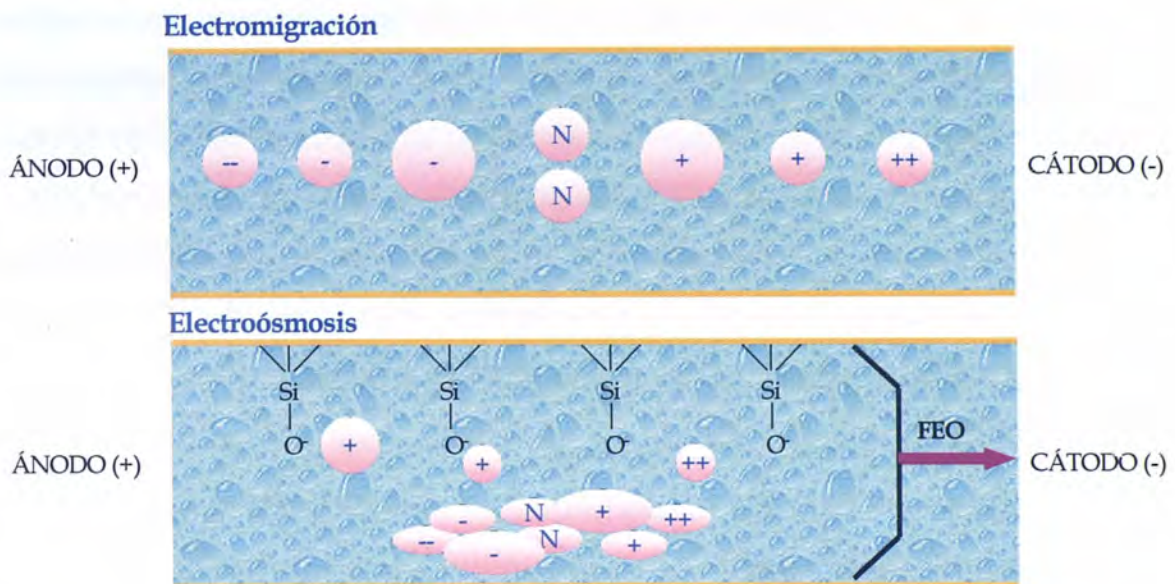


Figura 2. Movilidades electroosmóticas y electroforéticas en la separación de sustancias neutras y cargadas.

Debido a que para que tenga lugar la separación en CE se aplica un campo eléctrico a la disolución que contiene la muestra, el medio electroforético tiene que ser tal que conduzca bien la corriente eléctrica. El más empleado es una disolución reguladora que presente una baja conductividad ya que el efecto térmico se minimiza, pudiendo trabajar con voltajes elevados consiguiendo así buenas resoluciones.

La naturaleza de la disolución reguladora elegida es de vital importancia ya que determina el comportamiento de los analitos, pues estos se afectan enormemente por parámetros tales como el pH, fuerza iónica y composición de la misma.

Junto con la naturaleza del medio electroforético, otra variable que va a afectar en gran medida a la magnitud y dirección del flujo electroosmótico y, por tanto, a la calidad de las separaciones, es la composición del material con que se fabrica el capilar. Éste es la parte más importante de un equipo de CE ya que, gracias a su empleo, se pueden aplicar voltajes elevados, consiguiendo una buena disipación del calor generado y, por tanto, minimizándose el calentamiento debido al efecto Joule.

El principal problema en el uso de capilares en este tipo de separaciones radica en la fabricación de los mismos con diámetros muy pequeños y empleando materiales que presenten buenas propiedades térmicas, químicas y físicas. Generalmente, estos materiales son el teflón, pirex o la sílice fundida siendo éste el más empleado por presentar una buena transparencia a la luz UV y una alta conductividad térmica, aunque el inconveniente es su fragilidad, que queda subsanada mediante el recubrimiento con polímeros de poliimida de espesores comprendidos entre 10-30 μm .

Además del recubrimiento, el diámetro interno, externo y la longitud total del capilar son otros parámetros a optimizar para conseguir una buena resolución. En general, el diámetro interno no debe ser muy grande para que se disipe bien el calor generado dentro del capilar, al igual que le ocurre al diámetro externo, siendo los más habituales los que presentan diámetros internos entre 10-100 μm

y externos de 190-375 μm . En cuanto a la longitud total del capilar, ésta se encuentra relacionada con la resolución y el tiempo de análisis por lo que convendrá trabajar con capilares cortos, de longitudes inferiores a 100 cm⁴⁸, aunque se pueden utilizar otros de mayor longitud.

1.3. Modalidades de electroforesis capilar

Para aumentar la resolución y, por tanto, la selectividad de la determinación, se puede emplear en electroforesis capilar distintos modos de separación entre los que se pueden destacar:

1.3.1. *Electroforesis capilar en zona (CZE)*

La CZE fue introducida por Hjertén en 1985 y es el modo de CE más empleado, debido a su simplicidad y poder de separación, presentando la limitación de ser útil sólo para la separación de especies cargadas¹⁵.

En CZE se utiliza un capilar lleno de una disolución electrolítica que suele ser una disolución reguladora^{49,50}. En esta disolución, los analitos se separan basándose en las diferencias entre sus movilidades electroforéticas, que están relacionadas con su relación carga/tamaño, a un pH determinado. La dirección y la velocidad de migración de los analitos está determinada por los fenómenos de electrofomigración y electroósmosis⁵¹. La electroósmosis se origina por la ionización de los grupos silanoles de la pared interna del capilar de sílice fundida. Estos grupos, a un pH superior a 4, empiezan a estar ionizados, por lo que atraen eléctricamente a los iones con carga positiva de la disolución reguladora formando una doble capa eléctrica. Los iones de la disolución reguladora en la región móvil de la doble capa migran juntos hacia el cátodo cuando se aplica un campo eléctrico e inducen un flujo electroosmótico de todo

[48] J.W. Jorgenson, *Capillary Zone Electrophoresis*, ACS Symp. Serv. 335 (1987) 182.

[49] J.W. Jorgenson, *Trends Anal. Chem.* 3 (1984) 51.

[50] K. Altria, C. Simpson, *Anal. Proc.* 23 (1986) 453.

[51] J.H. Knox, *J. Chromatogr. A.* 680 (1994) 3.

el líquido del capilar. Si la velocidad del flujo electroosmótico hacia el cátodo es mayor que la velocidad de migración electroforética de los analitos aniónicos hacia el ánodo, entonces los aniones y los cationes migrarán en el mismo sentido y podrán ser separados en un mismo análisis (Figura 3).

Hay numerosas aplicaciones de este modo de separación, destacando el análisis de compuestos iónicos solubles en el medio electroforético, incluyendo aniones y cationes inorgánicos⁵²⁻⁵⁶, moléculas pequeñas contenidas en productos farmacéuticos o biomoléculas grandes⁵⁷⁻⁶¹ y en numerosos campos de la Química Analítica⁶⁶⁻⁷².

-
- [52] M.P. Harrold, M.J. Wajtusik, J. Riviello, R. Henson, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 463.
 [53] P.Y. Jandik, W.R. Jones, *J. Chromatogr.* 546 (1991) 431.
 [54] J. Xu, P. Che, Y. Ma, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 287.
 [55] M.A. Friedberg, M.E. Hinsdale, Z.K. Shihabi, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 491.
 [56] K.E. Ferslew, A.N. Hagardorn, M.T. Harrison, W.F. McCormick, *Electrophoresis* 19 (1998) 6.
 [57] R. Lehmann, M. Koch, W. Voelter, H.U. Haring, H.M. Liebich, *Chromatographia* 45 (1997) 390.
 [58] R.D. Macfarlane, P.V. Bondarenko, S.L. Cockrill, I.D. Cruzado, W. Doss, C.J. Mcneal, A.M. Spiekerman, L.K. Watkins, *Electrophoresis* 18 (1997) 179.
 [59] C.R. Jolliff, C.R. Blessum, *Electrophoresis* 18 (1997) 1781.
 [60] Y. Henskens, J. De Winter, M. Pedelharing, G. Ponjee, *Clin. Chem.* 44 (1998) 1184.
 [61] J. Bienvenue, M.S. Graziani, F.A. Rpin, H. Bernon, C. Blessur, C. Marchetti, G. Roighetti, M. Somenzini, G. Vega, F. Agulli, *Clin. Chem.* 44 (1998) 1184.
 [62] D. Kaniansky, M. Masár, V. Madajová, J. Marák, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 179.
 [63] E. Dabek-Zlotorzynska, J.F. Dlouhy, N. Houle, M. Piechowski, S. Ritchie, *J. Chromatogr. A* 706 (1995) 459.
 [64] I. Recio, M. Ramos, L. Amigo, *J. Dairy Res.* 64 (1997) 525.
 [65] S. Pozdniakova, A. Padarauskas, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 41.
 [66] L. Arce, A.S. Carretero, A. Rios, C. Cruces, A. Fernandez, M. Valcarcel
J. Chromatogr. A, 816 (1998) 243.
 [67] Ch.W. Klampfl, *J. Agr. Food Chem.* 47 (1999) 987.
 [68] T. Soga, I. Tajima, D.N. Heiger, *American Lab.* 2000 Agilent Technologies N. 5968-9463E.
 [69] J.M.L. Gallego, J.P. Arroyo, *Anal. Lett.* 35 (2002) 2105.
 [70] L. Cavani, C. Ciavatta, O.E. Trubetskaya, O.I. Reznikova, G.V. Afanaseva, O.A. Trubetskoj,
J. Chromatogr. A 983 (2003) 263.
 [71] A. Bendini, M. Bonol, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, T.G. Toschi, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 425.
 [72] S. Cortacero Ramirez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Hernáinz Bermúdez, A. Fernández Gutiérrez, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 440.
 [73] S. Cortacero Ramirez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M. Hernáinz Bermúdez, A. Fernández Gutiérrez, *Proceeding of the 29th EBC Congress*, 97 (2004) 993, ISBN 90-70143-22-4.

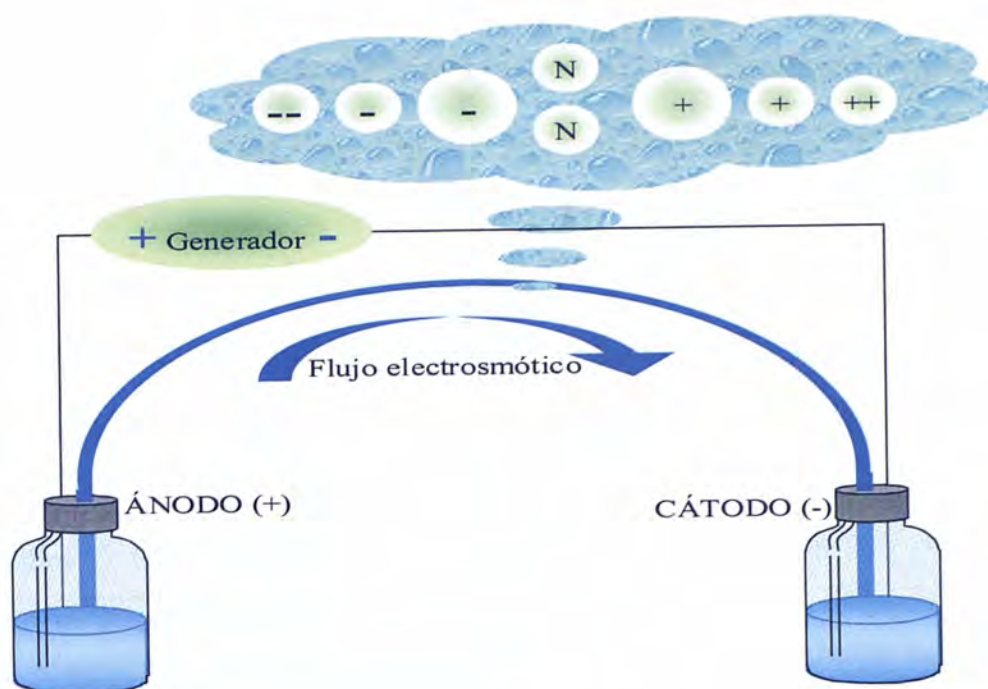


Figura 3. Representación esquemática de la migración de especies en CZE.

1.3.2. Cromatografía Electrocinética (EKC)

Desde los trabajos con electroforesis capilar de Mikkers *y col.* en 1979⁸ esta técnica ha presentado una resolución mayor y en menor tiempo que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) pero presentaba la limitación de ser aplicable sólo a solutos iónicos o cargados. Este hecho cambió cuando Terabe⁷⁴ desarrolló el modo de aplicación denominado EKC.

La EKC constituye otra modalidad de trabajo en CE definida por Terabe como: *"un método de separación analítico que emplea la técnica experimental de la CZE en combinación con los principios básicos de la cromatografía"*⁷⁵. En EKC, además de la disolución reguladora de separación empleada en CZE (fase acuosa), se añade un componente denominado pseudofase que origina la existencia de un fenómeno cromatográfico al existir dos fases (la fase acuosa y la pseudofase) entre las cuales se distribuye el soluto. El fenómeno electrocinético, que incluye

[74] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.

[75] S. Terabe, *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 129.

tanto la electromigración como la electroósmosis, provoca el transporte de la pseudofase y los analitos dentro del capilar^{75,76}.

Los modos de separación en EKC pueden clasificarse según la naturaleza de la pseudofase empleada o el tipo de migración⁷⁶:

a) *Modos de separación en EKC según la naturaleza de la pseudofase empleada.*

La EKC se clasifica generalmente en función de la pseudofase empleada. Se han empleado tensioactivos aniónicos, no iónicos, zwitteriónicos y catiónicos⁷⁷⁻⁸¹, polímeros micelares⁸²⁻⁸⁵, tensioactivos poliméricos⁸⁶ y micelas cargadas *in situ*^{87,88} como pseudofases micelares en cuyo caso se habla de EKC micelar (MEKC). Otras pseudofases utilizadas son las microemulsiones⁸⁹⁻⁹¹, las fases macrocíclicas y macromoleculares⁹², las vesículas⁹³, los resorcarenos⁹⁴, los dendrímeros⁹⁵, los iones poliméricos⁹⁶, los calixarenos^{44,45}, las ciclodextrinas⁹⁷⁻¹⁰⁰, las proteínas¹⁰¹, los antibióticos macrocíclicos¹⁰², los polisacáridos¹⁰³ y los

-
- [76] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 456.
 [77] S. Takeda, S. Wikida, M. Yamane, K. Higashi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 135.
 [78] N. Matsubara, S. Terabe, *Chromatographia*, 34 (1992) 493.
 [79] K. Koezuka, H. Ozaki, N. Matsubara, S. Terabe, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 3.
 [80] D. Crosby, Z. El Razzi, *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 2161.
 [81] S. Takeda, S. Wikida, M. Yamane, K. Higashi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 781 (1996) 11.
 [82] J. Wang, I. M. Warner, *Anal. Chem.* 66 (1994) 37773.
 [83] C.P. Palmer, S. Terabe, *J. Microcol. Sep.*, 8 (1996) 115.
 [84] K.T. Tellman, C. P. Palmer, *Electrophoresis*, 20 (1999) 152.
 [85] I. Peric, E. Kenndler, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 2924.
 [86] H. Ozaki, A. Ichihara, S. terabe, *J. Chromatogr. A*, 709 (1995) 3.
 [87] J.T. Smith, Z. El Razzi, *J. Microcol. Sep.*, 6 (1994) 127.
 [88] Y. Mechref, Z. El Razzi, *J. Chromatogr. A*, 724 (1996) 285.
 [89] L. Vomastova, I. Miksik, Z. Deyl, *J. Chromatogr. B*, 681 (1996) 107.
 [90] S. Terabe, N. Matsubara, Y. Ishihama, Y. Okada, *J. Chromatogr. A*, 608 (1992) 23.
 [91] S.H. Hansen, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 3900.
 [92] S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka, T. Ando, *J. Chromatogr. A*, 332 (1985) 217.
 [93] M. Hong, B. S. Weekly, S. J. Greib, J. P. Foley, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1394.
 [94] K. Baechmann, A. Bazzanella, K.Y. Han, R. Arenque, V. Bohmer, W. Vogt, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1722.
 [95] N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Hosoya, K. Kimata, T. Arai, S. Terabe, *Chem. Lett.*, 9 (1992) 959.
 [96] S. Terabe, T. Isemura, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 650.
 [97] H. Nishi, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 694 (1995) 245.
 [98] I.S. Curie, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 297.
 [99] V. Poinsot, C. Bayle, F. Couderc, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 4047.
 [100] C. Foulon, C. Danel, C. Vaccher, S. Yous, J.P. Bonte, J.F. Goossens, *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 131.
 [101] D.K. Lloyd, A. F. Aubry, E.D. Lorenzi, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 349.

alcaloides¹⁰³. Estos otros modos de EKC se suelen describir añadiendo o anteponiendo las siglas del compuesto del compuesto empleado como pseudofase al término EKC, como por ejemplo, EKC con ciclodextrinas (CD-EKC).

b) Modos de separación en EKC según el tipo de migración.

EKC puede clasificarse según el tipo de migración de los solutos como: (i) EKC con migración normal (NM-EKC), que es el modo de trabajo principal y más común que se caracteriza porque el flujo electroosmótico se mueve más rápidamente que la pseudofase y (ii) EKC con migración inversa (RM-EKC), que se caracteriza porque la pseudofase se mueve más rápidamente que el flujo electroosmótico. El tipo de migración (normal o inversa) puede realizarse básicamente controlando el flujo electroosmótico. En los capilares de sílice fundida no recubiertos se produce la electroósmosis a un pH superior a 4 originándose un flujo electroosmótico catódico. Sin embargo, cuando se emplean pseudofases catiónicas, éstas interactúan con la pared del capilar y se invierte la dirección del flujo electroosmótico. Por otro lado, en capilares no recubiertos a pH inferior a 4 ó capilares recubiertos con poliacrilamida u otros materiales apropiados, el flujo electroosmótico es prácticamente nulo y puede realizarse EKC con migración inversa con pseudofases cargadas¹⁰⁴.

Aunque inicialmente se desarrolló EKC para extender la aplicabilidad de la CZE a solutos neutros, EKC también se ha aplicado a solutos cargados (aniónicos y catiónicos) obteniendo algunas separaciones que en ocasiones no era posible conseguir utilizando CZE¹⁰⁵⁻¹⁰⁹.

[102] D.W. Armstrong, U. B. Nair, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2331.

[103] G. Gübitz, M. G. Schmid, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 179.

[104] G.M. Janini, G.M. Muschik, H.J. Issaq, *Electrophoresis*, 17 (1996) 1575.

[105] K. Otsuka, S. Terabe, T. Ando, *J. Chromatogr. A*, 348 (1985) 39.

[106] C. Luang, J.K. Strasters, M.G. Khaledi, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1646.

[107] M.G. Khaledi, S.C. Smith, J.K. Strasters, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1820.

[108] J.E. Palmer, *J. Chromatogr. A*, 1036 (2004) 95.

[109] S.A. Shamsi, *Electrophoresis, Review*, 23 (2002) 4036.

1.3.2.1. Separación por MEKC.

El carácter hidrófobo de muchos compuestos orgánicos puede relacionarse con su actividad biológica, con su bioacumulación en los seres vivos o con su absorción en suelos. Por tanto, el análisis de compuestos orgánicos hidrófobos es interesante en disciplinas como el diseño de fármacos, la toxicología o el control ambiental^{110,111}.

Debido a la poca solubilidad en agua de los compuestos orgánicos hidrófobos, para llevar a cabo su separación empleando una técnica electroforética es necesario emplear sistemas de EKC con pseudofases relativamente hidrófobas que interaccionen con este tipo de compuestos. En este sentido, se han empleado sistemas micelares de relativa hidrofobicidad que tienen capacidad de interaccionar con este tipo de solutos. Como se acaba de comentar en el apartado anterior, cuando se emplean micelas como pseudofase en EKC se habla de técnicas MEKC. A continuación, se hará un estudio más detallado de esta modalidad de trabajo en CE y de cómo puede modificarse la selectividad de separación con el propósito final de realizar la separación de compuestos orgánicos neutros de diferente hidrofobicidad.

Este modo de trabajo fue introducido por primera vez por Terabe *y col.* en 1984⁷⁴ y aunque en un principio se concibió para ampliar el campo de aplicación de la CZE a compuestos neutros, con posterioridad se ha utilizado para separar tanto solutos neutros como cargados.

Las micelas (Figura 4) son agregados que se forman añadiendo a la disolución reguladora de separación, tensioactivos a una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC). Así se pueden formar micelas normales en las cuales el carácter hidrófobo se encuentra en el interior (cola) y el hidrófilo en el exterior (cabeza) y micelas inversas que ocurre justamente al contrario.

[110] L. Golberg (ed.), *Structure-Activity Correlation as a Predictive Tool in Toxicology*. Hemisphere, Washington D. C. (1983).

[111] C. Hansch, en Ariens, E.J. (Ed.), *Drug Design*, Vol. 1, Academic Press, New York (1971).

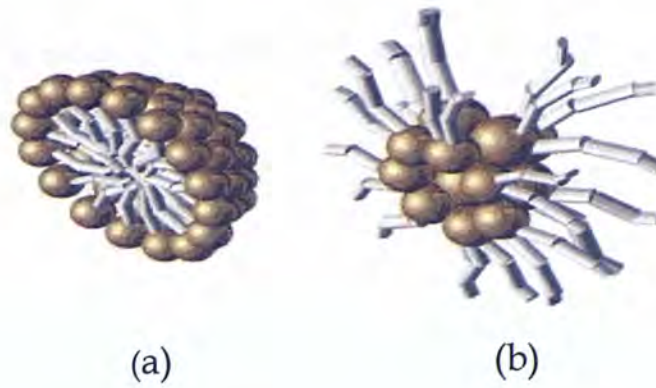


Figura 4. Representación de la estructura de la micela normal (a) e inversa (b).

Estas micelas se mueven a diferente velocidad que el flujo electroosmótico. En esta situación, la separación de analitos neutros se produce por el reparto de éstos entre la fase acuosa y la fase micelar. Se creará un intervalo de elución comprendido entre el tiempo correspondiente al flujo electroosmótico (t_0) y el tiempo de migración de la micela ($t_{PS} = t_m$) de manera que todos los analitos migrarán entre estos dos límites dependiendo de su reparto entre la fase acuosa y la fase micelar. A modo de ejemplo, en la Figura 5 se muestra el principio de separación de un soluto neutro en un sistema de MEKC con micelas aniónicas. En esta figura, se observa que los solutos (N), que no tienen afinidad por el sistema micelar, migrarán a la misma velocidad que el flujo electroosmótico de manera que cuando pasen por la ventana de detección originarán un pico que se registrará a un tiempo de migración correspondiente a t_0 . Por otro lado, las micelas aniónicas migrarán hacia el ánodo de modo que si la velocidad del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad de migración de las micelas en sentido contrario, éstas pasarán por la ventana de detección transcurrido un cierto tiempo. Si se inyecta un soluto (T) que esté totalmente incluido en las micelas, conocido como marcador micelar, la señal correspondiente a este soluto aparecerá a un tiempo de migración t_m . Entre este intervalo de tiempos de migración aparecerán los picos correspondientes a los otros solutos dependiendo de su reparto entre las fases acuosa y micelar. Así, un soluto que

se distribuye entre las fases acuosa y micelar eluirá a un tiempo de migración intermedio entre t_0 y t_m que se ha denominado t_r en la figura.

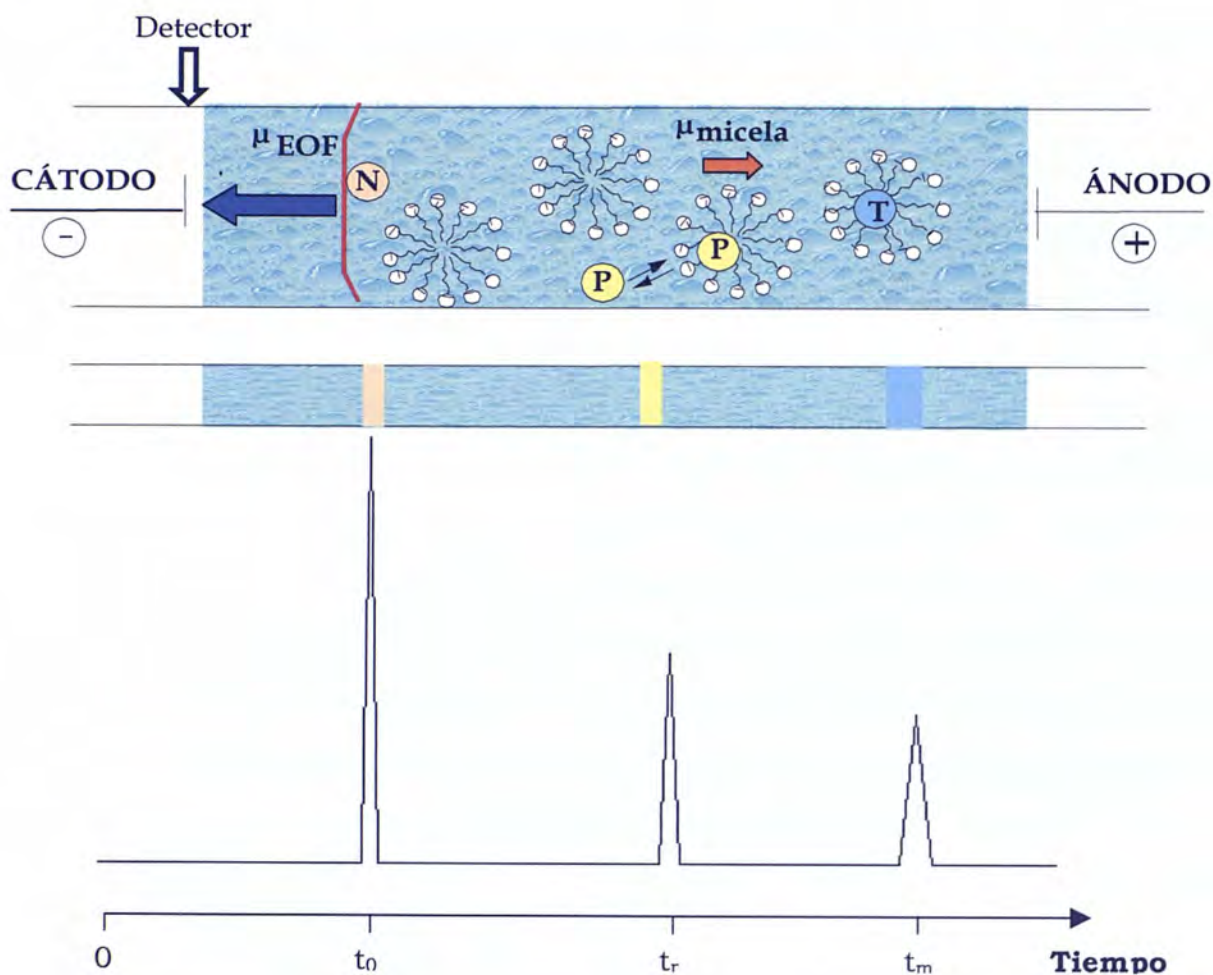


Figura 5. Principio de separación de solutos neutros en MEKC en presencia de un tensioactivo aniónico.

El control de la selectividad de separación en MEKC puede hacerse principalmente cambiando el tipo de tensioactivo o haciendo mezclas de distintos tensioactivos. Además, debido a la estructura dinámica de las micelas (las micelas están en equilibrio con los monómeros de tensioactivo), la agregación de los tensioactivos y el tamaño de las micelas está influenciado por

cambios en la concentración micelar, el pH, la temperatura, la fuerza iónica de la disolución electrolítica y la adición de modificadores orgánicos^{112,113}.

De los distintos tipos de tensioactivos empleados (aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos o poliméricos) los más utilizados son los tensioactivos de cadena alquilada aniónicos, siendo el más ampliamente utilizado el dodecilsulfato sódico (SDS)^{107,114,115}. La popularidad del SDS se debe a su elevada solubilidad en agua, baja CMC, pequeña absorptividad molar en el ultravioleta incluso a bajas longitudes de onda, disponibilidad y bajo coste. Este tensioactivo forma micelas de relativa hidrofobicidad que proporcionan una selectividad adecuada para muchas mezclas de solutos. Para este tensioactivo, se forman micelas esféricas en agua por encima de su CMC de 8.1 mM hasta que por encima de 70 mM las micelas cambian a una forma elipsoidal. El número de agregación para estas micelas esféricas en agua y a la CMC es aproximadamente de 60¹¹⁶. Sin embargo, al añadir un electrolito la CMC disminuye debido a una reducción de las repulsiones electrostáticas entre los grupos de cabeza cargados aniómicamente favoreciendo la formación de la micela. Por otro lado, los alcoholes influyen en el valor de la CMC causando una disminución o un aumento de su valor dependiendo del porcentaje de disolvente añadido. Además, los alcoholes de cadena larga tienden a disminuir la CMC al emplear concentraciones crecientes debido a que se incorporan en las micelas y reducen la repulsión electrostática entre los grupos de cabeza cargados.

1.3.2.2. Separación por CD-EKC.

Las ciclodextrinas (CD) (Figura 6a) son oligosacáridos cíclicos consistentes en seis, siete u ocho unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas por enlace alfa,

[112] K. Otsuka, S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography in Molecular Biotechnology*, Vol. 9, (1998) 253.

[113] M.L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I. E. Valkó, H. Sirén, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 13.

[114] R.D. Holland, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1140.

[115] M.A. García, J.C. Díez-Masa, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 345.

[116] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 89.

correspondiendo a los nombres α -, β - y γ -ciclodextrina respectivamente, aunque estas CD's fueron las primeras y son las más utilizadas, existe en el mercado otro número considerable de ellas con diferentes sustituyentes que le dan diferente solubilidad y les aportan otras características.

La cavidad interna de las CD's tiene carácter hidrofóbico por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con grupos aromáticos y alquílicos. El aumento de la selectividad debido al uso de las ciclodextrinas se atribuye, normalmente, a su capacidad para incluir selectivamente una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas en su cavidad hidrofóbica.

La estabilidad de los complejos de inclusión formados con ciclodextrinas depende de factores como los enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, efectos del disolvente y tamaño y forma de las moléculas. La efectividad en el uso de las CDs para aumentar la selectividad depende del tamaño y geometría de la molécula invitada, con respecto a las dimensiones de la cavidad de la CD.

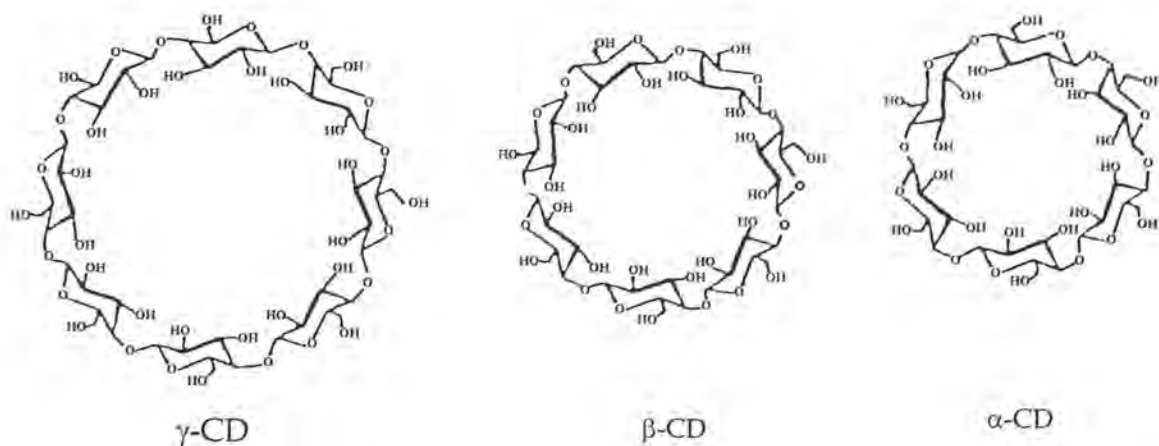


Figura 6a. Estructura química de las ciclodextrinas.

Su característica forma de toroide (Figura 6b) se debe a la conformación tipo C1 de los residuos individuales de glucosa y sus enlaces en posición α -1,4^{117,118}.

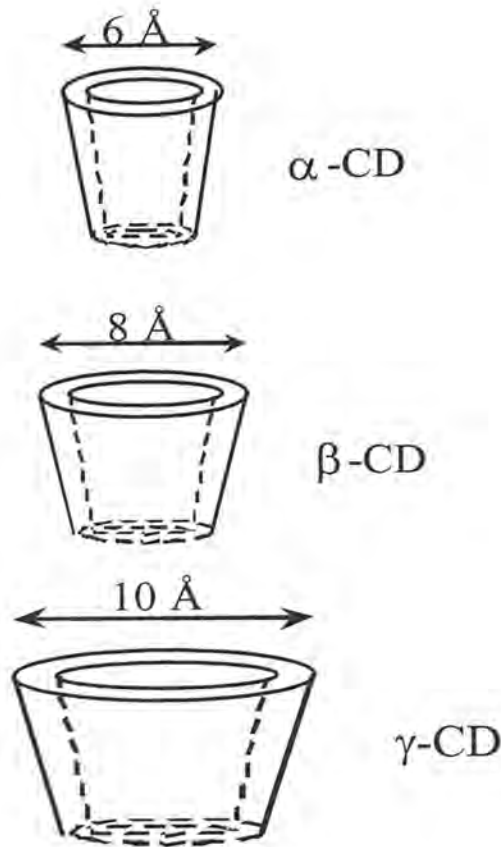


Figura 6b. Estructura funcional y propiedades estructurales de la α , β y γ -CD.

El desarrollo y comercialización en los últimos años de numerosos derivados de ciclodextrina (obtenidos a partir de las ciclodextrinas nativas) ha permitido: (i) aumentar la solubilidad en agua de las ciclodextrinas; (ii) establecer diferentes enlaces con los analitos, lo cual puede favorecer la complejación por inclusión; (iii) analizar compuestos quirales neutros e (iv) invertir el orden de migración de dos enantiómeros para facilitar el control de pureza enantiomérica de un soluto^{119,120}.

[117] J.H. Fendler, *Che. Eng. News* (1984) 25.

[118] W. Saenger, *Agnew. Chem. Int., Ed. Engl.* 19 (1980) 344.

[119] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 227.

[120] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 875 (2000) 89.

El empleo de derivados cargados de las ciclodextrinas ha permitido separar especies neutras sin la necesidad de emplear sistemas micelares que les proporcionen movilidad en un sistema electroforético.

Como ejemplo, en la Figura 7 se muestra la separación de un soluto neutro por CD-EKC en presencia de una ciclodextrina aniónica. Los solutos neutros (N) que no interaccionan con las ciclodextrinas se moverán a la misma velocidad de migración que el flujo electroosmótico dando lugar a un pico a t_0 . Sin embargo, si el soluto neutro (P) interacciona con la ciclodextrina aniónica que migra hacia el ánodo, se moverá a diferente velocidad que el flujo electroosmótico. Si la velocidad de migración del flujo electroosmótico es mayor que la velocidad de migración en sentido contrario de la ciclodextrina aniónica, el soluto neutro (P) pasará por la ventana de detección después que el flujo electroosmótico. Por tanto, de forma general, el principio de separación en CD-EKC se basa en la formación de complejos de inclusión de diferente estabilidad entre cada analito y las ciclodextrinas.

Aunque los analitos interaccionan con la cavidad interna hidrófoba de las ciclodextrinas en función de su hidrofobicidad, también intervienen enlaces secundarios entre el analito y los grupos hidroxilo o hidroxilos modificados del anillo de la ciclodextrina que pueden estabilizar el complejo de inclusión formado. Como los grupos hidroxilo primarios y secundarios están unidos a carbonos asimétricos, estas interacciones pueden ser selectivas y por tanto favorecer la separación¹¹⁹.

Este modo de separación ha experimentado un notable desarrollo desde su introducción en 1984 y el número de aplicaciones en distintos campos del análisis es muy numeroso, debido, principalmente, a que permite la separación de moléculas tanto cargadas como neutras y que aumenta considerablemente la selectividad de las separaciones en EC¹²¹⁻¹²³.

[121] S.H. Edwards, S.A. Shamsi, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1320.

[122] C. Garcia-Ruiz, R. Andres, J.L. Valera, F. Laborda, M.L. Marina, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 17.

[123] Y. Martin-Biosca, C. Garcia-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis*, 22 (2001) 3216.

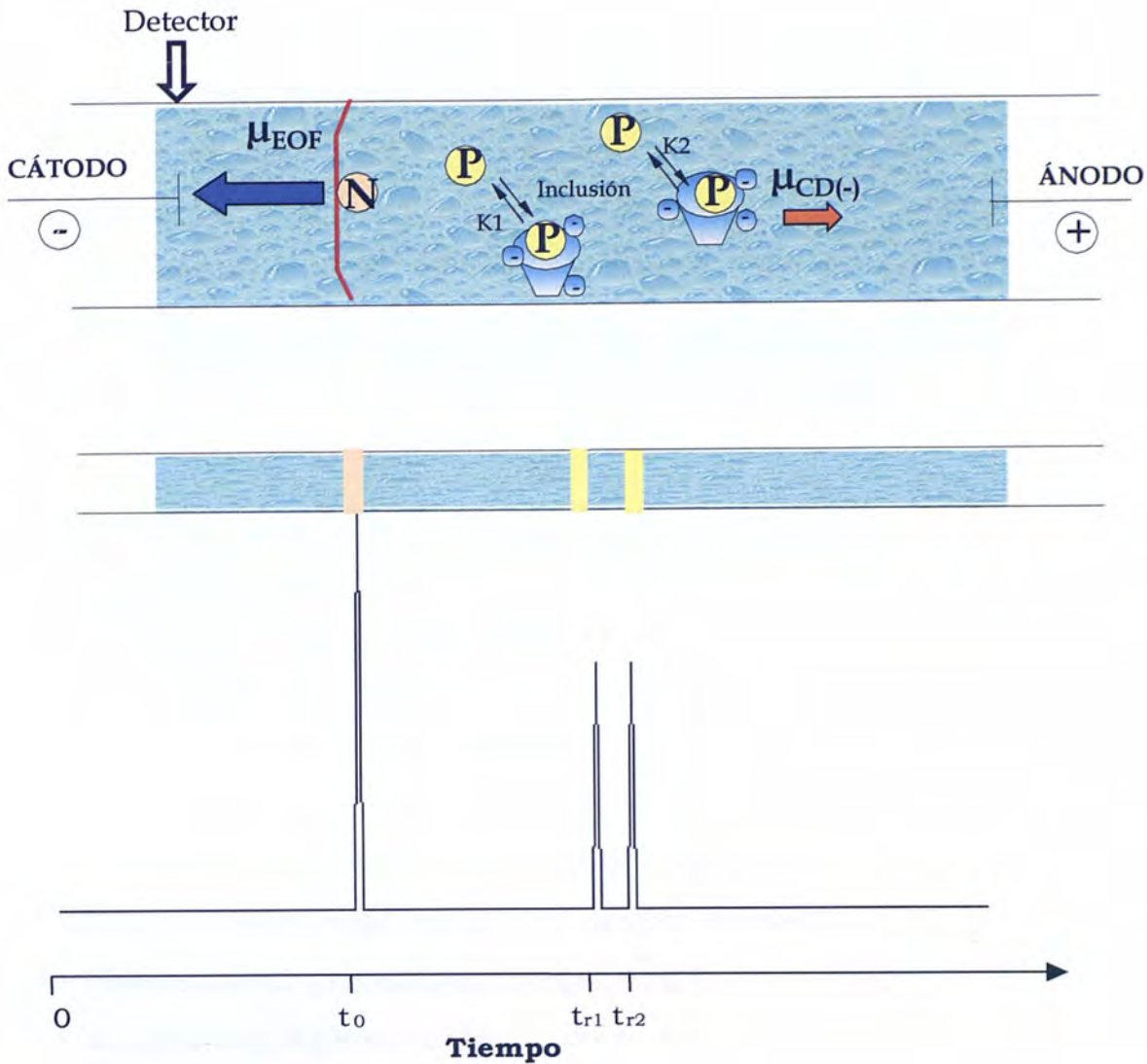


Figura 7. Principio de separación de dos solutos neutros (P y P₁) en CD-EKC en presencia de una ciclodextrina aniónica.

1.3.2.3. Separación por MEKC modificado con CD (CD-MEKC).

Existen muchos ejemplos de la utilización de ciclodextrinas en separaciones electroforéticas¹²⁴⁻¹²⁷ en los distintos modos de electroforesis capilar pero

[124] S. Fanali, *J. Chromatogr. A*, 474 (1989) 447.

[125] L. Ali, V.K. Gupta, H.Y. Aboul-Enein, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003)1360.

especialmente en el modo de MEKC, debido a que, originalmente, las CDs eran eléctricamente neutras y no afectaban a la electromigración. Esto significa que, por si solas, no pueden utilizarse como medio electroforético, a menos, como se ha comentado anteriormente, que se les introduzca un grupo iónico en la molécula. Además, su parte externa es hidrofílica y, por tanto, se puede asumir con seguridad que las CDs no interaccionan con las micelas utilizadas en el modo MEKC y las que estén en contacto con la disolución micelar se encontrarán como otra fase que migra a una velocidad idéntica a la del conjunto de la disolución siendo capaces de solubilizar selectivamente ciertos tipos de solutos dependiendo de su tamaño, forma e hidrofobicidad.

El principio de separación en un sistema MEKC modificado con ciclodextrinas (CD-MEKC) se basa en el reparto diferencial de los compuestos entre la fase micelar, las ciclodextrinas y la fase acuosa. Como ejemplo, en la Figura 8 se muestra el principio de separación de un soluto neutro en un sistema CD-MEKC empleando micelas aniónicas y ciclodextrinas neutras. En este caso, los solutos (N), que migran a la misma velocidad que el flujo electroosmótico originarán un pico a un tiempo de migración t_0 y los solutos (T) que se incorporan totalmente al sistema micelar y que no interaccionan con la ciclodextrina darán lugar a un pico a un tiempo de migración t_m . Los solutos (P) que interaccionan con las ciclodextrinas neutras del sistema experimentarán un reparto diferencial entre las fases acuosa y micelar al existir una tercera fase, las ciclodextrinas, mostrando un pico a un tiempo de migración t_r . La selectividad de separación en estos sistemas se modificará cambiando el tipo o concentración de ciclodextrina o tensioactivo¹¹⁰.

[126] B. Zhang, I.S. Krull, A. Cohen, D.L. Smisek, A. Kloss, B. Wang, A.J. Bourque, *J. Chromatography A*, 1034 (2004) 213.

[127] C.Q. Zhang, X.L. Lin, Y.H. Wei, C.F. Zhu, *Analytical Letters* 37 (2004) 293.

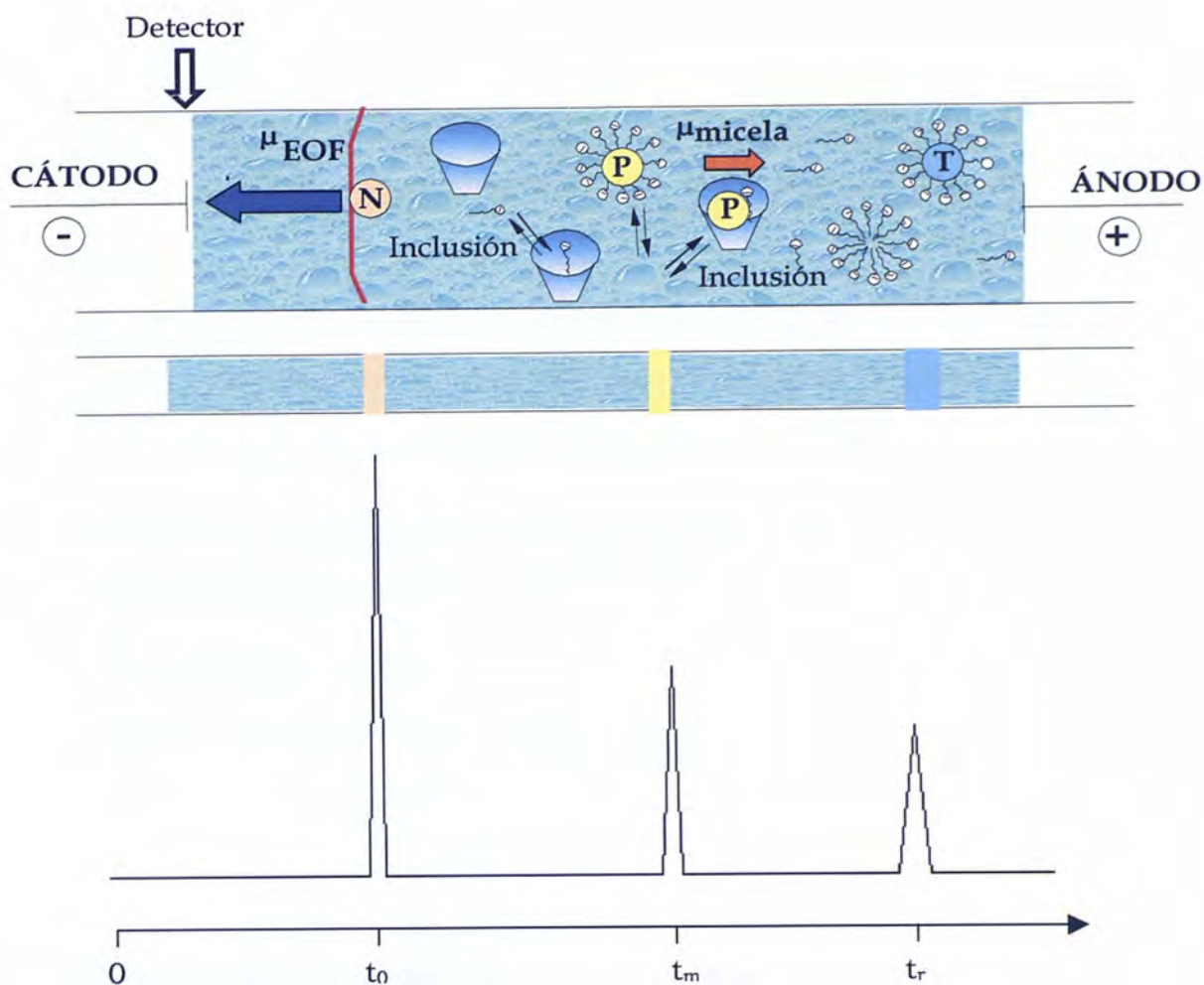


Figura 8. Principio de separación de solutos neutros en CD-MEKC en presencia de un tensioactivo aniónico y una ciclodextrina neutra.

2. Sistemas de detección en electroforesis capilar

La separación en CE se produce al migrar los solutos a través del capilar, después de la aplicación de un determinado voltaje, pero posteriormente es necesario determinar y cuantificar los componentes que se han separado.

En los últimos años las metodologías y las aplicaciones electroforéticas han progresado de un modo espectacular; sin embargo la principal limitación ha sido las posibilidades en cuanto al acoplamiento de diferentes sistemas de

detección a la separación electroforética debido principalmente a las pequeñas dimensiones del capilar utilizado así como los pequeños volúmenes de muestra usados que hacen que la sensibilidad en la detección de las zonas ocupadas por los solutos de interés se vea afectada por la dispersión en la detección on-line, provocando alteraciones en la señal que, en ocasiones, son cruciales para la efectividad de la detección.

De forma general, cuando se acopla un detector a un sistema de separación, éste debe cumplir una serie de condiciones para el buen funcionamiento como son:

- ✓ Presentar una buena sensibilidad.
- ✓ Proporcionar límites de detección bajos. Para ello es necesaria la combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo.
- ✓ A veces es necesario que el detector presente una determinada selectividad a una serie de analitos o a uno determinado, evitando así posibles interferencias en la señal por parte de otras sustancias presentes en la muestra.
- ✓ La respuesta del detector sea rápida, ante un cambio en la concentración de analito.
- ✓ La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- ✓ Proporcionar señales fiables. Esto implica principalmente que las señales deben ser reproducibles y estables en el tiempo.
- ✓ Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito. La señal de fondo no debe perturbar la señal correspondiente a los analitos y conviene que sea lo más pequeña posible y/o constante posible.
- ✓ Proporcionar cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, es decir que presente un amplio intervalo lineal. Además, sería deseable que la relación entre la señal y la concentración fuera lineal.

Todas estas razones comentadas influyen en gran medida en los sistemas de detección que se acoplan a estos equipos y además, los detectores que se pueden acoplar a CE deben ser sensibles a pequeñas cantidades de muestra y compatibles con las dimensiones físicas del capilar, aún en detrimento de otras cualidades.

Hasta ahora, se han adaptado una gran variedad de técnicas de detección a la electroforesis capilar con diferente éxito. En la Tabla 1 se muestran los distintos sistemas de detección y el rango de los límites de detección alcanzados en dicho acoplamiento.

2.1. Detección por técnicas ópticas.

En este tipo de técnicas se incluyen aquellos sistemas de detección basados en la interacción de algún tipo de radiación con los analitos. Estos detectores se sitúan habitualmente antes del final de la columna capilar, empleando una porción de ésta como célula de detección. Este hecho supone una ventaja ya que la eficacia de la separación no se ve afectada, por el contrario su mayor desventaja radica en que, en muchos casos, la sensibilidad se ve comprometida por el tamaño del capilar.

2.1.1. Absorción UV-Visible.

Los métodos basados en la absorbancia de la luz UV/Visible son los más utilizados en equipos comerciales de CE, debido a su posibilidad para determinar un gran número de compuestos y grupos funcionales y su facilidad de manejo, a pesar de que su sensibilidad es mucho menor que la de otros sistemas de detección¹⁵ ya que ésta depende del diámetro interno de la columna capilar y de las absorptibilidades molares de los analitos. Su sencillez y relativo bajo coste son sus principales ventajas.

| Sistema de detección | Límite de detección (M) |
|---|-------------------------|
| Técnicas ópticas | |
| Absorción UV-Visible | |
| Directa | $10^{-5} - 10^{-7}$ |
| Indirecta | $10^{-4} - 10^{-6}$ |
| Con paso óptico aumentado | 10^{-7} |
| Fluorescencia | |
| Directa | $10^{-7} - 10^{-9}$ |
| Indirecta | $10^{-6} - 10^{-8}$ |
| Inducida por láser directa | $10^{-10} - 10^{-13}$ |
| Inducida por láser indirecta | $10^{-5} - 10^{-7}$ |
| Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido | $10^{-6} - 10^{-8}$ |
| Quimioluminiscencia | $10^{-5} - 10^{-11}$ |
| Termoóptico | $10^{-7} - 10^{-8}$ |
| Índice de refracción | $10^{-5} - 10^{-7}$ |
| Espectroscopía Raman | $10^{-3} - 10^{-7}$ |
| Técnicas electroquímicas | |
| Conductimetría | $10^{-7} - 10^{-8}$ |
| Potenciometría | $10^{-7} - 10^{-8}$ |
| Amperometría | $10^{-7} - 10^{-9}$ |
| Otras técnicas | |
| Espectrometría de masas | $10^{-7} - 10^{-9}$ |
| Radiométricos | $10^{-10} - 10^{-11}$ |

Tabla 1. Sistemas de detección en CE y rangos de límites de detección alcanzados.

Existen diferentes formas de trabajar con esta modalidad de detección como son, la modalidad directa en la que la molécula objeto de análisis es el cromóforo; la indirecta que se emplea cuando los compuestos analizados no poseen grupos cromóforos en su molécula o absorben poca intensidad de luz como para ser detectados de forma directa.

La descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación de este sistema de detección junto con referencias de las numerosas aplicaciones existentes en relación a la misma, serán recogidas en el Capítulo I de la presente memoria en el cual se ha empleado este sistema de detección.

2.1.2. Fluorescencia.

Estos detectores presentan como principal ventaja su elevada sensibilidad, pudiéndose alcanzar los menores límites de detección cuando se emplea fluorescencia inducida por láser (LIF). La desventaja de este sistema está en que el número de compuestos que presentan propiedades fluorescentes no es amplio, siendo necesario recurrir a procesos de derivatización o detección indirecta para analitos no fluorescentes¹⁵.

La descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación necesarias para llevar a cabo una determinación empleando LIF como sistema de detección en CE se recogen en el Capítulo II de la presente memoria, donde se ha empleado como sistema de detección. Además, se hará referencia a distintas publicaciones que recogen las numerosas aplicaciones de esta técnica.

2.1.3. Fosforescencia.

El acoplamiento de la fosforescencia a temperatura ambiente a la electroforesis capilar es otra técnica que está emergiendo en los últimos años para el análisis de una amplia variedad de compuestos. Uno de los inconvenientes que se pueden presentar a la hora de usar esta forma de detección es que el número de compuestos que presentan fosforescencia nativa en disolución acuosa es muy

limitado además de la necesidad de mantener las disoluciones a medir libres de oxígeno para evitar así la atenuación molecular. Es también de vital importancia el hecho de que la fosforescencia a temperatura ambiente presenta unos tiempos de vida mayores que la fluorescencia, por lo cual, los problemas debidos a la dispersión y fluorescencia se pueden evitar empleando la detección a tiempo resuelto. En esta técnica de detección se pueden utilizar hasta tres modos diferentes: fosforescencia directa en la cual el propio analito en estudio es el encargado de producir fosforescencia; atenuada o indirecta en la que el analito, no fosforescente, interacciona con un compuesto fosforescente dando lugar a una disminución en la señal, y la sensibilizada en la el analito se detecta indirectamente por la fosforescencia emitida por un aceptor, después de la excitación el analito actúa como donador de energía cediéndola a un aceptor¹²⁸.

Una descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación necesarias para llevar a cabo una determinación empleando la fosforescencia como sistema de detección en CE, se recoge en el Capítulo III de la presente memoria, citando las pocas referencias existentes hasta el momento empleando este sistema de detección.

2.1.4. Quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia (CL) se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o infrarrojo cercano) producida en el transcurso de una reacción química. Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia. Una ventaja de las técnicas CL es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. Sin embargo el número de componentes que emiten quimioluminiscencia es bastante limitado

El uso analítico de la CL está experimentando un creciente interés, ya que representa una alternativa simple, barata y sensible para cuantificar diversos

[128] J. Kuijt, *Phosphorescence detection in capillary electrophoresis*, doctoral thesis, Vrije universiteit (2003) Amsterdam.

compuestos. Debido a la nueva instrumentación y, especialmente a la incorporación de técnicas modernas, la CL y la bioluminiscencia (BL) se aplican de forma rutinaria en el análisis tanto cuali- como cuantitativo.

Las tendencias más actuales en química analítica implican la aplicación de la CL como sistema de detección, combinada con CE como método previo de separación, proporcionando una selectividad y sensibilidad analítica excelentes y permitiendo la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas^{15,129}.

2.1.5. Termoópticos.

Estos detectores se basan en el fenómeno de la refracción fototérmica (PTR). Estos procesos se generan al excitar con una radiación, una porción discreta del capilar, provocando que parte de esa radiación sea absorbida por los analitos, que de inmediato sufren cambios térmicos. Estos cambios modifican ligeramente el índice de refracción en el punto de la columna capilar irradiada¹³⁰.

2.1.6. Índice de refracción.

Este sistema de detección consiste en medir la cantidad de luz refractada después de pasar a través de un soluto que se encuentre dentro de un capilar en relación con la variación cuando sólo hay disolución reguladora dentro de dicho capilar. La detección se produce por la diferencia entre el índice de refracción de la disolución con el analito separado y el de la disolución reguladora¹⁵.

[129] A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, N.A. Guzmán, *Cp. 15: Chemiluminescence Detection in Capillary Electrophoresis*, Chemiluminescence in Analytical Chemistry, Eds. A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, Marcel Dekker, Inc. (2001).

[130] A. Sánchez Arribas, *Tesis doctoral*, Universidad Autónoma (2003) Madrid.

El número de publicaciones, al igual que el sistema de detección anterior, es, muy limitado, existiendo referencias en la determinación de carbohidratos¹³¹ y proteínas¹³².

2.1.7. Dispersión Raman.

En este tipo de sistema de detección la muestra es excitada mediante una fuente de luz monocromática intensa que provoca variaciones en la frecuencia e intensidad de radiación dispersada posterior. La sensibilidad de este tipo de detección puede verse incrementada utilizando espectroscopía Raman resonante, de superficie aumentada o la unión de ambos. Con este tipo de sistema de detección se consigue una valiosa información vibracional del analito en estudio lo que la hace una potente técnica de identificación¹³³.

Los fundamentos e instrumentación necesarios, los distintos campos de aplicación de las determinaciones empleando como sistema de detección en CE la espectroscopía Raman se recogen en el Capítulo IV de la presente memoria.

2.2. Detección por espectrometría de masas.

El desarrollo del acoplamiento de la espectrometría de masas a equipos de electroforesis capilar es reciente, ganando aceptación con los años.

La espectrometría de masas es el único sistema de detección que permite la identificación de compuestos desconocidos, por lo que la combinación de una técnica de separación de alta eficacia como la CE con la espectrometría de masas como sistema de detección da lugar a una herramienta muy útil en el análisis de muestras complejas, tanto en su caracterización analítica como estructural, además de presentar una aceptable sensibilidad, selectividad y universalidad.

[131] S. Suzuki, S. Honda, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 3577.

[132] X.Z. Wu, J.Q. Wu, J. Pawliszyn, *LC GC North America, Review*, 19 (2001) 526.

[133] J. R. Ferraro, K. Nakamoto, *Introductory Raman Spectroscopy*, New York (1994): Academic Press.

Es indudable que su contribución va a ser clave en la evolución futura de la electroforesis capilar¹³⁴.

La descripción más detallada de los fundamentos e instrumentación necesarias para el empleo de la espectrometría de masas como sistema de detección en CE, se describen con detenimiento en el Capítulo VI de la presente memoria, dando referencias de numerosos trabajos de investigación en distintos campos de aplicación.

2.3. Detectores electroquímicos.

Esta modalidad de detección se basa en el estudio de las sustancias electroactivas en disolución, apoyándose en los principios de la conductimetría, potenciometría, amperometría o voltamperometría.

2.3.1. Detectores conductimétricos.

En los detectores conductimétricos se mide la conductividad entre dos electrodos inertes sobre los que se aplica un potencial constante. Dado que cualquier ión produce un cambio en la conductividad, este modo de detección tiene un carácter universal. Esto implica que no sea en absoluto selectivo y se limite su uso a muestras de composición conocida. Por otro lado, tiene como desventaja que la conductividad es directamente proporcional al área de los electrodos e inversamente proporcional a la distancia entre ellos, lo que significa que la señal está muy influenciada por el volumen de la célula de detección¹³⁵.

El número de publicaciones de este sistema de detección en CE es también muy limitado, ciñéndose, fundamentalmente a la determinación de aniones y cationes inorgánicos¹³⁶⁻¹³⁸.

[134] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 3837.

[135] T. Capees, P.C. Hauser, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 103.

[136] V. Pacakova, P. Coufal, K. Stulik, B. Gas, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 1883.

[137] J. Tanyanyiwa, S. Leuthardt, P.C. Hauser, *Electrophoresis, Review*, 23 (2002) 3659.

2.3.2. Detectores potenciométricos.

La detección del analito se basa en su capacidad para transferirse de la disolución a través de una membrana. Este proceso genera una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana, que es proporcional a la concentración de analito. Las membranas no son completamente selectivas y tienen respuestas a varios iones en diferentes rangos de concentración, siendo esta característica la que permite que puedan emplearse como detectores en métodos de separación. Aunque la señal potenciométrica es independiente del volumen de la célula de detección, no es fácil la fabricación de electrodos con membranas de un diámetro similar al de los capilares y su alineación con la salida de éstos¹³⁰.

El número de publicaciones de este sistema de detección en CE se reduce, fundamentalmente, al análisis de aniones y cationes inorgánicos¹³⁷ además del análisis de compuestos de interés farmacéutico y biomédico¹³⁹.

2.3.3. Detectores amperométricos.

Son los detectores electroquímicos que se utilizan más frecuentemente. El sistema de medida consta habitualmente en un electrodo de trabajo situado a la salida de la columna capilar, otro de referencia y un tercero auxiliar, conectados a un potenciostato. La detección amperométrica consiste, por tanto, en medir la corriente resultante de la oxidación o reducción de sustancias electroactivas, a un potencial constante, en la superficie del electrodo de trabajo. Este sistema se puede utilizar siempre que un compuesto pueda oxidarse o reducirse o experimentar ambos procesos, por lo que no es universal. Sin embargo, puede discriminar entre sustancias electroactivas (detectables) y no electroactivas (no detectables) e, incluso, seleccionando adecuadamente el potencial aplicado, entre sustancias electroactivas que tengan la suficiente diferencia en sus potenciales redox^{15,130}.

[138] A. Padarauskas, *Rev. Anal. Chem.*, 20 (2001) 271.

[139] A.B. Wang, Y.Z. Fang, *Electrophoresis, Review*, 21 (2000) 1281.

El fundamento e instrumentación necesaria para llevar a cabo determinaciones en CE empleando este sistema de detección se describen, ampliamente, en el Capítulo V de esta memoria, donde ha sido empleado como sistema de determinación de sustancias electroactivas.

EPILOGO A LA INTRODUCCIÓN

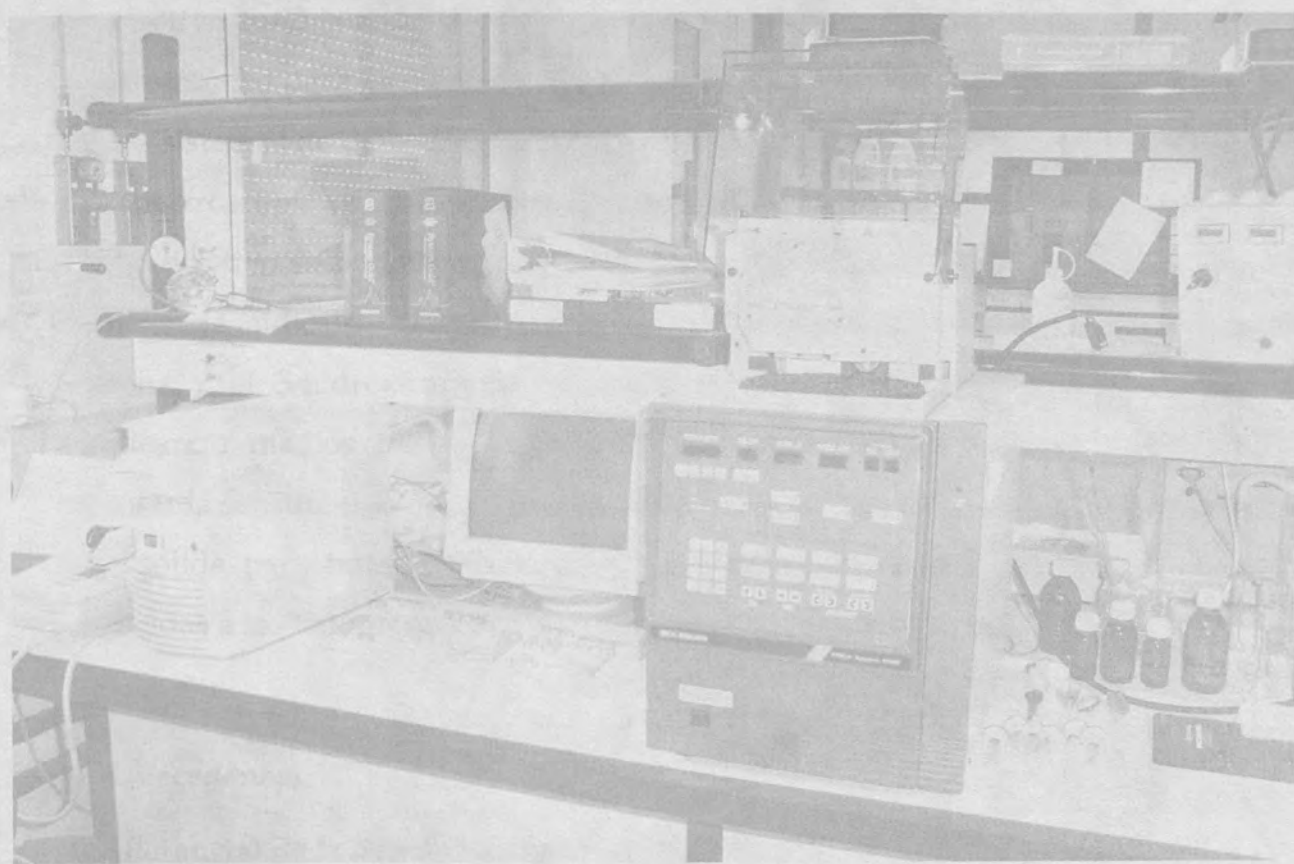
La técnica de CE, además de sus ventajas inherentes, presenta una gran versatilidad al combinar las distintas modalidades (CZE, MEKC, CD-EKC) con los distintos y numerosos sistemas de detección, presentando un abanico de posibilidades que abarca el análisis de, prácticamente, cualquier analito de una forma sencilla y rápida.

En la presente memoria se ha demostrado esa versatilidad desarrollando distintos métodos de análisis de compuestos de muy diferente naturaleza, desde pesticidas o hidrocarburos aromáticos policíclicos hasta aditivos, neurotransmisores, aminoácidos, etc... empleando el mayor número de sistemas de detección posible de los disponibles. Así se ha desarrollado un método para la determinación de pesticidas empleando la espectroscopía de absorción molecular UV-Visible con batería de diodos en el Capítulo I, la determinación de un neurotransmisor de gran importancia biológica como la serotonina empleando fluorescencia inducida por láser (LIF) previa derivatización pre-columna en el Capítulo II, la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos empleando como sistema de detección la fosforescencia atenuada a temperatura ambiente en estado líquido (RTPL) en el Capítulo III, la determinación de colorantes empleando la espectroscopía Raman resonante con superficie aumentada (SERRS) en el Capítulo IV, en el Capítulo V la determinación de herbicidas empleando la detección amperométrica y finalmente la caracterización de extractos de romero empleando la detección por espectrometría de masas en el Capítulo VI.

Con todo ello se ha querido dar una visión amplia de los sistemas de detección más utilizados, destacando los cuatro sistemas de detección ópticos (la

espectrofotometría, las dos técnicas luminiscente: fluorescencia y fosforescencia y la espectroscopía Raman, así como un sistema de detección electroquímico, la amperometría y, por último una técnica que como ya dijimos presenta un futuro muy prometedor como técnica acoplada con CE como es la espectrometría de masas, cuya utilidad ya ha sido ampliamente demostrada en otras técnicas acopladas de uso más extendido en los laboratorios de análisis como la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

En un futuro no muy lejano, creemos que los distintos sistemas de detección aquí citados y aún no implementados irán ganando cada vez más popularidad cuando existan equipos comerciales y así se extenderá el uso de CE como técnica alternativa a las técnicas cromatográficas en laboratorios de control y de rutina.



CAPÍTULO I

Determinación de los pesticidas aldicarb, carbofurano y sus metabolitos, en aguas de riego mediante cromatografía electrocinética micelar con detección por batería de diodos y mediante el uso de extracción en fase sólida.

El conjunto de las investigaciones realizadas en este capítulo I se han desarrollado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y se han concretado en un trabajo que se encuentra publicado en la revista "Pest Management Science 60 (2004) 675-679" (ver anexo I).

1. Objetivo

El objetivo fundamental de este capítulo ha sido la puesta a punto de un método electroforético para pesticidas polares utilizando un equipo de CE acoplado con uno de los sistemas de detección más ampliamente utilizados en los laboratorios, como es la espectroscopía de absorción molecular UV-Vis con detector de batería de diodos. Dicho objetivo se pondrá de manifiesto mediante el desarrollo de un método para el análisis de aldicarb, carbofurano y sus metabolitos aldicarb sulfoxido y aldicarb sulfona y el 3-hidroxicarbofurano en la modalidad de EKC, mas concretamente empleando medios micelares (MEKC) como pseudofase. Además, se pretenderá mejorar la sensibilidad de la detección para lo cual se usarán sistemas de extracción en fase sólida para tratar de conseguir preconcentraciones que permitan analizar los pesticidas a los valores que establece la legislación vigente.

2. Antecedentes

2.1. Potencial de la detección espectrofotométrica en CE

Los detectores basados en espectroscopía de absorción molecular son la opción comercial más extendida en electroforesis capilar por su asequibilidad y amplio campo de aplicación, pese a que ofrecen un nivel de sensibilidad notablemente menor que otras modalidades de detección¹. Estos detectores son a menudo empleados con el carácter de detección universal debido a que la mayoría de las moléculas orgánicas pueden ser detectadas en un rango de longitudes de onda entre 195-210 nm, sin embargo, la detección en este rango de longitud de onda es particularmente problemática debido a la absorción de radiación de los componentes ópticos e incluso de los gases del aire. Además, para compuestos cuyas estructuras no incluyen enlaces "π", la detección por absorción a longitudes de onda mayores de 190 nm ofrece una relativamente baja relación señal-ruido. Por ello, aunque las técnicas de absorción UV-Visible son aplicables a una gran cantidad de analitos, no son verdaderamente universales².

[1] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis. The Techniques in Analytical Series*. Wiley, New York (1995).

[2] K. Swinney, D.J. Bornhop, *Electrophoresis, Review.*, 21 (2000) 1239.

Por otra parte, el pequeño paso de luz de los capilares empleados en esta técnica de separación, cuyos diámetros internos son menores de 100 μm , limita la sensibilidad de la detección sobre todo para la detección de analitos con una débil absorptividad molar. No obstante, se han desarrollado varias estrategias generalmente aumentando el paso óptico de luz mediante la modificación de la forma del capilar (capilar tipo Z) o el diámetro en la zona de detección (capilar de tipo burbuja)³⁻⁵ para conseguir mejorar la sensibilidad sin sacrificar la resolución.

Tsuda *y col.*⁶ fueron los primeros en usar capilares rectangulares con anchuras superiores a 1 mm, consiguiendo así aumentar 15 veces la sensibilidad, sin embargo estos capilares presentan el inconveniente de que son muy frágiles y difícilmente utilizables en análisis de rutina.

Posteriormente, Xi y Yeung⁷ desarrollaron una técnica de iluminación axial mejorando la sensibilidad en 7 veces usando un capilar de 50 μm de diámetro interno, pero por el contrario esta técnica de iluminación axial requiere preparativos especiales entre la columna capilar, la fuente de luz y el detector.

Chervet *y col.*⁸ aumentaron el paso óptico introduciendo el capilar en una célula de detección con forma de Z, consiguiendo una zona de detección de 3 mm de longitud alcanzando así un aumento de sensibilidad de 6 veces. También Moring *y col.*⁹ presentaron un aumento similar de sensibilidad mediante el uso de esta célula de tipo Z. De hecho usando este tipo de célula y la derivatización química de los analitos, lograron incrementar los límites de detección en un factor de 20 en el análisis de trazas de compuestos carbonílicos en agua de lluvia¹⁰.

Las mejoras en los límites de detección usando las células tipo Z comparados a los resultados obtenidos por Chervet *y col.*⁸, son debidas a la diferencia en el volumen de detección y a la eficiencia en la separación. Sin embargo, Bachmann y Mainka¹⁰

[3] T. Hu, H. Zuo, C. Riley, J.F. Stobaugh, S.M. Lunte, *J. Chromatogr. A*, 716 (1995) 381.

[4] J.A. Taylor, E.S. Yeung, *J. Chromatogr. A*, 550 (1991) 831.

[5] I.H. Grant, W. Steuer, *J. Microcol. Sep.*, 2 (1990) 74.

[6] T. Tsuda, J.V. Sweedler, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2149.

[7] X. Xi, E.S. Yeung, *Appl. Spectrosc.*, 45 (1991) 1199.

[8] J.P. Chervet, R.E.J. van Soest, M. Ursem, *J. Chromatogr. A*, 543 (1991) 439.

[9] S.E. Moring, R.T. Reel, R.E.J. van Soest, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3454.

[10] A. Mainka, K. Bachmann, *J. Chromatogr. A*, 767 (1997) 241.

demonstraron que aumentando el camino óptico de la célula de flujo se producía una reducción en la resolución del 47 %. Más recientemente, la casa comercial Hewlett-Packard¹¹ introdujo una célula de flujo tipo Z con un paso óptico de 1.2 mm y un volumen de muestra de 12 nL. Esta célula está fabricada con sílice fundida negra y ventanas transparentes planas para minimizar la luz dispersada. De esta manera, la relación señal/ruido aumenta 10 veces sin sacrificar la eficiencia de la separación, minimizando la luz dispersada e incrementando el camino óptico de la célula. Aunque la célula tipo Z se utiliza habitualmente en equipos de CE comerciales, sufre serios problemas debidos a la dispersión de la luz. Por ello para resolver este problema es necesario focalizar la luz incidente con ópticas especiales así como alinearlas con los ejes del capilar¹².

Hoy día, el intento más prometedor para la mejora de los límites de detección por aumento del camino óptico en este tipo de detección acoplada a la CE ha sido el desarrollo de las células de multireflexión^{13,14}. Usando este tipo de células la excitación por láser se han conseguido incrementos de 40 veces en los límites de detección. Por el contrario, este tipo de célula requiere un gran volumen y como resultado la eficiencia de la separación se ve empeorada.

También se han utilizado celdas con forma de burbuja (que permiten obtener una sensibilidad de 3 a 5 veces mayor), células de tipo T post-columna (en la que se ha aumentado la sensibilidad del orden de 8 veces) y además, recientemente se han comercializado capilares de sección rectangular y cuadrada que mejoran el camino óptico y la geometría¹⁵⁻¹⁷. Algunos de estos diseños se muestran en la Figura I.1.

[11] P. Kaltenbach, G. Ross, D.N. Heiger, *HPCE 1997*, Anaheim, CA 1997.

[12] P. Doble, M. Macka, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 804 (1998) 327.

[13] T. Wang, J.H. Aiken, C.W. Huie, R.A. Hartwick, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1372.

[14] H. Salimi-Moosavi, Y.T. Jiang, L. Lester, G. McKinnon, D.J. Harrison, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1291.

[15] S. Kim, W. Kim, J.H. Hahn, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 109.

[16] K. Lim, S. Kim, J.H. Hahn, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (2002) 295.

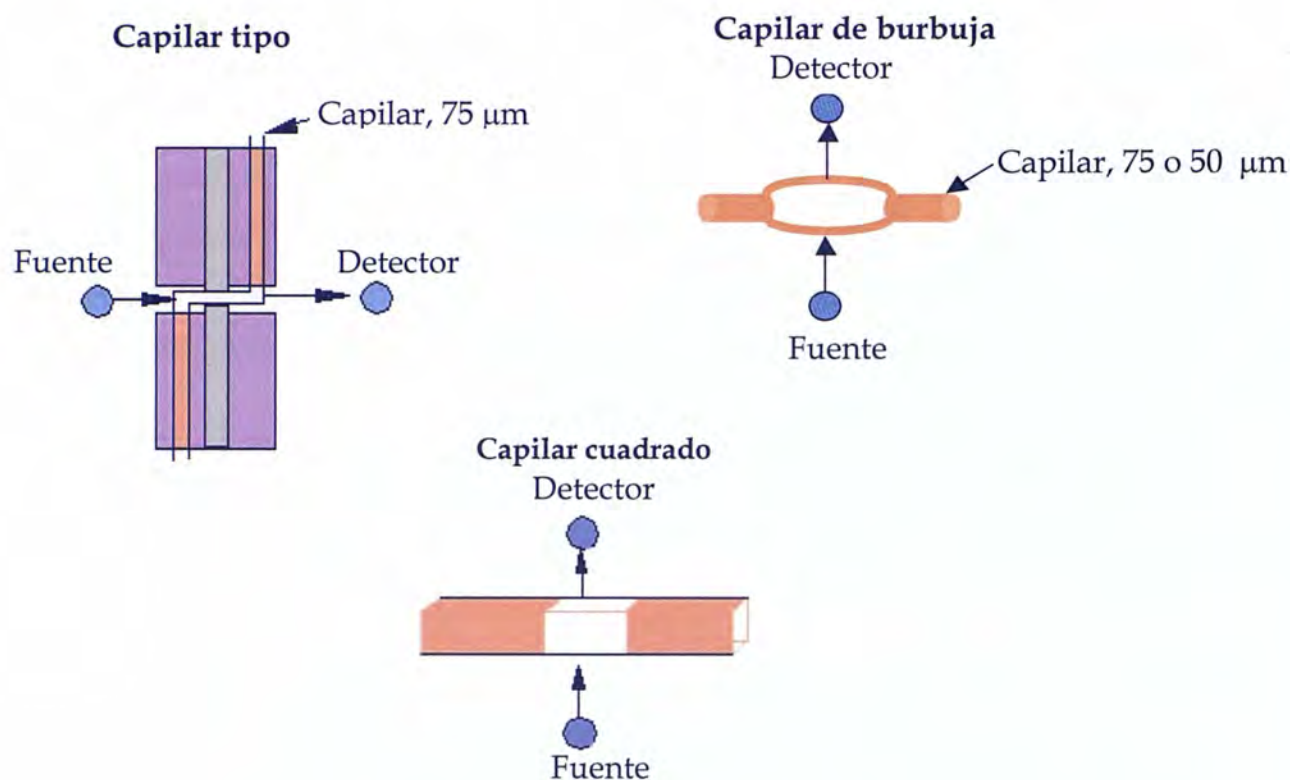


Figura I.1. Diseño de células de detección

Además del sistema estándar de detección directa en espectrofotometría, existe otro sistema denominado por batería de diodos o diodo array (DAD) en los que se permite la obtención de electroferogramas a distintas longitudes de onda a partir de una sola inyección de la muestra, pudiendo, de esta forma, optimizar cada longitud de onda para un determinado analito.

Por otro lado, las medidas de absorción directa son muy difíciles para analitos que poseen coeficientes de absorción molar bajos. Una alternativa para la detección de este tipo de moléculas es el uso de la absorción indirecta. Estas medidas en CE han sido usadas para la detección de pequeños iones¹⁸⁻²¹, carbohidratos²², lantánidos^{23,24}, alquil sulfatos²⁵ y ácidos carboxílicos²⁶.

[17] C. García Ruiz, *Tesis Doctoral*, Alcalá de Henares (2001) Madrid.

[18] A. Weston, P.R. Brown, P. Jandik, W.R. Jones, A.L. Heckenberg, *J. Chromatogr. A*, 593 (1992) 289.

[19] S. Cortacero-Ramirez, M. Hernaiz Bermudez de Castro, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, A. FernandezGutierrez, *Trac-Trends in Analytical Chemistry, Review*, 22 (2003) 440.

2.2. Técnicas de preconcentración

Otro inconveniente encontrado al usar esta modalidad de detección son las reducidas cantidades de muestra que se inyectan en CE, del orden de los nL, lo cual implica que la cantidad de analito que llega al detector sea muy pequeña. Para solventar este problema se han empleado técnicas de preconcentración ya sean on-line, como son la preconcentración por acumulación o stacking^{27,28} o la preconcentración por barrido o sweeping²⁹ técnicas utilizadas también para mejorar los límites de detección para CE. Varios autores han usado la preconcentración tipo stacking para el análisis de pesticidas³⁰⁻³³. El modo normal de stacking consiste en la inyección hidrodinámica de una gran cantidad de muestra con una conductividad eléctrica menor que la disolución de separación.

Una variación de esta técnica es la denominada stacking con eliminación de matriz en la que el capilar se llena con la muestra previamente disuelta en una matriz de baja conductividad^{32,31}.

Otro procedimiento de stacking on-line que ha sido aplicada al análisis de pesticidas³⁴, se basa en la inyección electrocinética de la muestra la cual presenta una conductividad menor que la disolución reguladora de separación.

[20] V. Pacakova, P. Coufal, K. Stulik, B. Gas, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 1883.

[21] B. Paull, M. King, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 1892.

[22] J. Zidkova, *J. Chmelik Chemické Listy, Review*, 94 (2000) 1093.

[23] F. Foret, S. Fanali, A. Nardi, P. Bocek, *Electrophoresis*, 11 (1990) 780.

[24] P. Janos, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 1982.

[25] M.W.W. Nielen, *J. Chromatogr. A*, 588 (1991) 321.

[26] E. Dabek-Zlotorzynska, K. Keppel-Jones, *LC GC North America*, 18 (2000) 950.

[27] B.S.M. Macka, P.R. Haddad, *J. Chromatography A*, 1039 (2004) 201.

[28] G. Álvarez-Llamas, A. Rodríguez-Cea, M. R. Fernández de la Campa, A. Sanz-Medel, *Ana. Chim. Acta*, 486 (2003) 183.

[29] P. Britz-McKibbin, T. Ichihashi, K. Tsubota, D.D.Y. Chen, S. Terabe, *J. Chromatography A*, 1013 (2003) 65.

[30] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Domínguez-Álvarez, *J. Chromatogr. A.*, 990 (2003) 291.

[31] R. Rodríguez, Y. Picó, G. Font, J. Mañes, *J. Chromatogr. A.*, 949 (2002) 359.

[32] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A.*, 946 (2002) 275.

[33] O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Chromatogr. A.*, 912 (2001) 353.

[34] Z. Aturki, C. Desiderio, C.M. Polcaro, *Chromatographia*, 54 (2001) 489.

También, se han desarrollado procedimientos de preconcentración off-line como la microextracción en fase sólida (SPME)³⁵, extracción en fase sólida (SPE)³⁶⁻³⁸ o extracción a punto de nube (CPE)³⁹.

Estas técnicas también han sido aplicadas al análisis de pesticidas⁴⁰. Concretamente la modalidad SPME tiene la ventaja de su rapidez y su facilidad de uso, sin embargo como desventaja, la fibra se daña fácilmente a pH's extremos y por problemas salinos.

2.3. Los pesticidas un problema ambiental

Los pesticidas son compuestos hoy día indispensables en la civilización moderna, pero también una parte es potencialmente tóxica para los seres humanos, debido a la presencia de sus residuos los alimentos. Por lo tanto, los gobiernos de muchos países han establecido unos niveles de residuos máximos (MRLs) permitidos de pesticidas y han establecido programas de seguimiento para residuos de pesticidas en las cosechas. La Unión Europea ha establecido una concentración máxima admisible de 0.1 µg litro⁻¹ para pesticidas individuales y sus compuestos derivados en aguas de consumo.

Dentro de los pesticidas más usados, los N-metilcarbamatos (NMCs) son una importante familia de pesticidas, cuya introducción dentro del mercado agroquímico fue en los años 50 y que se emplean ampliamente como insecticidas, acaricidas, nematocidas y molusquicidas en un amplio número de cultivos. Debido a que son relativamente biodegradables y tienen menor persistencia que otros pesticidas en suelos, se han hecho pocos intentos para investigar su degradación ambiental en los días siguientes a su aplicación.

Dentro de la familia de los NMCs el aldicarb y el carbofurano son dos pesticidas ampliamente utilizados en suelos para el control de nematodos y de ácaros. La

[35] S. Frías-García, M.J. Sánchez, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.*, 27 (2004) 660.

[36] K. Vuorensola, H. Sirén, U. Karjalainen, *J. Chromatography B*, 788 (2003) 277.

[37] N.A. Guzman, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3718.

[38] Q. Yang, A.J. Tomlinson, S. Naylor, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 183A

[39] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A.*, 902 (2000) 251.

[40] P. Popp, K. Kalbitz, G. Oppermann, *J. Chromatogr. A.*, 687 (1994) 133.

combinación de su alta solubilidad en agua y baja adsorción por las plantas hace que ambos pesticidas se distribuyan fácilmente por aguas de riego, y que aparezcan sus productos de degradación, el aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona y el 3-hidroxicarbofurano. Existen pocos métodos analíticos para estos metabolitos polares en técnicas como cromatográficas como GC, LC o HPLC⁴¹⁻⁴³ comparados con los que existen para aldicarb y carbofurano tanto por GC, LC, HPLC y CE⁴⁴⁻⁴⁶.

3. Parte experimental

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Analitos, disoluciones y cartuchos de extracción en fase sólida

Los pesticidas aldicarb (ALD) [2-metil-2-(metil-tio)propionaldehído-O-metilcarbamoiloxima], aldicarb-sulfóxido (SX) [2-metil-2-metilsulfenilpropionaldehído-O-metilcarbamoiloxima], aldicarb sulfona (SN) [2-metil-(2-metil-sulfonil)-propionaldehído-O-metilcarbamoiloxim], carbofurano (CARB) [2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-y N-metilcarbamoilato], y 3-hidroxicarbofurano (3-OH) [2,3-dihidro-3- hidroxi-2,2-dimetilbenzofuran-7-yl metilcarbamoilato] (content > 99%) fueron obtenidos de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania) (ver Tabla I.1).

Las disoluciones madre de 500 mg.L⁻¹ de todos los analitos fueron preparadas disolviendo diferentes cantidades, pesadas exactamente, de cada pesticida en acetonitrilo. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante la dilución con agua de la disolución madre a las concentraciones apropiadas. Alícuotas de estas disoluciones se emplearon para preparar los patrones de calibración y para la

-
- [41] E. PapadopoulouMourkidou, J. Patsias, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 99.
 [42] G.S. Nunes, R.M. Alonso, M.L. Ribeiro, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 113.
 [43] G.P. Cobb, F.D. Harper, C.P. Weisskopf, *Arch. Environm. Cont. Tox.*, 40 (2001) 77.
 [44] M. Molina, D. Perez-Bendito, M. Silva, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3439.
 [45] J.L.M. Vidal, P.P. Vazquez, J.M. Fernández, *Chromatographia*, 51 (2000) 187.
 [46] L.S. Nelson, J. Perrone, F. DeRoos, C. Stork, R.S. Hoffman, *J. Tox. Clinic. Tox.*, 39 (2001) 447.
 [47] P. Nisse, M. Deveaux, A.S. Tellart, V. Dherbecourt, D. Peucelle, M. Mathieu-Nolf, *Act. Clin. Bel.*, Review, 57 (2002)12.
 [48] J. Haib, I. Hofer, J.M. Renaud, *J. Chromatogr. A*, 1020 (2003) 173.
 [49] J.M.F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra, *J. Chromatogr. A*, 996 (2003) 133.
 [50] J. Haib, I. Hofer, J.M. Renaud, *J. Chromatogr. A*, 1020 (2003) 173.

fortificación de las muestras de agua. Estas disoluciones de trabajo se conservaron en el frigorífico a 4 °C.

Acetonitrilo extrapuro y acetato de etilo de calidad "reactivo análisis" fueron suministrados por Scharlau (Barcelona). La disolución reguladora de separación se preparó mediante una disolución de 20 mM borato ajustada a pH 8.0 con HCl 0.1 M conteniendo SDS a una concentración de 140 mM.

Todas las disoluciones fueron preparadas en agua bidestilada obtenida mediante un equipo Millipore Milli-Q (Bedford, MA, USA) y filtradas a través de membranas Millipore de 0.45 µm previamente a su inyección dentro del capilar del equipo de electroforesis.

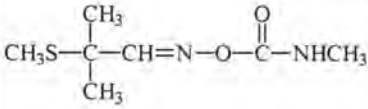
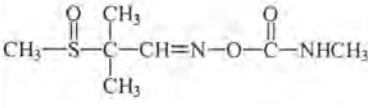
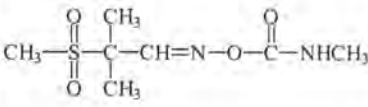
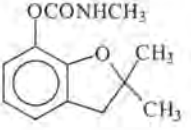
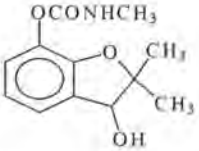
| Analito | Estructura | Presión de vapor (mPa) | Sol. H ₂ O (g.L ⁻¹) | λ _{max} absorción (nm) | ε _{200nm} (L.mol ⁻¹ .m ⁻¹) |
|-------------------------|---|------------------------|--|---------------------------------|--|
| Aldicarb (ALD) |  | 13 | 6 | 210 | 19000 |
| Aldicarb-sulfóxido (SX) |  | - | 330 | 210 | 15500 |
| Aldicarb-sulfona (SN) |  | 12 | 10 | 210 | 16700 |
| Carbofurano (CARB) |  | 2.7 | 0.7 | 210 | 38700 |
| 3-OH-Carbofurano (3-OH) |  | - | - | 210 | 47000 |

Tabla I.1. Estructura y algunas características de los compuestos estudiados.

Los cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) se fabricaron manualmente usando jeringas conteniendo 500 mg de carbón grafitado carbopack™ con malla 60/80 obtenido de Supelco (Madrid).

3.1.2. Instrumentación

Todos los experimentos electroforéticos fueron llevados a cabo con un Beckman modelo P/ACE 5500 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) equipado con un dispositivo de detección por batería de diodos Beckman. Se empleó un Software Beckman System Gold para el control del sistema y para la recogida y procesamiento de datos. Los capilares de sílice fueron elegidos con 75 μm de diámetro interno y una longitud total (L_T) de 57 cm (50 cm hasta el detector, (L_D)) y 375 μm de diámetro interno.

3.1.3. Preacondicionamiento del capilar

Al comienzo de cada sesión experimental, los capilares fueron lavados con una disolución de NaOH 0.1 M durante 5 min, seguido de otros con agua bidestilada durante 1 min. Los capilares fueron posteriormente equilibrados con la disolución reguladora de separación durante 4 min antes de cada inyección y después de cada análisis lavados a una presión de 20.0 psi con NaOH 0.1 M durante 1 min y con agua bidestilada durante otro minuto.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Desarrollo de la separación electroforética

Para optimizar la separación electroforética de estos cinco analitos, el pH de la disolución reguladora se varió entre 7-11 de unidad en unidad y ensayando tres tipos de disoluciones reguladoras diferentes. Las tres disoluciones reguladoras estudiadas han sido fosfato/ HPO_4 , carbonato/bicarbonato y borato/HCl, observando que con

esta última se consigue la mejor resolución trabajando a pH 8.0, y una concentración de 20 mM de borato/HCl.

Por otro lado, debido al hecho de que todos los analitos son neutros, la separación electroforética requiere la presencia de un medio organizado. En este trabajo se utilizó dodecyl sulfato sódico (SDS), el cual está cargado negativamente y presenta una movilidad electroforética opuesta al flujo electroosmótico.

Para seleccionar la concentración de SDS óptima, se probó un amplio rango de concentraciones. Así a concentraciones cercanas a la concentración micelar crítica (CMC) del SDS (3 mM), se obtenía una pobre resolución entre los dos primeros picos (correspondientes al SX y SN). Por esta razón, se llevó a cabo un estudio de la influencia en la resolución a elevadas concentraciones de SDS entre 80-170 mM (ver Figura I.2).

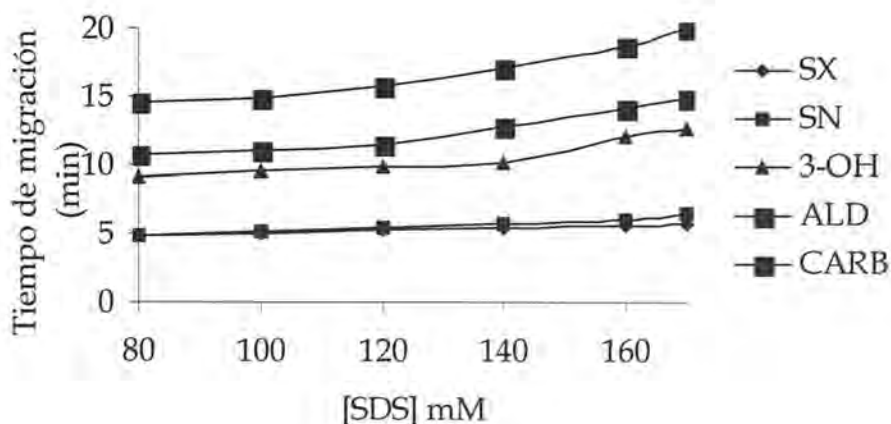


Figura I.2. Variación de tiempos de migración en función de la concentración de SDS. Condiciones experimentales e instrumentales: 20 mM borax/HCl, pH 8, voltaje de separación: 23 kV.

De esta figura se concluye que ya a una concentración de 140 mM los dos picos anteriormente citados (SX y SN) se resuelven adecuadamente mientras que los correspondientes a 3-OH, ALD y CARB se encuentran perfectamente resueltos a cualquier concentración de SDS entre 80 y 170 mM.

En relación con la optimización de los parámetros instrumentales, fueron probados diferentes voltajes entre 20 y 27 kV, obteniendo los mejores resultados y eficiencias a 23 kV.

Las muestras fueron inyectadas por aplicación de 0.5 psi de presión (1 psi=6894.76 Pa) usando capilares de sílice fundida (L_D 50 cm, L_T 75 cm) a 25 °C. El estudio del tiempo de inyección fue llevado a cabo desde 4 a 12 segundos y los mejores resultados fueron obtenidos a este último valor ya que valores superiores a 12 segundos no fueron posibles ya que disminuía considerablemente la resolución entre SX y SN.

El uso de la detección con batería de diodos permitió el registro instantáneo de un rango de longitudes de onda entre 190-400 nm, si bien 210 nm fue el valor óptimo seleccionado para monitorizar los electroferogramas.

Después de la selección de las variables experimentales e instrumentales, y especialmente de la concentración de SDS, se ha conseguido una buena resolución para los cinco analitos en un tiempo de análisis menor de 17 minutos (véase Figura I.3).

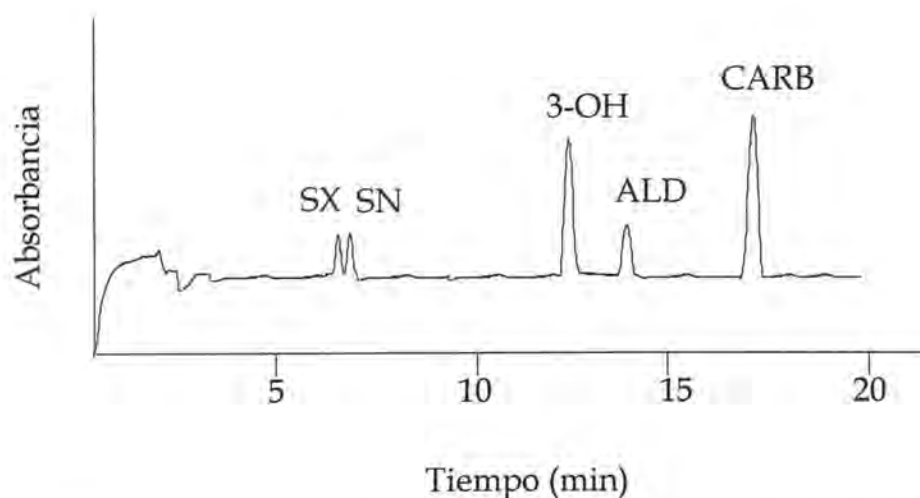


Figura I.3. Electroferograma de los cinco pesticidas en estudio (30 ng mL^{-1}) en las condiciones óptimas. Condiciones instrumentales y experimentales: 20 mM borax/HCl, pH 8, SDS: 140 mM, voltaje de separación: 23 kV.

3.2.2. Cuantificación mediante MEKC

Las áreas de los picos fueron usadas para desarrollar la calibración para cada analito. Para SX, el intervalo lineal fue entre 2.30-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para el SN entre 3.80-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para el 3-OH entre 2.01-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para ALD entre 7.47-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y CARB entre 5.11-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Los límites de detección (DL) y cuantificación (CL) fueron calculados por el método de Cuadros *et al.*⁵¹ resultando que el límite de detección más bajo se obtuvo para el 3-OH, mientras que el mayor valor de 7.47 $\mu\text{g.L}^{-1}$ fue obtenido para ALD. La precisión del método fue determinada mediante la repetición de cuatro muestras de cada carbamato a una concentración de 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ obteniendo un valor medio para la desviación estándar relativa de 4.08%. Estos valores son aceptables y similares a los obtenidos con técnicas cromatográficas. Todos los resultados son presentados en la Tabla I.2.

| Parámetro | SX | SN | 3-OH | ALD | CARB |
|---|------|-------|------|-------|-------|
| Límite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 2.30 | 3.80 | 2.01 | 7.47 | 5.11 |
| Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 0.83 | 1.36 | 0.72 | 2.69 | 1.84 |
| Límite de cuantificación ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | 7.69 | 12.65 | 6.70 | 24.91 | 17.06 |
| Repetibilidad (% , área de pico) | 2.25 | 3.72 | 1.96 | 7.19 | 5.27 |

Tabla I.2. Parámetros de calidad

3.2.3. Extracción en fase sólida

La extracción de los pesticidas de las muestras de agua fue llevada a cabo mediante cartuchos de extracción en fase sólida de 6 mL de volumen conteniendo 500 mg de carbón grafitado con 60/80 malla.

[51] L. Cuadros-Rodríguez, A.M. García-Campaña, C. Jiménez-Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, 67 (1993) 1243.

Los cartuchos fueron precondicionados secuencialmente con 10 mL de acetato de etilo, 15 mL de acetonitrilo y 10 mL de agua bidestilada y posteriormente secados mediante una corriente de aire. Se pasaron 250 mL de muestra de agua dopada a una concentración entre 0-40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a través de los 500 mg precondicionados anteriormente a una velocidad de flujo de 5 mL.min^{-1} y secados mediante una corriente de aire durante 10 min.

Después fue llevada a cabo una elución con 2 mL de acetonitrilo. La disolución eluida fue evaporada hasta sequedad con una corriente de nitrógeno. Al residuo seco se le añadió 250 μl de la disolución separadora y la disolución fue directamente transferida a microviales consiguiendo de esta forma una preconcentración de mil veces.

3.2.4. Aplicación a muestras ambientales

Para demostrar como el método puede ser aplicado a muestras reales y debido al hecho de que la contaminación de aguas de riego por pesticidas ha estimulado en los últimos años el desarrollo de métodos, se tomaron distintas aguas de riego de diferentes localidades de Almería donde se desarrolla la agricultura intensiva.

| Pesticida | Nivel de fortificación ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | Concentración encontrada ($\mu\text{g.L}^{-1}$) | % R ^a |
|-----------|---|---|------------------|
| SX | 30 | 23.07 | 76.91 |
| SN | 30 | 27.64 | 92.14 |
| 3-OH | 30 | 29.00 | 96.67 |
| ALD | 30 | 27.33 | 91.10 |
| CARB | 30 | 24.24 | 80.81 |

^a Valores de recuperación

Tabla I.3. Análisis de muestras de agua.

Las muestras fueron fortificadas a un nivel de concentración de $30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ con los cinco carbamatos previamente comentados. La aplicabilidad de la metodología propuesta fue demostrada al obtener porcentajes de recuperación entre 77-97% ($n=5$) para los cinco carbamatos analizados (Tabla I.3).

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

En este capítulo se ha desarrollado una aplicación del acoplamiento entre la CE y el sistema de detección UV-visible para el análisis en aguas de riego de dos pesticidas, aldicarb y carbofurano y de sus principales metabolitos, aldicarb sulfoxido y aldicarb sulfona del primero, y el 3-hidroxicarbofurano del segundo mediante MEKC utilizando un sistema de preconcentración como es la extracción en fase sólida para con ello mejorar la sensibilidad de la detección llegándose a conseguir una preconcentración del orden de mil veces para los analitos estudiados. El estudio realizado confirma la viabilidad de la metodología MECK y el uso de DAD para la detección y cuantificación de una familia de pesticidas como son los N-metilcarbamatos.

Las separaciones fueron llevadas a cabo usando borato sódico/HCl a una concentración de 20 mM (pH 8) y 140 mM de SDS a 23 kV. Los patrones y muestras fueron inyectadas hidrodinámicamente con una presión de 0.5 psi (3.45 kPa) durante 12 segundos y la detección fue llevada a cabo con la batería de diodos a 210 nm empleando para el análisis menos de 17 min.

Mediante la optimización de los diferentes parámetros, ya sean instrumentales y experimentales y mediante la puesta a punto de un sistema de extracción en fase sólida, se han conseguido límites de detección del orden de los pocos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ obteniéndose unos porcentajes de recuperación de entre 77-97 % y una DER entre 2-7 % para diferentes muestras de agua fortificadas a niveles de concentración de las ppb.

El sistema de detección utilizado en este acoplamiento ha sido de tipo comercial que consistió en un espectrofotómetro de longitud de onda variable usando una lámpara continua de deuterio, una red de difracción la cual se utiliza para seleccionar la longitud de onda y finalmente un detector, en este caso se usó un multidetector

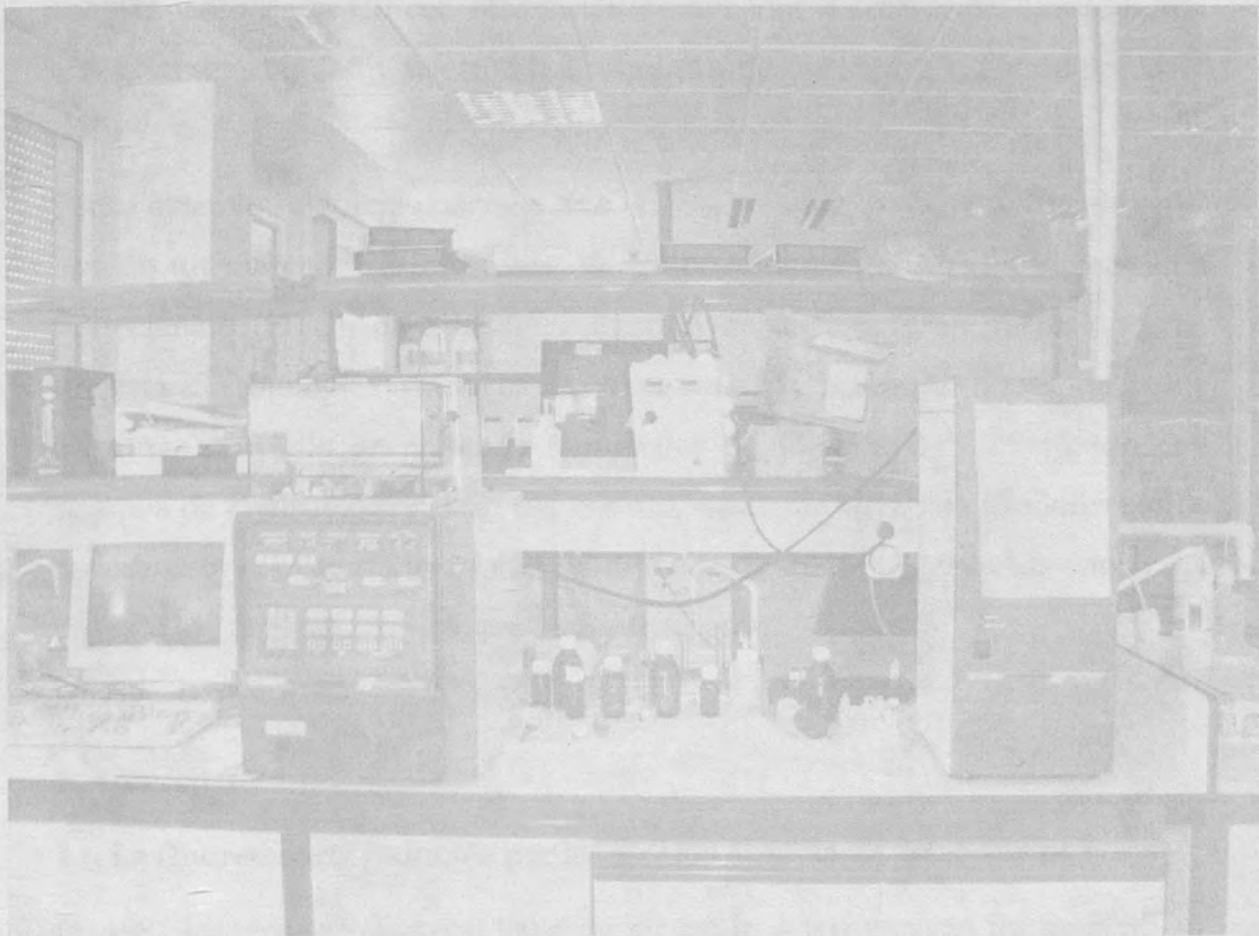
fotométrico o detector por batería de diodos que permiten monitorizar, simultáneamente, varias longitudes de onda, realizar espectros para cada analito, lo cual a su vez permite comprobar la pureza espectral de los picos, etc. El equipo de CE utilizado acoplado a la detección por espectrofotometría UV-Vis se muestra en la Figura I.4.

El inconveniente más importante del uso de este sistema de detección es el pequeñísimo paso de luz (diámetro del capilar 50-100 μm) y el pequeño volumen de muestra introducido con lo que con estos sistemas se reduce la sensibilidad de forma notable. Además, la pequeña intensidad lumínica induce un notable ruido de fondo. Dicho problema de sensibilidad puede ser fácilmente resuelto con técnicas de preconcentración como la SPE tal y como se ha demostrado en este capítulo.

A pesar de estas inconveniencias, que en la mayoría de los casos son fácilmente subsanables, los equipos de CE con detección por espectrofotometría UV-Vis son los mas ampliamente utilizados en la mayoría de los laboratorios de rutina puesto que es un modo de detección casi universal, ya sea por detección directa o indirecta y permite una fácil y reproducible detección.



Figura I.4. Imagen del equipo CE-UV.



CAPÍTULO II

Determinación del neurotransmisor serotonina en muestras biológicas mediante electroforesis capilar en zona con detección por fluorescencia inducida por láser.

Las investigaciones realizadas en este capítulo II se han desarrollado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y se han concretado en un trabajo que se encuentra en publicado en la revista "Biomedical Chromatography 18 (2004) 422-426" (ver anexo II)

1. Objetivo

En este segundo capítulo se pretende poner de manifiesto las posibilidades del acoplamiento de la CE con otro sistema comercial de detección que presenta una gran sensibilidad y selectividad como es la fluorescencia inducida por láser (LIF).

Dicho objetivo se quiere concretar con el desarrollo de un método basado en el uso de un marcador fluorescente, de grupos amino como es la fluoresceína isotiocianato (FITC), para la determinación de un neurotransmisor, de gran importancia biológica como es la serotonina en muestras reales de orina humana. Para ello se pretende desarrollar un método de CZE rápido con tiempos de análisis por debajo del minuto, mediante el uso de capilares cortos usando este marcador cuya longitud de onda de excitación coincide con la del láser de ión argón comercial que se desea emplear.

2. Antecedentes

2.1. La fluorescencia inducida por láser como sistema de detección en CE

En 1981 Jorgenson y Lukacs¹ llevaron a cabo la determinación fluorescente de una mezcla de aminoácidos mediante CE. En este trabajo pionero se utilizó una lámpara de arco de mercurio a alta presión como excitación y la fluorescencia obtenida fue detectada por medio de un fluorímetro estándar.

Hoy día se emplean láseres como fuente de excitación, es la denominada LIF. Este tipo de fuentes son muy útiles en la instrumentación analítica debido a sus elevadas intensidades, a sus estrechas anchuras de banda y a la naturaleza coherente de sus señales de salida². Tienen además la particularidad de poder ser focalizados fácilmente por lo que se pueden hacer incidir en la ventana del capilar.

[1] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 226 (1981) 1298.

[2] X. Zhang, J.N. Stuart, J.V. Sweedler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 332.

Así, la LIF es hasta la fecha la fuente de excitación más sensible para pequeños volúmenes de muestra. Varias modalidades de LIF han sido implementadas, como son a) la detección on-column desarrollada por Zare y col.³, b) la post-column demostrada por Dovichi y col.⁴⁻⁶ y c) la FIL indirecta presentada por Yeung y Kuhr^{7,8}.

Así, la detección LIF directa se emplea en aquellos casos en los cuales el analito de interés es fluorescente o bien, presenta fluorescencia tras una reacción de derivatización⁹ o bien se utiliza la forma indirecta^{7,8}.

Desde la primera introducción de la detección LIF por Zare y col.³ para CE los límites de detección han mejorado de forma espectacular. En este dispositivo desarrollado se usaron fibras ópticas para iluminar el capilar y recoger la señal fluorescente y un láser de He-Cd a 325 nm. La señal fluorescente fue dirigida a un monocromador y detectada con un tubo fotomultiplicador. Con este dispositivo se consiguieron límites de detección de 0.1 μM para amino ácidos dansilados¹⁰.

Hernández y col.¹¹ consiguieron unos límites de detección de 10^{-13} M para una serie de amino ácidos derivatizados. Para ello, diseñaron un sistema donde el ángulo entre el rayo láser de excitación y la fluorescencia recogida es de 0° , con lo cual se redujo la dispersión del láser por las paredes del capilar.

Novotny y col.¹² presentaron también el uso de LIF para la detección de amino ácidos usando un láser modulado de He-Cd focalizado directamente en el capilar y la señal fluorescente se recogió a 90° respecto del haz incidente utilizando fibras ópticas.

[3] E. Gassmann, J.E. Kuo, R.N. Zare, *Science*, 230 (1985) 813.

[4] D.Y. Cheng, H.P. Swerdlow, H.R. Harke, J.Z. Zang, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A*, 559 (1991) 237.

[5] Y.F. Cheng, N.J. Dovichi, *Science*, 242 (1988) 562.

[6] S. Wu, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A*, 480 (1989) 141.

[7] W.G. Kuhr, E.S. Yeung, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1832.

[8] W.G. Kuhr, E.S. Yeung, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2642.

[9] D.R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons (1995) New York.

[10] K. Swinney, D.J. Bornhop, *Electrophoresis*, Review, 21 (2000) 1239.

[11] L. Hernández, N. Joshi, J. Escalón, N. Guzmán, *J. Chromatogr. A*, 502 (1990) 247.

[12] J. Liu, O. Shirota, M. Novotny, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 413.

Swaile y Sepaniak¹³ fueron los primeros en usar un láser de ion-Ar de frecuencia doblada a 257 nm consiguiendo unos límites de detección de 10^{-8} M.

Usando el mismo tipo de láser, Nie y col.¹⁴ consiguieron obtener mejores límites de detección, del orden de 10^{-11} M para la detección de fluorescencia nativa de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Yenung y Chang¹⁵ y Sweedler y col.¹⁶ describieron la detección de triptófano basandose en su fluorescencia nativa utilizando un láser de Kr. Ambos grupos obtuvieron unos límites de detección del orden de 10^{-10} M.

La desventaja del uso de la fluorescencia nativa radica en que la señal a menudo es débil y la señal de la línea base puede ser alta a parte de que se requieren en la mayoría de los casos láseres que emitan en la región del UV lejano y el coste de estos láseres es elevado. Además, muy pocas moléculas exhiben fluorescencia nativa, por lo que, la técnica está limitada a un pequeño número de moléculas, no obstante, mediante esta modalidad se han analizado un importante número de compuestos¹⁷⁻¹⁹.

Aunque la derivatización permite la detección de moléculas que no presentan fluorescencia nativa, la reacción química necesaria y el tiempo empleado en los procesos de derivatización ha hecho que LIF sea menos atractiva que los métodos de detección universales. La derivatización es una modificación de los analitos, intentando dar a estos compuestos unas características analíticas más adecuadas. Hay numerosas reacciones para incorporar cambios en estos analitos, en la mayoría de los casos la derivatización lleva consigo asociada la introducción de grupos absorbentes o fluorescentes en la molécula consiguiendo así incrementar la selectividad y sensibilidad de la detección²⁰.

[13] D.F. Swaile, M.J. Sepaniak, *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 869.

[14] S. Nie, R. Dadoo, N. Zare, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3571.

[15] H.T. Chang, E.S. Yeung, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1079.

[16] A.T. Timperman, K.E. Oldenburg, J.V. Sweedler, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3421.

[17] K. Swinney, D. Bornhop, *Critical Reviews in Anal. Chem.*, 30 (2000) 1.

[18] C. Gooijer, S.J. Kok, F. Ariese, *Analisis*, 28 (2000) 679.

[19] X. Paez, L. Hernandez, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 22 (2001) 273.

[20] W.J.M. Underberg, J.C.M. Waterval, *Electrophoresis, Review*, 23 (2002) 3922.

Existen diversos modos de derivatización, como la derivatización on-line, on-column y post-column y la derivatización pre-column²¹.

La derivatización pre-columna ha sido una modalidad utilizada con éxito debido principalmente a que apenas hay una limitación en el número de reacciones posibles. Todos los tipos de reactivos pueden ser empleados, además de que son posibles las derivatizaciones en condiciones extremas, como altas temperaturas y largos tiempos de reacción. Además la eliminación del exceso de reactivo mediante extracción o evaporación solo es posible en este modo de derivatización.

En el modo on-line, en el cual la derivatización se produce por mezcla de los analitos con el reactivo justo antes del capilar empleando una unión en forma de T, frecuentemente se emplea en combinación con un proceso de microdiálisis. La baja velocidad de flujo y la posibilidad de monitorizar la concentración del analito con cortos intervalos requiere el uso de una técnica con bajos volúmenes de muestra combinada con una alta sensibilidad y tiempos de análisis cortos y CE con LIF cumple estos requisitos.

Las técnicas de derivatización on-column se desarrollan en el interior del capilar durante la electroforesis de los analitos y los reactivos. Debido a la diferencia en las velocidades de migración los reactivos se mezclan durante la migración de los compuestos. La reacción puede tener lugar al comienzo del capilar, en la zona media o durante todo el recorrido en el capilar. Generalmente, esta modalidad es adecuada para pequeños volúmenes de muestra, para lo cual la dilución de la muestra es importante.

En el caso de la derivatización post-column, se pueden encontrar algunas ventajas con respecto a los anteriores modos. Los compuestos nativos son separados y derivatizados posteriormente, así se evitan ciertas interferencias en cuanto al tamaño de los productos además de los ensanchamientos de banda, causados por las múltiples reacciones de derivatización. Sin embargo, los

[21] W.J.M. Underberg, J.C.M. Waterval, *Electrophoresis, Review*, 23 (2002) 3922.

efectos negativos en la eficiencia de pico, pérdida de analito, reacciones incompletas y el alto ruido línea base son importantes.

También para esta modalidad de detección es importante tener en cuenta, además del tipo de analitos que se pretenden estudiar, la longitud de onda de excitación del láser que se va a emplear, ya que la elección del tipo de compuesto marcador es otro factor crítico y de gran selectividad a la hora de emplear esta modalidad. Así, se pueden encontrar un determinado grupo de compuestos marcadores que han sido utilizados como son el cloruro de dansilo, ácido aminobenzoico, fluorescamina, o-ftalaldehído (OPA), naftalen-2,3-dicarboxaldehído, fluoresceína isotiocianato (FITC)²¹ y con ellos se han determinado una gran variedad de compuestos como proteínas²²⁻²⁴, DNA^{25,26}, amino ácidos²⁷⁻²⁹, péptidos^{24,30,31} y aminas biógenas³²⁻³⁴.

La LIF indirecta es otra posibilidad de detección para esta técnica. Este tipo de modalidad fue presentada por primera vez por Yueng y Kuhr^{7,8}. El concepto de las medidas por fluorescencia indirecta es esencialmente el mismo que para las medidas por absorción indirecta, excepto que la disolución reguladora utilizada es fluorescente en lugar de presentar absorbancia. Los límites de detección en esta técnica están generalmente en el rango de 10^{-6} - 10^{-7} M. Comparada con LIF directa, los peores límites de detección para esta modalidad son el resultado del ruido fluorescente de la línea base, principalmente causado por la inestabilidad de la intensidad del láser. Sin embargo se requieren bajas concentraciones de compuestos fluorescentes para maximizar la sensibilidad de los analitos

[22] V. Dolnik, K.M. Hutterer, *Electrophoresis, Review*, 22 (2001) 4163.

[23] H.F. Zhang, L. Ma, X. Liu, Y.T. Lu, *J. Chromatogr. B*, 804 (2004) 413.

[24] M.L. Ye, S. Hu, W.W.C. Quigley, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 201.

[25] Y.W. Lin, T.C. Chiu, H.T. Chang, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 37.

[26] M. Wirtz, D. Stach, H.C. Kliem, M. Wiessler, O.J. Schmitz, *Electrophoresis*, 25 (2004) 839.

[27] V. Poinot, C. Bayle, F. Couderc, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 4047.

[28] H. Zhang, W.R. Jin, *Electrophoresis* 25 (2004) 480.

[29] Y.Y. Chen, W. Wang, W.P. Yang, Z.J. Zhang, *Chinese Chemical letters*, 15 (2004) 112.

[30] N. Siri, P. Riolet, C. Bayle, F. Couderc, *J. Chromatogr. B*, 793 (2003) 151.

[31] M. Sandberg, S.G. Weber, *Trac-Trends Anal. Chem., Review*, 22 (2003) 522.

[32] W.J.M. Underberg, J.C.M. Waterval, *Electrophoresis, review*, 23 (2002) 3922.

[33] X. Liu, L.X. Yang, Y.T. Lu, *J. Chromatogr. A*, 998 (2003) 213.

[34] C. Bayle, N. Siri, V. Poinot, M. Treillhou, E. Causse, F. Couderc, *J. Chromatogr. A*, 1013 (2003) 123.

luminiscentes. A causa de estas bajas concentraciones de aditivos, la fuerza iónica de la solución reguladora es baja. Debido a esto, a menudo ocurre una asimetría en los picos en la parte superior del rango dinámico lineal que hace que, la detección por LIF indirecta no se emplea a menudo¹⁰. No obstante ha sido utilizada para el análisis de aminas³⁵, aniones inorgánicos^{36,37}, ácidos carboxílicos³⁸ e hidrocarburos aromáticos policíclicos³⁹.

2.2. La serotonina como analito de interés

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) (Figura II.1) es un importante neurotransmisor, que también desempeña otras funciones fisiológicas dado que, además de en el sistema nervioso central, se encuentra en los mastocitos y las plaquetas. Esta amina puede actuar también en el tracto gastrointestinal induciendo la liberación de hormonas peptídicas.

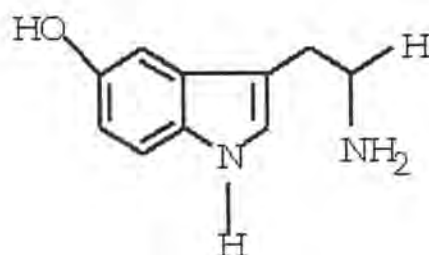


Figura II.1. Estructura de la serotonina

La serotonina interviene en diversas funciones como neurotransmisor del sistema nervioso central, influyendo en funciones cerebrales como el sueño, la función cognoscitiva, la percepción sensorial, la actividad motora, la regulación

[35] M.F. Huang, H.T. Chang, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.*, 26 (2003) 3387.

[36] J.E. Melanson, C.A. Boulet, C.A. Lucy, *Anal. Chem.*, 3 (2001) 1809.

[37] N. Ragozina, M. Putz, W. Faubel, U. Pyell, *Electrophoresis*, 24 (2003) 567.

[38] T.C. Chiu, M.F. Huang, C.C. Huang, M.M. Hsieh, H.T. Chang, *Electrophoresis*, 23 (2002) 449.

[39] S.R. Wallenborg, C.G. Bailey, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1872.

de la temperatura, el apetito, la conducta sexual y la secreción de hormonas; también como regulador de la función del músculo liso en los aparatos cardiovascular y digestivo, y como regulador de la función plaquetaria.

Estudios llevados a cabo sobre su regla fisiológica han elucidado algunas de sus funciones pero aún es objeto de una investigación intensiva, la cual no será posible sin el desarrollo de métodos, precisos y sensibles para el análisis de esta amina biógena⁴⁰⁻⁴².

3. Experimental

3.1. Materiales e instrumentación

3.1.1. Analito y disoluciones

Serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) fue suministrada por Sigma-Aldrich. Una disolución de una concentración de 1.0×10^{-3} M fue preparada disolviendo la cantidad requerida de serotonina en agua bidestilada. Alícuotas de esta disoluciones de trabajo fueron usadas para preparar los patrones de calibración.

Una disolución madre del agente derivatizante FITC 0.1 M fue preparada disolviendo la fluoresceína isotiocianato en acetona. Esta disolución fue diluida con acetona para preparar disoluciones de trabajo de 1.0×10^{-2} M. Estas disoluciones fueron mantenidas en refrigerador a 4 °C. Una disolución 0.2 M de carbonato sódico/bicarbonato (pH 9) fue usada para el procedimiento de derivatización mientras que una disolución 15 mM a pH 9 de borato/HCl fue seleccionada para el procedimiento de separación electroforética.

Todas las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de 0.45 µm Millipore (Bedford, MA, USA) antes de ser introducidas en el capilar del instrumento. El agua destilada fue obtenida con un sistema de purificación Milli-Q.

[40] B. Geller, E.H. Cook, *Biol. Psychiat.*, 45 (1999) 1230.

[41] T. Kappes, P. Schnierle, P.C. Hauser, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1390.

[42] H. Miao, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 1007.

3.1.2. Instrumentación

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con un Beckman P/ACE modelo 5500 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de FIL Beckman con el ánodo en el vial de inyección y el cátodo en el de detección. La radiación a la longitud de onda de excitación (488 nm) se generó mediante un láser de argón y la longitud de onda de emisión de 520 nm se obtuvo mediante el uso de un filtro de paso óptico. Se utilizó también un Software Beckman System Gold para el control del sistema y para la adquisición y procesamiento de señales.

3.1.3. Procedimiento de derivatización

Alicuotas entre 5-20 μL de disolución de serotonina (1.0×10^{-3} M) fueron mezclados con 495 μL de una disolución de reguladora 0.2 M de carbonato (pH 9) y 400 μL de disolución de FITC (1.0×10^{-2} M). La mezcla fue introducida en un baño termostático durante 2 horas a 45 °C y 109 μL de la disolución resultante fueron diluidas hasta un volumen final de 10 mL con agua bidestilada. La disolución final fue introducida en un CE-LIF para llevar a cabo el análisis.

3.1.4. Procedimiento electroforético

La separación fue llevada a cabo en un capilar hueco de sílice de 75 μm de diámetro interno y una longitud total de 32 cm (25 cm hasta el detector) el cual fue instalado en un cartucho con refrigeración controlada a 25 °C y especialmente diseñado para el detector FIL. El acondicionamiento del capilar fue llevado a cabo lavando las columnas durante 1 min con hidróxido sódico 0.1 M, luego durante 1 min con agua y finalmente durante 4 min con el reguladora de separación. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua bidestilada. Las separaciones fueron llevadas a cabo usando una disolución de borato sódico 15 mM a pH 9. El voltaje aplicado fue de 25 kV y la corriente aplicada fue de 50 μA . Las muestras fueron inyectadas hidrodinámicamente con una presión de 0.5 psi durante 12 s y los electroforogramas para la determinación de la serotonina

fueron obtenidos en menos de 1 min a 488 nm de longitud de onda de excitación y 520 nm de emisión.

3.2. Optimización del método propuesto

Como se comentó anteriormente CE con detección mediante FIL ha sido ampliamente usada para determinar aminas primarias y aminoácidos. Los reactivos más comúnmente usados como agentes derivatizantes han sido FITC, naphthalenedicarboxaldehído, o-phthaldialdehído, 3-(4-carboxybenzoil)-2-quinolina carboxaldehído y fluorescamina. Entre ellos FITC fue seleccionada para la derivatización de la serotonina ya que provoca un derivado altamente fluorescente cuya longitud de onda de excitación coincide exactamente con la del láser de argón (488 nm) y por otro lado el uso de longitudes de onda de excitación de la zona del visible reduce los problemas de luz dispersa y mejora la sensibilidad de los métodos.

3.2.1. Optimización de las condiciones de derivatización

El objetivo principal de estos experimentos fue conseguir la mayor y más intensa señal fluorescente del derivado de la serotonina y el mejor límite de detección posible. Para optimizar las condiciones de derivatización, varios parámetros que afectan a la reacción fueron estudiados (composición química, concentración y pH de la disolución regularora, la cantidad de FITC, la adición de disolventes orgánicos, el tiempo y la temperatura de reacción).

También es necesario indicar que la aparición de subproductos en la reacción de derivatización no fue impedimento alguno para la determinación y cuantificación de la serotonina.

El efecto del pH, tipo y concentración de la disolución reguladora sobre la eficiencias de la reacción de derivatización fue estudiada usando cuatro disoluciones reguladoras (carbonato sódico/ HCO_3^- , borato sódico/HCl, CAPSO/NaOH y cloruro amónico/ NH_3) a diferentes pH conteniendo 10% (v/v) de acetona.

Cómo se puede ver en la Figura II.2, hay una gran influencia del pH sobre el área del pico electroforético de la serotonina, obteniendo los mejores resultados usando una disolución de carbonato sódico/ HCO_3^- a pH 9.

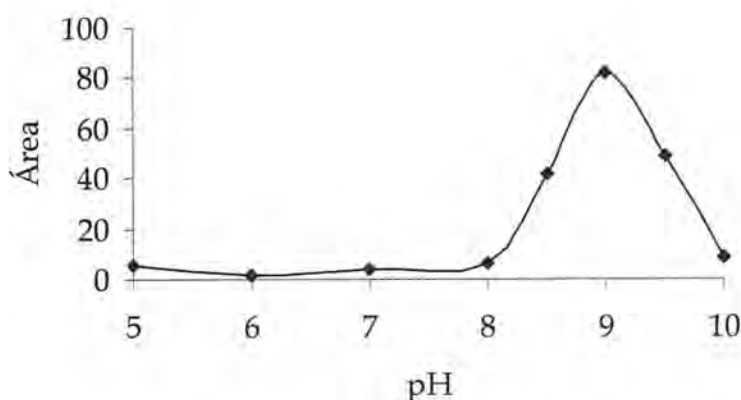


Figura II.2. Influencia del pH de la disolución reguladora de carbonato/ HCO_3^- en el área del pico de la serotonina.

Además se observó que la velocidad de la reacción no estaba significativamente afectada por el cambio de concentración de la disolución reguladora de carbonato en el rango comprendido entre 50 y 400 mM presente en la disolución de la reacción. Teniendo en cuenta estos resultados, una disolución reguladora de 100 mM carbonato a pH 9 fue seleccionada para el resto del trabajo experimental.

Dado que los disolventes orgánicos pueden aumentar o atenuar la emisión fluorescente de los compuestos derivatizados, la influencia de diferentes disolventes como son acetona, acetonitrilo, metanol, tetrahidrofurano (THF) y dimetilformamida (DMF) han sido seleccionados para el presente estudio. La selección de estos disolventes ha sido llevada a cabo basándose en la solubilidad de la FITC en dichos disolventes.

Se observó que la mejor intensidad de señal fluorescente se obtuvo utilizando acetona y dado que el porcentaje de acetona afecta a la intensidad de la emisión, se tuvo que realizar un cuidadoso estudio en un rango de 15 a 60%. La intensidad de la señal fue casi similar con porcentajes de acetona entre el 15-40%,

mientras fue observada una disminución con porcentajes alrededor del 50 %. Así, se seleccionó un porcentaje de acetona del 20 % en la disolución.

Por otro lado, la reacción de derivatización de aminas primarias y secundarias utilizando FITC es relativamente lenta, siendo necesario usualmente un tiempo de reacción de 12 h. Para disminuir este tiempo de reacción, se llevó a cabo un cuidadoso estudio de la velocidad de reacción a diferentes temperaturas. Como era de esperar, la velocidad de la reacción entre serotonina y FITC aumentó al aumentar la temperatura. Como se observa en la Figura II.3, a temperatura ambiente (25 °C) la reacción se completa a partir de las 8 horas mientras que a 45 °C, la máxima fluorescencia se encontró en 2 horas. A 70 °C los tiempos de reacción no disminuyen y a esta temperatura se produce una descomposición de los productos derivatizados y del propio marcador. Como se puede observar en esta figura, la derivatización de la serotonina es prácticamente completa después de 2 horas a 45 °C, tiempo sensiblemente inferior a los descritos anteriormente para este tipo de reacción de derivatización.

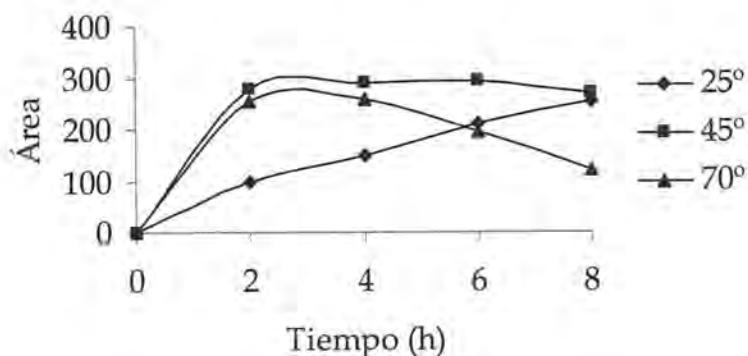


Figura II.3. Efecto del tiempo y temperatura de la reacción de derivatización de 5-HT con FITC en área de pico.

3.2.2. Elección de las condiciones electroforéticas

La optimización de las condiciones electroforéticas (concentración de reguladora, voltaje aplicado, tiempo de inyección y longitud del capilar) se realizaron en función del comportamiento en la migración, tratando de mejorar la sensibilidad e intentando acortar el tiempo de análisis para la serotonina.

Primero de todo el pH de la disolución reguladora se varió desde 8 a 11 de unidad en unidad, y la mayor resolución entre el pico de la serotonina y de los metabolitos del marcador se obtuvo a pH 9. A continuación se estudiaron varios tipos de disoluciones reguladoras en un intento por mejorar aún más la resolución. Así aunque con varias se obtuvo buena resolución, se eligió borato/HCl a 15 mM por ser la que presentaba una mejor resolución entre la serotonina y los metabolitos derivados del agente derivatizante y los componentes de la matriz.

El efecto del voltaje aplicado fue estudiado entre 20-30 kV eligiendo un voltaje de 25 kV. Las muestras fueron introducidas hidrodinámicamente con una presión de inyección de 0.5 psi (1 psi=6894.76 Pa) utilizando capilares de sílice (L_D 25 cm, L_T 32 cm) a 25 °C. Aumentando el tiempo de inyección se puede aumentar la sensibilidad del método. Por ello, se llevó a cabo un detallado estudio del tiempo de inyección en un rango de 2 a 14 s obteniéndose los mejores resultados a 12 s.

En la Figura II.4 se presentan los electroferogramas del blanco corresponden a la derivatización del reactivo FITC y en presencia de 94 nM de 5-HT. Como se puede observar, a pesar de que aparecen diferentes picos en el reactivo de derivatización, ellos no interfieren con la determinación de 5-HT que puede ser realizada en 1 min libre sin interferencia del reactivo.

3.2.3. *Curvas de calibrado*

La selección de los parámetros electroforéticos ha permitido la óptima determinación de serotonina en tiempos de análisis inferiores a 1 min. A partir de aquí, el establecimiento de las curvas de calibrado de la serotonina fue llevada a cabo utilizando las medidas en áreas de pico. El intervalo lineal obtenido fue entre 0-40 ng.mL⁻¹ con un coeficiente de correlación 0.995 y una DSR entre 2-9% para las diferentes concentraciones ensayadas. En la tabla II.1 se muestran detalladamente los datos analíticos del método propuesto.

| Parámetro | Serotonina |
|---|------------|
| Pendiente | 16.952 |
| Ordenada en el origen | 139.772 |
| Límite de detección (ng.mL ⁻¹) | 3.509 |
| Sensibilidad analítica (ng.mL ⁻¹) | 1.226 |
| Límite de cuantificación (ng.mL ⁻¹) | 11.696 |

Tabla II.1. Parámetros de calidad.

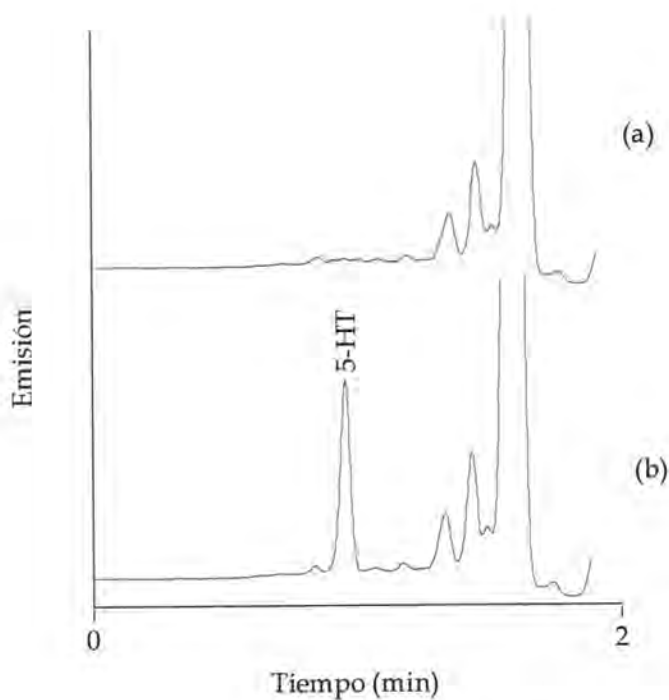


Figura II.4. Electroferograma de la (a) reactivo marcador FITC y (b) la FITC derivatizada con serotonina a 94 nM. Condiciones electroforéticas: 15 mM borato/HCl a pH 9, voltaje 25 kV y tiempo de inyección de 12 s.

3.2.4. Aplicación a muestras de orina

La determinación del neurotransmisor serotonina en fluidos biológicos es de gran importancia para la investigación biomédica, diagnósticos médicos y la industria farmacéutica ya que juega un importante papel en el control y regulación de una variedad de funciones del sistema nervioso central.

El presente método ha sido aplicado a muestras de orina y validado utilizando la metodología de adición de patrón. Las muestras de orina fueron centrifugadas a 3.500 r.p.m. y posteriormente una porción del sobrenadante fue derivatizada según el procedimiento anteriormente descrito. En esta metodología se realizó una recta de calibrado con concentraciones crecientes de analito y otra con las mismas concentraciones anteriores y en cada una de ellas se adicionó 20 μ L de orina. En la figura II.5 se muestra la recta de adición de patrón obtenidas.

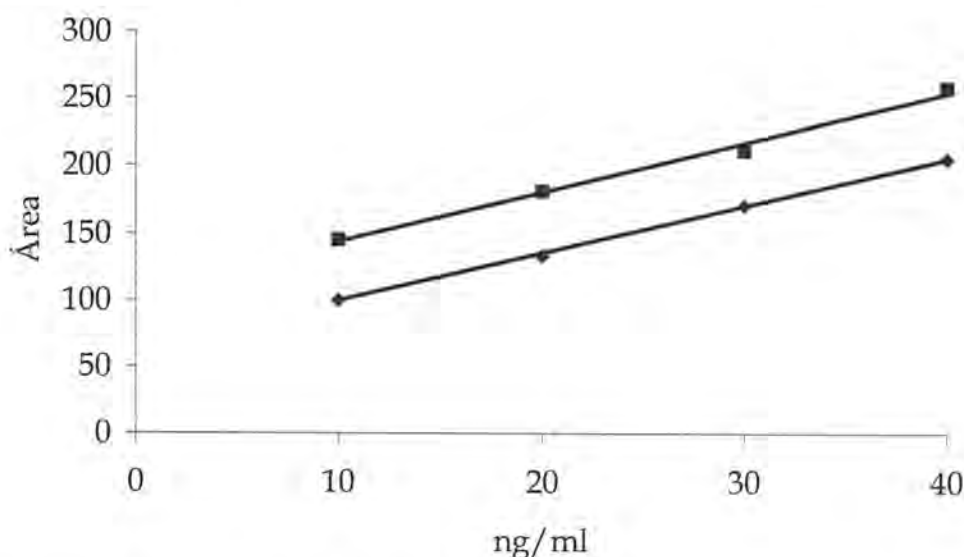


Figura II.5. Gráfica de adición de patrón.

Para comprobar la similitud de las pendientes se llevó a cabo la aplicación del test "t" de Studen. La "t" calculada para las pendientes fue de 0.666 mientras que la "t" tabulada fue de 2.776 a 4 grados de libertad y un α de 0.01. Por lo tanto las pendientes son esencialmente iguales. La aplicabilidad del método propuesto se demostró para el análisis de 5-HT en orina humana obteniendo

una concentración de 12.33 ng.mL^{-1} . Como se puede apreciar en la Figura II.4, el pico correspondiente a la serotonina en muestras de orina esta claramente identificado y permite su cuantificación en muestras reales tiempos inferiores al minuto minuto.

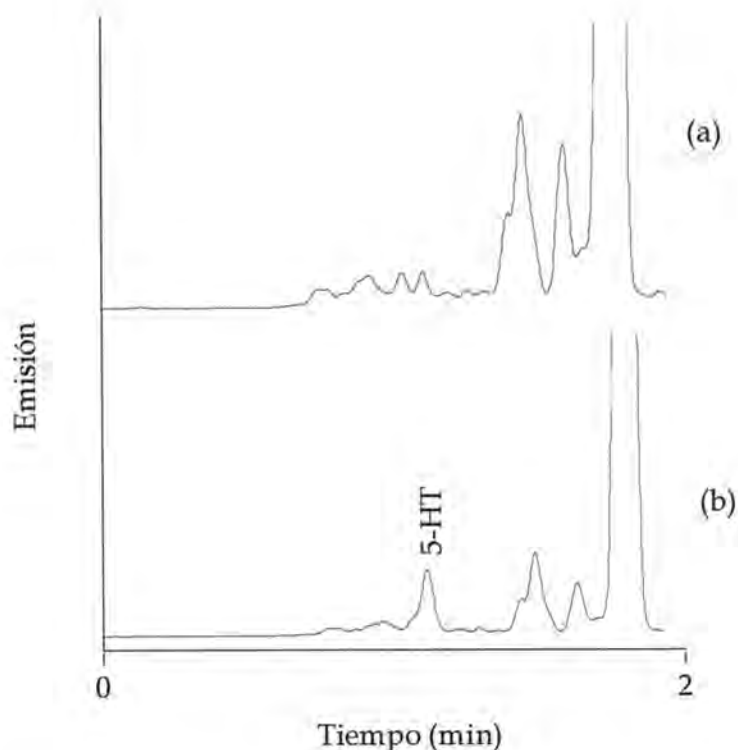


Figura II.5. Aplicación de la reacción de la FITC derivada para la determinación de serotonina en muestras de orina. (a) Blanco de muestra de orina (b) Muestra de orina dopada con 94 nM 5-HT. Condiciones electroforéticas: 15 mM borato/HCl a pH 9, voltaje 25 kV y tiempo de inyección de 12 s .

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

En el presente capítulo se ha utilizado el acoplamiento electroforesis capilar con la detección por fluorescencia inducida por láser para el análisis de un neurotransmisor biológico en orina utilizando la derivatización pre-columna y como agente derivatizante FITC.

En este estudio se ha desarrollado un método CE-LIF rápido y sensible para la determinación y la cuantificación de serotonina en orina humana. Es de interés comentar el uso de la derivatización pre-columna, la cual como se ha comentado en los antecedentes de este capítulo es el modo de derivatización más empleado debido a las ventajas que presenta aunque esto conlleve un aumento en el tiempo total de análisis, no obstante en el presente estudio se ha desarrollado una metodología para reducir considerablemente el tiempo de derivatización mediante el control de la temperatura de la reacción, así como el tiempo de análisis mediante CE con el empleo de capilares cortos dando lugar a la consecución de un análisis rápido del analito en estudio. Para ello se han estudiado diferentes variables que afectan tanto al proceso de derivatización como al de separación obteniéndose con ello un límite de detección de 16 nM (3.40 ppb) y una concentración de 57 nM (12.1 ppb) en la muestra de orina analizada.

La interfase utilizada en este acoplamiento es de tipo comercial utilizando como fuente de excitación un láser de ión argón cuya excitación se produce a una longitud de onda de 488 nm (Figura II.6). La luz láser se conduce mediante una fibra óptica y se enfoca con una lente hacia el interior del capilar, la luz emitida del capilar se recoge en una lente y se detecta en un fotomultiplicador, existiendo entre la lente y el fotomultiplicador un filtro para la recogida de la emisión, en este caso se empleó filtro a 520 m, además de emplearse para evitar la luz reflejada del mismo (Figura II.7).

En la Figura II.8 se muestra la imagen del equipo CE comercial acoplado a LIF con una fuente láser de ión argón que ha permitido el desarrollo de un método electroforético sensible para el análisis y cuantificación del neurotransmisor serotonina en orina humana.

La principal ventaja, sin duda, de este tipo de acoplamiento, viene dada por la alta sensibilidad que proporciona, sin embargo, hay ciertas desventajas o limitaciones que son importantes destacar.



Figura II.6. Detalle del mecanismo del láser de ión argón empleado.



Figura II.7. Filtro de emisión a 520 nm.

Así existe un número muy limitado de fuentes de excitación láser, siendo los más utilizados láseres continuos entre los que destacan los de helio-cadmio, helio-neón o ión argón emitiendo los primeros a 325 y 442 nm, en cambio, los de ión argón pueden ser adaptados a distintas longitudes de onda siendo las más frecuentes de 350-360, 476, 488 y 514 nm y 257 nm para láser de frecuencia doblada utilizados a distintas potencias, aunque también se han utilizado láseres de diodos, pulsantes y de colorantes.

Otro factor a tener en cuenta es que el número de moléculas que exhiben fluorescencia nativa es muy limitado, por lo que, en la mayoría de los casos, es necesario recurrir a las denominadas reacciones de derivatización empleando marcadores fluorescentes específicos de distintos grupos funcionales que permiten convertir un analito no fluorescente en fluorescente.

Debido a estas dos limitaciones, el problema que se plantea es encontrar el marcador fluorescente adecuado, si el analito no presenta fluorescencia nativa, para que, en primer lugar, pueda reaccionar con el analito en cuestión dando lugar a un compuesto que sea fluorescente, y en segundo lugar, que el compuesto obtenido tras la reacción de marcado sea susceptible de ser excitado a la longitud de onda del láser que se tenga disponible en el equipo.

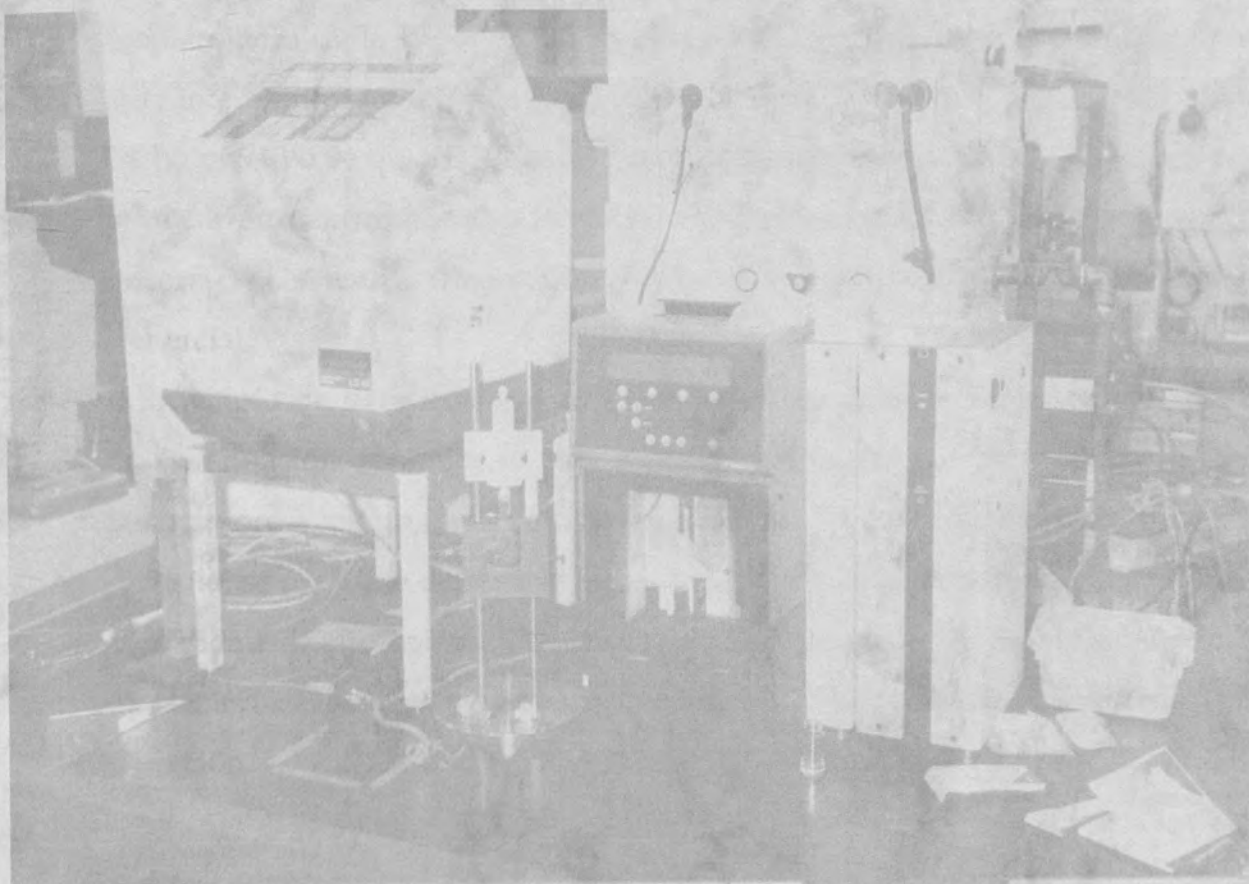
Así, el número de marcadores fluorescentes disponibles para la longitud de onda de excitación del láser utilizado son limitados, reduciéndose de esta manera el campo de aplicación.

Concluyendo se puede decir que el empleo de la técnica acoplada CE-LIF presenta una importante ventaja sobre otros sistemas de detección en relación a los límites de detección tan bajos que se obtienen al emplear láseres como fuente de excitación pero presenta la limitación, igual que la tiene la técnica de espectroscopía de luminiscencia molecular, de que el número de analitos que presentan fluorescencia nativa es muy reducido por lo que la detección directa se encuentra bastante limitada y aunque se dispone de la alternativa de una detección indirecta previo marcado fluorescente con agentes derivatizantes, lo ideal sería disponer de distintos tipos de láseres que, de esa forma, abarcaran

un gran rango de longitudes de onda de excitación y con ello, se ampliarán las posibilidades del citado acoplamiento.



Figura II.8. Imagen del equipo CE-LIF.



CAPÍTULO III

Determinación de nitrocompuestos de interés ambiental mediante cromatografía electrocinética con ciclodextrinas y detección por fosforescencia atenuada.

Los trabajos experimentales reunidos en este capítulo III se han realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y Espectroscopía Aplicada de la Vrije Universiteit de Amsterdam y se recogen en un trabajo que se encuentra publicado en la revista "Analytical Chemistry 74 (2002) 5139-5145" (ver anexo III).

1. Objetivo

En este capítulo se pretenden poner de manifiesto las posibilidades del acoplamiento de la CE con otra técnica óptica espectroscópica, potencialmente muy interesante como es la espectrofosforimetría.

Dicho objetivo se quiere concretar en el desarrollo de un método indirecto para hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados (nitro-PAHs) que no presentan fosforescencia nativa desarrollando una nueva interfase en un equipo CE no comercial.

El principio de detección que se quiere emplear es la fosforescencia atenuada. Esta atenuación dinámica se basa en la desactivación por parte de los analitos (atenuadores) con un fosforóforo presente en la disolución de separación. En este capítulo, se pretende demostrar que este modo de detección es compatible con la modalidad electroforética CD-EKC y que la presencia de ciclodextrinas en la disolución de separación, no impiden el desarrollo de este tipo de modo de detección.

2. Antecedentes

2.1. Acoplamiento electroforético de la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución

Varias modalidades de la fosforescencia a temperatura ambiente en disolución (RTPL) como son la fosforescencia sensibilizada y la fosforescencia atenuada han sido acopladas con éxito a la electroforesis capilar¹. Sin embargo, se ha estudiado con mucha más profundidad el acoplamiento con la fosforescencia atenuada ya que aquella ofrece mejores perspectivas de futuro.

Fueron Kuijt *y col.*² quienes desarrollaron inicialmente el acoplamiento de la electroforesis capilar con la RTPL utilizando un detector estándar de luminiscencia para cromatografía líquida y usando la modalidad electroforética CZE y aplicándolo a la determinación de cinco naftalenos sulfonados. En este

[1] J. Kuijt, *Tesis doctoral*, Vrije universiteit Ámsterdam (2003), Holanda.

[2] J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1384.

primer trabajo, se utilizaron dos modalidades de detección fosforescente obteniendo unos resultados muy prometedores para ambos casos. De los analitos estudiados, tres de ellos mostraron fosforescencia sensibilizada y dos fosforescencia atenuada dinámicamente. La detección sensibilizada se basó en la medida de la fosforescencia a temperatura ambiente del biacetilo (presente en la disolución reguladora de separación) a una concentración de 0.02 M, aunque para la fosforescencia atenuada se consiguieron mejores resultados con una concentración de 0.05 M. Para conseguir reducir la concentración de oxígeno se pasó una corriente de nitrógeno a través de la disolución reguladora durante 10 min antes de la medida fosforescente consiguiendo así límites de detección entre $5 \cdot 10^{-8}$ y $4 \cdot 10^{-7}$ M.

Los mismos autores³, hicieron posteriormente más hincapié en el aumento de la sensibilidad en la modalidad de fosforescencia atenuada, utilizando varias clases de disoluciones reguladoras y usando biacetilo. Sin embargo a pH superiores a 9.5 no se obtuvo señal debido a la pobre relación señal/ruido, principalmente debido a las bajas absorptividades molares del biacetilo. Así se detectaron naftalenos sulfonados, nitrofenoles, ácidos hidroxibenzoicos, ditiocarbamatos y aminoácidos sulfurados obteniéndose unos límites de detección del orden de 10^{-7} a 10^{-8} M, y consiguiendo en todos los casos una señal fosforescente estable en el rango de pH de 4.7 a 8.5.

Posteriormente este mismo grupo de investigación⁴, realizó la detección de péptidos utilizando CZE con detección por fosforescencia atenuada, sin necesidad de derivatización química previa. En este trabajo, se utilizó el ácido 1-bromo-4-naftalensulfónico (BrNS) como fosforóforo. Esta molécula tiene la particularidad de que es suficientemente soluble en medio acuoso y proporciona una fuerte RTP en un amplio rango de pH. La detección estaba basada en la atenuación dinámica en la señal fosforescente del BrNS por transferencia electrónica desde el grupo amino de los péptidos a pH entre 9.5 y

[3] J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1305.

[4] J. Kuijt, R. van Teylingen, T. Nijbacker, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5026.

10. Con este método se consiguieron límites de detección cercanos a 10^{-8} M para los aminoácidos estudiados.

2.2. Importancia del análisis de los nitro-HAPs

Los compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos constituyen un grupo de compuestos químicos muy numeroso que se caracterizan por la presencia de uno o varios grupos nitro en un núcleo aromático o heterocíclico respectivamente. Durante muchos años, los compuestos nitro-sustituidos se han empleado en productos manufacturados, y como agentes antimicrobianos debido a su potente actividad biológica, existiendo, por tanto, una importante implicación en la salud humana y en el ambiente como resultado de haberse identificado a muchos de estos compuestos como potenciales carcinogénicos.

El interés por los nitro-PAHs comenzó a principios de los años 1980 ya que aparecieron ciertas correlaciones entre la presencia de los nitro-PAHs en la combustión del gasoil y la actividad mutagénica. Posteriormente se desarrollaron métodos analíticos para separar e identificar estos compuestos y especificar su composición isomérica, debido a que la actividad biológica está en función de su estereoespecificidad.

La actividad biológica de estos compuestos nitro-sustituidos se debe al metabolismo reductor que presentan por los grupos nitro en la molécula; proceso que es catalizado por enzimas del grupo de las nitroreductasas.

Los nitro-PAHs son derivados de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), que contienen dos o más anillos aromáticos unidos y constituidos por átomos de carbono e hidrógeno. Los nitro-PAHs se forman en la naturaleza como mezcla de sus parientes los PAHs y cientos de otros compuestos orgánicos, si bien los nitro-PAHs se encuentran presentes, normalmente, en mucho menor proporción que los PAHs.

Los nitro-PAHs se encuentran en el ambiente en fase gaseosa o adsorbidos en partículas sólidas. Son insolubles o ligeramente solubles en agua, aunque la mayoría son solubles en disolventes orgánicos. Los nitro-PAHs más

comúnmente encontrados en el aire incluyen el 1- y 2-nitronaftaleno y los metilnitronaftalenos, 2-nitrofluoreno, 9-nitroantraceno, 9-nitrofenantreno, etc... siendo las concentraciones encontradas en ambientes urbanos diferentes dependiendo de la estación del año, del tipo de calefacción empleado y del número de vehículos que circulan por la zona a analizar, no debiendo exceder los niveles de 1 ng/m³, aunque se han publicado valores hasta 13 de ng/m³.

También existe la posibilidad de encontrar estos compuestos en alimentos, bebidas, especialmente en especias, cacahuetes y alimentos ahumados y asados en parrilla; las concentraciones en las que se encuentran suelen ser inferiores a 5 µg/kg. Habitualmente, los compuestos analizados en este tipo de alimentos son el 9-nitroantraceno y el 1-nitropireno y suelen encontrarse en concentraciones de alrededor de 0.9 µg/kg de alimento.

En realidad, en estudios toxicológicos llevados a cabo con ratas de laboratorio, sólo dos nitroPAHs presentaban una toxicidad en agua, concretamente el 2-nitronaftaleno y el 2-nitrofluoreno, sin embargo, no hay publicaciones relacionadas con los efectos en humanos de los nitroPAHs de forma individual.

3. Parte experimental

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Reactivos

La carboximetil-β-ciclodextrina (CM-β-CD; grado de sustitución 3.0-3.5) y 9-nitroantraceno (9-NA, ca. 95 %) fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza). El nitrobenzeno (NB, 99+ %), 2-nitrotolueno (2-NT; 99+ %), 3-nitrotolueno (3-NT; 99 %), 4-nitrotolueno (4-NT; 99%), 1,3-dinitrobenzeno (1,3-DNB; 97 %), 2,4-dinitrotolueno (2,4-DNT, 97 %), 2-nitrofluoreno (2-NF; 98 %), 1-nitronaftaleno (1-NN; 99 %), 1-nitropireno (1-NP; 99 %), antraceno (99 %), y γ-ciclodextrina fueron suministrados por Aldrich (St. Louis, MO, USA).

El ácido bórico y el metanol fueron suministrados por Riedel-de Haën (Seelze, Germany). El ácido 1-bromo-4-naftalen sulfónico (BrNS) fue sintetizado en el laboratorio.

Se prepararon semanalmente disoluciones madre de los analitos estudiados (10^{-3} M en metanol) y disoluciones reguladoras conteniendo CM- β -CD. Disoluciones estándar en agua/metanol (20:80 v/v) fueron preparadas cada día. Para algunos experimentos se usó disoluciones agua/metanol (50:50 v/v). Las disoluciones reguladoras conteniendo CM- β -CD y las soluciones madres fueron almacenadas a 4 °C y filtradas en filtros de jeringa de 0.2 μ m (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania). Los capilares fueron lavados durante 15 min (1000 mbar) con 0.1 M de NaOH al comenzar cada día.

Para la preparación de las disoluciones estándar y disoluciones reguladora, se usó agua desmineralizada y destilada.

3.1.2. Equipo de electroforesis capilar y sistema de detección

Se utilizó un aparato Prince CE (Prince Technologies, Emmen, The Netherland) con capilares de 50 y 75 μ m de diámetro interno (BGB Analytik, Anwil, Switzerland) con una longitud total de 120 cm y una longitud efectiva de 60 cm. Debido a la disposición del equipo de CE, se aplicó un voltaje negativo para el desarrollo de las separaciones.

Se empleó para la detección un luminómetro LS-40 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) en el modo de tiempo resuelto con un tiempo de decaimiento de 0.05 ms y un tiempo de integración de 5.00 ms. La excitación del fosforóforo BrNS contenido en la disolución de separación, fue llevada a cabo a 294 nm obteniendo la emisión a 390 nm usando un filtro de corte incorporado al instrumento. Otros electroferogramas fueron registrados con un detector de absorción UV (SpectraPhysics, Mountain View, CA, USA) a 200 nm.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Desoxigenación de la disolución reguladora/mecanismo de inyección de muestra y separación

El oxígeno es un atenuador de la fosforescencia por ello hay que eliminarlo en los medios donde se desean realizar medidas de fosforescencia. Para ello se diseñó un mecanismo para permitir la inyección de muestras, mientras se mantenían las condiciones de desoxigenación requeridas (Figura III.1).

La desoxigenación de la disolución reguladora de separación fue llevada a cabo purgando con gas nitrógeno. El flujo de gas nitrógeno se midió continuamente durante los experimentos usando un medidor de flujo. El programa de CE usado se presenta en la Tabla III.1. Durante el paso 1 del programa fue aplicado un voltaje durante 2 min, después las posiciones de los viales fueron cambiadas durante el paso 2 para permitir la inyección (paso 3). Durante el paso 4 la posición del vial son cambiadas otra vez, después comienza la separación (paso 5).

Los límites de detección en detección fosforescente son fuertemente dependientes de la concentración de oxígeno en la disolución de separación. Cuando se usó el dispositivo comentado anteriormente para la desoxigenación de la disolución reguladora/inyección de muestras, la producción de oxígeno total ($M \cdot s^{-1}$) en un volumen fijo de disolución reguladora desoxigenada depende de la concentración oxígeno exterior y del producido en el ánodo durante la separación electroforética.

$$\frac{d[O_2]}{dt} = \varphi_{ox} + \frac{I}{4FV} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde φ_{ox} indica el efecto del oxígeno exterior, I la corriente generada durante la separación, F la constante de Faraday y V el volumen de la disolución reguladora. El número de moléculas de oxígeno generadas por segundo es igual a $I/4$, puesto que se requieren 4 electrones para producir una molécula de

oxígeno. Así, la división por F y V da el número de moléculas por litro y por segundo.

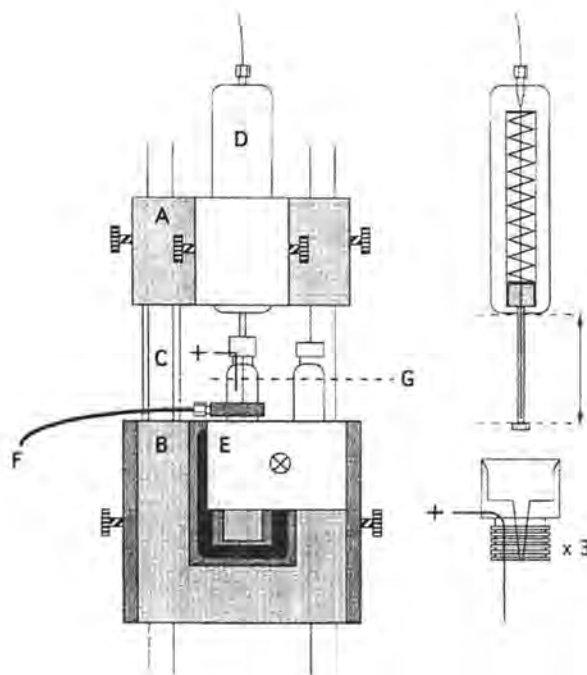


Figura III.1. Cambiador manual de la desoxigenación de la disolución reguladora/mecanismo de inyección de muestra. A, B: bloques ajustables; C: espaciadores; D: cilindro ajustable por donde se introduce el capilar; E: bloque cambiador de posiciones (muestra-disolución reguladora de separación); F: entrada de gas nitrógeno; G: nivel de líquido. El interior de la parte D muestra el cilindro ajustable a través del cual se conduce el capilar. El tapón de los viales de la disolución reguladora se dibujó ampliándolo 3 veces para mostrar la conexión anódica y la apertura para el capilar con todo detalle.

En el sistema comentado anteriormente, la disolución reguladora desoxigenada fluyó a través de la interfase (ánodo), donde el oxígeno se genera durante la electroforesis, y el resultando es una disminución considerable de la concentración de oxígeno. En cualquier caso, para obtener una baja concentración de oxígeno, el flujo de gas nitrógeno usado debe ser alto para contraponer ambas contribuciones en la ecuación 1.

| Paso | Posición del vial | Presión (mbar) | Voltaje (kV) | Duración (min) |
|------|-------------------|----------------|--------------|----------------|
| 1 | B | 0 | -20 | 2.0 |
| 2 | B→S | 0 | 0 | 0.1 |
| 3 | S | -50 | 0 | 0.1 |
| 4 | S→B | 0 | 0 | 0.1 |
| 5 | B | 0 | -20 | 20.0 |

B: vial de disolución reguladora

S: vial de muestra

Tabla III.1. Programa de CE utilizado para CD-EKC con detección por fosforescencia atenuada.

Se observó que la influencia del oxígeno exterior puede ser bastante grande durante el intercambio de la posición de los viales, cuando la disolución reguladora está expuesta más directamente al oxígeno exterior. Sin embargo, el efecto se elimina casi completamente cuando se usa un flujo de nitrógeno adecuado. El flujo requerido es además dependiente de la disolución reguladora de pH, del voltaje de separación y del diámetro interno del capilar usado; todo ello determina la corriente de nitrógeno necesaria.

Los flujos de nitrógeno óptimos establecidos para diferentes condiciones de separación se presentan en la Tabla III.2.

Después de rellenar el capilar, se puede aplicar un voltaje para obtener una línea base estable con sólo 20 min debido al pequeño volumen de disolución reguladora. Esto supone una mejora significativa en comparación al sistema que se usó en trabajos previos al acoplar CZE a la fosforescencia atenuada (con un tiempo de comienzo de 2 h)².

| Diámetro interno del capilar (μm) | [CM- β -CD](M) ^a | Corriente (μA) ^b | Flujo nitrógeno (ml/min) |
|--|-----------------------------------|--|--------------------------|
| 75 | 5.0 | -17 | 24 |
| 50 | 5.0 | -7 | 13 |
| 50 | 10.0 | -12 | 18 |
| 50 | 12.5 | -14 | 18 |
| 50 | 12.5 | -23 (-30 kV) | 24 |

^a Disolución reguladora: 25 mM borato/HCl, 1mM BrNS, pH 8.5

^b Voltaje de separación: -20 kV

Tabla III.2. Flujos de nitrógeno aplicados para la desoxigenación bajo diferentes condiciones CE.

3.2.2. Determinación del factor de capacidad

En este apartado, se establecieron las ecuaciones para el cálculo de los factores de capacidad, K' (y la fracción de analitos en la fase acuosa, R) para analitos neutros y aniónicos ya que solamente la fracción de analitos en la fase acuosa contribuye significativamente a la atenuación observada.

Para los compuestos neutros, los valores de K' tienen que conocerse para saber la dependencia de la sensibilidad de la detección en el grado de inclusión del analito en la fase CD.

Las ecuaciones para compuestos aniónicos se necesitaron para establecer en que fase estaría presente el fosforoforo, BrNS. El factor de capacidad en un sistema CD-EKC viene dado por:

$$k' = \frac{n_{\text{CD}}}{n_{\text{aq}}} = K \frac{V_{\text{CD}}}{V_{\text{aq}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde n_{CD} y n_{aq} son el número de moléculas en cada fase y V_{CD} y V_{aq} son los correspondientes volúmenes, K es el coeficiente de distribución para el proceso

de partición. El factor de capacidad está relacionado con la fracción de analitos que están en la fase acuosa, R , a través de la bien conocida ecuación:

$$R = 1/1 + K'$$

Para compuestos neutros, la movilidad es inducida sólo durante el tiempo que están en la fase CD (cargadas negativamente). La movilidad producida, $\mu_{i,ind}$ (cm^2/Vs), es por lo tanto dada por:

$$\mu_{i,ind} = (1-R) \mu_{CD} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde μ_{CD} es la movilidad de la CD. Ordenando esto:

$$R = \frac{\mu_{CD} - \mu_{i,ind}}{\mu_{CD}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Para compuestos aniónicos la movilidad en presencia de la CD, $\mu_{i,CD}$, viene dada por:

$$\mu_{i,CD} = R\mu_{i,fs} + (1-R) \mu_{CD} \quad \text{Ecuación 5}$$

donde $\mu_{i,fs}$ es la movilidad del anión en ausencia de CD, por lo tanto, en solución libre. Ordenando resulta:

$$R = \mu_{i,CD} - \mu_{CD} / \mu_{i,fs} - \mu_{CD} \quad \text{Ecuación 6}$$

De estas ecuaciones se puede deducir que la inclusión de una molécula huésped en una CD no cambia significativamente la movilidad de la CD. Las movilidades son todas valores intrínsecos, p.e. valores corregidos para μ_{EO} (movilidad producida por electroósmosis). Con detección fosforimétrica en CE, la μ_{EO} puede ser fácilmente determinada porque t_{EO} se marca por una gran depresión en la línea base, debido al hecho de que las muestras no están

desoxigenadas. Desafortunadamente, es bien conocido que la determinación de μ_{CD} es el mayor problema para calcular el factor de capacidad en CD-EKC. Esto es porque las CD's derivatizadas sintetizadas son en general mezclas complejas con diferentes grados de sustitución y diferentes isómeros posicionales. Para ello, la detección por absorciometría indirecta fue usada en CE para caracterizar CD's cargadas, pero no ha sido posible establecer un valor medio de la μ_{CD} .

Se han deducido valores aproximados para las movilidades de CD's cargadas usando la movilidad proporcionada por el antraceno, y basándose en la suposición de que la inclusión de este compuesto hidrofóbico en la cavidad de la CD es casi completa.

Se observó que el pico del antraceno se desplaza hacia el frente del electroferograma cuando el contenido de metanol de la disolución de antraceno inyectada va aumentando, en consecuencia, μ_{CD} quizás se podría despreciar cuando usamos este procedimiento. En la Figura III.2 se presenta un electroferograma de CM- β -CD a 10 mM, obtenido con una disolución reguladora de borato 25 mM a pH 8.5 y usando detección por absorción UV directa a 200 nm, registrándose los electroferogramas de CM- β -CD para obtener la μ_{CD} .

Para calcular el valor medio de μ_{CD} se estableció, el centro de masas del agrupamiento de picos en los electroferogramas. En este punto, las áreas de los picos fueron corregidas en relación al tiempo de migración (dividir por t_i) y para su grado de sustitución estimado. Esta corrección fue necesaria porque la absorción a 200 nm es debida principalmente a los grupos carboximetilos. Se asumió que el grado de sustitución es aproximadamente proporcional a las movilidades observadas. El valor medio de μ_{CD} resultó ser de $3,1 \cdot 10^{-4}$ cm²/Vs (RSD: 1,3 %, n=4).

Debe tenerse en cuenta también que la disolución reguladora empleada para determinar las μ_{CD} no es exactamente la misma que la empleada en el método propuesto, en la cual se adicionaron BrNS (1mM) y CM- β -CD (concentraciones desde 5 a 12,5 mM).

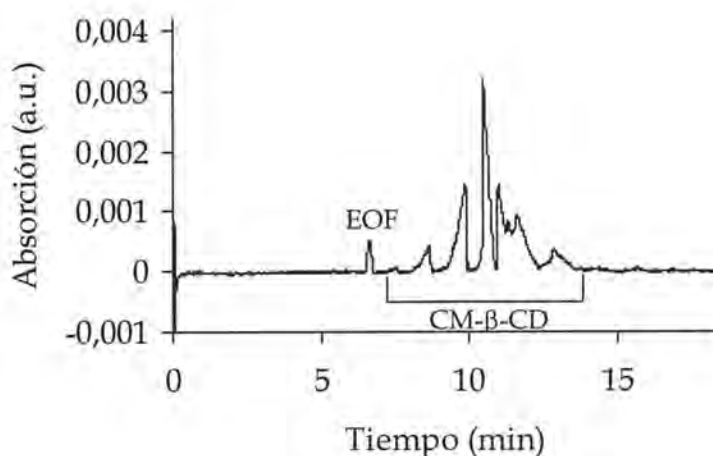


Figura III.2. Electroferograma de CM- β -CD a 10 mM. Disolución reguladora: 25 mM borato, pH 8.5. Voltaje de separación: -20 kV. Detección: Absorción UV a 200 nm. EOF: Señal del flujo electroosmótico.

Por lo tanto, la movilidad en la disolución reguladora empleada para separar los analitos en estudio es más baja debido a la mayor fuerza iónica.

El BrNS no fue añadido debido a su interferencia con la detección fotométrica debido a la débil absorptividad de la CM- β -CD. Electroferogramas de 50 mM de CM- β -CD registrados con una disolución reguladora compuesta de 5 mM de CM- β -CD presentaron picos muy anchos impidiendo la determinación de μ_{CD} . Sin embargo, la movilidad calculada fue similar al valor anterior, lo que indica que la adición de CM- β -CD no influye en μ_{CD} .

3.2.3. Separación de los analitos en estudio

Se seleccionaron 4 compuestos nitropoliaromáticos como analitos: 1-NN, 2-NF, 9-NA y 1-NP. Los electroferogramas obtenidos con una disolución reguladora 25 mM de borato/HCl, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD a pH 8.5, usando un capilar de 75 μ m i.d. se muestran en la Figura III.3 (trazos a y b).

Se resolvieron el 1-NN (K' , 0.57), 9-NA (K' , 0.98), y 2-NF (K' , 1.30), pero 1-NP (K' , 0.96) solapaba casi por completo con 9-NA. Las partes hidrofóbicas del 1-NN y del 2-NF encajan bien dentro de la cavidad de la ciclodextrina quedando fuera

el grupo nitro, siendo esta situación la más favorable energéticamente. Sin embargo, el factor de capacidad de 1-NN es bastante bajo porque este compuesto no es muy hidrofóbico. Para 9-NA y 1-NP la parte hidrofóbica de la molécula estaría parcialmente excluida de la cavidad, lo cual explica la relativamente pequeña interacción de estos compuestos fuertemente hidrofóbicos con la CD. De acuerdo con esta explicación, la adición a la disolución reguladora de separación de una pequeña cantidad de γ -CD no derivatizada, las cuales tienen una gran cavidad, resultó en un fuerte desplazamiento de los picos de 1-NP y 9-NA hacia el frente del electroferograma. De este modo los 4 compuestos se separaron cuando se añadió a la disolución reguladora una concentración de 0.5 mM de γ -CD. Sin embargo, el pico de 1-NP llegó a ser casi dos veces más ancho mostrando una importante cola (Figura III.3, trazo c), la cual quizás es debida a la lenta transferencia de masa desde la cavidad hidrofóbica de la CD a la fase acuosa.

El límite de detección (tres veces la desviación estándar del ruido de fondo) se determinó usando un estándar de baja concentración ($2 \cdot 10^{-7}$ M), porque la respuesta en la detección por fosforescencia atenuada es lineal en un intervalo relativamente bajo de concentraciones. Este hecho puede explicarse a través de la conocida ecuación de Stern-Volmer ($I_0/I = 1 + K_q[Q]\tau^0$), en la cual la atenuación fraccional $(I_0-I)/I_0$, viene dado por:

$$I_0-I/I_0 = K_q[Q]\tau^0/1 + K_q[Q]\tau^0 \quad \text{Ecuación 7}$$

donde I y I_0 son las intensidades de fosforescencia en presencia y ausencia de atenuador, respectivamente y K_q es la constante de proporcionalidad de la atenuación biomolecular, $[Q]$ la concentración del atenuador (analito) y τ^0 el tiempo de vida de fosforescencia en ausencia de atenuador. Una parte de la atenuación $K_q[Q]\tau^0$ es lineal sólo a valores bajos de este atenuador.

Los límites de detección (LOD's) se calcularon alrededor de $2 \cdot 10^{-8}$ M para los cuatro analitos probados, aunque se observó una ligera dependencia con el factor de capacidad.

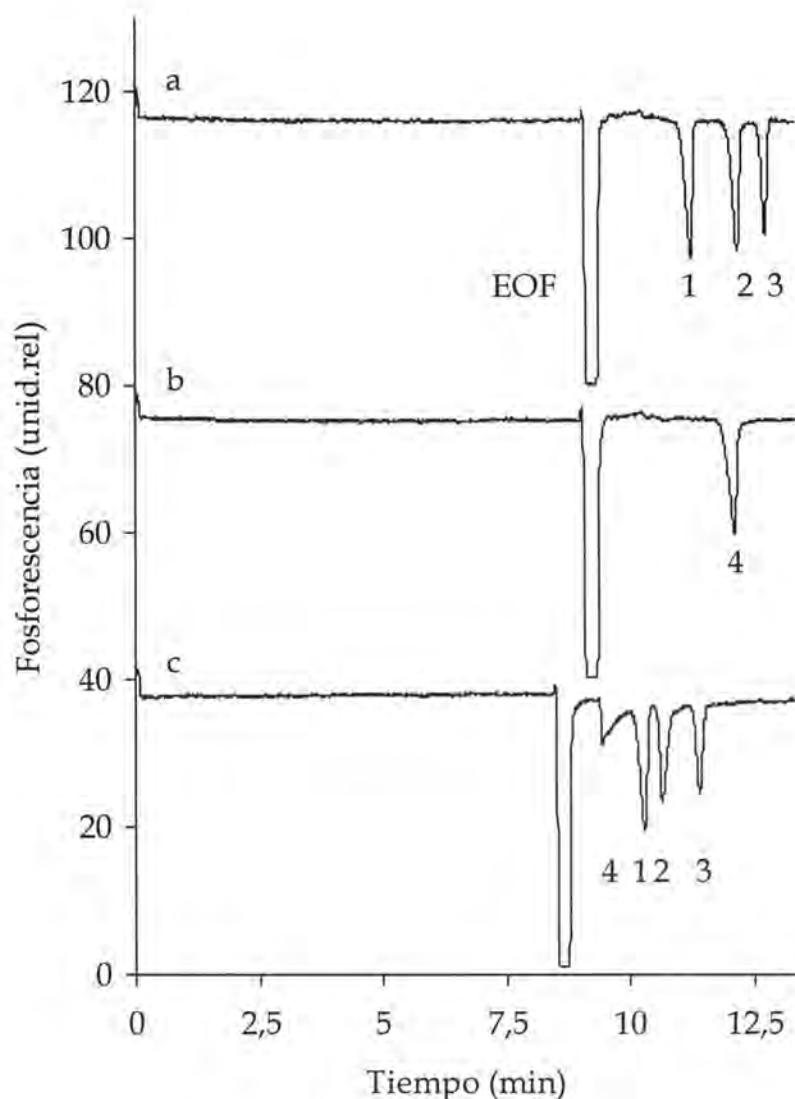


Figura III.3. Electroferogramas de los compuestos nitropoliaromáticos seleccionados ($\sim 1 \times 10^{-6}$ M) detectados con fosforescencia atenuada. 1. 1-Nitronaftaleno; 2. 9-Nitroantraceno; 3. 2-Nitrofluoreno; 4. 1-Nitropireno. EOF: Señal del flujo electroosmótico. Voltaje de separación: -20 kV ($-17 \mu\text{A}$). (a) y (b) Disolución reguladora: 25 mM borato/HCl, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, pH 8.5; (c) Disolución reguladora: 25 mM borato, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, 0.5 mM γ -CD, pH 8.5.

Estos valores son cercanos a los LOD's más bajos obtenidos en CZE con detección con fosforescencia atenuada ($1 \cdot 10^{-8}$ M)³. Cuando en la disolución reguladora de separación se encontraba una concentración de 0.5 mM de γ -CD, los límites de detección del 1-NP incrementaban del orden de 3 veces ($6 \cdot 10^{-8}$ M).

Los electroferogramas fueron además obtenidos usando capilares de 50 μm i.d., lo que aumentó el ruido relativo de la línea base y condujo a altos LOD's. Sin embargo, la concentración de LOD's fue baja, de $\sim 5 \cdot 10^{-8}$ M, mientras los LOD's absolutos fueron ~ 0.1 pg para todos los compuestos. Una ventaja de usar capilares de 50 μm i.d. es la mejor estabilidad de la línea base, debido al pequeño flujo de nitrógeno requerido para la desoxigenación (Tabla III.2).

Como segundo ejemplo de aplicación del método, seis compuestos nitromonoaromáticos (1,3-DNB, 2,4-DNT, NB, 4-NT, 2-NT y 3-NT) fueron estudiados mediante CD-EKC (-20 kV). Todos estos compuestos encajan fácilmente dentro de la cavidad de la CM- β -CD quedando fuera sus grupos nitro. Sin embargo, eran de esperar valores de K' pequeños ya que estos compuestos son menos hidrofóbicos que los estudiados anteriormente. De hecho, la separación se llevó a cabo con una disolución reguladora 25 mM de borato/HCl, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD a pH 8.5.

Los valores de K' se encontraron en un rango de 0.07 a 0.48. Los picos de 1,3-DNB se encuentran solapados parcialmente con la señal del EOF y el 4-NT con el 2-NT (Figura III.4, trazo a).

La separación se mejoró aumentando la concentración de CM- β -CD (Figura 4, trazos b y c), ya que se incrementara K' de todos los compuestos sin cambios en el orden de migración obteniendo una mejor resolución. Por último, empleando 12,5 mM CM- β -CD en la disolución reguladora de separación, se resolvieron 4-NT y 2-NT casi completamente pero el tiempo de análisis se vio aumentado significativamente. Sin embargo como se muestra en la trazo "d" de la Figura III.4, el tiempo de análisis se pudo reducir, manteniendo la resolución empleando voltajes más altos (-30 kV). No obstante, se consigue una adecuada separación usando una concentración 10 mM de CM- β -CD (Figura III.4, trazo b).

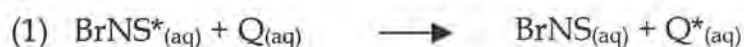
La Figura III.4 además sirve para ilustrar la optimización de separaciones en CD-EKC con detección por fosforescencia atenuada. Altas concentraciones de CM- β -CD conducen a unas altas intensidades de corriente y, consecuentemente, a aumentar la producción de oxígeno en el ánodo durante la electroforesis. Esto

conduce además a disminuir la señal de fondo en la fosforescencia y la eficiencia de la atenuación, resultando ambas en un empeoramiento de los límites de detección. Sin embargo, el efecto del aumento de CM- β -CD parece ser menor en el rango de concentraciones considerado en este estudio.

Con una disolución reguladora 25 mM de borato, 1 mM BrNS, 10 mM CM- β -CD a pH 8.5, se consiguieron LOD's de $(4-5) \cdot 10^{-8}$ M para todos los compuestos nitromonooaromáticos, excepto para el 2-NT ($8 \cdot 10^{-8}$ M). La fosforescencia atenuada es para estos compuestos diez veces más sensible que la detección por UV.

3.2.4. Mecanismo de atenuación y sensibilidad

Los buenos límites de detección obtenidos en este estudio indican que la atenuación es eficiente, aún cuando las CD's están presentes. En esta sección se trata de dar una explicación a estos hechos. En principio, 4 mecanismos son posibles para la fosforescencia atenuada del BrNS por un atenuador, Q, en presencia de CM- β -CD.



El mecanismo (1) describe una atenuación en disolución-libre; ésta ocurre para varios compuestos, resultando en una detección CZE sensible. El mecanismo (2) quizás contribuye mucho menos a la atenuación que el mecanismo (1), debido a la protección por las moléculas de CD.

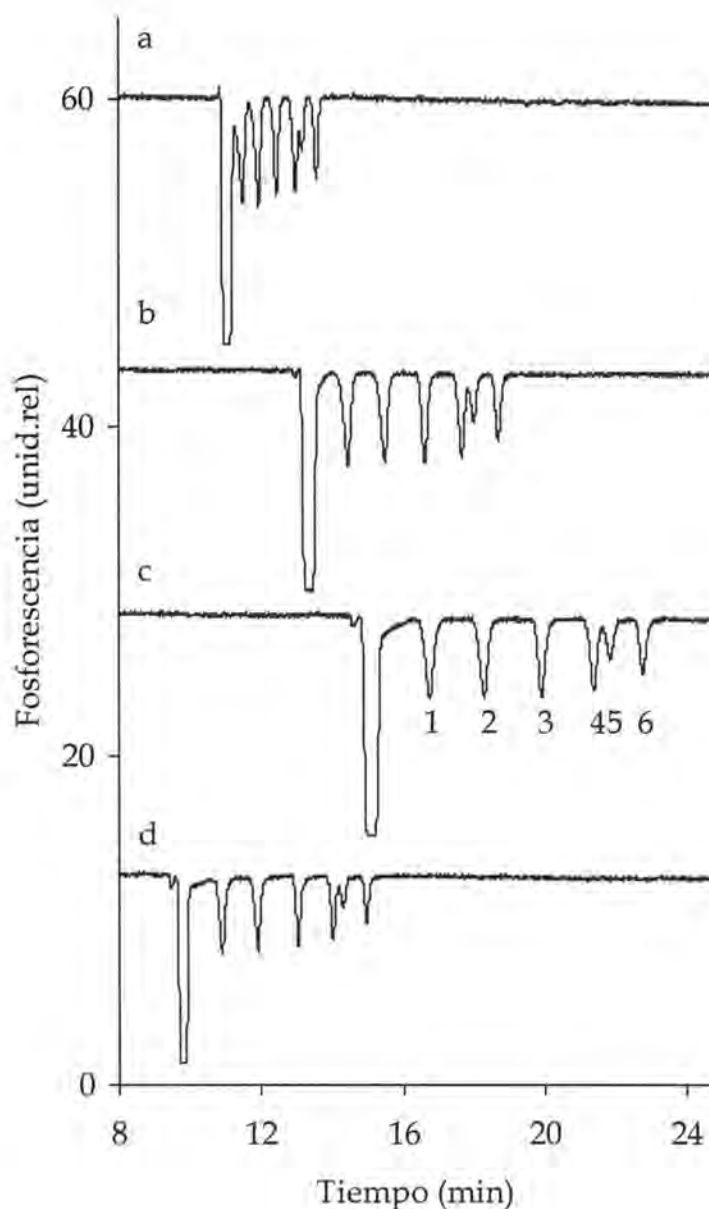


Figura III.4. Electroferogramas de los compuestos nitromonoaromáticos seleccionados, ($\sim 1 \times 10^{-6}$ M) detectados con fosforescencia atenuada. 1. 1,3-Dinitrobenzeno; 2. 2,4-Dinitrotolueno; 3. Nitrobenzeno; 4. 4-Nitrotolueno; 5. 2-Nitrotolueno; 6. 3-Nitrotolueno. Disolución reguladora: 25 mM borato/HCl, 1 mM BrNS, pH 8.5 con: (a) 5 mM CM- β -CD; (b) 10 mM CM- β -CD; (c) y (d) 12.5 mM CM- β -CD. Voltaje de separación: -20 kV, excepto la traza d, -30 kV. Para las corrientes, ver la Tabla III.2.

Han sido publicados varios estudios en luminiscencia atenuada por atenuadores en fase acuosa de luminóforos incluidos en CD. La mayor parte de

éstos tratan sobre fluorescencia atenuada, aunque algunos se han desarrollado sobre fosforescencia atenuada.

Para investigar si el mecanismo (2) juega un papel significativo, fue medida la dependencia de K_q en K' para los compuestos y el antraceno. El grupo anterior induce la atenuación fosforescente de BrNS por transferencia de electrones, mientras que el antraceno causa una atenuación por transferencia de energía triplete-triplete. Si bien, algunas desviaciones en los datos calculados para los nitromonooaromaticos, pueden ser debidas a la influencia de los sustituyentes en esta constante de atenuación.

Se ha deducido que la constante de atenuación $K_{q,av}$ en un sistema conteniendo CD's viene dado por la ecuación:

$$K_{q,av} = RK_{q,fs} + (1-R)K_{q,CD} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde $K_{q,fs}$ y $K_{q,CD}$ son la razón de las constantes de atenuación para atenuadores en la fase acuosa (solución libre) y en la CD, respectivamente. En el caso especial que $K_{q,CD}$ sea insignificanemente pequeño comparado a $K_{q,fs}$, la Ecuación 8 se reduce a:

$$K_{q,av} = R K_{q,fs} \quad \text{Ecuación 9}$$

Puesto que la atenuación biomolecular de la razón de la constante, K_q , es proporcional a la cantidad fraccional de la atenuación (ver Ecuación 7), $(I_0-I)/I_0$ puede ser tomada como una medida de K_q . La Figura III.5 muestra la dependencia experimentalmente encontrada de $(I_0-I)I_0$ en la fracción del atenuador en la fase acuosa, R . Los valores de $(I_0-I)/I_0$ fueron normalizados para $R = 1$. En la Figura III.5a se presentan los resultados para los compuestos nitropoliaromáticos y el antraceno. Se observa, el ajuste a través de la recta ($Y = 0.9943X + 0.0057$; $r^2 = 0.85$) exactamente parecidos a la línea teórica $Y = R$ como lo predicho por la ecuación 9.

Por lo tanto, se puede concluir que la atenuación por analitos en la fase de la CD no contribuye significativamente a la atenuación total. Esta conclusión es confirmada por los resultados obtenidos para los nitromonooaromáticos (Figura III.5b); en este caso, el ajuste a través de los puntos de datos se da para la línea $Y = 0.9705X + 0.0295$ ($r^2 = 0.88$). El resultado aislado para 2-NT no fue incluido en el ajuste.

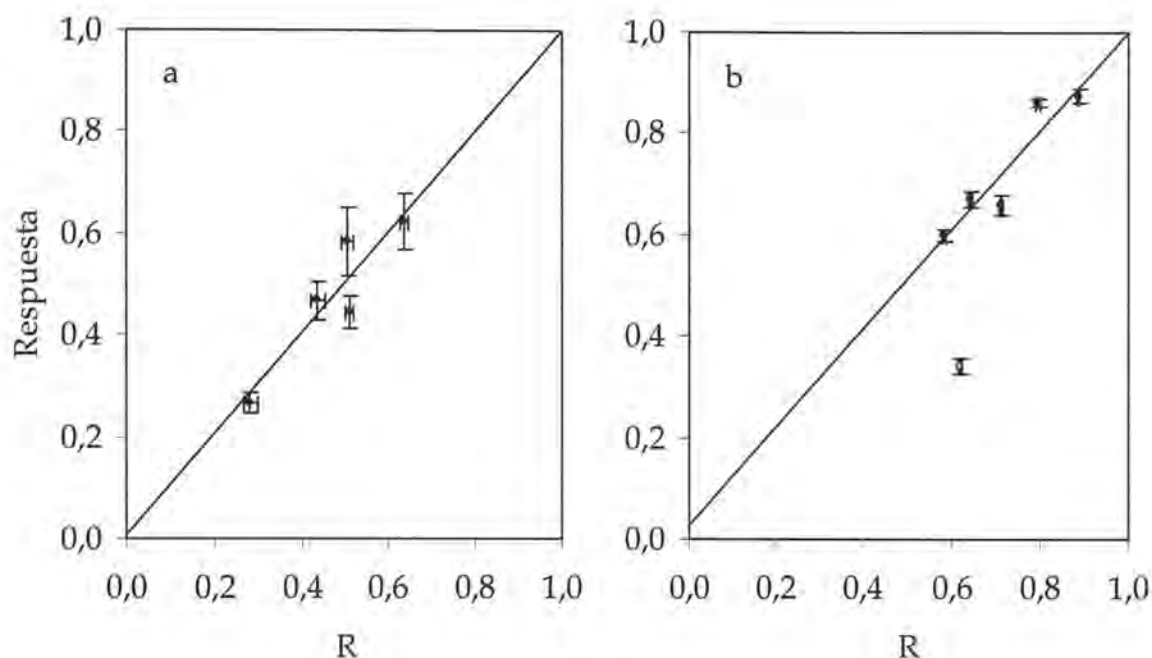


Figura III.5. Respuesta normalizada como una función de la fracción de atenuadores en la fase acuosa para: (a) compuestos nitropoliaromáticos y el antraceno; Disolución reguladora: 25 mM borato/HCl, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, pH 8.5; capilar i.d.: 75 μ m; (b) compuestos nitromonooaromáticos; Disolución reguladora: 25 mM borato/HCl, 1 mM BrNS, 10 mM CM- β -CD, pH 8.5; capilar i.d.: 50 μ m.

Para este compuesto la sensibilidad es aproximadamente 2 veces menor que para los otros nitromonooaromáticos, lo cual quizás es debido al impedimento estérico (efecto-orto).

Por lo tanto, se puede deducir que la complejación de 2-NT con CM- β -CD, combinada con la sustitución en posición orto, induce un efecto estérico que reduce la eficiencia de la atenuación.

Los mecanismos de desactivación (3) y (4) pueden ser probablemente excluidos, ya que el BrNS tiene una pobre interacción con CM- β -CD debido a la repulsión electrostática (ambas moléculas están cargadas negativamente). Esta suposición está corroborada por las siguientes observaciones. Primera, es que el tiempo de vida de la fosforescencia observada, τ^0 , fue aproximadamente 300 μ m, tiempo muy similar a sistemas de disolución reguladora sin CD's bajo condiciones electroforéticas similares. En otras palabras, fue observado el efecto no-protector de las CD's en el fosforóforo, lo cual indica una débil complejación del BrNS en presencia de CM- β -CD 5 mM (25 mM de una disolución reguladora de borato, pH 8.5). En segundo lugar se obtuvieron valores de $2,7 \cdot 10^{-4}$ y $2,8 \cdot 10^{-4}$ cm^2/Vs para $\mu_{i,\text{CD}}$ y $\mu_{i,\text{fs}}$, respectivamente, sugiriendo que el grado de inclusión de BrNS en la fase de la CD es prácticamente cero. Por lo tanto los mecanismos (3) y (4) pueden ser excluidos. También se debería deducir que el mecanismo (4) puede ser excluido debido a que el mecanismo (2) no juega un papel importante ya que en ambos casos los atenuadores están incluidos en la cavidad de la CD y, obviamente, el mecanismo (4) es aún mas improbable porque en este caso el fosforóforo está también incluido en la fase de la CD. Por tanto, la mayor parte de la atenuación ocurre predominantemente en fase acuosa.

Esta conclusión está en marcado contraste con un estudio sobre el comportamiento de la atenuación de compuestos nitromonoaromáticos en ausencia y presencia de β -CD⁵. En este estudio, se concluyó que la atenuación de un complejo tris(2,2'-bipiridina)rutenio(II) no estaba significativamente afectada por la presencia de β -CD ya que los grupos nitro no están incluidos en la CD.

Sin embargo, en nuestra opinión esta conclusión no está debidamente justificada, puesto que los autores indican que la interacción de estos atenuadores con la β -CD fue más bien débil (K_f típicamente ~ 100). La importante reducción de la atenuación observada puede, por lo tanto, ser explicada por la larga fracción de moléculas atenuadoras presentes en la fase acuosa. En otras palabras, los datos son compatibles con nuestra conclusión de

[5] R. Ramaraj, V.M. Kumar, C.R. Raj, V. Ganesan, J. *Inclusión Phenom.*, 40 (2001) 99.

que la atenuación en fase acuosa es el mecanismo más importante en un sistema fosforóforo/atenuador/CD.

Finalmente, hay que hacer constar que la inhibición de la eficiencia de la atenuación puede ser a menudo más fuerte para CM- β -CD que para β -CD neutras, debido a la repulsión electrostática entre los BrNS negativamente cargados y la CM- β -CD.

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

En este capítulo se ha puesto de manifiesto el acoplamiento entre la técnica CE y el sistema de detección por fosforescencia, en su modalidad atenuada, en presencia de ciclodextrinas para el análisis de compuestos nitroaromáticos (nitropoliaromáticos y nitromonoaromáticos) de gran importancia a nivel ambiental, debido a su carácter carcinogénico, mutagénico y por su toxicidad.

La detección por fosforescencia atenuada ha sido introducida recientemente en la modalidad de CZE, sólo para el análisis de compuesto cargados. Sin embargo, en el presente trabajo se aborda una nueva investigación en la cual se ha puesto de manifiesto que este tipo de detección se puede utilizar con la modalidad CD-EKC, permitiendo la resolución de mezclas de compuestos no cargados.

En principio, la atenuación observada puede justificarse por la interacción del fosforóforo con analitos complejados y no complejados. Sin embargo, de la dependencia de la atenuación fraccional con el factor de capacidad, se puede concluir que sólo la atenuación en la fase acuosa contribuye significativamente a la atenuación observada, pudiendo considerar compatibles, la separación y la detección, ya que los factores de capacidad encontrados en CD-EKC para los analitos estudiados son generalmente bajos. Esta detección mediante fosforescencia atenuada proporciona unos límites de detección del orden de 2 a $5 \cdot 10^{-8}$ M, debido fundamentalmente a los bajos factores de capacidad encontrados que están en el rango de 0.1 a 2.5.

Para llevar a cabo las medidas correspondientes al análisis por CE acoplada a RTPL, se recurrió a un equipo de CE al cual se le adaptó un detector luminiscente diseñado previamente como detector para un equipo de HPLC. Se

empleó una lámpara pulsada de xenón adaptada a las dimensiones del capilar para que, de esta manera, se pueda realizar la detección de forma on-line (Figura III.6). Además se utilizó un dispositivo externo diseñado y fabricado en el servicio de apoyo técnico de la Universidad que se utilizó como cambiador manual del vial de la disolución reguladora desoxigenada y de la muestra (Figura III.7).

Como analitos modelo, se han seleccionado dos grupos de compuestos, por un lado compuestos nitropoliaromáticos como el 1-NN, 2-NF, 9-NA y 1-NP y por otro, un grupo de compuestos nitromonoaromáticos como el 1,3-DNB, 2,4-DNT, NB, 4-NT, todos de alta toxicidad medioambiental.



Figura III.6. Imagen del equipo CE-RTPL.

La ventaja fundamental de este tipo de acoplamiento radica en los bajos límites de detección que se consiguen que, para el caso concreto de determinaciones de compuestos de importancia en el análisis ambiental, como los nitrocompuestos citados, que se encuentran a niveles de concentración incluso más bajos que sus parientes cercanos como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), se requieren técnicas de gran sensibilidad.

Aunque la RTPL como sistema de detección presenta unas características muy interesantes, como ya se ha demostrado en los numerosos trabajos existentes al

respecto, existen una serie de inconvenientes que son los mismos que aparecen cuando dicha técnica se emplea como sistema de detección en CE.

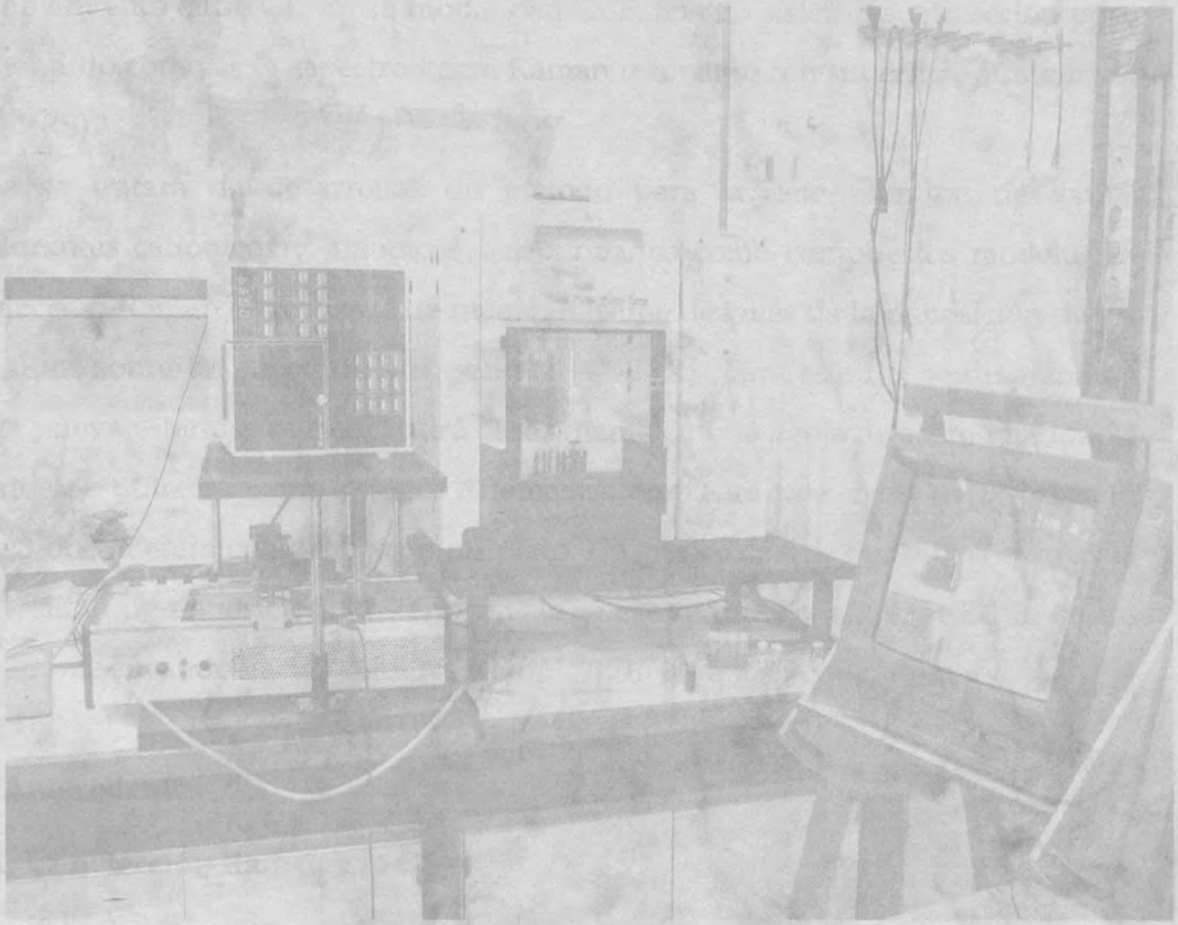
En primer lugar, el número de compuestos que presentan fosforescencia nativa es muy limitado, por lo que llevar a cabo determinaciones fosforescentes de forma directa, no suele ser lo habitual. Sin embargo, este inconveniente se ve subsanado mediante el empleo de un fosforóforo que permita llevar a cabo medidas de fosforescencia atenuada.



Figura III.7. Imagen del dispositivo cambiador.

En segundo lugar, el efecto desactivante del oxígeno disuelto que obliga a la desoxigenación rigurosa de las disoluciones reguladoras, lo que conlleva una complicación añadida en el diseño del método.

Por todo ello, el acoplamiento de CD-EKC con la detección mediante fosforescencia atenuada resulta ser una técnica de una buena sensibilidad y de fácil acoplamiento y manejo para el análisis resuelto el problema del oxígeno y que tiene potencial para una amplia variedad de compuestos.



CAPÍTULO IV

Determinación de colorantes mediante electroforesis capilar en zona acoplada a la espectroscopía Raman resonante con superficie aumentada.

Las investigaciones reunidas en este capítulo IV se han realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y Espectroscopía Aplicada de la Vrije Universiteit de Ámsterdam y los resultados se recogen en un trabajo que se ha sido enviado a la revista "Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC)" (ver anexo IV)

1. Objetivo

En este capítulo el objetivo ha sido poner de manifiesto las posibilidades del acoplamiento entre CE, en su modalidad CZE, con un sistema de detección poco extendido como es la espectroscopía Raman resonante con superficie aumentada (SERRS).

Así se tratará de desarrollar un método para la determinación de varios colorantes catiónicos y aniónicos, seleccionados como compuestos modelo. La detección Raman se realizará de manera off-line después de la deposición de los analitos sobre un substrato que permita la SERRS. Para este fin, se desarrollará una nueva interfase que consistirá básicamente en una aguja de acero inoxidable y que se utilizará como cátodo. Además se empleará una mesa de translación modificada en la cual se posará un plato TLC de sílice que permita controlar la velocidad de deposición. Posteriormente se estudiarán las señales SERRS de los colorantes usando varios coloides y empleando un microscopio Raman.

2. Antecedentes

2.1. La detección Raman y la CE

La espectroscopía Raman (RS) es una técnica de detección que ha emergido de forma notable en la última década debido principalmente a los recientes desarrollos instrumentales. La RS proporciona una detallada información vibracional y tiene por lo tanto un alto potencial de identificación para muchas clases de compuestos, especialmente cuando se analizan disoluciones acuosas. Por ello hay un especial interés en acoplar esta técnica de identificación con técnicas de separación.

Así, ya se ha conseguido acoplar tanto la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)¹⁻³, la Cromatografía de Líquidos (LC)⁴⁻⁷ como la CE⁸.

[1] G. J. Vergote, T. R. M. De Beer, C. Vervaet, J. P. Remon, W. R. G. Baeyens, N. Dierix, F. Verpoort, *European J. Pharma. Sci.*, 21 (2004) 479.

[2] J. Cheng, Y-S. Li, R. L. Roberts, G. Walker, *Talanta*, 44 (1997) 1807.

[3] R. Sheng, F. Ni, T. M. Cotton, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 437.

[4] G. W. Somsen, S. K. Coulter, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, 349 (1997) 189.

En principio, no hay requerimientos especiales para el acoplamiento on-line de técnicas de separación con la RS convencional. El agua es el disolvente más idóneo en comparación con otros líquidos, ya que es un pobre dispersor Raman. Desde este punto de vista, CE y RS pueden formar una perfecta combinación. En LC, la situación es menos favorable ya que el espectro Raman de los disolventes puede interferir con el espectro del analito por lo que tienen que ser aplicados procesos de sustracción⁹.

Los primeros en demostrar la posibilidad de un detector de espectroscopía Raman para electroforesis capilar fueron Chen y Morris en 1988⁸.

Los primeros pasos dados en este tipo de acoplamiento se encaminaron en el intento de aumentar la sensibilidad de este sistema de detección. Esto fue demostrado por Morris *y col.* los cuales separaron de forma on-line nucleósidos¹⁰, obteniendo unos límites de detección del orden de $5 \cdot 10^{-6}$ M, y herbicidas¹¹ con límites de detección alrededor de $2 \cdot 10^{-7}$ M haciendo uso del modo de isotacoforesis. Se obtuvieron unos factores de enriquecimiento de alrededor de 3000 veces mejores que utilizando RS convencional.

El acoplamiento on-line de CE con RS no es sencillo. La desventaja más notable de esta técnica de detección es que la sensibilidad proporcionada por RS no es suficiente para detectar analitos a los niveles de concentraciones típicamente estudiados con esta técnica ya que las intensidades de la señal son proporcionales a λ^{-4} con lo que son enormemente reducidas a longitudes de onda largas. Por otro lado, a longitudes de onda cortas la interferencia causada por la fluorescencia es un factor limitante por lo que es necesario recurrir a procesos que aumenten la sensibilidad de la detección así como que produzcan una atenuación en la fluorescencia¹². De esta manera se desarrolló la

[5] C. Gooijer, G. Ph. Hoornweg, T. de Beer, A. Bader, D. J. van Iperen, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 824 (1998) 1.

[6] M. D'Orazio, U. Schimpf, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 809.

[7] C. K. Chong, C. K. Mann, T. J. Vickers, *Appl. Spectrosc.*, 46 (1992) 249.

[8] C.-Y. Chen, M.D. Morris. *Appl. Spectrosc.*, 42 (1988) 515.

[9] T. de Beer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 971 (2002) 1.

[10] P.A. Walker III, W.K. Kowalchuk, M.D. Morris, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4255.

[11] P.A. Walker III, M. D. Morris, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3766.

[12] C. Gooijer, A.J.G. Mank, *Anal. Chim. Acta.*, 400 (1999) 281.

Espectroscopía Raman de Resonancia (RRS) en la cual las líneas Raman aumentan considerablemente por la excitación con longitudes de onda que se aproximan bastante a la del pico de absorción del analito; bajo estas circunstancias, las magnitudes de los picos Raman asociados con las vibraciones más simétricas aumentan por un factor de 10^2 a $10^{6,13}$. También se desarrolló, la Espectroscopía Raman de Superficie Aumentada (SERS) en la que las muestras se adsorben sobre la superficie de partículas metálicas coloidales (normalmente plata, oro o cobre) o sobre superficies rugosas de piezas de estos metales^{14,15}. Por razones del todo no conocidas, las líneas Raman de la molécula adsorbida se incrementan en un factor de 10^5 a 10^6 y además se produce atenuación en la fluorescencia^{16,17}.

Desafortunadamente esta técnica es menos aplicable que la convencional RS ya que no todos los analitos se adsorben en las partículas del coloide⁹.

Sepaniak y col.¹⁸ pusieron de manifiesto la determinación on-line de riboflavina y rodamina 6G mediante CE con detección por SERS con objeto de aumentar la sensibilidad de la propia detección introduciendo la disolución coloidal de plata en la disolución reguladora de separación, utilizando un espectrómetro Raman convencional con un láser de ión-argón a 515 nm y consiguiendo límites de detección del orden de 10^{-9} M; sin embargo, aparecían ciertos problemas de adsorción en la pared del capilar con lo que se requerían continuos lavados del capilar además de utilizarse un capilar de 100 μm de diámetro interno.

Dijkstra y col.¹⁹ utilizaron el acoplamiento on-line CE-UV-RRS para la determinación e identificación de ácidos sulfónicos aromáticos, nucleótidos y pirenos sustituidos utilizando una excitación láser en la región UV a 244 y 257 nm. Hasta ahora, en la literatura, el foco de atención en RRS ha sido en la

[13] R. J. Dijkstra, C. T. Martha, F. Ariese, U. A. Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 4977.

[14] R. L. Garell, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 401A.

[15] J. J. Laserna, *Anal. Chim. Acta*, 283 (1993) 607.

[16] D. L. Leanmaire, R. P. van Duyne, *J. Electroanal. Chem.*, 84 (1977) 1.

[17] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2957.

[18] W.F. Nirode, G.L. Devault, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1866.

[19] R.J. Dijkstra, E.V. Efremov, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5697.

región del visible aunque pocos compuestos muestran absorción en esta región y la gran mayoría requiere excitación UV. Además, en la región UV lejano (< 260 nm) la fluorescencia apenas interviene, es muy baja o en cualquier caso se da a longitudes de onda mayores, lo que hace de la CE-UV-RRS una detección bastante atractiva.

Otra técnica Raman que se ha desarrollado ha sido la Espectroscopía Raman Resonante de Superficie aumentada (SERRS) que supone la combinación de Raman de resonancia y la superficie aumentada²⁰ y que permite obtener muy buenos resultados ya que el incremento neto de la intensidad de la señal es más o menos el producto de la intensidad producida por cada uno de los modos²¹.

He y col.²² evaluaron la separación y la detección post-columna de una mezcla de trans-1,2-bis(4-piridil)etileno (BPE) y N,N-dimetil-4-nitrosoanilina, dos aminoácidos, dos clorofenoles mediante CE-SE(R)RS. Este grupo presentó una nueva forma de detección post-columna mediante un sistema ya desarrollado con anterioridad por Sweedler y col.²³ en el cual el eluyente era depositado directamente sobre una membrana en movimiento en la que se hacía incidir la radiación láser para de esta forma recoger la señal mediante una cámara CCD. En el sistema desarrollado por He y col. el substrato SERS se depositó debajo de la punta de una capilar metalizado para recoger el eluyente. Posteriormente a la zona del eluyente depositado se le hizo incidir la radiación láser (láser de He-Ne a 632.8 nm) para posteriormente recoger la señal. Además estos autores compararon varios tipos de substratos SERS para tratar de obtener la mayor sensibilidad y mejor estabilidad de los espectros.

También se ha estudiado la detección off-columna por CE-SE(R)RS mediante la deposición del efluente en substratos activos SERS en movimiento utilizando un electrofilamento mientras un líquido adicional coaxial proporcionaba el contacto eléctrico²⁴. Posteriormente los espectros SERS eran obtenidos con una

[20] R. J. Dijkstra, A. Gerssen, E. V. Efremov, F. Ariese, U. A. Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem. Acta*, 508 (2004) 127.

[21] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Análisis Instrumental*, 1998, 4ª edición McGraw-Hill.

[22] L. He, M.J. Natan, C.D. Keating, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5348.

[23] S. Tracht, V. Toma, J.V. Sweedler, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2382.

[24] G.L. DeVault, M.J. Sepaniak, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2303.

simple focalización del espectrómetro Raman, el cual utiliza un láser de ión-argón a 514 nm, obteniendo unos límites de detección del orden de 10^{-7} M. Seifar y col.²⁵ usaron el sistema desarrollado por He y col.²² para la determinación de colorantes utilizando un láser de ión-argón con una longitud de onda de 514.5 nm. Aquí el efluente se depositó sobre un plato de TLC en movimiento. Destacar que debido a las favorables propiedades adsorbentes de los platos de sílice TLC, la deposición de los efluentes acuosos fue simple y el electroferograma completo podría ser inmovilizado en un pequeño espacio de unos pocos centímetros de longitud en la TLC.

En cuanto a la mejora en la sensibilidad de CE-SE(R)RS se han estudiado varios tipos de substratos²⁰, el sistema CE-SE(R)RS utilizado era el desarrollado por Seifar y col.²⁵. En esta investigación se hizo un mayor énfasis en la repetitibilidad espectral por el uso de los diferentes substratos empleados y como era de esperar la intensidad de las señales variaban considerablemente.

2.2. Interés de los compuestos estudiados

El color puede ser incorporado directamente a diferentes artículos manufacturados como, por ejemplo, tejidos y plásticos, pinturas y tintas de imprenta, sobre todo para el realzar el aspecto y el atractivo de un producto y hacerlo más llamativo al público. De hecho, el color es lo primero que nos atrae de un artículo en concreto. Generalmente, el color deseado se logra mediante la incorporación al producto de compuestos coloreados, denominados tintes y pigmentos, siendo la diferencia fundamental entre los primeros y los segundos la solubilidad, siendo los tintes solubles y los pigmentos insolubles, siendo el término *colorante* utilizado, con frecuencia, para abarcar ambos tipos compuestos.

Los colorantes pueden ser clasificados de un modo útil de dos formas distintas: a) según su estructura química o b) según el método de aplicación. La obra de referencia más importante que trata de la clasificación de los tintes y los

[25] R.M. Seifar, R.J. Dijkstra, A. Gerssen, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *J. Sep. Sci.*, 25 (2002) 1.

pigmentos es el *Colour Index* (*Índice de colores*), una publicación editada por la Society of Dyes and Colourists de Inglaterra. Esta colección de volúmenes proporciona un listado completo de los tintes comerciales y los pigmentos conocidos, y se actualiza periódicamente. Cada colorante recibe un "nombre genérico C.I.", el cual incorpora su clase de aplicación, y un número, que refleja simplemente el orden cronológico en que los colorantes fueron introducidos comercialmente y que es un índice muy útil puesto que está aceptado universalmente.

Para el tintorero textil, cuya labor es aplicar el color a una fibra textil dada, la clasificación de los tintes según el método de aplicación es, probablemente, de mayor interés que la clasificación química, puesto que las moléculas de tintes y pigmentos son diseñadas cuidadosamente para asegurar que presenten un conjunto de propiedades adecuadas para una aplicación concreta.

Sin embargo, desde el descubrimiento de los primeros tintes sintéticos, hacia mediados del siglo XIX, los químicos han estado interesados en la relación entre el color de un tinte y su estructura molecular, por lo que el método de clasificación química es el más valioso.

Por otro lado, en el transcurso de la últimas décadas, la sociedad se ha sensibilizando hacia la protección del medio ambiente. El fabricante y el usuario del color tienen la obligación de abordar los riesgos ambientales y toxicológicos, incluyendo los riesgos en el puesto de trabajo, la exposición del público en general a los productos y el efecto general sobre el medio ambiente.

La importancia de ser consciente de los potenciales efectos adversos de la exposición a productos químicos sobre nuestra salud es patente. Es relativamente tranquilizador que los estudios sobre los tintes textiles sugieran que hay pocas evidencias sobre toxicidad oral aguda y que la mayoría muestren un efecto tóxico pequeño, aunque recientemente ha habido una mayor preocupación por la potencial carcinogenicidad de ciertos tintes azoicos.

Los colorantes estudiados en este trabajo de investigación son un tipo de tintes que se usan ampliamente en muchos campos, tales como la industria textil, la del papel, el cuero o en la industria alimentaria. Sin embargo, estos compuestos

y sus productos de degradación pueden ser peligrosos debidos a su toxicidad y carcinogénesis. Se estima que aproximadamente el 12% de los colorantes azoicos empleados en la industria textil se pierden en las aguas de lavado y, de este porcentaje, el 20% pasa al medio ambiente con el agravante de que son muy difíciles de eliminar de las aguas y pueden incluso llegar a los abastecimientos municipales y los ríos.

La aplicación de este tipo de tintes azoicos en la industria textil da lugar a su aparición en las aguas de lavado procedentes de estas industrias en concentraciones que oscilan entre 5 y 1500 mg/L debido a su poca fijación a los tejidos. Además, estos tintes no se degradan por los procedimientos tradicionales de tratamiento de las aguas residuales con plantas aerobias debido a que son resistentes a la degradación oxidativa. La decoloración sólo se puede llevar a cabo empleando bien digestión anaerobia, generación microbiana de radicales de oxígeno o bien con tratamientos físico-químicos muy costosos.

3. Parte experimental

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Reactivos, analitos y disoluciones

Los colorantes, Food Yellow 3 (CI 15985), Acid Orange 7 (CI 15510), Basic red 9 (42500) cuya estructura se muestra en la Figura IV.1, fueron cedidos por J.W. Wegener (Instituto de Estudios Medioambientales, Vrije Universiteit Amsterdam). Estos colorantes muestran una moderada absorción a 514 nm, pero la línea de excitación Raman no coincide con su absorción máxima (ver Figura IV.1). Se prepararon disoluciones madre de 1 mg/mL disolviendo la cantidad requerida de cada colorante en agua bidestilada y se utilizaron alícuotas de estas disoluciones madre para preparar los patrones de calibración. Todas las disoluciones se guardaron en el frigorífico a 4 °C y se prepararon diariamente disoluciones diluidas.

Para la separación electroforética se empleó una disolución reguladora borato (20 mM, pH 10), mezcla de ácido bórico y tetraborato disódico (Baker

Analyzed® Reagents) y una disolución de hidróxido de tetraetilamonio (1 mM) de Sigma Aldrich. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 μm antes de la inyección en el equipo.

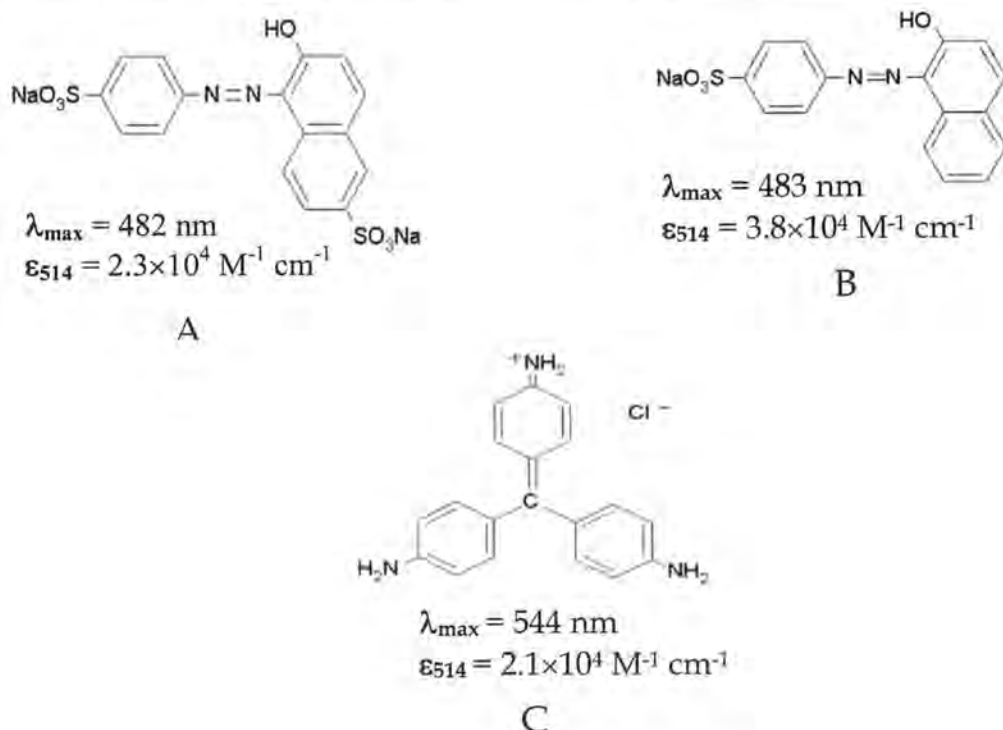


Figura IV. 1. Estructura de A) Food Yellow 3 B) Acid Orange 7 C) Basic Red 9

Se emplearon tres tipos de coloides de plata: citrato (Lee y Meisel); borato, y plata recubiertos de oro. Para la reducción del citrato²⁶, se calentaron a ebullición 45 mg de AgNO_3 en 250 mL de agua y se adicionaron 5 mL de una disolución al 1% (volumen/peso) de dihidrato de citrato trisódico y se mantuvo calentando durante una hora. La reducción del borohidruro sódico se llevó a cabo mediante el método descrito por Creighton²⁷, el cual consiste en adicionar gota a gota 18 mL de 2.2 mM de AgNO_3 a 150 mL de una disolución 1.2 mM de borohidruro sódico enfriada y la mezcla resultante se agita durante 45 minutos. Posteriormente se adicionan 18.7 mL de una disolución 3.9 mM de dihidrato de citrato trisódico. El coloide de plata recubierto de oro se sintetizó mediante la

[26] P.C. Lee, D.J. Meisel, *Phys. Chem.*, 86 (1982) 3391.

[27] J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, *J. Chem. Soc. Faraday trans.*, 75 (1979) 790.

receta descrita por Rivas *y col.*²⁸ mediante la adición gota a gota de diferentes alícuotas (entre 0.2 mL y 1.5 mL) de una disolución 0.3 mM de HAuCl_4 a 20 mL del coloide de plata de citrato reducido sintetizado anteriormente (ver arriba). Después de la adición de la apropiada cantidad de la solución de citrato sódico, la mezcla se mantuvo a calentamiento y agitándose durante 5 minutos.

Todos los coloides fueron preconcentrados mediante centrifugación a 6000 rpm durante 30 min; la fracción más concentrada (aproximadamente un 3 %) se extrajo con una pipeta y se guardó para un uso futuro mientras que se desecharon los líquidos sobrenadantes.

3.1.2. Instrumentación

Se utilizó un instrumento CE prinCE CE (Lauerlabs, Emmen, the Netherlands) con detección on-line UV a 500 nm (model SP8480XR, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA). El capilar de sílice fundida elegido fue de 75 μm de diámetro interno con 100 cm de longitud total y una ventana de detección para la detección por absorbancia a 82 cm de la entrada del capilar. Las muestras se introdujeron hidrodinámicamente aplicando una presión de inyección de 50 mbar durante 10 s en el capilar. El acondicionamiento del capilar se llevó a cabo lavando las columnas con hidróxido sódico 0.1 M durante 1 min, posteriormente 2 min con agua y finalmente 4 min con la disolución reguladora de separación. Para permitir la deposición de los compuestos separados en la placa de TLC, el vial para la disolución reguladora de salida ha sido eliminado (Ver figura IV.5).

El final del capilar se encajó dentro de una aguja de acero inoxidable que además se utilizó para el contacto eléctrico. Una mesa modificada de translación Camag (Muttentz, Switzerland) Linomat III se utilizó para mover el plato de TLC durante la deposición del efluente proveniente del equipo de CE. Platos de TLC de sílice (Merck, Darmstadt, Germany) soportados en aluminio y con indicador fluorescente se utilizaron como substrato de deposición.

[28] L. Rivas, S. Sánchez-Cortes, J.V. García-Ramos, G. Morcillo, *Langmuir*, 16 (2000) 9722.

El sistema Raman utilizado consta de un láser de ión-argón Spectra Physics Series 2000, un expandidor del rayo Spectra Physics Modelo 336, un microscopio Zeiss (Oberkochen, Germany) UEM óptimamente acoplado a un triple monocromador SPEX (Metuchen, NJ, USA) 1877 y una cámara CCD (Andor Technology, Model DV420-OE, Belfast, UK). La representación esquemática del sistema Raman se muestra en la Figura IV.2.

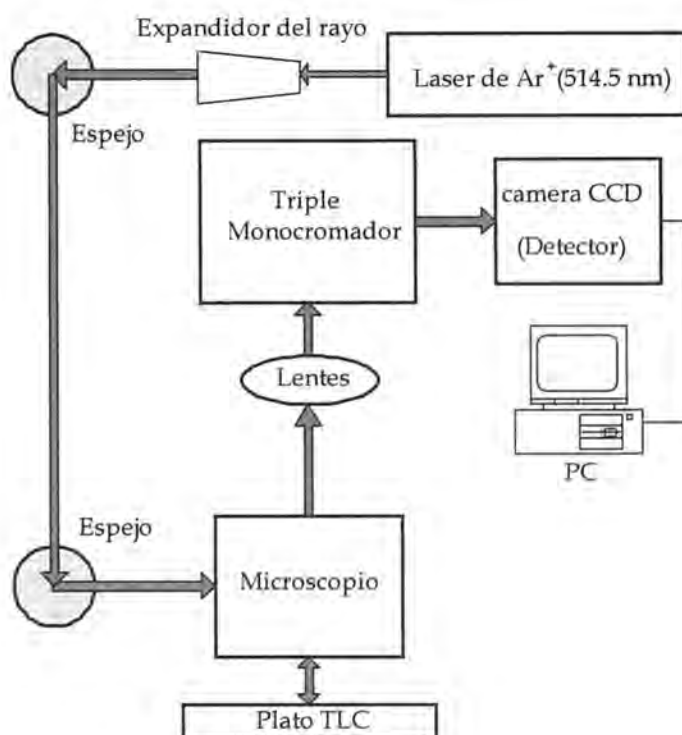


Figura IV.2. Diseño esquemático del montaje del microscopio Raman.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Condiciones electroforéticas

Las condiciones electroforéticas (concentración de tetraetilamonio, concentración de la disolución reguladora, voltaje aplicado) fueron optimizadas para una mezcla de los colorantes a una concentración de 35 mg/mL basándose en los siguientes criterios: comportamiento de migración, sensibilidad, tiempo de análisis y forma de pico.

En primer lugar se varió la concentración de tetraetilamonio de 0.1 a 9 mM para tratar de conseguir mejorar la forma del primer pico (BR9, el cual está

positivamente cargado al pH 10 de trabajo). Se obtuvo un importante estrechamiento del pico, mejorando substancialmente su forma cuando el tetraetilamonio está presente en la disolución de separación, eligiendo una concentración de 1 mM como valor óptimo.

El pH de la disolución reguladora se varió en un rango de 7 a 11 en pasos de 1 (Figura IV.3). Para los tres colorantes estudiados, la forma de los picos también se vió influenciada por el pH. Por lo general, con un aumento del pH a valores básicos se obtuvieron picos estrechos, obteniendo la mejor resolución y los mejores picos estrechos a pH 10. A este pH se investigaron diferentes concentraciones de la disolución reguladora de ácido bórico/NaOH en un rango de 10 a 80 mM para mejorar la resolución y minimizar el tiempo de análisis, seleccionando una concentración de 20 mM.

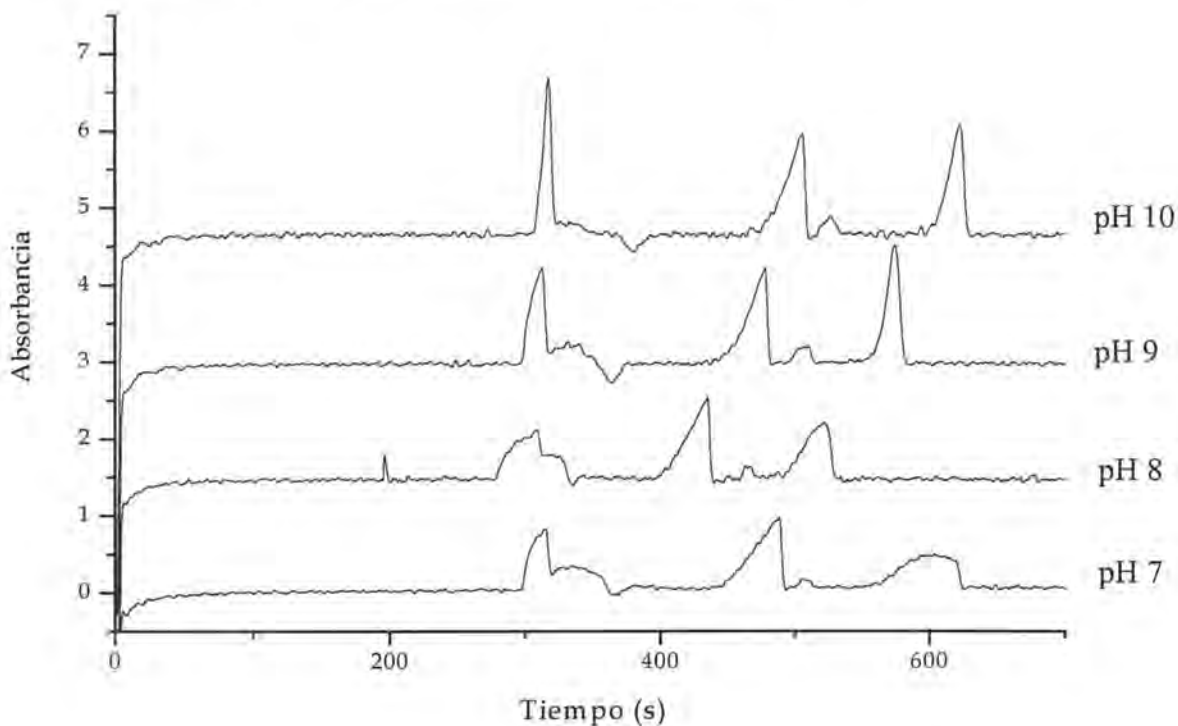


Figura IV.3. Evolución del pH en la disolución reguladora de separación.

En cuanto al voltaje aplicado, éste se varió entre 10-30 kV seleccionando 20 kV como voltaje de compromiso.

Como se muestra en la Figura IV.4 a las condiciones optimizadas y, con la configuración CE aplicada (voltaje negativo en la disolución reguladora de entrada y tierra en la salida) el colorante cargado positivamente BR9 migra más rápido que el flujo electroosmótico (EOF), mientras que los otros dos colorantes cargados negativamente son eluidos después del EOF.

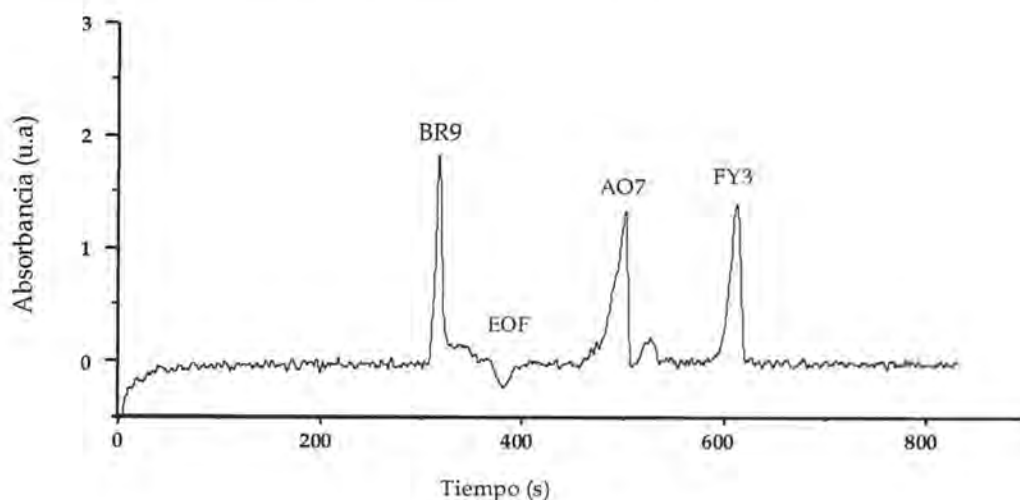


Fig. IV.4. Electroferograma de los tres colorantes estudiados. Condiciones de separación: 20 mM ácido bórico/NaOH a pH 10, 1 mM tetraetilamonio, 10 s tiempo de inyección, 20 kV, λ 500 nm

3.2.2. Procedimiento de deposición (interfase)

La deposición sobre la TLC comenzó con un cierto tiempo de retraso determinado por el paso del primer analito por el detector UV.

En este trabajo de investigación se desarrolló una nueva interfase, en la cual la salida del capilar se insertó en una aguja de acero inoxidable. La aguja suple la conexión eléctrica, a través de la disolución reguladora de separación que fluye por el extremo final de la aguja (ver Figura IV.5).

Las placas de sílice tienen una excelente capacidad de adsorción del agua no habiendo una gran difusión del agua sobre su superficie, y haciendo que la deposición de los analitos ocurra en una pequeña zona. Los volúmenes depositados de CE tenían una anchura de alrededor de 1 mm, y el lugar de deposición del analito una longitud de alrededor de 2 mm, con dependencia de

la velocidad de translación del plato TLC. Normalmente se utilizó una velocidad de translación de 6 mm/min.

La punta de la aguja del capilar no debe tocar el plato TLC, ya que las partículas de sílice pueden entrar en el capilar y desestabilizar la corriente. Por otra parte, la distancia entre la salida del capilar y el plato en movimiento debe ser lo mínima posible para depositar el efluente en una franja estrecha ya que si no sino, el efluente tiende a acumularse en la punta del capilar, formándose grandes gotas en el puente de flujo, en las cuales los analitos ya separados pueden mezclarse de nuevo. Idealmente, el efluente se deposita a un flujo constante consiguiendo una distancia entre la punta de la aguja y el substrato de alrededor de 2 mm (ver Figura IV.5). El proceso de deposición y distancia de la aguja estuvo constantemente controlado utilizando una cámara de aumento en 12 veces de la imagen.

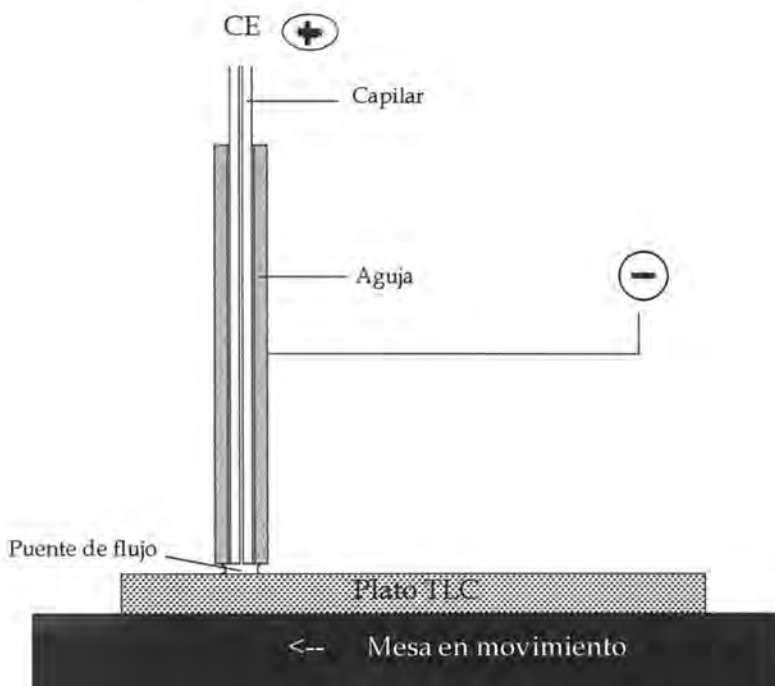


Figura IV.5. Dibujo esquemático del extremo de la aguja, indicando el contacto eléctrico mediante el eluyente y la forma de puente del flujo del eluyente hacia el substrato.

3.2.3. Estudio comparativo de coloides para registro de espectros Raman

Se probaron tres tipos diferentes de coloides para el registro del espectro Raman, citrato, borato y plata recubiertos de oro". Estas experiencias se llevaron a cabo utilizando una adición manual con micropipetas de 1 μL de colorante seguido de 1 μL de uno de los coloides. La potencia del láser utilizado fue de 7 mW; se realizó un promedio de las señales Raman obtenidas de 10 en 1 segundo para posteriormente obtener la medida.

Los espectros se obtuvieron en cinco lugares dentro de la zona deposito del analito (el área de medida del láser era aproximadamente de 10 μm de diámetro) y se hizo un promedio de ellos. Para el colorante catiónico BR9 los resultados de los espectros SERRS se muestran en la Figura IV.6. Las intensidades más altas fueron obtenidas con el tradicional coloide de citrato (tipo Lee y Meisel), seguido por el coloide recubierto de oro mientras que con el coloide de borato se obtuvieron resultados peores.

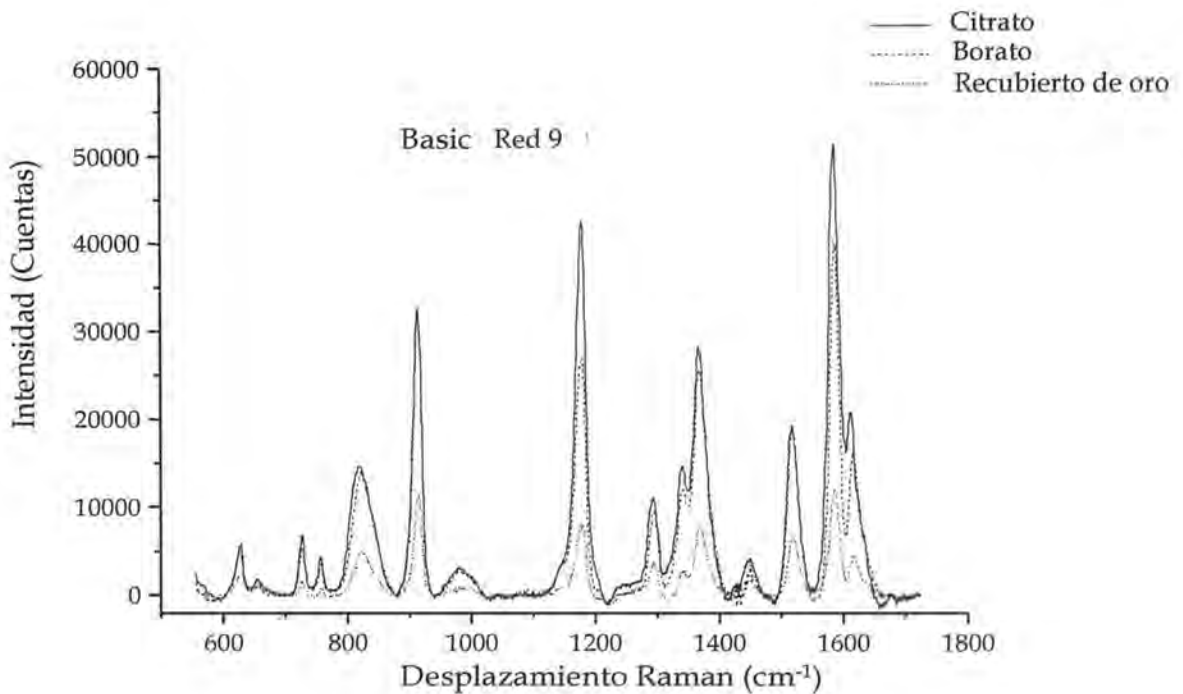


Figura IV.6. Espectro SERRS de BR9 depositado manualmente en el plato TLC con los tres tipos de coloides diferentes. Tiempo de acumulación del espectro 10 x 1 s.

Las intensidades relativas de las diferentes bandas vibracionales no fueron idénticas para los distintos coloides. Así, las bandas a 810, 905 y 1510 cm^{-1} son de intensidad similar para los coloides de citrato y recubiertos de oro, mientras que para las otras bandas el coloide de citrato da las mayores intensidades. Este hecho es debido probablemente a las diferencias en la adsorción en los coloides afectando a los factores de aumento en la superficie. Desde una perspectiva analítica es importante hacer énfasis en que la posición de las bandas no son dependientes del coloide, y estas posiciones proporcionan la información más importante para la identificación del analito en estudio.

Para el colorante AO7 (compuesto cargado negativamente) los resultados de los espectros SERRS se muestran en la Figura IV.7.

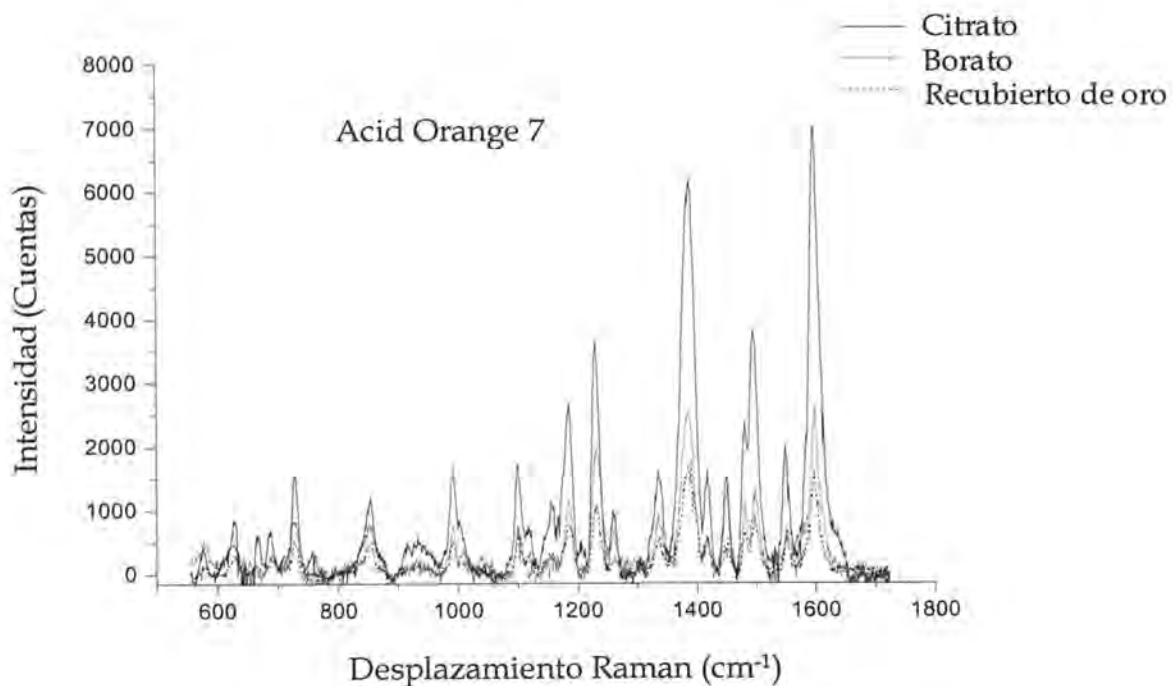


Figura IV.7. Espectro SERRS de AO7 depositado manualmente en el plato TLC con los tres tipos diferentes de coloides.

En ella se observa que el conjunto de las intensidades son mucho menores que para el colorante positivo BR9. Esto es debido a la pobre adsorción de este compuesto cargado negativamente y a la carga ya que la adsorción a el coloide

es mucho mas intensa para compuestos catiónicos^{29,30}. Extrañamente, también para este compuesto se obtuvieron los mejores resultados con el coloide citrato, a pesar de estar cargado negativamente a pesar de que las partículas de estos coloides tengan una superficie cargada negativamente. En segundo lugar los mejores resultados fueron conseguidos con el coloide de borato mientras que el coloide recubierto de oro dio los peores resultados.

En este estudio el compuesto FY3 no mostró ningún espectro Raman para estos tres tipos de coloides probablemente debido a que no se absorba en las partículas del coloide⁹.

3.2.4. CE-SERRS

En el acoplamiento de CE a SERRS off-line se utilizaron las condiciones optimizadas anteriormente para la separación y se usó el coloide de citrato Lee y Meisel. Se trataron de separar e identificar los colorantes catiónicos y aniónicos en una sola separación, pero resultó complicado debido a retenciones indeseables, de trazas del colorante cargado positivamente BR9 que se adhieren a varios componentes del sistema de separación y dejan un efecto de memoria a lo largo de toda la separación.

Debido al intenso espectro SERRS de este analito cargado positivamente (ver las intensidades en la Figuras IV.6 y IV.7) frente al espectro de los colorantes AO7 y FY3 la señal de BR9 interfiere en la señal SERRS de estos colorantes cargados negativamente.

Por ello, se procedió a la separación electroforética de una mezcla de los dos colorantes cargados negativamente AO7 y FY3. La disolución de separación se depositó en un plato TLC en movimiento y se adicionaron a los analitos depositados el coloide de citrato y además 1 μL de ácido nítrico 1 M para mejorar la adsorción de los colorantes cargados negativamente al coloide pudiéndose de esta manera registrar el espectro Raman de FY3. Los espectros SERRS obtenidos off-columna se muestran en la Figura IV.8.

[29] C.H. Munro, W.E. Smith, P.C. White, *Analyst*, 118 (1993) 731.

[30] R.M. Seifar, J.M. Verheul, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Analyst*, 126 (2001) 1418.

Con AO7 se obtuvo una señal más intensa que con el FY3, hecho que puede ser explicado basándose en los diferentes coeficientes de absorción a 514 nm de ambos colorantes.

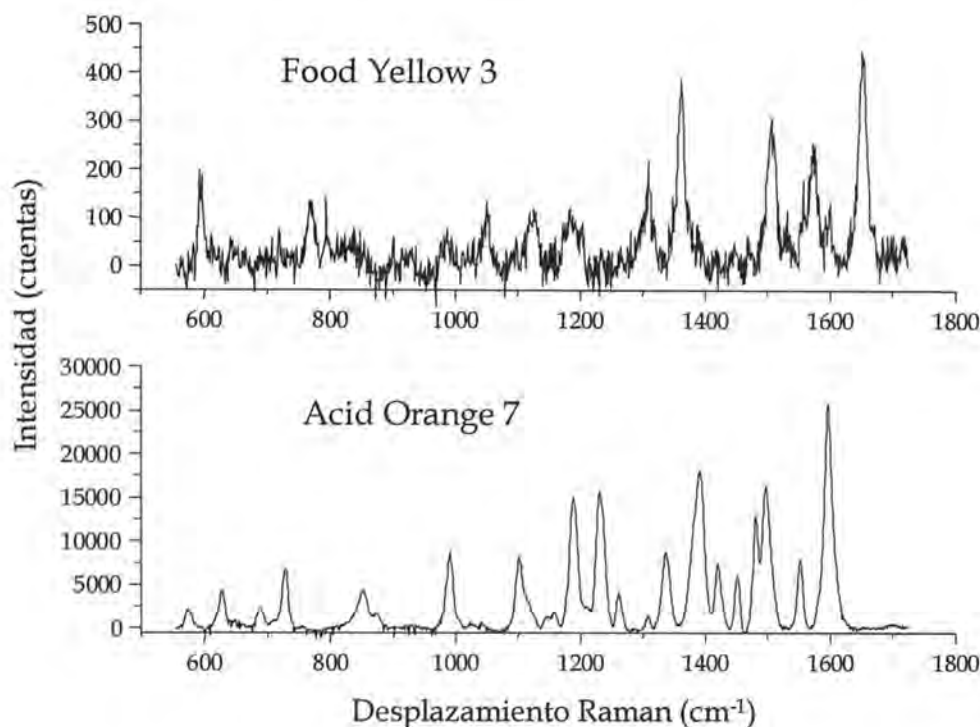


Figura IV.8. Espectro SERRS de los colorantes AO7 y FY3 separados tras separación electroforética y deposición en el plato TLC con adición de 1 μ L del coloide de citrato y 1 μ L de 1 M de ácido nítrico.

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

Se ha puesto de manifiesto la utilidad del acoplamiento de la CE, en su modalidad de CZE, con una técnica como la RS, empleando para subsanar la baja sensibilidad que presenta habitualmente esta técnica, la modalidad de SERRS usando como analitos modelo una mezcla de colorantes.

Además, en esta investigación se ha desarrollado una nueva interfase para el acoplamiento CE-SERRS basada en el uso de una aguja de acero inoxidable como cátodo y se han comparado la sensibilidad de diferentes tipos de coloides encontrando en todos los casos que para los colorantes cargados negativamente,

los mejores resultados en términos de intensidad de señal se consiguieron con el clásico coloide Lee-Meisel de citrato. Este acoplamiento se demostró viable especialmente para dos colorantes cargados negativamente ya que para el colorante cargado positivamente se observaron interferencias por retenciones indeseables en el sistema de separación.

El equipo CE y la interfase desarrollada para llevar a cabo este estudio se presenta en la Figura IV.9.

En este tipo de acoplamiento, la detección de los analitos en estudio se llevó a cabo de manera "off-column", es decir, en un primer paso se separaron los analitos siguiendo su separación mediante un detector UV-Vis y posteriormente se depositaron en placas de TLC donde posteriormente se detectan por SERRS.

Por tanto, en primer lugar se tuvo que hacer una adaptación de la salida del capilar. Éste fue introducido en una aguja metálica de dimensiones parecidas para poder realizar el contacto eléctrico para el cierre del circuito durante la separación electroforética. Por otro lado, la TLC se montó sobre una mesa movable para la deposición de los analitos en estudio conforme eran eluidos del capilar y tratando de evitar, que se volviesen a mezclar de nuevo una vez separados, además de tratar de conseguir la deposición de todos ellos en una misma línea en la TLC.



Figura IV.9. Imagen del equipo de CE con detección "on-line" UV e interfase para la posterior detección off-line mediante SERRS.

Fue necesario controlar la velocidad de movimiento de la mesa y llegar a un valor de compromiso para la velocidad tal que no se mezclasen los analitos y que la deposición se hiciese en la menor longitud posible de TLC (Figura IV.10). Otro factor que ha sido necesario controlar es la distancia existente entre la salida del capilar y la TLC, ya que conforme la distancia es mayor surgen problemas de que se forme una gota al final del capilar, produciéndose así mezcla de los analitos, y por el contrario, si el capilar se encuentra demasiado cerca de a la TLC el capilar se puede llegar a obstruir impidiendo así la separación. Esta distancia se observó mediante una cámara, la cual aumentaba la imagen de manera que se pudiese controlar dicha distancia mediante un tornillo milimétrico emplazado en la parte final del capilar (ver Figura IV.11).

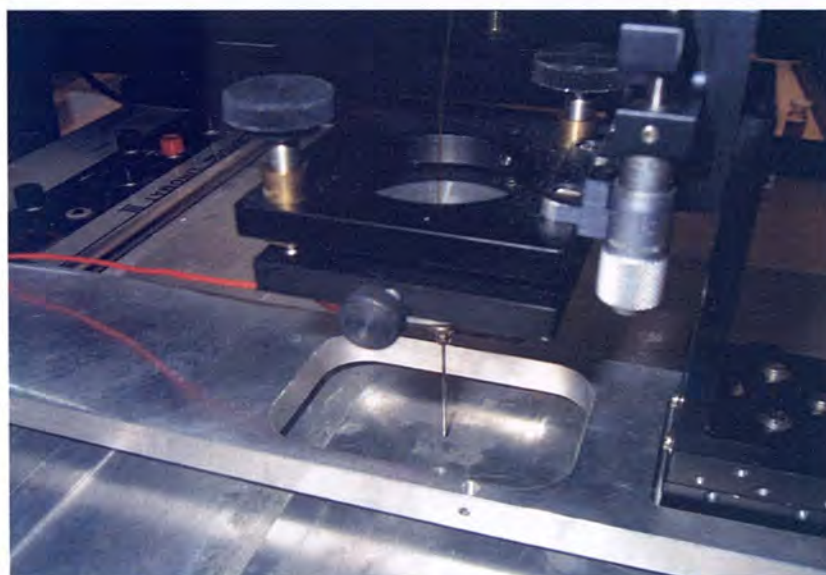


Figura IV.10. Imagen de la interfase para la deposición del efluente.

Debido a la modalidad de Raman utilizada basada en el uso de coloides metálicos, es necesario comentar que, estos coloides se sintetizaron siguiendo recetas ya descritas en bibliografía. Si bien, para que estas suspensiones de partículas metálicas coloidales realizaran su finalidad de forma adecuada hubo que controlar mucho la morfología de las partículas, la formación del coloide, las

impurezas y efectos de agregación del analito con el coloide, ya que la sensibilidad estaba determinada por esta gran cantidad de factores.

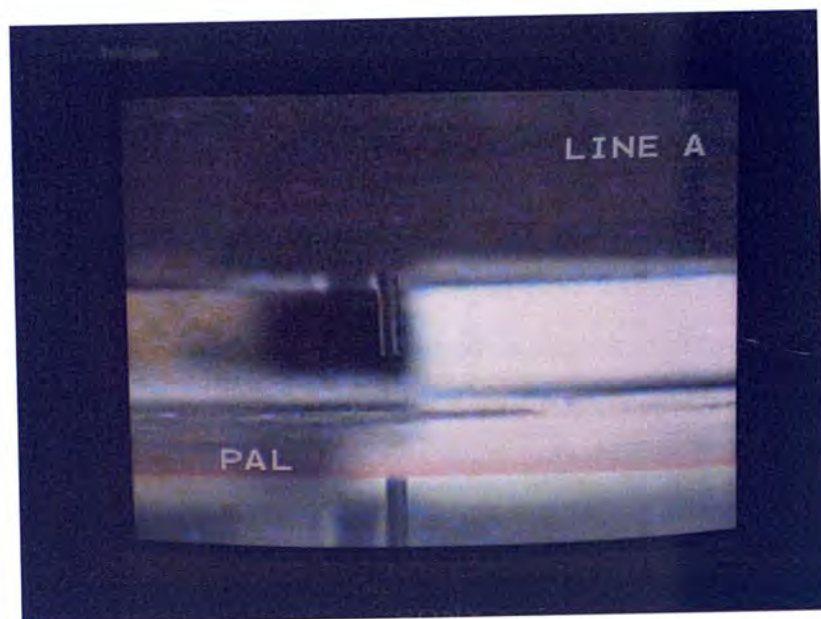


Figura IV.11. Imagen observada al ajustar la distancia entre el capilar y la TLC.

Por tanto, posteriormente a la deposición de los analitos en la TLC, se adicionaron los tres tipos de coloides estudiados y se llevaron al equipo de Raman. Mediante un microscopio, los analitos fueron focalizados para la posterior incidencia del láser sobre los mismos (Figura IV.12) y su posterior registro del espectro Raman (Figura IV.13).

Otro importante inconveniente a tener en cuenta es el problema de la fluorescencia, ya que si una muestra presenta fluorescencia debida generalmente a impurezas, el espectro Raman prácticamente no puede ser observado debido a la fluorescencia con lo que se arruina la detección.

Para evitar este problema existen diferentes caminos de eliminarla o suprimirla como son el purificar la muestra, exponer la muestra de forma prolongada a un haz láser (se "blanquean" las impurezas), elegir una longitud de onda adecuada, hacer un promediado de la señal que es lo que sucede en los instrumentos de

Transformada de Fourier (TF) o el uso de un láser pulsado de tal manera que se pueda grabar el espectro Raman antes de que se presente la fluorescencia.

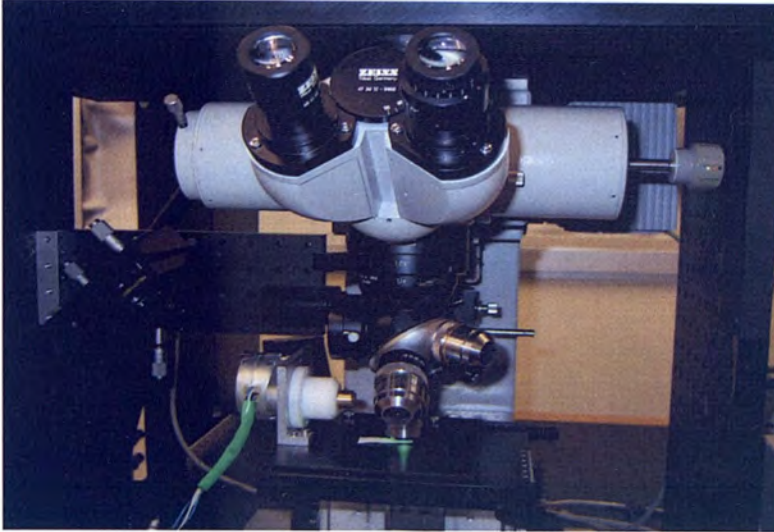


Figura IV.12. Imagen de la focalización de la TLC con los analitos y coloides depositados para su posterior detección.

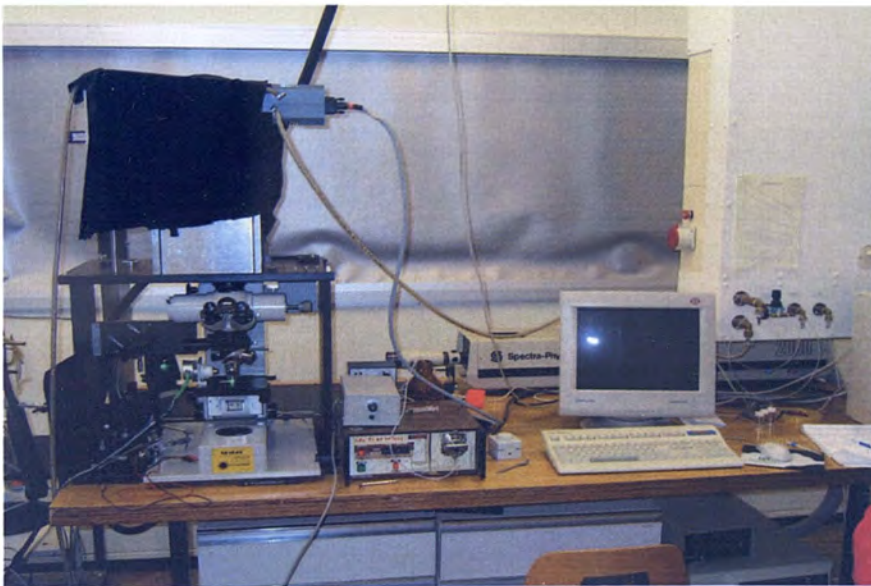
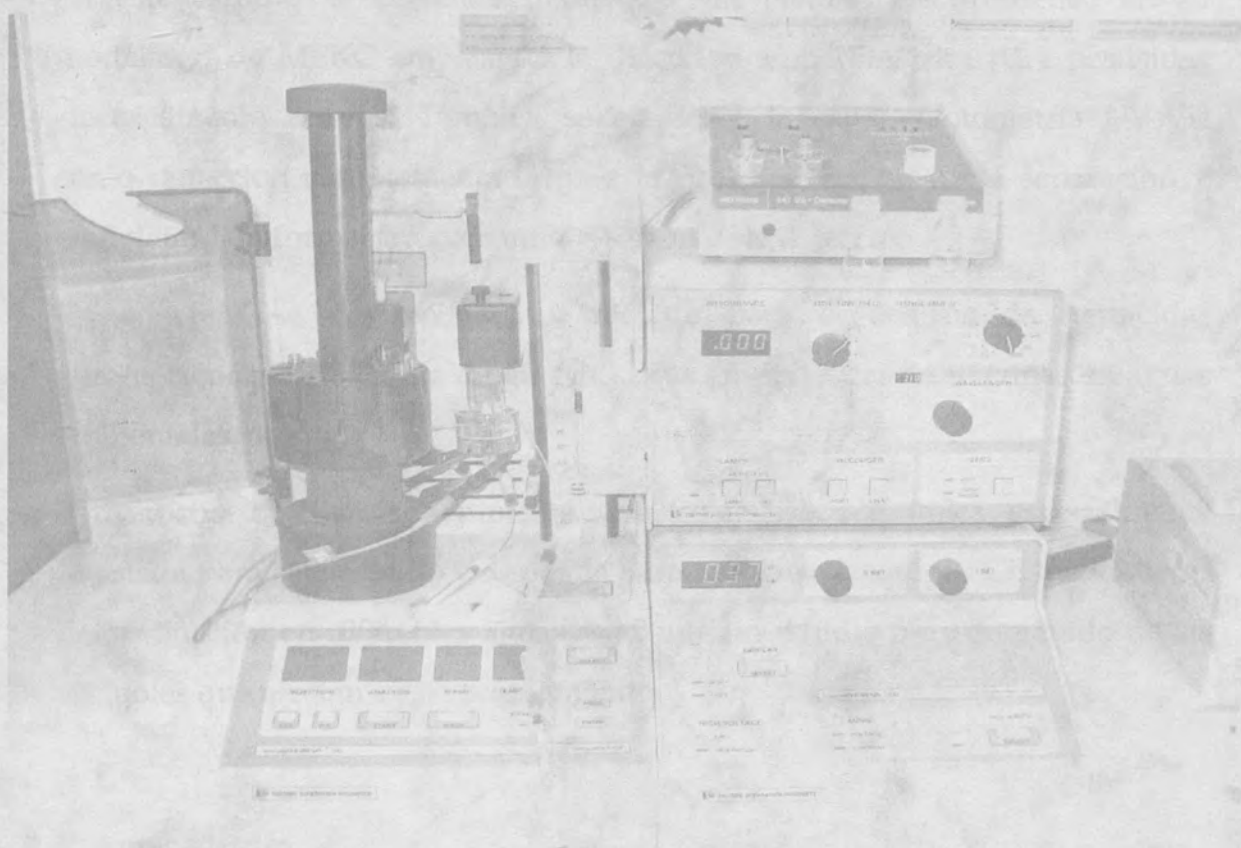


Figura IV.13. Imagen del sistema de detección off-line.

Por último destacar que la espectroscopía Raman proporciona una detallada información vibracional para muchas familias de compuestos y posee por lo tanto un alto potencial de identificación, especialmente cuando se analizan soluciones acuosas. Es por esta razón que hay una especial necesidad e interés en el acoplamiento de esta técnica de identificación con las técnicas separativas como la CE.



CAPÍTULO V

Determinación de herbicidas en aguas mediante cromatografía electrocinética micelar con detección amperométrica.

La experimentación que se recoge en este capítulo VI ha tenido lugar en los laboratorios del Departamento de química Analítica y Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid y se han concretado en un trabajo que se encuentra en prensa en la revista "Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC-00500-2004)" (ver anexo V)

1. Objetivo

En este estudio se pretende desarrollar un método electroforético en su modalidad de MEKC empleando la detección amperométrica para pesticidas eléctricamente activos. También se empleará la espectrofotometría UV-Vis como detección complementaria para la previsualización de la separación y completar la información para ambos sistemas de detección.

En concreto se desarrollará un método para el análisis de herbicidas pertenecientes a la familia de las fenilureas en presencia de triazinas en aguas ambientales.

Para dicho objetivo se empleará una celda electroquímica especialmente diseñada para este estudio y diseñada para acoplarse a equipos CE mediante su determinación en diferentes aguas mediante un estudio pormenorizado de las variables que afectan a este acoplamiento.

2. Antecedentes

2.1. La detección electroquímica y la CE

La detección electroquímica permite el estudio de sustancias electroactivas, usando los principios de la conductimetría, potenciometría y amperometría o voltamperometría. La detección amperométrica consiste, por tanto, en medir la corriente resultante de la oxidación o reducción de sustancias electroactivas en la superficie del electrodo de trabajo.

El primer estudio del acoplamiento de la detección electroquímica a un sistema de electroforesis capilar se debe a Wallingford y Ewing en el año 1987¹. A partir de ese trabajo han ido apareciendo gradualmente hasta la actualidad un cierto número de trabajos²⁻¹³, que en relación con otras técnicas usadas en la detección con CE son muy escasos.

[1] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1762.

[2] X. Huang, T. You, X. Yang, E. Wang, *Talanta* 49 (1999) 425.

[3] H.H. Ruttinger, B. Drager, *J. Chromatogr. A*, 925 (2001) 291.

[4] X.H. Sun, W.D. Cao, X.X. Bai, X.R. Yang, E.A. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 442 (2001) 121.

En la detección amperométrica, que es la más utilizada, el sistema de medida consiste habitualmente en un electrodo de trabajo, otro de referencia convencional y un tercero auxiliar, conectados a un potencióstato. Habitualmente, la señal amperométrica se obtiene a partir de la medida de la corriente debida a la oxidación o reducción de los analitos a potencial constante; en ocasiones también se ha empleado la detección amperométrica de pulsos (PAD)¹⁴⁻¹⁶, la detección amperométrica integrada de pulsos (IPAD)¹⁴, la voltamperometría de onda cuadrada¹⁷ y la voltamperometría cíclica¹⁸. Las primeras están indicadas para la detección de analitos que inactivan el electrodo de trabajo mientras que las últimas permiten obtener información cualitativa¹⁹.

Como ya se indicó este sistema de medida sólo es operativo para sustancias electroactivas, por lo que no es universal, permitiendo discriminar entre sustancias electroactivas (detectables) y no electroactivas (no detectables) e incluso seleccionando adecuadamente el potencial aplicado, entre sustancias electroactivas que tengan la suficiente diferencia en sus potenciales redox, siendo, por tanto, bastante selectivo²⁰.

2.1.1. Modos de detección electroquímica

Aunque los detectores electroquímicos tienen cualidades que los hacen especialmente idóneos para ser incorporados a equipos de electroforesis capilar,

[5] M. Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, A. Sánchez, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 243.

[6] J. Wang, M. Pumera, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 5919.

[7] X.J. Li, Y.P. Zhang, Z.B. Yuan, *Chin. J. Anal. Chem.*, 30 (2002) 815.

[8] M. Trojanowicz, M. Szewczynska, M. Wcislo, *Electroanalysis, Review*, 15 (2003) 347.

[9] O. Klett, L. Nyholm, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 1245.

[10] J. Wang, G. Chen, M.P. Chatrathi, M. Musameh, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 298.

[11] C.D. García, C.S. Henry, *Anal. Chim. Acta*, 508 (2004) 1.

[12] N.A. Lacher, S.M. Lunte, R.S. Martín, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2482.

[13] J. Wang, G. Chen, M. Wang, M.P. Chatrathi, *Analyst*, 129 (2004) 512.

[14] G. S. Owens, W. R. Lacourse, *J. Chromatogr. B*, 695 (1997) 15.

[15] P. D. Voegel, W. Zhou, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 951.

[16] J. Wen, R. M. Cassidy, A. S. Baranski, *J. Chromatogr. A*, 811 (1998) 181.

[17] G. C. Gerhardt, A. Baranski, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 908.

[18] S. Park, M. J. McGrath, M. R. Smyth, D. Diamond, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2994.

[19] A. Zapardiel, M. Chicharro, E. Bermejo, A. Sánchez, F. Montes de Juan, M. Moreno, *Química e Industria*, 536 (2002) 716.

[20] A. Sánchez Arribas, *Tesis doctoral*, Universidad Autónoma (2003) Madrid.

como son su perfecta adaptación a las dimensiones físicas de los capilares sin perder por ello sensibilidad y que los materiales e instrumentación asociados necesarios para el detector son muy sencillos y relativamente baratos, generalmente, la detección se lleva a cabo al final de la columna capilar, por lo que es necesario un correcto alineamiento entre el electrodo y la columna capilar, así como aislar el detector de los altos voltajes de separación. Los procedimientos para ello son en ocasiones difíciles, complican el manejo del dispositivo y pueden elevar el coste final del detector. Es por estas razones por las que ha sido escasamente introducida en equipos comerciales de electroforesis capilar a pesar de sus atractivas cualidades y de estar ampliamente extendidas a nivel de laboratorios de investigación^{21,22}.

Principalmente, se han desarrollado, de forma exhaustiva, dos modos de detección electroquímica en los últimos años, los primeros conocidos con el nombre de modos "off-column"^{1,23,24} y los segundos denominados "end-column"^{25,27}. En el caso de detección "off-column" es necesario la utilización de una separación entre la columna capilar, donde se aplica el alto voltaje y la parte final de la columna capilar, donde se realiza la detección, cuando las columnas son de diámetro interno superiores a 25 μm ²⁸. En los modos "end-column", generalmente un microelectrodo se coloca directamente al final de la columna capilar, realizando la aplicación del alto voltaje y la detección en la misma zona.

Aunque los resultados obtenidos con ambos modos son buenos es necesario, en el caso de los modos "off-column", que la separación entre la zona donde se aplica el alto voltaje y la zona de detección estén completamente separadas.

[21] L. A. Holland, S. M. Lunte, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 1H-4H.

[22] R. P. Baldwin, *Electrophoresis*, 21 (2000) 4017.

[23] D. Kaniansky, P. Havasi, J. Marak, R. Sokolik, *J. Chromatogr. A*, 366 (1986) 153.

[24] A. J. Tudas, M. M. C. Van Dyck, H. Poppe, W. Th. Kok, *Chromatographia*, 37 (1993) 79.

[25] S. Park, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4366.

[26] M. Chem, H. Huang, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4010.

[27] J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3525.

[28] A. G. Ewing, J. M. Mesaros, P. F. Gavin, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 527.

Por esta razón, las mayores dificultades que se encuentran al utilizar esta técnica son dos ^{21,22}:

1.- Es necesario aislar el sistema de detección del alto voltaje requerido para la separación, pues la magnitud de la corriente que se genera es tan grande que solapa por completo a la producida por los analitos al oxidarse o reducirse.

2.- Alinear de manera fiable el electrodo de trabajo con el final de la columna capilar, pues este proceso suele ser de gran complicación y afecta de manera importante a la sensibilidad y reproducibilidad de la señal medida.

Para resolver el primer problema existen en la actualidad dos métodos contrastados y su elección se realiza teniendo en cuenta el diámetro interno de la columna capilar. Uno de ellos se utiliza principalmente para capilares de diámetro interno mayor de 25 μm , teniendo en cuenta como base los trabajos de Wallingford y Ewing¹ los cuales introdujeron el concepto de "decoupler" (junta dieléctrica de vidrio previa al sistema de detección a la salida de la columna capilar) que tiene como objetivo hacer caer suficientemente el alto voltaje de separación al final de la columna capilar, de manera que ya no suponga una interferencia en el lugar donde se realiza la detección. Se han realizado diferentes modificaciones desde entonces, utilizando desde juntas porosas de grafito²⁹, de acetato de celulosa³⁰, de nafión^{31,32}, e incluso de metales como el paladio³³, desacopladores galvanostáticos³⁴ aunque también existen antecedentes de "decoupler" basados en fracturas libres³⁵ o fabricados mediante el ataque con ácido fluorhídrico³⁶ a la pared del capilar hasta hacerla conductora. Dependiendo de la geometría del electrodo de trabajo éste se sitúa justo a la salida de la columna capilar, en el caso de electrodos de disco, o introducido dentro de su parte final, como es el caso de los ultramicroelectrodos

[29] Y. F. Yik, H. K. Lee, S. F. Y. Li, S. B. Khoo, *J. Chromatogr. A*, 585 (1991) 139.

[30] Ch. W. Whang, Y. Chen, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2461.

[31] M. A. Malone, H. Zuo, S. M. Lunte, M. R. Smyth, *J. Chromatogr. A*, 700 (1993) 73.

[32] M Chicharro, A. Zapardiel, E. Bermejo, A. Sanchez, R. Gonzalez, *Electroanalysis* 16 (2004) 311.

[33] X. Huang, W. Th. Kok, *J. Chromatogr. A*, 707 (1995) 335.

[34] D. Kaniansky, P. Havasi, F. Iranyi, J. Marak, *J. Chromatogr. A*, 709 (1995) 69.

[35] M. C. Linhares, P. T. Kissinger, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 2076.

[36] S. Hu, Z. L. Wang, P. B. Li, J. K. Cheng, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 264.

de tipo cilíndrico. Este método se aplica para columnas de diámetro interno mayor de 25 μm ²⁰.

El otro método para eliminar la influencia del alto voltaje sobre la señal amperométrica, comúnmente conocido como detección "end-column", fue introducido por Huang *y col.*³⁷ y se ha extendido ampliamente en los últimos años²¹. Este método implica el uso de columnas capilares de diámetro interno inferiores a 25 μm , ya que en ellas la corriente parásita debida al voltaje de separación es menor que la corriente faradaica debida a las reacciones redox de los analitos en el electrodo de trabajo cuando éste se sitúa a la salida del capilar. Normalmente, el electrodo tiene un diámetro similar al diámetro interno del capilar, aunque también se emplean electrodos de mayor tamaño que proporcionan buenos resultados³⁸. La ventaja de este segundo método está en la mayor sencillez del detector al no incluir el "decoupler", pero adquiere una mayor relevancia el alineamiento del electrodo con la columna capilar por lo que necesita para ello un dispositivo externo de precisión.

También hay ejemplos de detección sin fractura en capilares de 50 μm empleando disolventes no acuosos de reducida conductividad que rebajan mucho la corriente debida al voltaje de separación³⁹.

El segundo gran problema que se plantea a la hora de adaptar un sistema de detección amperométrica a un equipo de electroforesis capilar, es el alineamiento del electrodo de trabajo con la columna capilar. No debe olvidarse que, en un detector amperométrico, el electrodo de trabajo es el componente de mayor importancia puesto que de sus características van a depender la sensibilidad y la selectividad de la señal obtenida. Sin embargo, no es menos importante la adaptación del electrodo de trabajo a las dimensiones físicas de la columna capilar empleada. Por ello, el dispositivo necesario para llevar a cabo de una manera efectiva este proceso puede ser más o menos complejo en función de la geometría y dimensiones del electrodo de trabajo utilizado²⁰.

[37] X. Huang, R. N. Zare, S. Sloss, A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 184.

[38] J. Ye, R. P. Baldwin, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3525.

[39] F. M. Matysik, *Electrochim. Acta*, 43 (1998) 3475.

A priori, el tipo de electrodo de trabajo que mejor responde a los requerimientos impuestos por las pequeñas dimensiones de los capilares así como a las cantidades de analito manejadas son los ultramicroelectrodos, debido a sus características favorables de: pequeño tamaño, baja caída óhmica y respuesta de tipo difusional. La utilización de ultramicroelectrodos de geometría cilíndrica como fibras o hilos de 5 a 50 μm de diámetro y 100 a 500 μm de longitud es muy habitual, y fueron incluidos en los primeros detectores amperométricos para electroforesis capilar desarrollados por Wallinford y Ewing¹. Su inconveniente fundamental radica en que su fabricación y manejo es complicado, son frágiles, necesitan de pretratamientos y activadores, y son limitados los materiales con los que pueden ser construidos.

Para el control del alineamiento entre este tipo de electrodos y la columna capilar, es imprescindible fijarlos a un sistema microposicionador que les sitúa correctamente y de manera precisa, con la ayuda de un microscopio, frente a la columna capilar. Este procedimiento es empleado igualmente para el posicionamiento de ultramicroelectrodos de otras geometrías. En este caso, la ineludible presencia de estos dispositivos ópticos y de precisión hace que el sistema de detección sea complicado, sensible a perturbaciones mecánicas, difícil de manejar y, por supuesto más costoso²¹.

Como alternativa a la geometría cilíndrica, está muy extendido el uso de electrodos de disco de diversos tamaños. Aunque el empleo de ultramicroelectrodos de esta geometría es muy habitual, la utilización de electrodos de disco de diámetros superiores a 100 μm ³⁸ ha ido en continuo aumento hasta la actualidad. Estos electrodos son más fáciles de construir y manejar, son más robustos, pueden ser tratados mecánicamente y pueden emplearse para su construcción un mayor número de materiales. Gracias a estas cualidades, y con objeto de mejorar la sensibilidad, para efectuar la detección a potenciales más favorables u obtener señales de sustancias que de otro modo no serían electroactivas, se han empleado con éxito electrodos de trabajo de

diversos materiales^{22,32,40,41} tales como carbono, platino, oro, cobre o níquel, tanto directamente como modificados, y con diámetros que normalmente están comprendidos entre 20 y 500 μm . Puesto que los electrodos de esta geometría no se introducen en el interior del capilar, dependiendo del tamaño de aquellos, el proceso de alineamiento con la columna capilar puede resultar más sencillo. Así, se ha comprobado que cuando se utilizan electrodos de trabajo de disco con diámetros superiores al diámetro interno de la columna capilar, la señal que proporcionan es más reproducible³⁸ aunque su alineamiento con la salida de la columna capilar no necesite de una elevada precisión. Esto es beneficioso a la hora de simplificar el sistema de alineamiento, pues se puede eliminar el dispositivo de control óptico y el microposicionador puede ser sustituido por un dispositivo de alineamiento menos complejo.

Basándose en estos aspectos, actualmente se desarrollan diseños muy cuidados de la célula de detección que permiten un alineamiento automático del electrodo al montar la célula, evitando así el uso del microposicionador. En su mayoría, el tamaño de los electrodos es superior al diámetro interno de la columna capilar y, normalmente, en el diseño de la célula se incluyen sistemas que guían a la columna capilar y al electrodo de trabajo para su perfecto alineamiento. Con este objetivo, se han descrito células de detección que incorporan tubos,^{42,43} canales^{44,45} o tornillos,⁴⁶ con los que se combina algún medio que permita fijar la posición del electrodo y la columna capilar una vez que han sido alineados, como pueden ser tornillos o "septum". Son células más manejables aunque su sencillez hace que los límites de detección que se obtienen sean menos favorables.

Otra de las aproximaciones realizadas para solventar el problema del alineamiento consiste en fijar un electrodo metálico en forma de hilo o anilla al

[40] L. A. Holland, A. M. Leigh, *Electrophoresis*, 23 (2002) 3649.

[41] T. You, X. Yang, E. Wang, *Electroanalysis*, 11 (1999) 459.

[42] M. Chen, H. Huang, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4010.

[43] F-M. Matysik, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 27.

[44] A. M. Fermier, M. L. Gostkowski, L. A. Colón, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1661.

[45] X. Huang, T. You, X. Yang, E. Wang, *Talanta*, 49 (1999) 425.

[46] M. Goto, S. Inagaki, Y. Esaka, *Anal. Sci.*, 17 (2001) 1383.

extremo de la columna capilar^{15,47} ya que de esta forma se consigue un sistema sencillo y de gran reproducibilidad en cuanto a la señal proporcionada. Su principal inconveniente está en su limitación a electrodos metálicos y, además, si falla el electrodo o el capilar, el sistema entero debe ser desechado¹⁹.

A pesar de los esfuerzos realizados para simplificar y aumentar su robustez, todos los detectores amperométricos descritos hasta el momento han sido adaptados únicamente a equipos de electroforesis capilar contruidos en los propios laboratorios de investigación, no existiendo antecedente alguno de su acoplamiento a un equipo comercial de electroforesis capilar. Sin embargo, el desarrollo de dispositivos de detección amperométrica compatibles con equipos de electroforesis capilar comerciales abriría una nueva vía para su expansión y aceptación a nivel general²⁰.

2.2. Interés del análisis de pesticidas

El uso de los herbicidas tipo fenilureas en agricultura provoca un alto riesgo puesto que entran con facilidad en la cadena alimentaria por medio del agua y del forraje contaminados. Su uso intensivo también está causando otros problemas, como es el uso de dosis crecientes como resultado de la adaptación de las plantas y de la introducción de nuevos herbicidas con una actividad y una especificidad más alta. El aumento progresivo en la producción y el uso de esta clase de herbicidas ha convertido el problema de la calidad del agua en un asunto a nivel internacional y nacional. De hecho los casos de contaminación fortuita con pesticida de depósitos de agua han sido más numerosos en los últimos años.

La producción de pesticida ha ido cambiando desde la fabricación de pesticidas no polares, persistentes y duraderos a pesticidas más polares y más degradables.

Sin embargo la mayor movilidad ambiental de los pesticidas polares obliga a aumentar el control sobre la salud pública modificando la legislación que regula

[47] M. Zhong, S. M. Lunte, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 209.

los niveles permitidos en agua potable. El acta del agua de la Comunidad Europea 1998 (EC) indica que la concentración máxima admisible de todos los pesticidas en aguas potables debe ser inferior a 500 ng/L y que la concentración individual máxima del pesticida debe ser 100 ng/L. Por lo tanto, los límites de detección requeridos para el análisis del agua potable necesitan estar en el nivel de los nanogramos.

Todos estos cambios obligan a la implantación de técnicas analíticas para la detección de residuos de pesticidas en muestras acuosas, especialmente de pesticidas de las familias de las triazinas, compuestos de la fenilurea, etc.

Las fenilureas son herbicidas sistémicos selectivos usados comúnmente en agricultura, solos o combinados. Debido a su naturaleza polar, la posibilidad de lixiviación de la superficie al abastecimiento de agua y a las reservas de agua, junto con la aparición de la degradación tóxica potencial y de los productos metabólicos, constituyen un riesgo a la salud humana.

Por otro lado, los herbicidas del tipo de las s-triazinas son de los pesticidas más ampliamente utilizados para el control de las malas hierbas en hojas duras, especialmente en los cultivos de maíz y otras cosechas similares. Debido a su uso tan extenso y su relativamente alta persistencia, las clorotriazinas, al igual que la simazina, producen una gran contaminación del medio ambiente a niveles de concentración que cada vez están siendo más elevados.

3. Parte experimental

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Analitos, reactivos y disoluciones

Los pesticidas fenurón, clorotolurón, monurón, monolinurón, isoproturón, diruón, linurón, atrazina y simazina (grado Pestanal®) fueron adquiridos de Riedel de Haën (Madrid, España) y su estructura se muestra en la Figura V.1. El metanol (grado Pestanal®) también fue adquirido de Riedel de Haën (Madrid, España) y empleando como disolvente. Todos los otros componentes utilizados

para la preparación de las disoluciones reguladoras fueron de calidad reactivo de análisis. Las disoluciones madres de los herbicidas (1.0×10^{-2} mol l⁻¹) se prepararon disolviendo una cantidad apropiada del compuesto en metanol:agua. Todas las disoluciones madre se guardaron fuera de la luz y en el frigorífico. Se prepararon disoluciones diluidas diariamente a partir de las disoluciones madre. Las disoluciones reguladoras y las muestras fueron tratadas en un baño de ultrasonidos durante 5 min y filtradas a través de un microfiltro de 0.45 μ m MFS-13 (Advantec MFS, Inc. USA). El agua utilizada para la preparación de disoluciones se purificó con un sistema Milli-Q Milli-RO (Millipore, España).

3.1.2. Aparatos y electrodos

Previamente el grupo de investigación del Dr. Chicharro, parte de ellos colaboradores en este trabajo de investigación, describieron un sistema de detección dual semejante (UV u electroquímico) con CE³.

Todas las medidas electroquímicas se realizaron en el modo de tres electrodos usando un analizador electroquímico BAS 100B conectado a un ordenador 386/PC. La adquisición de datos y la conversión a un archivo "txt" se realizaron mediante un software BASCOM 2.21 (BAS, West Lafayette, USA).

Se emplearon como pseudo-referencia y como electrodo auxiliar un alambre de plata y de platino, respectivamente. Todos los potenciales dados en este trabajo fueron medidos con respecto a este sistema de referencia. Los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente aplicando el potencial de operación deseado. La corriente se estableció hasta conseguir una línea base estable antes de llevar a cabo el registro de la señal amperométrica.

Los experimentos CE se llevaron a cabo con un SpectraPHORESIS 100 (Thermo Quest Corporation, España) equipado con un detector SC100 UV/Vis de longitud de onda variable (Thermo Quest Corporation, Spain).

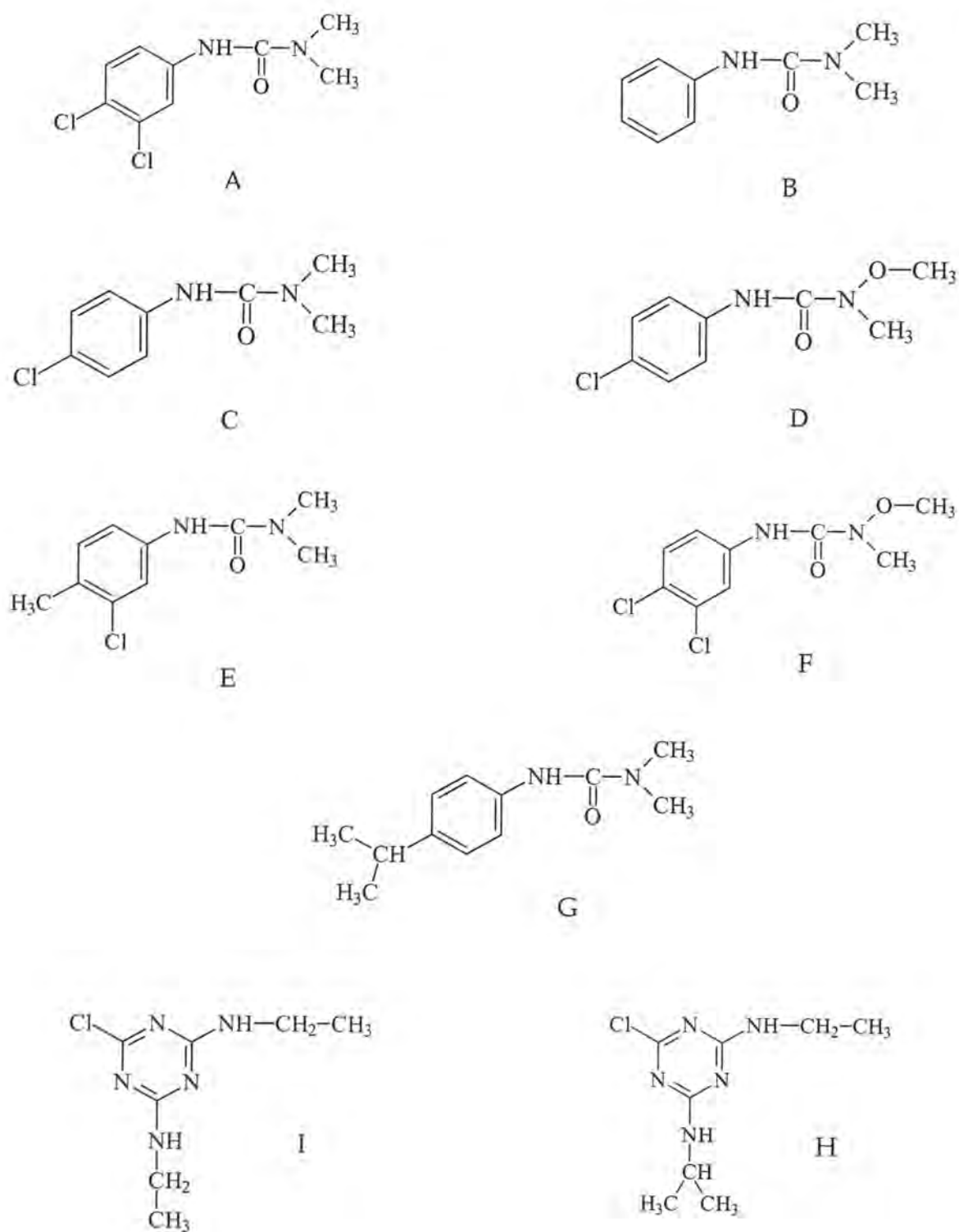


Figura V.1. Estructura de los compuestos estudiados. A) Diurón B) Fenurón C) Monurón D) Monolinurón E) Clortolurón F) Linurón G) Isoproturón H) Atrazina I) Simazina.

La adquisición de datos y el procesamiento de los mismos se llevó a cabo usando un ordenador 486/PC equipado con dos canales y un paquete software Chrom-Card (Thermo Quest Corporation, España).

Se utilizó una columna capilar de sílice fundida de 100 cm con un tubo desacoplador de nafión a 2 cm para las separaciones electroforéticas. Esta columna tenía un diámetro interno de 75 μm y un diámetro externo de 365 μm que fue suministrado por Supelco, cat. No. 77500 (Bellefonte, USA).

Los electrodos de pasta de carbono de 500 μm de diámetro se prepararon manualmente mediante la mezcla de polvo de grafito (Acheson 38#, Fischer Scientific. Code no. G/0900/60) y aceite mineral (Aldrich Chemical Co. no. 16/140-3). La proporción de polvo de grafito y aceite mineral fue de 70:30. El cuerpo de los electrodos de pasta de carbono (CPE) era un tubo de teflón (PTFE) de 20 mm de longitud con un diámetro interno de 0.5 mm y un diámetro externo de 1.6 mm llenado con la pasta de carbón que no necesitó ninguna activación especial. El contacto eléctrico se estableció con un alambre de cobre.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Voltamperogramas cíclicos e hidrodinámicos

La voltamperometría cíclica es una técnica apropiada para el estudio del comportamiento electroquímico de compuestos electroactivos. Esto puede ayudar a seleccionar el potencial del electrodo de trabajo. La Figura V.2 muestra el voltamperograma cíclico de los siete herbicidas de la familia de las fenilureas investigados en una disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0.05 mol l^{-1} a pH 7.0. Los otros dos herbicidas del tipo s-triazinas no son electroactivos en estas condiciones, por lo que en este trabajo se empleó la detección UV y electroquímica de manera simultánea, sólo para observar la importante interferencia de las s-triazinas en la detección UV de las fenilureas. De acuerdo con los voltamperogramas cíclicos (Figura V.2), la oxidación de todas las fenilureas fue irreversible con potenciales de pico anódico en el rango de 850 a 1110 mV.

También se investigó el efecto en la señal analítica de la velocidad de barrido, entre 5 y 100 mV s^{-1} , para una concentración de herbicidas de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ en una disolución reguladora fosfato (0.05 mol l^{-1} y a pH 7.0) observando una dependencia proporcional de la corriente del pico con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido para todos los herbicidas. Hecho que indica la presencia de un proceso difusional.

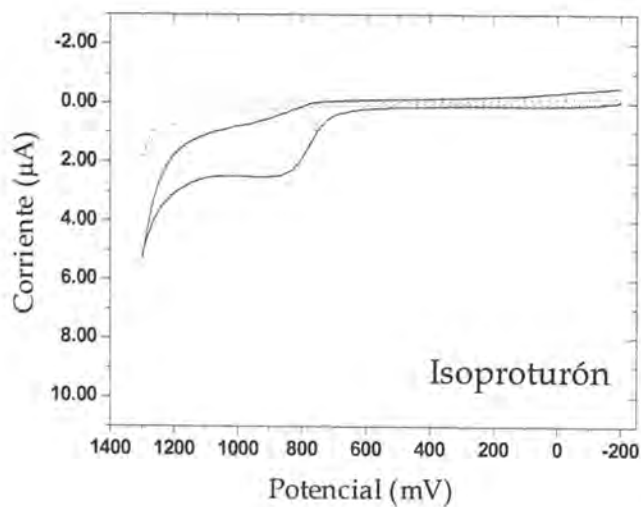
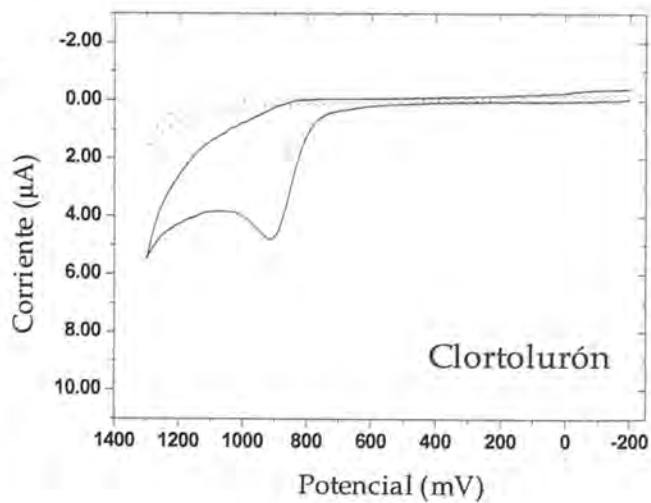
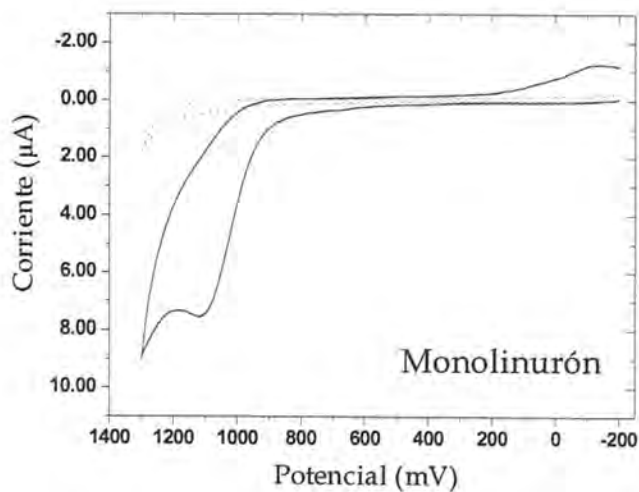
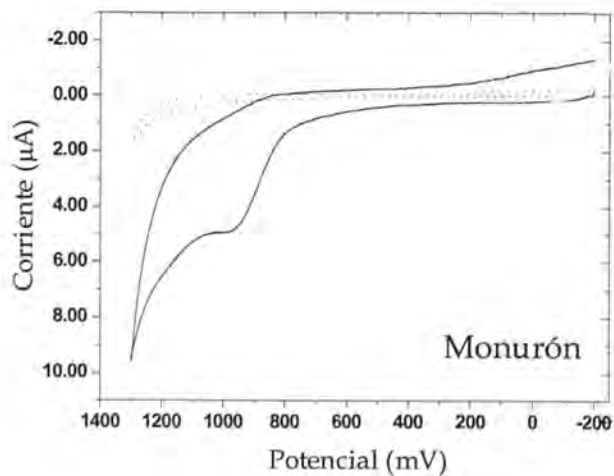
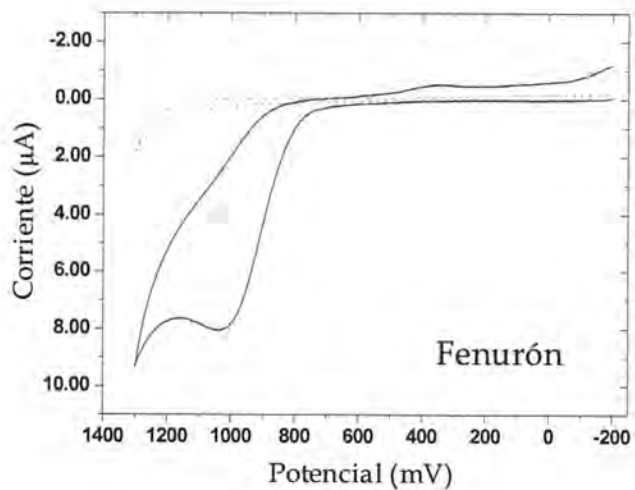
El potencial aplicado al electrodo de trabajo afecta directamente a la sensibilidad y a los límites de detección. Como se muestra en la Figura V.3., la corriente del pico aumenta rápidamente a un potencial de 600 mV para el clortolurón y a 700 mV para el resto de las fenilureas.

También se observó que cuando el potencial aplicado excede los 850 mV, la corriente pico de todos los herbicidas aumenta más lentamente pero que sin embargo aplicando un potencial mayor de 950 mV se obtiene una corriente de pico mayor. A potenciales mayores de 1000 mV la línea base y el ruido de la corriente de fondo empeoran substancialmente, debido a la oxidación del disolvente. El potencial aplicado al electrodo de trabajo elegido fue de 950 mV ya que bajo estas condiciones la corriente de fondo no es muy alta y la relación señal/ruido es la mejor posible.

La reproducibilidad y estabilidad de la señal analítica se estudió para una serie de diez muestras inyectadas a una concentración de $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (un tiempo total de análisis de 300 min), resultando una DER del 6.1%.

3.2.2. Condiciones analíticas de separación y cuantificación

El método electroforético desarrollado se basó en la aplicación de la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC), muy útil en la separación de compuestos neutros, como son los herbicidas tipo fenilureas. Se eligió dodecil sulfato sódico (SDS) como agente formador de micelas capaz de formar una pseudofase interior en la cual las moléculas de los analitos son capaces de disolverse en su interior.



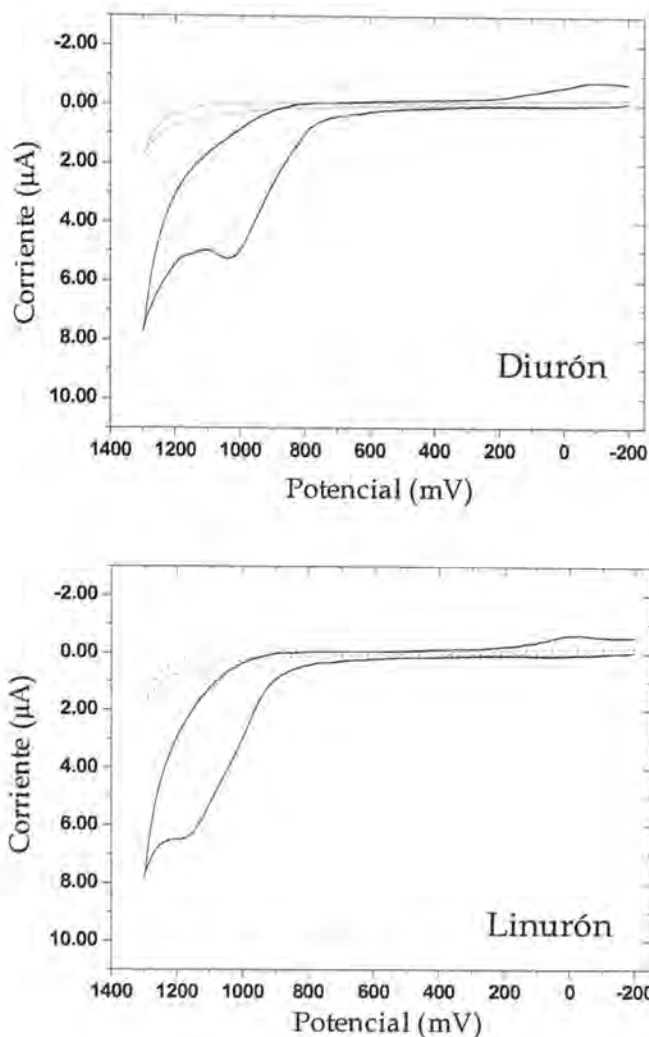


Figura V.2. Voltamperogramas cíclicos para las fenilureas en estudio usando el electrodo de pasta de carbono. Señal de fondo obtenida en una disolución reguladora 0.02 mol l^{-1} de fosfato a pH 7.0 (línea punteada); concentración de $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ para cada herbicida en una disolución reguladora 0.02 mol l^{-1} de fosfato a pH 7.0 (línea continua). Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} . Potencial inicial: -200 mV . Potencial final: 1300 mV .

El trabajo desarrollado en este apartado de puesta a punto del método CE, comienza con los estudios de M. Barroso *y col.*⁴⁸, que usaban una mezcla de tetraborato sódico 0.004 mol l^{-1} , fosfato ácido de potasio 0.012 mol l^{-1} y 0.030 mol l^{-1} de SDS a pH 7.0 para la separación de fenilureas mediante CE-UV.

El potencial aplicado para la separación fue de 30 kV , resultando una corriente de aproximadamente $30 \text{ } \mu\text{A}$. Sin embargo bajo estas condiciones

[48] M.B. Barroso, L.N. Konda, G. Morovjan, J. High Resol. Chromatogr., 22 (1999) 171.

experimentales, no se obtuvo una buena separación, y la resolución de los picos fue muy pobre.

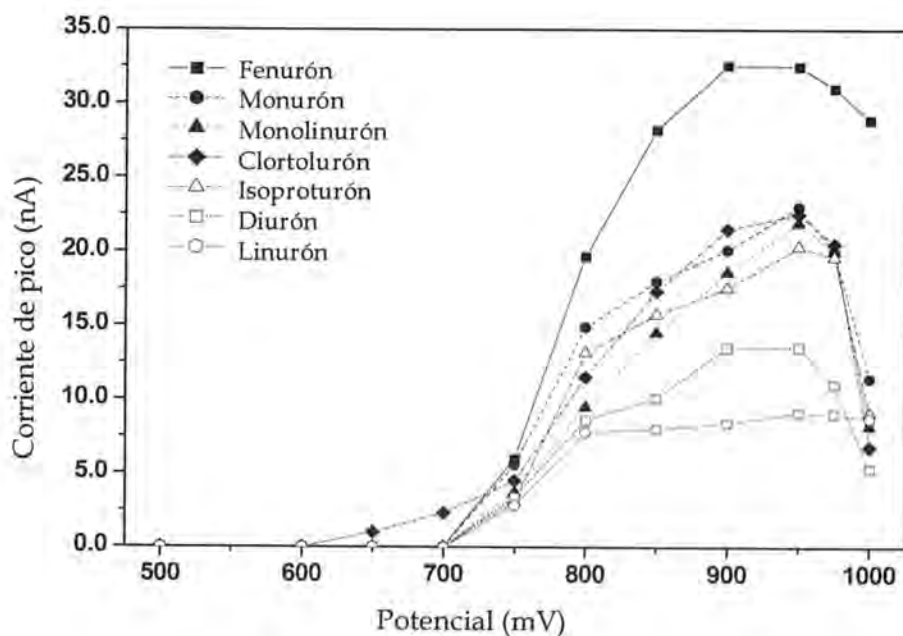


Figura V.3. Voltamperogramas hidrodinámicos para las fenilureas ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) obtenidos mediante MEKC. Columna capilar de sílice fundida de $75 \mu\text{m}$ i.d. x 100 cm de longitud; electrodo de trabajo: $500 \mu\text{m}$ de diámetro del electrodo de pasta de carbono. Disolución reguladora de separación: 0.02 mol l^{-1} fosfato a pH 7.0 y 0.025 mol l^{-1} SDS. Voltaje de separación 20.0 kV . Inyección hidrodinámica de 1.5 s .

Para obtener una separación eficiente de las fenilureas, se ensayaron diferentes disoluciones reguladoras, con ausencia de tetraborato sódico y a diferentes concentraciones de fosfato (concentraciones entre 0.005 a 0.050 mol l^{-1}). La separación total de las fenilureas se consiguió sólo cuando la concentración de disolución reguladora de fosfato fue mayor de 0.020 mol l^{-1} .

Posteriormente se llevaron a cabo estudios similares para la concentración de SDS, obteniendo la mejor separación cuando la concentración de SDS era mayor de 0.020 mol l^{-1} . Por tanto, una mezcla de 0.020 mol l^{-1} fosfato ácido de potasio y 0.020 mol l^{-1} SDS ajustado a pH 7.0 fue la composición óptima encontrada como disolución reguladora de separación para estos compuestos.

Después de estos experimentos, los estudios del voltaje aplicado más apropiado para la separación reveló que la resolución mejoraba con una disminución del voltaje, así se seleccionó un voltaje de 18 kV (corriente 34 μ A) para los estudios posteriores para evitar el posible efecto Joule por calentamiento y permitía que el tiempo de análisis fuese no muy largo, cercano a 30 min.

En este punto de la investigación es importante destacar la dificultad en la separación del isoproturón y la atrazina. Estos herbicidas aparecen con el mismo tiempo de migración y su detección por UV fue imposible. Sin embargo usando la detección electroquímica es posible el análisis del isoproturon, ya que la atrazina no es electroactiva.

Se eligió la inyección hidrodinámica para introducir las muestras de patrones de herbicidas y las muestras de agua dentro del capilar. La disolución madre de los herbicidas se preparó en metanol aunque posteriormente se estudió el efecto de la composición de la muestra con inyección hidrodinámica. Diferentes alícuotas de los herbicidas se mezclaron con agua para obtener la misma concentración de herbicidas y diferentes proporciones de metanol/agua, entre 0.5 y 25 % (v/v). La variación de la resolución para los herbicidas y la detección electroquímica fue crítica cuando la proporción de metanol fue más alta del 20%. El tiempo de migración fue casi constante para fenurón, monurón, monolinurón, simazina y clorotolurón, pero muy diferente en el caso de isoproturón, atrazina, diurón y linurón. También el área de pico disminuyó considerablemente cuando aumentó la proporción de metanol. La pérdida de resolución observada puede ser debida a la gran difusión longitudinal de la muestra en el capilar, debido a las diferentes propiedades termofísicas de la muestra y el contenido de SDS en la disolución de separación, llevando a cabo un ensanchamiento del tamaño de la muestra inyectada. Además, la presencia de metanol afecta a la formación micelar la cual tiene naturalmente consecuencias para la separación final.

El volumen de la inyección hidrodinámica fue optimizado con respecto a la altura de pico y área de pico a dos niveles diferentes de concentración (5.0×10^{-5} y 1.0×10^{-4} mol l⁻¹) conteniendo un 18% (v/v) metanol-agua. En algunos casos, el

área de pico fue lineal con volúmenes de inyección sobre 75 nl y la resolución se mantuvo, la respuesta en la altura de pico no aumentó y los picos llegan a ser más anchos con una disminución en el número de platos teóricos. Un volumen de 50 nl (1.0 segundo de inyección) proporcionó los mejores resultados a las concentraciones de herbicidas estudiados. En cambio, la detección electroquímica presentó una menor señal de fondo que la detección UV, por lo tanto se espera que los límites de detección para la detección electroquímica sean más bajos que los límites de detección cuando se utiliza la detección UV.

La Figura V.4 muestra la separación electroforética de los nueve herbicidas con ambos sistemas de detección. Es muy importante destacar la diferencia en el tiempo de registro en ambos electroferogramas. En la detección UV, la longitud efectiva de la columna capilar es de 70 cm, mientras que la longitud efectiva en la detección electroquímica es la misma que la longitud total del capilar, 100 cm. Además, el electroferograma de la detección electroquímica muestra siete picos, correspondientes a los herbicidas tipo fenilureas mientras que en el electroferograma de la detección UV se pueden observar siete picos, correspondientes con las siete fenilureas y una s-triazina (isoproturón y atrazina aparecen con el mismo tiempo de migración).

Las curvas de calibrado en función del área de pico se prepararon con volúmenes de 50 nl y fueron usadas para cuantificar las siete fenilureas empleando sólo detección electroquímica. En la Tabla V.1 se muestran las ecuaciones de regresión, coeficientes de regresión y límites de detección para estos siete herbicidas. Cada punto fue presentado como la media de seis análisis. La respuesta del detector UV a 210 nm y la electroquímica a +950 mV fue lineal para la mayoría de los casos en el rango de concentración entre 1.4×10^{-5} y 3.0×10^{-4} mol l⁻¹.

Además, la linealidad se mantuvo aún a altas concentraciones pero no se consideró de uso práctico teniendo en cuenta que los niveles de concentración para estos compuestos en muestras de agua medioambientales son muy bajos.

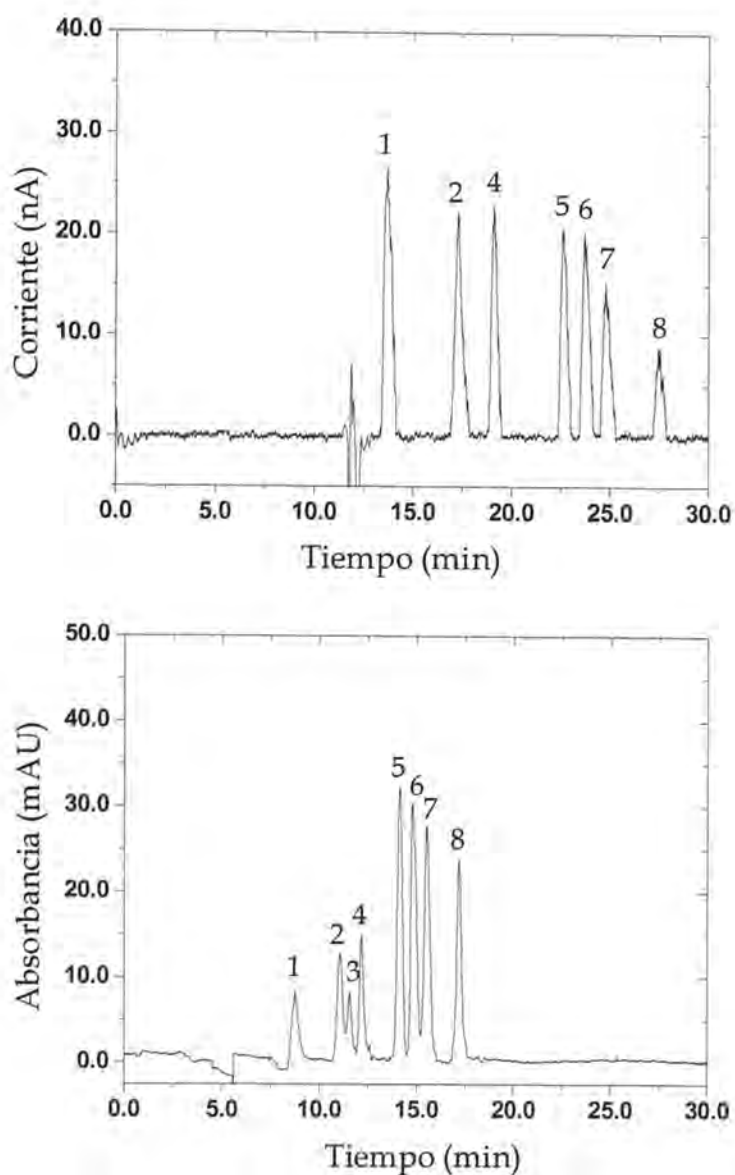


Figura V.4. Electroferogramas para 7.0×10^{-5} mol l^{-1} de fenurón (1), monourón (2), monolinurón (4), clortolurón (5), isoproturón (6), diurón (7) y linurón (8), y para 2.0×10^{-4} mol l^{-1} de simazina (3) y atrazina (6) en agua purificada utilizando detección UV (A) y detección electroquímica (B) bajo condiciones óptimas. Condiciones: potencial del electrodo de trabajo +950 mV; detección UV a 210 nm; capilar i.d. 75 μ m, longitud efectiva: 70 cm detección UV y 100 cm para la detección electroquímica; disolución reguladora de separación 0.02 mol l^{-1} fosfato a pH 7.0 y 0.02 mol l^{-1} SDS; voltaje aplicado 18.0 kV. Otras condiciones como la Figura V.3.

Los límites de detección, calculados con una relación señal/ruido de 3 se muestran en la Tabla V.1. Indicar de nuevo que en el caso del isoproturón, la

detección UV y la cuantificación fue casi imposible, sólo la detección electroquímica puede ser utilizada para su cuantificación.

| Herbicida | Ecuación de regresión ^b | Coefficiente de correlación (n=10) | Límite de detección (mol l ⁻¹) | Rango lineal (mol l ⁻¹) |
|-------------|--|------------------------------------|--|---|
| Fenurón | $y = -0.1 \pm 0.3 + (6.5 \pm 0.4) \times 10^4 x$ | 0.998 | 3.80×10^{-6} | $1.4 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Monurón | $y = -0.5 \pm 0.1 + (5.1 \pm 0.1) \times 10^4 x$ | 0.9998 | 4.85×10^{-6} | $1.6 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Monolinurón | $y = +1.0 \pm 0.2 + (4.0 \pm 0.1) \times 10^4 x$ | 0.9990 | 6.10×10^{-6} | $2.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Clortolurón | $y = +0.1 \pm 0.3 + (4.2 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.998 | 5.64×10^{-6} | $1.9 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Isoproturón | $y = +0.6 \pm 0.4 + (4.4 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.997 | 5.57×10^{-6} | $1.8 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Diurón | $y = -0.1 \pm 0.5 + (3.8 \pm 0.3) \times 10^4 x$ | 0.996 | 6.59×10^{-6} | $2.1 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| Linurón | $y = +0.7 \pm 0.3 + (1.2 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.994 | 1.97×10^{-5} | $6.6 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |

- Potencial de trabajo 950 mV utilizando detección electroquímica
- Donde Y es el area de pico (nA min) y X es la concentración de los herbicidas (mol l⁻¹) respectivamente.
- Los límites de detección correspondientes a la concentración se dan para una relación señal/ruido de 3.

Tabla V.1. Resultados del análisis de regresión de las curvas de calibrado y límites de detección.

El tiempo de migración y la reproducibilidad en la respuesta de pico fueron evaluados a una concentración de 5.0×10^{-5} mol l⁻¹ para cada herbicida. Los valores de la desviación estándar relativa obtenidos estaban por debajo del 5.5% para las áreas de pico en la detección electroquímica, menores a 4.7% para las áreas de pico en la detección UV y menores del 1.1% para el tiempo de

migración. La alta reproducibilidad indica que este método es preciso, exacto y robusto.

3.2.3. *Aplicación y recuperación en muestras ambientales de agua.*

Bajo las condiciones óptimas, se demostró la aplicabilidad del método MEKC propuesto utilizando detección electroquímica, para la determinación de las fenilureas en muestras de agua del Río Alberche (Comunidad Autónoma de Madrid, España). Las muestras de agua fueron dopadas por adición de la cantidad apropiada de disolución estándar del herbicida al agua para proporcionar las concentraciones finales deseadas (1.0×10^{-7} a 4.0×10^{-7} mol l⁻¹). En todos los casos, una muestra del blanco fueron sometidas al mismo procedimiento.

Las muestras de agua se trataron utilizando la técnica de extracción en fase sólida para su preconcentración y purificación. Los cartuchos C18 se acondicionaron con 2 ml de metanol y 2 ml de agua destilada y cien mililitros de muestra de agua se hicieron pasar a través de los cartuchos C18. Bajo estas condiciones, las fenilureas son retenidas en el adsorbente. La recuperación de los herbicidas fue llevada a cabo con 2 ml de metanol. Los extractos se evaporaron hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno y posteriormente se diluyeron hasta un volumen final de 100 µl con metanol:agua (18:82); el mismo porcentaje de metanol:agua utilizado para las disoluciones madre de los herbicidas. Las muestras reconstituidas se prepararon por triplicado y se utilizaron microviales de muestra de 100 µl para introducir la muestra dentro del sistema CE.

Las muestras de agua fueron recolectadas de diferentes lugares a lo largo del Río Alberche. Todas las muestras fueron recolectadas siguiendo las recomendaciones de la EPA. El análisis de las muestras se llevó a cabo en las primeras 48 horas después de la recolección en el río.

La Figura V.5 muestra el electroferograma obtenido, con detección electroquímica, para una muestra de agua de río y la misma muestra fortificada con los herbicidas estudiados a un nivel de concentración de 3.0×10^{-7} mol l⁻¹.

Los porcentajes de recuperación se encuentran en el rango de 85 a 102 % para todos los herbicidas utilizando la detección electroquímica. La desviación estándar relativa para las muestras fortificadas a un nivel de concentración de 1.0×10^{-7} mol l^{-1} fueron de 5.6%

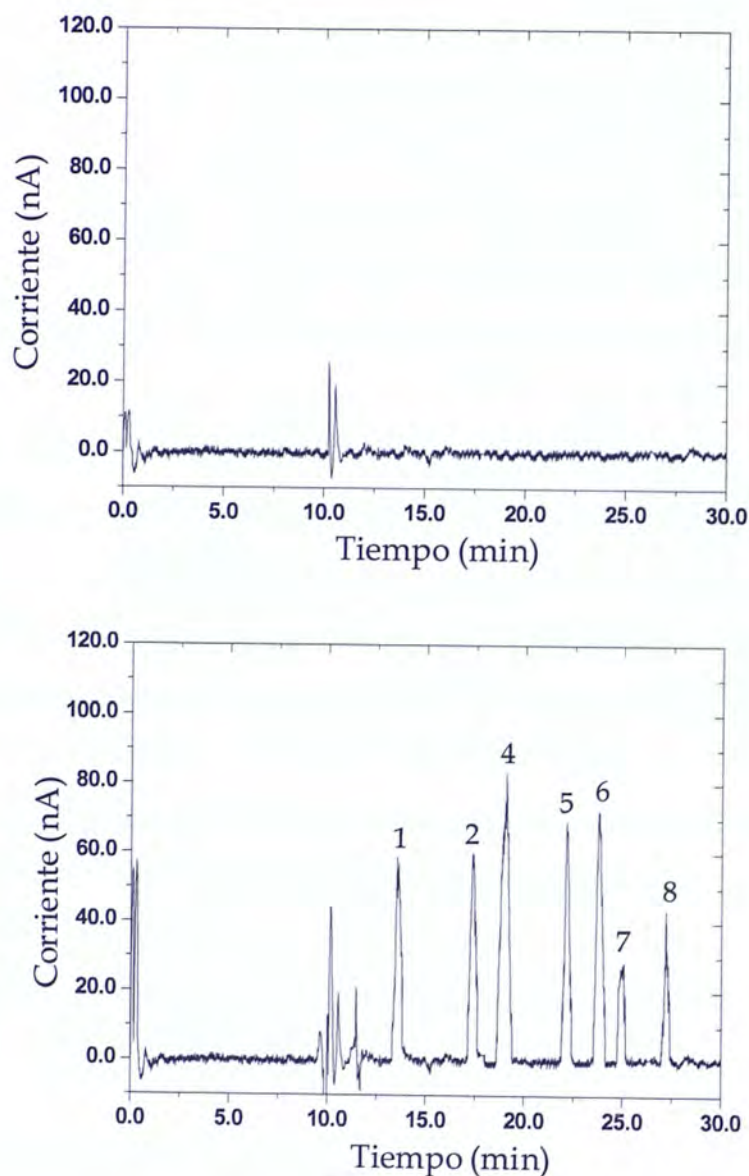


Figura V.5. Electroferogramas de muestras de agua del Río Alberche. (A) Muestras de agua de río utilizando un detector amperométrico: a) Blanco, b) muestra fortificada a una concentración de 3.0×10^{-7} mol l^{-1} . Resto de condiciones instrumentales como en la Figura V.4.

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

En esta investigación se han puesto de manifiesto las ventajas y dificultades del acoplamiento entre CE y el sistema de detección amperométrico para el análisis de fenilureas y triazinas en aguas y por ello se ha diseñado el equipo no comercial que se muestra en la Figura V.6.



Figura V.6. Imagen del equipo CE-UV-ED

Se ha utilizado la detección dual de los analitos en estudio mediante detección espectrofotométrica y electroquímica. La detección UV-Vis se realizó de manera usual, on-column, mientras la detección amperométrica se realizó en la configuración de end-column. Gracias a la combinación de ambas detecciones el método presenta una buena versatilidad y selectividad, pudiendo analizar compuestos electroactivos y no electroactivos al mismo tiempo.

La determinación de las siete fenilureas estudiadas se realizó bajo las mejores condiciones de separación y detección llegando a obtener unos límites de detección para todos los herbicidas cercanos a $5 \cdot 10^{-6}$ M mediante detección electroquímica.

Para obtener la mejor relación señal/ruido para la determinación electroquímica, se han ensayado diferentes disoluciones reguladoras y concentraciones en la célula de detección ya que en el proceso de separación se produce un envenenamiento de la célula electroquímica con algunas disoluciones reguladoras. Por otra parte, se observó que una sustitución de la disolución reguladora cada seis análisis da lugar a la mejor relación señal/ruido y se obtuvo la mejor sensibilidad posible.

Como ventaja interesante de la detección amperométrica se puede destacar su posibilidad de combinación con los métodos ópticos convencionales; en este caso ha sido combinado con la detección UV-Visible. Esta combinación permitiría ampliar la cantidad de sustancias detectables y mejorar la sensibilidad y selectividad de las determinaciones.

Para poder utilizar la detección UV-Visible de manera simultánea, es necesario emplear columnas capilares de diámetro interno mayor de 50 μm , pero cuando se utiliza la detección amperométrica con este tipo de capilares, es necesario aislar la célula de detección del circuito de alto voltaje responsable de la separación, para que éste no interfiera sobre la señal. Para resolver este problema es necesaria la incorporación de un "decoupler" a la salida de la columna capilar. Los procedimientos de fabricación más habituales y sencillos de estos "decoupler" consisten en realizar una rotura en el capilar de entre 1.5 y 2.0 cm al final, a partir de la cual el campo eléctrico deja de tener efecto. Esta rotura puede ser protegida por un material conductor que permita el contacto eléctrico con el interior del capilar e impida que se pierda parte de la disolución de separación. Se han empleado para ello diversos materiales como vidrio poroso, acetato de celulosa, nafión, grafito poroso o paladio con fracturas libres o fabricados mediante el ataque con ácido fluorhídrico a la pared del capilar hasta hacerla conductora.

Para la elección del procedimiento adecuado se ha tenido en cuenta que el dispositivo diseñado requiere la fijación de la posición de la columna capilar en las cercanías de la fractura. Por tanto, es necesario que el "decoupler" sea resistente a las tensiones derivadas de este proceso y al posterior acoplamiento

del sistema al equipo. Por este motivo se descartaron los procedimientos de fractura libre, ataque con ácido fluorhídrico, vidrio poroso y grafito poroso. Así mismo, para el funcionamiento del "decoupler" de paladio es necesario que éste actúe como electrodo en la separación electroforética, lo cual supondría modificar el diseño del inyector del equipo comercial y, por ello, su uso no es aconsejable en este caso.

Como consecuencia de todo lo anterior, se eligió el empleo de un tubo de nafión pues el procedimiento de fabricación es barato, sencillo y, además, la flexibilidad de este polímero le permite soportar tensiones sin romperse.

Cuando se realiza la detección amperométrica empleando un "decoupler", éste debe estar emplazado en un compartimiento independiente mientras el tramo final del capilar debe penetrar en un segundo compartimiento donde están emplazados los electrodos y se realiza la correspondiente detección. La principal desventaja de la presencia del "decoupler" es que induce al ensanchamiento de la zona ocupada por cada analito. Esto es debido a que el avance de la disolución en el tramo posterior a la fractura se produce gracias al impulso del flujo electroosmótico creado a lo largo de la columna capilar y entre los puntos en que se aplica el voltaje de separación, perdiéndose por tanto parte de su perfil plano característico.

Para la fabricación del "decoupler" con nafión (Figura V.7), primero se elimina la capa de poliimida en una pequeña porción de la columna capilar situada a unos 2 cm de su extremo, seguidamente se protege la zona descubierta con un tubo de nafión de 1 cm de largo y, a continuación, el tubo se fija a la columna capilar mediante un pegamento de tipo epoxi, siguiendo las instrucciones del fabricante, y finalmente cuando la unión es firme, se realiza una ligera presión sobre la zona sin poliimida hasta que se fracture el capilar. Los dos fragmentos vuelven de inmediato a su posición original, quedando unidos por el tubo de nafion y el pegamento. De esta forma, el volumen muerto que queda en las fracturas es mínimo.

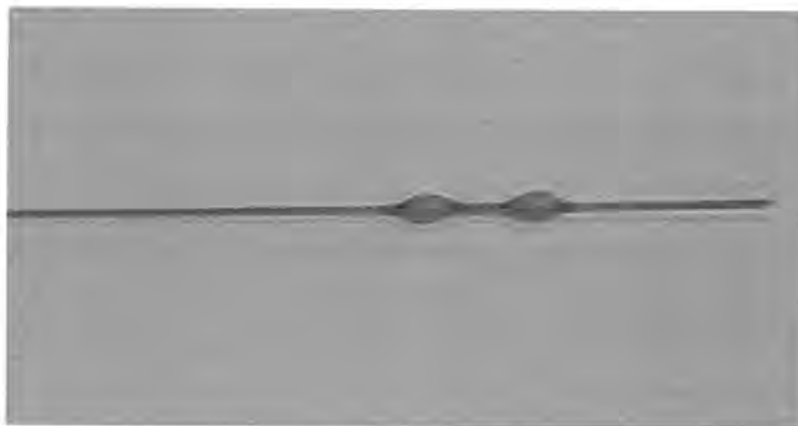


Figura V.7. Imagen de un "Decoupler"

En cuanto al diseño y la fabricación del sistema de detección electroquímico, en primer lugar hay que tener en cuenta si el equipo comercial tiene la posibilidad de introducir la muestra de forma hidrodinámica y la forma en que aplica la presión. En este caso, el equipo utilizado realiza esta operación aplicando una presión negativa en el vial destino, punto donde debe ser acoplado el sistema de detección. Por estas razones, el diseño del sistema de detección debe adaptarse a las características del equipo comercial para permitir el buen funcionamiento del sistema de vacío. Por tanto, el diseño del sistema de detección electroquímico consta de varias partes (Figura V.8), la primera de ellas (pieza A) es la responsable del acoplamiento de la célula de detección amperométrica y el equipo comercial de electroforesis capilar. Su función es actuar como vial destino, conteniendo el "decoupler", para que se pueda llevar a cabo el proceso electroforético responsable de la separación y servir, a su vez, como enlace entre el equipo y la célula. Esta pieza ha sido fabricada en metacrilato y sus dimensiones son similares a las de los viales destino proporcionados por el fabricante. En su parte superior presenta una posición roscada con las dimensiones apropiadas para su perfecto acoplamiento y fijación al inyector. Posee una entrada para la conexión del tubo de vacío de la célula de detección al punto de aplicación por parte del instrumento, así como un conducto para efectuar su llenado y vaciado de una manera sencilla

mediante una jeringa. Finalmente, en su parte inferior existe una posición roscada igual a la que se encuentra en el bloque de la célula de detección que permite que ambas piezas puedan ser unidas.

La segunda parte consta de dos bloques de metacrilato unidos con una junta de teflón. La pieza B presenta una posición roscada que permite su acoplamiento al vial destino de electroforesis capilar (pieza A). En su parte lateral están situados los conductos de llenado y vaciado a los cuales se fijan tubos de teflón para realizar estas operaciones de manera sencilla con ayuda de una jeringuilla. El conducto para la aplicación de vacío se ajusta mediante otro tubo de teflón al sistema de vacío del equipo de electroforesis. En la pieza C están fijados los electrodos de referencia (varilla de plata de 1.0 mm de diámetro) y auxiliar (varilla de platino de 1.0 mm de diámetro) mediante pegamento no conductor de cianoacrilato, formando un ángulo de 60° aproximadamente entre sí. Los diferentes electrodos de trabajo, en este caso el electrodo de pasta de carbono, pueden ser acoplados a la célula de detección utilizando la posición roscada con tornillos de tipo FIA que aligeran el tamaño de la celda.

En la Figura V.9 se muestra una imagen de la célula de detección en conjunto en y la Figura V.10 su adaptación al equipo de electroforesis capilar.

En cuanto al electrodo, la geometría más favorable en estas condiciones es el de forma de disco, pues permite efectuar tratamientos de limpieza y activación de forma más sencilla y pueden ser alineados con el final de la columna con mayor facilidad. Para el diseño propuesto es necesario adaptar los electrodos a tornillos para lograr su adecuada ubicación en la célula de detección.

Para la construcción del electrodo utilizado (Figura V.11), se usaron tubos de teflón de 1.6 mm de diámetro externo y 0.5 mm de diámetro interno. A continuación, el tubo se inserta en el tornillo tipo FIA, dejando expuesta una porción de 5 mm del extremo. Dado que el diámetro interno del tornillo coincide con el diámetro externo del tubo de teflón, la superficie del disco quedará alineada en el centro.

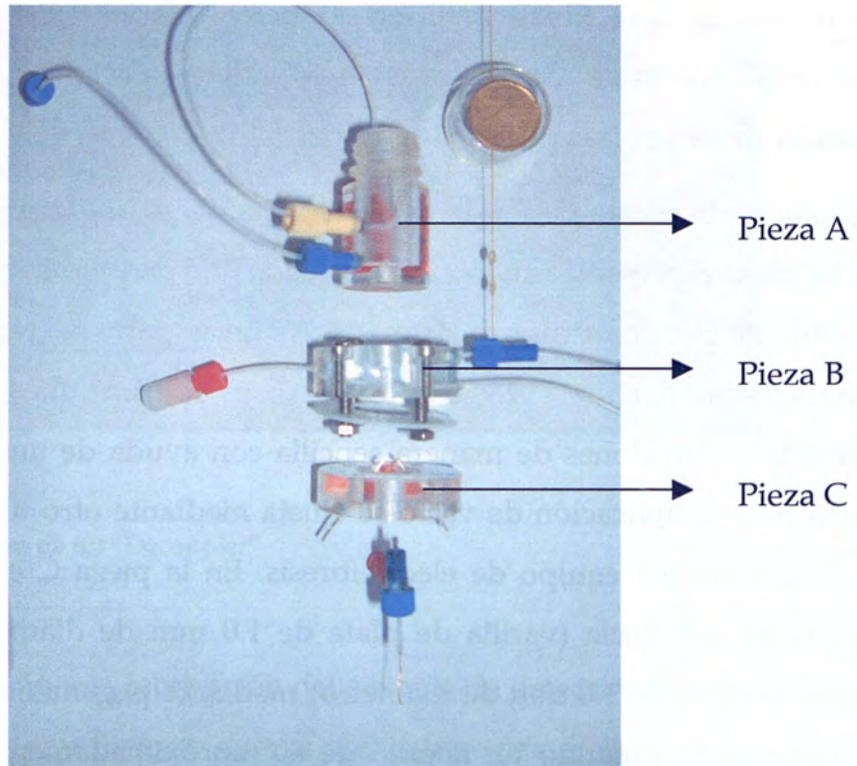


Figura V.8. Imagen del diseño de la célula de medida por piezas.

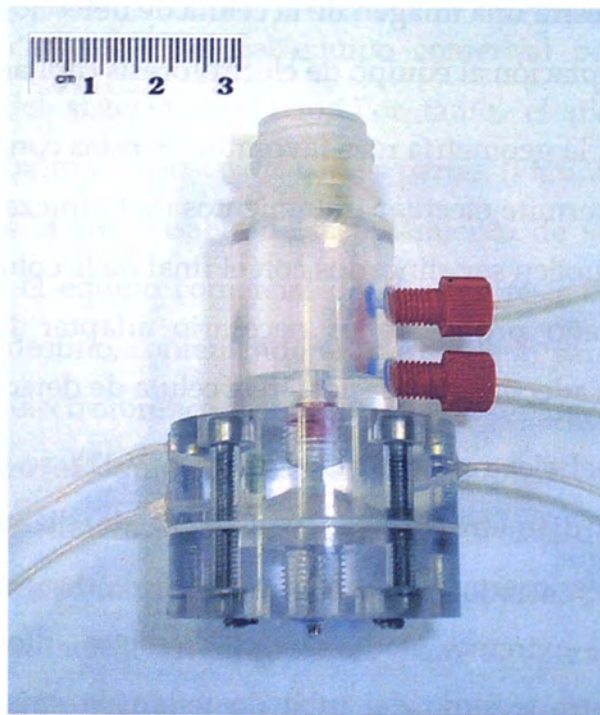


Figura V.9. Imagen del diseño de la célula de medida en conjunto.



Figura V.10. Imagen de la célula de medida adaptada al equipo de CE.

El tubo se fija al tornillo mediante imprimación poliolefínica y pegamento de cianoacrilato. Una vez fijado el tubo de teflón se llena con la pasta de carbono y se inserta un hilo de cobre para establecer el contacto eléctrico.

Finalmente se sella este contacto con pegamento de cianoacrilato. Antes de ser utilizado, la superficie del disco se debe pulir con una hoja de papel de pesar.

Dentro de las dificultades encontradas en este sistema de detección, a parte de aislarlo del alto voltaje requerido para la separación con la fabricación del “decoupler” es alinear, de manera fiable, el electrodo de trabajo con el final de la columna capilar, pues este proceso suele ser de gran complicación y afecta de manera importante a la sensibilidad y reproducibilidad de la señal medida, por lo que es necesario que el electrodo de trabajo esté situado lo más cerca posible de la salida de la columna capilar, pero sin llegar a obstruir dicha salida.

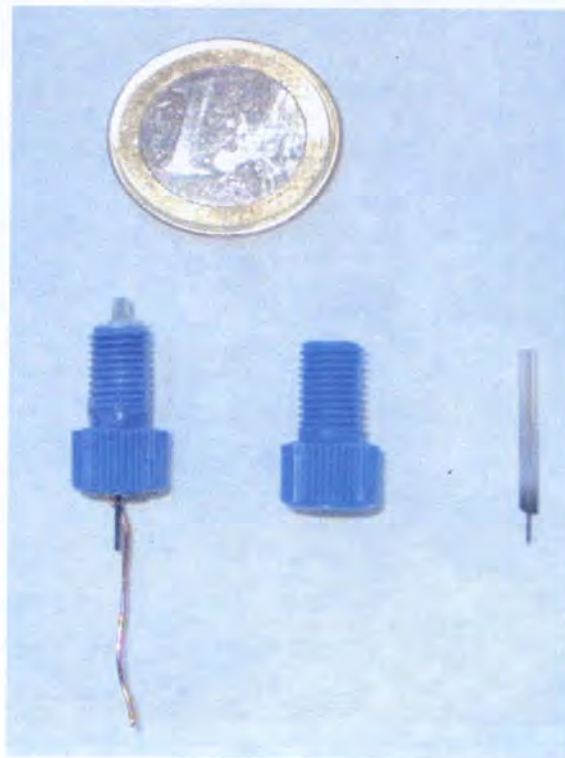
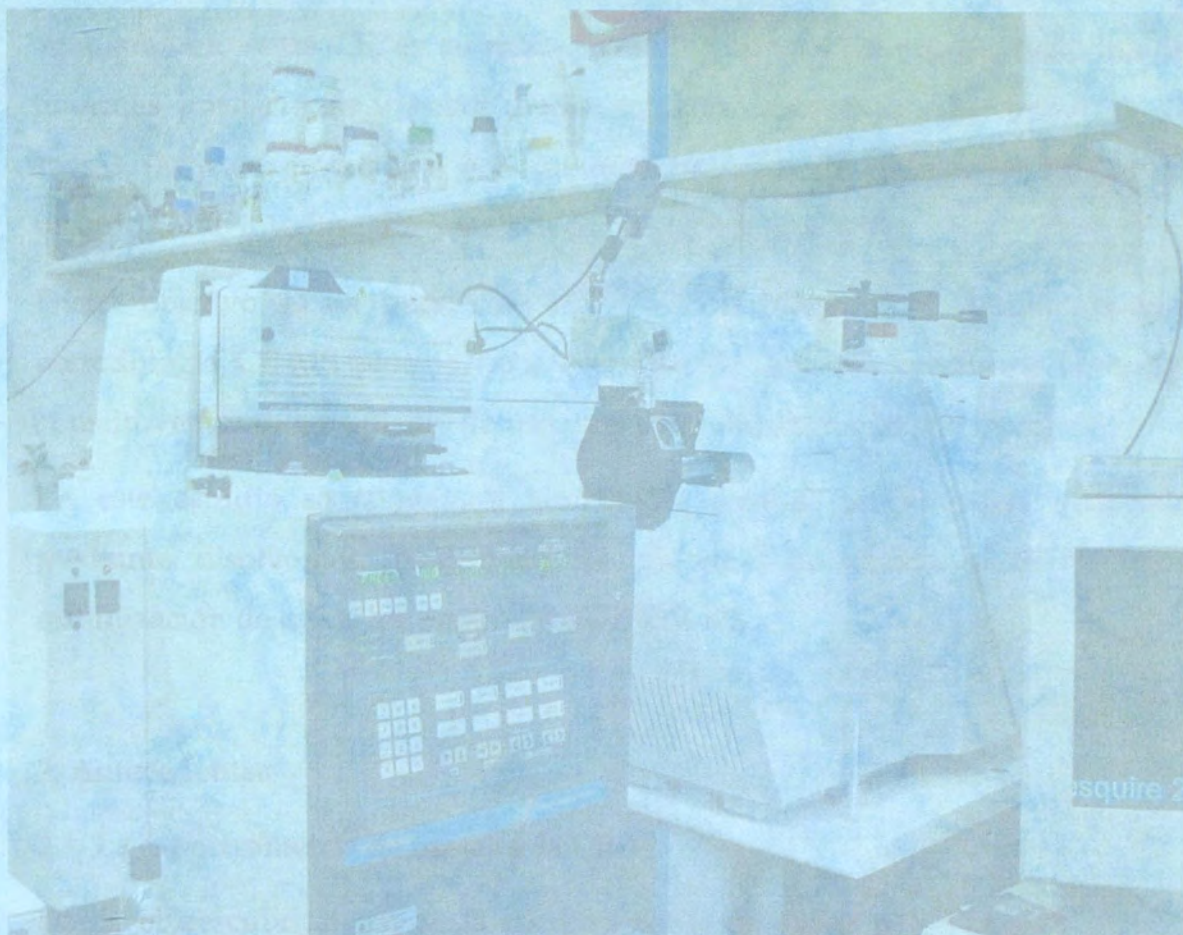


Figura V.11. Imagen del electrodo de trabajo utilizado.

Otra dificultad añadida para este tipo de detección a nivel experimental, es la necesidad de la presencia en el medio del tensoactivo dodecil sulfato sódico (SDS) para que sea posible la separación de los analitos en estudio. Aunque la célula de detección es independiente de los viales fuente y destino en la separación, era necesario la presencia de la misma disolución reguladora de separación en la célula de detección, ya que se llegó a comprobar que afectaba en gran medida al ruido y a la señal obtenida utilizando una disolución reguladora diferente al de separación. Por ello se optó por utilizar la misma disolución reguladora que en la separación en la célula de medida. Debido a esto, se comprobó que la presencia de SDS en la superficie del electrodo iba a afectar en cierta medida a la eficacia y a la sensibilidad de la detección cuando transcurría el tiempo de análisis, y esto puede ser debido a que las colas hidrófobas de las micelas se podrían ir adheriendo a la superficie del electrodo, ya que la preparación de la pasta de carbono es una mezcla de grafito con aceite

mineral en una proporción de 70:30, con lo cual ese aceite mineral puede ser el responsable, junto con las colas hidrófobas del SDS, de ir inutilizando con el paso del tiempo la superficie del electrodo de trabajo. Como consecuencia de ello se observa una disminución, en cuanto a la sensibilidad del análisis a lo largo del tiempo, además de que este tensoactivo empleado a altas concentraciones afecta, en gran medida, a la señal electroquímica ya que hace aumentar la corriente en la separación y esta corriente es otro parámetro importante a tener en cuenta para este tipo de detección, ya que altas corrientes pueden influir también en la señal electroquímica.

A pesar de las dificultades anteriormente comentadas, este sistema de detección sería una opción interesante para el futuro acoplamiento con CE principalmente debido a la selectividad, sensibilidad y bajo coste.



CAPÍTULO VI

Caracterización de extractos de romero mediante electroforesis capilar en zona con detección por espectrometría de masas.

La investigación desarrollada en este capítulo VI se efectuaron en los laboratorios del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC y han dado lugar a un trabajo que ha sido enviado a la revista "Journal of Chromatography A" (ver anexo VI)

1. Objetivo

El objetivo perseguido en este último capítulo ha sido implementar el acoplamiento entre CE, en su modalidad CZE con un sistema de detección de enormes prestaciones y posibilidades actuales como es la espectrometría de masas (MS) concretamente con un espectrómetro de trampa de iones (IT) usando como interfase una ionización con electrospray (ESI).

Dicho objetivo se ha puesto de manifiesto mediante el desarrollo de una metodología CE-MS para la caracterización de distintos productos naturales constituyentes de una planta de uso muy extendido como es el romero.

En este estudio se combinará también la técnica de extracción acelerada mediante disolventes (ASE) para las muestras de romero y la posterior optimización de todos los parámetros CE-ESI-MS.

2. Antecedentes

2.1. La espectrometría de masas y la CE

Desde el descubrimiento de la espectrometría de masas por Joseph Thomson (1856-1940), quien demostró experimentalmente la existencia del electrón al conseguir mediante métodos de deflexión con campos eléctricos y magnéticos medir la relación carga/masa de dicha partícula, han sido muchas las utilizaciones de este tipo de equipos, pero sin duda la que más importancia ha tenido ha sido su acoplamiento a técnicas separativas.

En particular, el acoplamiento de la espectrometría de masas a la electroforesis capilar se consiguió por primera vez en 1987¹ y es sin duda, en los últimos años, cuando la espectrometría de masas está cobrando una importancia cada vez mayor como método de detección en CE²⁻⁶.

[1] J. A. Olivares, N. T. Nyugen, C. R. Yonker, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1230.

[2] J. F. Banks, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2255.

[3] G. A. Ross, *LC-GC Europe*, January 201 issue.

[4] R. D. Smith, J. H. Wahl, D. R. Goodlett, S. A. Hofstadler, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 574A.

[5] J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 667 (1995) A703.

[6] W. M. A. Niessen, U. R. Tjaden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr. A*, 3 (1993) A636.

El acoplamiento de la electroforesis capilar con la espectrometría de masas combina el alto poder de resolución, las altas eficacias, rapidez, amplio intervalo de aplicación y automatización proporcionadas por CE con la selectividad, la información estructural y sensibilidad de la espectrometría de masas en un solo sistema dando como resultado una potente herramienta de análisis⁷.

2.1.1 Sistemas de ionización o interfases

Desde las primeras pruebas, a mitad de los años 80, y su primera representación en 1987¹, CE ha sido acoplada on-line a la MS mediante diferentes sistemas de ionización o interfases. Se pueden encontrar en la bibliografía artículos de CE-MS empleando sistemas de ionización específicos como pueden ser el plasma de acoplamiento inductivo (ICP)⁸⁻¹⁰, bombardeo de átomos rápidos de flujo continuo (CF-FAB)¹¹, ionización por electrospray o electronebulización (ESI)^{12,13,14}, ionización química a presión atmosférica (APCI)¹⁵, electrospray asistido neumáticamente o ISP (ión spray)¹⁶. En un gran número de trabajos se han desarrollado acoplamientos CE-MS *off-line* con otros sistemas de ionización como la desorción-ionización por láser (MALDI)¹⁷, aunque en los últimos años, se han desarrollado diversos mecanismos para llevar a cabo el acoplamiento

[7] J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 667.

[8] J.Z. Kang, T.C. Duan, J. Liu, X.J. Zeng, H.T. Chen, *Chin. J. Anal. Chem., Review*, 31 (2003) 1385.

[9] G. Álvarez-Llamas, M.D.F. de la Campa, A. Sanz-Medel, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 18 (2003) 460.

[10] J.E. Sonke, V.J.M. Salters *J. Anal. Atomic Spectrom.*, 19 (2004) 235.

[11] E.R. Verheij, U.R. Tjaden, W.M.A. Niessen, J. Van Der Greef, *J. Chromatogr. A*, 554 (1991) 339.

[12] Q.F. Liu, T. Inoue, J.R. Kirchoff, C.L. Huang, L.M.V. Tillekeratne, K. Olmstead, R.A. Hudson, *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 349.

[13] C. Simo, C. Elvira, N. González, J.S. Roman, C. Barbas, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2056.

[14] J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, F.J. García-Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis*, 25 (2004) 2065.

[15] Y. Tanaka, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2003) 1889.

[16] Y. Tanaka, Y. Kishimoto, S. Terabe, *Anal. Sci.*, 14 (1998) 383.

[17] T. Rejtar, P. Hu, P. Juhasz, J.M. Campbell, M.L. Vestal, J. Preisler, B.L. Karger, *J. Proteome Research*, 1 (2002) 171.

CE-MALDI-MS *on-line*^{18,19}. En la Figura VI.1 se muestra, de forma gráfica, una comparación entre los sistemas de ionización que han sido más utilizados en el acoplamiento CE-MS, en términos de polaridad y peso molecular de los analitos en estudio²⁰.

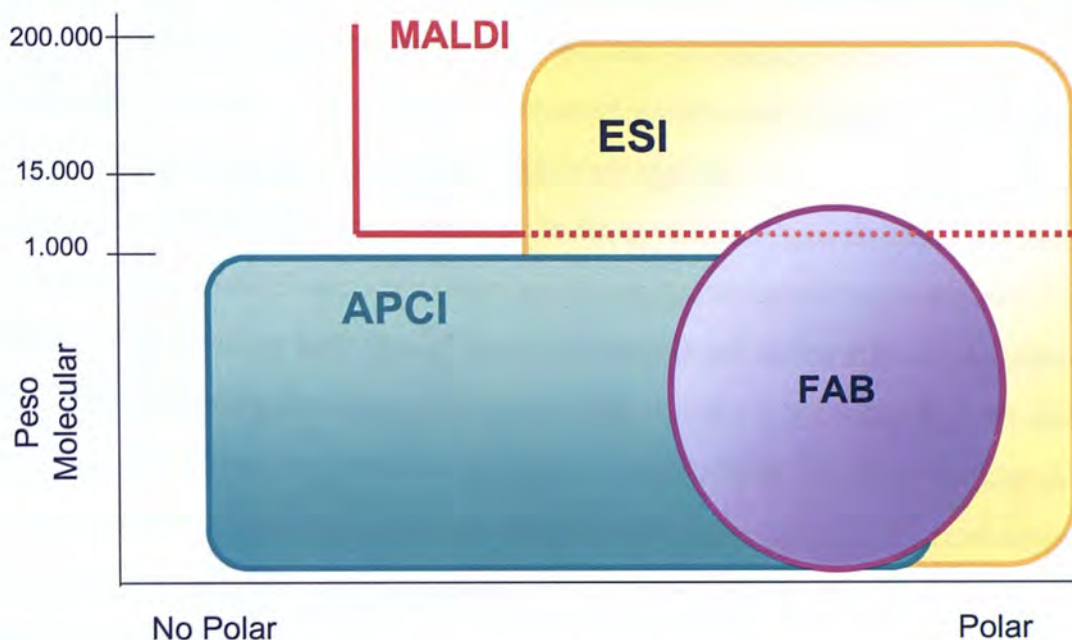


Figura VI.1. Gráfico comparativo de los sistemas de ionización más utilizados en el acoplamiento CE-MS²⁰.

2.1.1.1. Ionización por electrospray

Una característica crucial de la interfase entre CE y MS es resolver el problema que permita estabilizar la conexión eléctrica, que se utiliza para definir el gradiente del campo eléctrico a lo largo del capilar además de compatibilizar una técnica que trabaja con muestras en fase líquida como CE, con otra técnica que trabaja con muestras en estado gaseoso, como MS.

[18] M. Brivio, R.H. Fokkens, W. Verboom, D.N. Reinhoudt, N.R. Tas, M. Goedbloed, A. Van den Berg, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 3972.

[19] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, *Electrophoresis, Review*, 24 (2003) 3837.

[20] J. Hernández Borges, C. Simó, A. Cifuentes, *Cromatografía y técnicas Afines*, 24 (2003) 45.

En 1988 se implanta la ESI²¹ y se ha convertido en una de las técnicas más importantes para el análisis de biomoléculas tales como polipéptidos, proteínas y oligonucleótidos con pesos moleculares iguales o superiores a 200.000 daltons gracias a su capacidad de producir iones con cargas múltiples.²² En ocasiones, no se considera una técnica de ionización en sí, ya que no produce iones, sino la transferencia de éstos desde una fase líquida a una fase gaseosa; sin embargo, el electrospray tiene el potencial suficiente, principalmente a través de colisiones ión-molécula, para producir cambios en la naturaleza y cargas de los iones en fase gaseosa. Además este método ha empezado a tener aplicación en la caracterización de especies inorgánicas y polímeros de síntesis²³.

La ionización por electronebulización se realiza en condiciones atmosféricas de presión y temperatura. La ionización por ESI se basa en la técnica conocida como evaporación iónica. En presencia de un campo eléctrico provocado por la aplicación de una tensión de 3-6 kV entre el capilar de entrada y un contraelectrodo, la muestra emerge del capilar de entrada en forma de un aerosol de gotas muy pequeñas, el cual puede favorecerse con un gas auxiliar como helio o nitrógeno. Si este potencial es positivo, entrarán al equipo MS los iones negativos presentes en la disolución que salen del capilar de separación. Del mismo modo, si se aplica un potencial negativo, entrarán al sistema de masas los iones positivos. Estas gotas pequeñas adquieren una carga eléctrica muy elevada, y al pasar por la cámara de desolvatación van disminuyendo su tamaño debido a la evaporación del disolvente que se favorece mediante un flujo de gas "de secado" en la cámara de ionización y llega un momento en que su tamaño es tan pequeño que la repulsión entre cargas de igual signo en la superficie es tan grande que se superan las fuerzas de cohesión superficial y los iones escapan a la fase gaseosa. Al final del proceso se obtienen iones (monocargados o multicargados). Estos iones son dirigidos posteriormente hacia el analizador mediante la aplicación de vacíos crecientes, que van desde

[21] R.D. Smith, J.A. Olivares, N. T. Nguyen, H.R. Udseth, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 436.

[22] R. Bakhtiar, S. A. Hofstadler, R. D. Smith, *J. Chem. Educ.*, 73 (1996) A118.

[23] C. E. C. A. Hop, R. Bakhtiar, *J. Chem. Educ.*, 73 (1996) A162

presión atmosférica en la introducción de la muestra, hasta valores de vacío de 10^{-9} en la zona del analizador-detector^{24,25}.

El proceso de electronebulización tiene una característica muy interesante y útil, que es la pequeña fragmentación que se produce en biomoléculas grandes y térmicamente frágiles dando lugar a la formación de iones de carga múltiple²⁶. Una característica importante de la ionización por electronebulización es que se adaptan fácilmente a la introducción directa de una muestra de una columna de cromatografía líquida de alta resolución o de electroforesis capilar. Esta técnica de ionización es considerada como "blanda", ya que no produce apenas fragmentación y la mas importante información que aportan es el peso molecular del compuesto.

En la primera interfase ESI desarrollada, la conexión eléctrica se realizaba mediante una deposición o recubrimiento de un metal conductor al final del capilar¹. Con este caso era necesario seleccionar las condiciones electroforéticas que ocasionasen un flujo electroosmótico neto en la dirección del espectrómetro de masas siendo necesaria la presencia del flujo electroosmótico para completar el circuito eléctrico⁴. La parte metálica del final del capilar sirvió además para crear la diferencia de potencial necesaria para que se forme el electrospray entre el final del capilar y la entrada al espectrómetro de masas produciendo una diferencia de potencial entre 3-6 kV. Este tipo de interfase estaba limitada porque los flujos estaban por debajo de los óptimos empleados para el diseño del electrospray¹ además de frecuentes inestabilidades del spray. Era necesario por un lado, un alto porcentaje de medio acuoso, y por otro, una fuerza iónica adecuada en la disolución reguladora de separación. Además, el tiempo de vida de estos capilares estaba limitado a unos pocos días de operación, presumiblemente como resultado de procesos electroquímicos⁴.

[24] P. Kebarle, L. Tang, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 972A.

[25] R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Baringa, H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 882.

[26] L. Voress, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 481A.

Los problemas de esta interfase se mejoraron por la introducción del diseño "sheath flow"²⁷. La mejora se produjo introduciendo en el sistema diversas modificaciones que han dado lugar a nuevos modelos de interfase ESI para CE-MS como son, el coaxial con flujo adicional (*coaxial liquid sheath-flow interface*), sin flujo adicional (*sheathless interface*) y la de unión líquida (*liquid-junction interface*).

La interfase coaxial con flujo adicional "*coaxial liquid sheath-flow interface*" será comentada en la parte experimental y en las conclusiones ya que ha sido la utilizada para el acoplamiento entre CE y MS en la investigación presentada en este capítulo.

La interfase *sin flujo adicional "sheathless"* está basada en la primera interfase descrita por Olivares *y col.* en 1987¹, empleando para el cierre del circuito eléctrico un recubrimiento con un metal conductor^{19,28-30} (Figura VI.2). Otros dispositivos en cambio, permiten el cierre del circuito eléctrico mediante electrodos introducidos en la parte interna del capilar y situados en el extremo del mismo próximo al equipo MS (ver Figura VI.3)^{31,32}. En este tipo de interfase, a diferencia de la interfase coaxial con flujo adicional, no hay dilución de los analitos, ni hay durante la nebulización sustancias distintas al flujo procedente del capilar de separación, lo cual supone mayores eficacias en los procesos de ionización y desorción en el electrospray, que se traduce en una mejora considerable de la sensibilidad²⁰. Por el contrario el mayor problema de este tipo de diseños sin flujo adicional es su dependencia del flujo electroosmótico que se genera dentro del capilar y la menor estabilidad y, por tanto, robustez con respecto a las interfases comerciales del tipo "*coaxial liquid sheath-flow*" que son, hasta la fecha, las más empleadas en los laboratorios²⁰.

[27] R. D. Smith, C. J. Barinaga, H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1948.

[28] J. H. Wahl, D. C. Gale, R. D. Smith, *J. Chromatogr. A*, 659 (1994) 217.

[29] M. S. Kriger, K. D. Cook, R. S. Ramsey, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 385.

[30] K. P. Bateman, R. L. White, P. Thibault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (1997) 307.

[31] P. Cao, M. Moini, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 8 (1997) 561.

[32] L. Fan, R. Zang, E. R. Williams, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 3696.

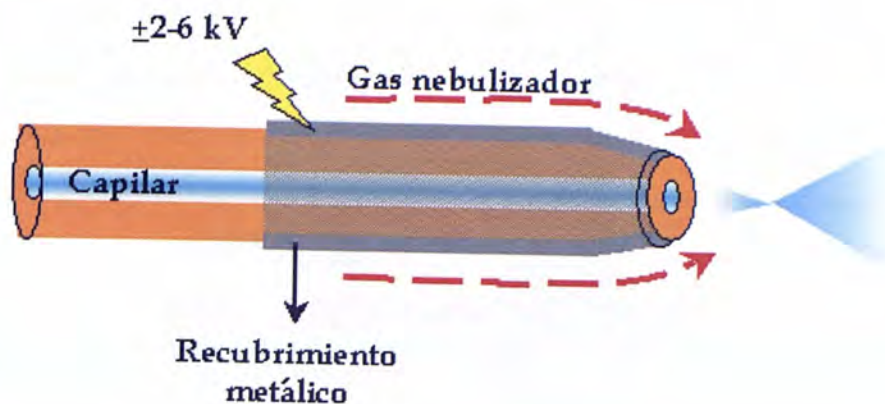


Figura VI.2. Representación esquemática de la conexión eléctrica mediante la interfase sin flujo adicional (“*sheathless*”) utilizando un capilar recubierto con un metal conductor.

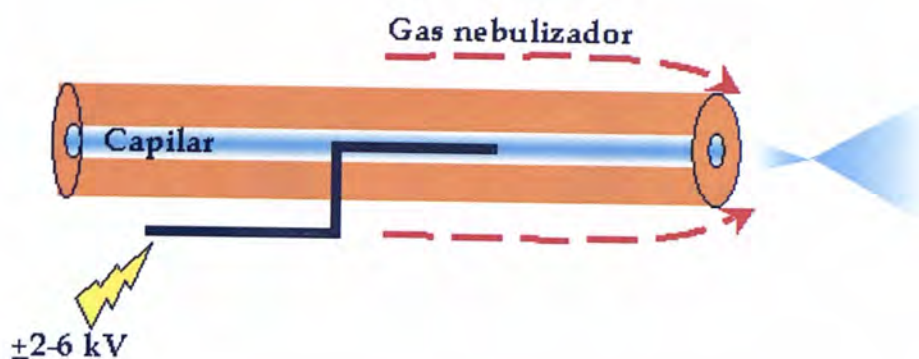


Figura VI.3. Representación esquemática de la conexión eléctrica mediante la interfase sin flujo adicional (“*sheathless*”) con el electrodo introducido en el interior del capilar.

Otra variación en la interfase de electroforesis capilar-espectrometría de masas es la interfase de *unión líquida* “*liquid-junction*” (Figura VI.4). Ésta es análoga al tipo *coaxial liquid sheath-flow* en algunos aspectos, pero difiere en la región de mezcla del líquido adicional necesario para realizar el contacto eléctrico con el capilar, mientras en el tipo *coaxial liquid sheath-flow* el líquido adicional se mezcla próximo al orificio del MS, en este tipo el líquido adicional se adiciona anterior al electroespray mediante una hendidura cercana a la parte final del capilar^{4,19}. Esta cavidad está conectada a un vial con disolución reguladora de

separación, que a su vez está en contacto con el electrodo que cierra el circuito eléctrico²⁰.

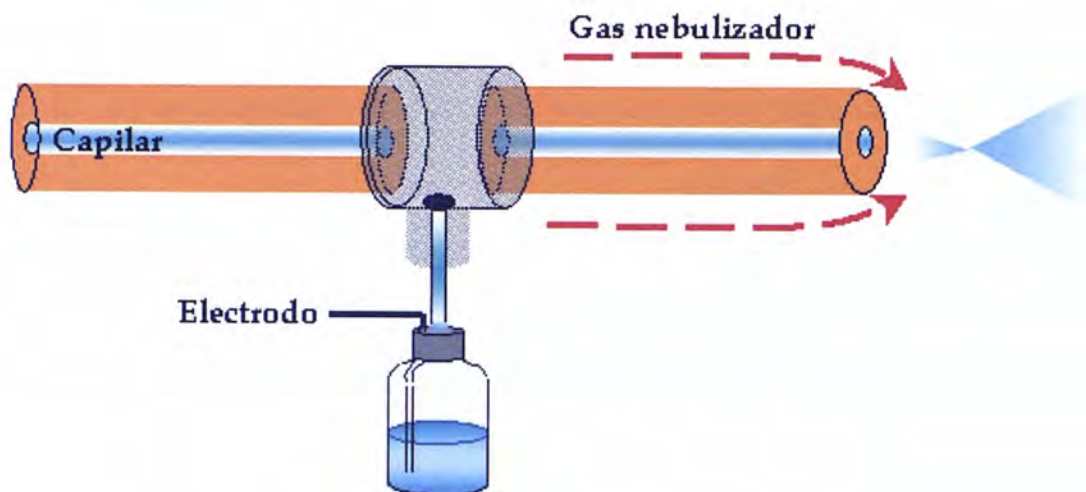


Figura VI.4. Representación esquemática de la conexión eléctrica mediante la interfase de unión líquida ("Liquid junction").

2.1.2. Analizadores

Los sistemas de ionización van acompañados de un analizador, que es la parte más importante del espectrómetro de masas y donde se realiza la detección de los diferentes iones formados. Los más utilizados son la trampa de iones (IT) analizadores de cuadrupolo (Q), sectores magnéticos (EBE), y el tiempo de vuelo (TOF).

El analizador de trampa de iones consiste fundamentalmente en un electrodo anular y dos electrodos laterales que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones, siendo los tres electrodos de geometría hiperbólica. Una vez que los iones se encuentran atrapados se puede llevar a cabo, en función del objetivo del análisis, tanto el análisis de las masas como el aislamiento de un ión precursor y la posterior fragmentación de este ión. Para llevar a cabo la determinación de todas las especies que entran o se forman en la trampa, se somete a los iones confinados a una rampa lineal de radiofrecuencia, RF, de modo que son expulsados progresivamente como resultado de

desestabilizaciones de la órbita que mantienen dentro de la trampa. Una vez estos iones pasan al detector, la señal se procesa y da lugar a un espectro de masas²⁰. La gran ventaja que presenta la trampa de iones es que una vez que se ha realizado la fragmentación del ión precursor, los fragmentos pueden volver a ser fragmentados (MS^n), lo que aporta una mayor información sobre la muestra que está siendo analizada.

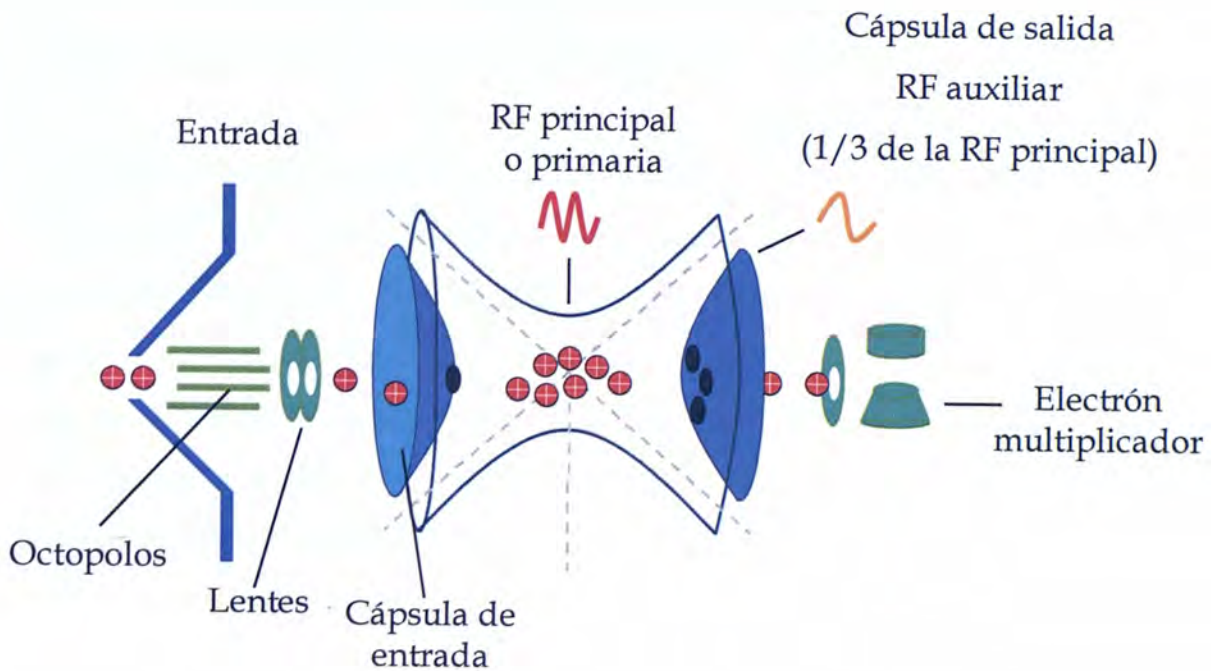


Figura VI.5. Representación esquemática del analizador trampa de iones

Los analizadores de cuadrupolo (Q) están formados por cuatro o seis barras de sección hiperbólica o cilíndrica que se encuentran situados a una distancia equidistante de un eje central. Entre cada pareja de barras opuestas se establecen voltajes variables de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) superpuestos. Dependiendo del valor de estos voltajes los iones con una determinada relación masa/carga alcanzarán el detector mientras que el resto

describirán trayectorias inestables desviándose fuera del conjunto de las barras²⁰.

También se han empleado otro tipo de analizadores denominados analizadores magnéticos (EBE) en estos, los iones son acelerados y dirigidos desde la fuente de ionización hacia el analizador aplicando un voltaje de aceleración. Un sistema de lentes electromagnéticas desvían los iones de su trayectoria en función de su masa y de su velocidad. El barrido de los iones con diferentes relaciones m/z se lleva a cabo variando el valor del campo magnético en función del tiempo. Los analizadores magnéticos de doble enfoque mejoran la resolución colocando antes o después del campo magnético un segundo analizador electrostático (EBE)²⁰.

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) separa los distintos iones basándose en la distinta velocidad que adquieren en el interior del analizador. En primer lugar, los iones son extraídos de la cámara de ionización y acelerados hacia el tubo de vuelo mediante un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. Los iones de mayor m/z "volarán" a menor velocidad que los de menor m/z . La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea la longitud del tubo (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente.

Además de estos analizadores se han utilizado sistemas más complejos formados por combinación de los anteriores como por ejemplo, FTIT, Q-TOF, TOF-TOF.

De todos estos analizadores hoy día, los más utilizados son los analizadores de trampa de iones, cuadrupolos y tiempo de vuelo. En la Tabla VI.1 se resumen las cualidades más importantes de cada uno de estos analizadores.

De todos éstos cabe decir que los Q e IT son compactos, sencillos y económicos, el analizador TOF presenta un gran intervalo lineal mientras que las principales desventajas que presenta EBE es su alto coste y su tamaño. Entre estos analizadores, los únicos que permiten hacer MS/MS son las trampas de iones,

unido a ésto y a la buena velocidad de barrido que presentan han hecho que estos analizadores sean los más empleados en los acoplamientos con CE a pesar de su desventaja en resolución y sensibilidad con respecto a los otros detectores.

| | Resolución | Sensibilidad | Rango de masas | Velocidad de barrido | MS/MS |
|-------|------------|--------------|----------------|----------------------|-------|
| MEJOR | EBE | TOF | TOF | TOF | |
| ↑ | TOF | EBE | EBE | IT | IT |
| | IT | IT | Q | Q | |
| PEOR | Q | Q | IT | EBE | |

Tabla VI.1. Características de los diferentes analizadores²⁰.

2.2. Análisis de compuestos funcionales en romero

Actualmente, el interés mayor hacia los alimentos naturales es cada vez mayor, debido a la demanda de compuestos funcionales como son los antioxidantes naturales que se ha elevado notablemente. Los antioxidantes naturales, son compuestos que tienen un origen no-sintético y pueden prevenir o retardar la oxidación. Son aplicados generalmente por el sector alimenticio no solamente debido a su utilidad en la preservación, sino también debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana. Entre los alimentos que contienen una gran cantidad de antioxidantes naturales, el romero resultó ser una de las especias con la actividad antioxidante más alta.

El romero es conocido también como Rosmarino y algunos autores lo llaman "el Ginseng de España" y de él se utilizan, sobre todo, las hojas y a veces las flores. Es una planta muy rica en principios activos cuya acción se ejerce sobre casi todos los órganos. Su contenido en aceite esencial (pineno, canfeno, cineol, borneol, alcanfor), le confiere una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además, es colerético, antiespasmódico y diurético. Posee también flavonoides (apigenina, luteolina, glucósidos de genkwanol), ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico), principios amargos (picrosalvia o carnosol). En uso externo es antineurálgico, antirreumático, cicatrizante y estimulante del cuero cabelludo. Está indicado en casos de agotamiento nervioso, astenia, convalecencias, alteraciones digestivas y hepáticas, reumatismo, gota, jaquecas, etc.

3. Experimental

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Analitos, reactivos y disoluciones

Las muestras de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) consistieron en hojas secas obtenidas de herbolario (Murcia, España), secadas usando un método tradicional descrito previamente³³. Las muestras fueron sometidas a condiciones criogénicas de dióxido de carbono y almacenadas (durante dos meses como máximo) en botes de topacio a -20°C.

Todos los reactivos químicos fueron de calidad para análisis y usados como fueron recibidos. El acetato amónico fue suministrado por Panreac (Barcelona) y el hidróxido amónico por Merck (Darmstadt, Alemania), ambos fueron usados en las disoluciones reguladoras para el desarrollo del método electroforético a diferentes concentraciones y pH. El etanol (calidad HPLC) y el hidróxido sódico fueron suministrados por Merck. La trietilamina (Sigma, St.

[33] E. Ibáñez, A. Oca, G. De Murga, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 1400.

Louis, MO) y el 2-propanol (calidad HPLC, Scharlau, Barcelona, Spain) se usaron en el flujo adicional.

Las disoluciones reguladoras fueron preparadas pesando acetato amónico para las concentraciones indicadas y añadiendo hidróxido amónico (0.5 M) para ajustar el pH. Estas disoluciones fueron almacenadas a 4 °C y dejadas a temperatura ambiente antes de su uso. El agua bidestilada fue desionizada mediante un sistema Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

3.1.2. Extracción acelerada mediante disolventes (ASE)

El agua de extracción subcrítica fue conseguida mediante un sistema de extracción acelerada con disolventes (ASE 200, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) equipado con un controlador de disolventes. Los extractos de romero fueron llevados a cabo a dos temperaturas 60 y 100 °C durante 25 minutos. Todas las extracciones se llevaron a cabo en células de 11 mL, conteniendo 2.0 g de muestra. El procedimiento de extracción fue como se describe en pasos a continuación: 1) la muestra fue alojada dentro de la célula, 2) la célula se llenó con agua y se aumentó la presión hasta 1500 psi, 3) se aplicó un tiempo de calentamiento, 4) se realizó una extracción estática en la cual las válvulas fueron cerradas, 5) la célula fue lavada en un 60% de volumen con agua, 6) el agua fue purgada de la célula con nitrógeno gaseoso y 7) se terminó con la despresurización del sistema. Posteriormente se llevó a cabo entre cada extracción un completo lavado del sistema. Los extractos obtenidos fueron inmediatamente protegidos de la luz y almacenados bajo refrigeración hasta secarlos. Para ello se empleó una "Freeze Dryer" (Unitop 400 SL, Virtis, Gardiner, NY, USA). Los extractos de agua subcrítica de romero fueron secados en condiciones criogénicas, luego 10 mg de cada extracto seco fueron disueltos en 1 ml de agua e inmediatamente inyectados en CE-MS sin previa purificación. El agua fue desoxigenada mediante burbujeo con He durante 15 minutos antes de ser usada como disolvente para extraer.

3.1.3. Condiciones de HPLC

Las muestras para ser analizadas mediante HPLC fueron preparadas disolviendo 10 mg de extracto seco de romero en 1 mL de agua bidestilada. La separación fue llevada a cabo siguiendo un método anteriormente publicado³⁴ usando un instrumento (HP 1090 Liquid Chromatograph, Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipado con un detector de batería de diodos y un automuestreador (volumen de inyección: 60 μ L). La columna fue Nova-Pack C18 (Waters, Madrid, España; 3.9 x 150 mm, 4 μ m tamaño de partícula). La fase móvil fue una mezcla de disolventes A (1 % ácido acético en agua) y B (1 % ácido acético en acetonitrilo) llevando a cabo un gradiente, cambiando desde el 50 % B a los 5 minutos hasta 70 % B a los 15 minutos y hasta un 100 % de B a los 40 minutos, a un flujo constante de 0.7 mL/min. La longitud de onda de detección fue 230 nm.

3.1.4. Electroforesis capilar

Los análisis fueron llevados a cabo mediante un equipo de CE (P/ACE 5500, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipado con un detector UV-Vis trabajando a 200 nm y acoplado con una interfase de electroespray ortogonal (electrospray interface, ESI) al detector MS. El equipo de CE fue controlado mediante un programa PC running System GOLD de Beckman. Se usó un sistema comercial coaxial de flujo adicional. El capilar hueco de sílice fue de 50 μ m de diámetro interno y suministrado por Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra). La longitud hasta la ventana del detector UV fue de 20 cm, y la longitud total (correspondiente a la longitud hasta la detección con MS) fue de 87 cm. Las inyecciones fueron hechas por el extremo anódico usando nitrógeno a presión a 0.5 psi durante 10 s (1 psi = 6894.76 Pa). Todas las separaciones fueron hechas a un voltaje de trabajo de 20 kV.

[34] E. Ibáñez, A. Kubátová, F.J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, B. Hawthorne, *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 375.

El acondicionamiento del capilar fue llevado a cabo mediante lavado con hidróxido sódico 0.1 M durante 1 min, con 2 min de agua y finalmente con 3 min de la disolución reguladora de separación. Antes del primer uso, los capilares fueron acondicionados usando 20 minutos de lavado con NaOH 0.1 M seguido de 10 min de agua. Al final del día los capilares fueron lavados con agua durante 10 min y con aire durante 5 min.

3.1.5. Espectrometría de masas

Los experimentos con MS se realizaron con un espectrómetro de masas con trampa de iones (Esquire 2000™, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) equipado con una interfase de electrospray ortogonal (model G1607A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El contacto eléctrico en la punta de la aguja del capilar se estableció a través de un líquido adicional compuesto por 2-propanol-agua (60:40, v/v) y 0.1% (v/v) de trietilamina a una velocidad de flujo de 0.24 mL/h mediante el bombeo con una jeringa (74900-00-05, Cole Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA). El espectrómetro de masas trabajó en el modo ión negativo. El espectrómetro barrió en el rango de 200-500 m/z a 13000 u/s durante la separación y la detección (centrada a un valor de 350 m/z). Los instrumentos se controlaron mediante un software PC running the Esquire NT de Bruker Daltonics.

3.2. Resultados y Discusión

3.2.1. Desarrollo de un método de CE-ESI-MS para el análisis de extractos de romero

Aunque existen dos procedimientos electroforéticos para la separación de compuestos del romero^{35,36}, estos métodos no son adecuados para CE-ESI-MS, ya que el primero de ellos usa una separación por MEKC con SDS y en el

[35] E. Ibáñez, A. Cifuentes, A.L. Crego, F.J. Señorans, S. Cavero, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4060.

[36] R. Sáenz-López, P. Fernández-Zurbano, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A*, 953 (2002) 251.

segundo aplica una disolución reguladora electroforética compuesta por tetraborato sódico, ambas sustancias incompatibles con ESI-MS. Además, estos dos métodos publicados trabajan con extractos de romero obtenidos utilizando CO₂ supercrítico o metanol, lo cual significa que la composición de los extractos es diferente de las fracciones obtenidas usando agua supercrítica. Esto se deduce teniendo en cuenta, el procedimiento diferente de extracción (extracción supercrítica, extracción directa y extracción subcrítica) y la diferente constante dieléctrica de los tres fluidos implicados (CO₂, metanol y agua, ver Tabla VI.2). Por lo tanto, se ha desarrollado un método CE-MS para extractos bajo estas consideraciones.

Inicialmente, se probaron diferentes disoluciones reguladoras compatibles con CE-ESI-MS usando acetato amónico a diferentes concentraciones y a altos valores de pH. Bajo condiciones básicas, los compuestos que se esperan que sean extraídos usando agua subcrítica (principalmente polifenoles) pueden adquirir alguna carga negativa, que podría favorecer su separación por CE. Se probaron concentraciones de acetato amónico de 10 a 100 mM y valores de pH desde 8 a 10.

| Disolvente | Constante dieléctrica | Temperatura (°C) | Presión (atm) |
|-----------------|-----------------------|------------------|---------------|
| Metanol | 32.6 | 25 | 1 |
| CO ₂ | 1.00 - 1.60 | 0 -100 | 1 |
| Agua | 58.5 | 100 | 100 |
| Agua | ~ 65.0 | 60 | 100 |

Tabla VI.2. Constante dieléctrica de los tres fluidos implicados en cada condiciones de extracción.

Un extracto de romero obtenido usando agua subcrítica a 100 °C se utilizó como muestra. Las mejores condiciones, en términos de eficiencia, resolución de pico y velocidad de análisis se obtuvieron con 40 mM de acetato amónico a pH 9.0, y estas condiciones fueron elegidas para la posterior optimización de los parámetros de ESI.

Repetidas veces ha sido demostrado que la optimización de los parámetros ESI juegan un importante papel en la obtención de una adecuada señal MS para algunos analitos. Para llevar a cabo la optimización en la detección de los compuestos extraídos de romero, se aplicó un método univariante usando como parámetro de optimización la suma de las intensidades de los picos de los cuatro compuestos mayoritarios extraídos del ASE a 100 °C. Así, inicialmente, se probaron cuatro tipos diferentes de líquidos como flujo adicional: 2-propanol/agua 60:40 (v/v), 2-propanol/agua 80:20 (v/v) y con y sin un 0.1 % (v/v) de trietilamina. Usando un líquido adicional de 80:20 con y sin trietilamina, la corriente cae frecuentemente indicando un pobre contacto eléctrico entre el CE y el circuito eléctrico ESI probablemente causado por el alto contenido orgánico de esta disolución. La disolución conteniendo una proporción de 60:40 de 2-propanol/agua proporcionó una alta estabilidad; además, la adición de un 0.1% (v/v) de trietilamina resultó dar una alta señal MS. Por lo tanto, la disolución 2-propanol/agua 60/40 (v/v) con 0.1% (v/v) de trietilamina fue seleccionada como líquido adicional.

Posteriormente, se optimizaron otros parámetros ESI-MS como son: temperatura del gas de secado (Figura VI.6.A) y flujo (Figura VI.6.C), presión del gas de nebulización (Figura VI.6.B), estabilidad del compuesto (Figura VI.6.D) y flujo del líquido adicional (Figura VI.6.E). Como se puede apreciar, la temperatura más alta a la cual el instrumento puede trabajar (350 °C) proporciona la mayor señal, y el óptimo para la presión del gas nebulizador se obtuvo a 2 psi (el mínimo requerido para obtener un espray estable).

El flujo óptimo del gas de secado se consiguió a 7 l/min. Este óptimo es debido por un lado al efecto sifón inducido por altas presiones (causando bajas

eficiencias y, por lo tanto, señales MS) y a la baja ionización conseguida a bajas presiones.

Se observó también que la estabilidad del compuesto jugó un importante papel para este tipo de compuestos. Así, a altos porcentajes (indicando un menor campo eléctrico dentro de la entrada del espectrómetro) el número de moléculas que son transferidas dentro del MS es demasiado baja, mientras a altos campos eléctricos algunos de los compuestos (principalmente el compuesto marcado como 4) llega a ser inestable, indicado por una disminución de sus intensidades de pico. Por lo tanto, el término medio se encontró empleando un porcentaje de estabilidad del compuesto del 50%.

El flujo óptimo del líquido adicional óptimo fue de 0.24 mL/h. Este efecto ya ha sido mencionado en la literatura ya que a flujos de líquido adicional bajos el campo de ionización se reduce debido a la inestabilidad del spray, mientras a altos flujos se produce una importante dilución de las bandas electroforéticas y la intensidad de la señal MS para estos compuestos es por tanto reducida.

En resumen, las condiciones CE-ESI-MS finalmente seleccionadas fueron: 40 mM acetato amónico / hidróxido amónico a pH 9, como disolución reguladora de separación; un líquido adicional formado por 2-propanol/agua 60:40 (v/v) y 0.1 % (v/v) trietilamina a una velocidad de flujo de 0.24 ml/h; una velocidad de flujo del gas de secado a 7 l/min y a 350 °C, presión del gas de nebulización de 2 psi; y por último los análisis MS se llevaron a cabo utilizando una estabilidad del compuesto del 50 %.

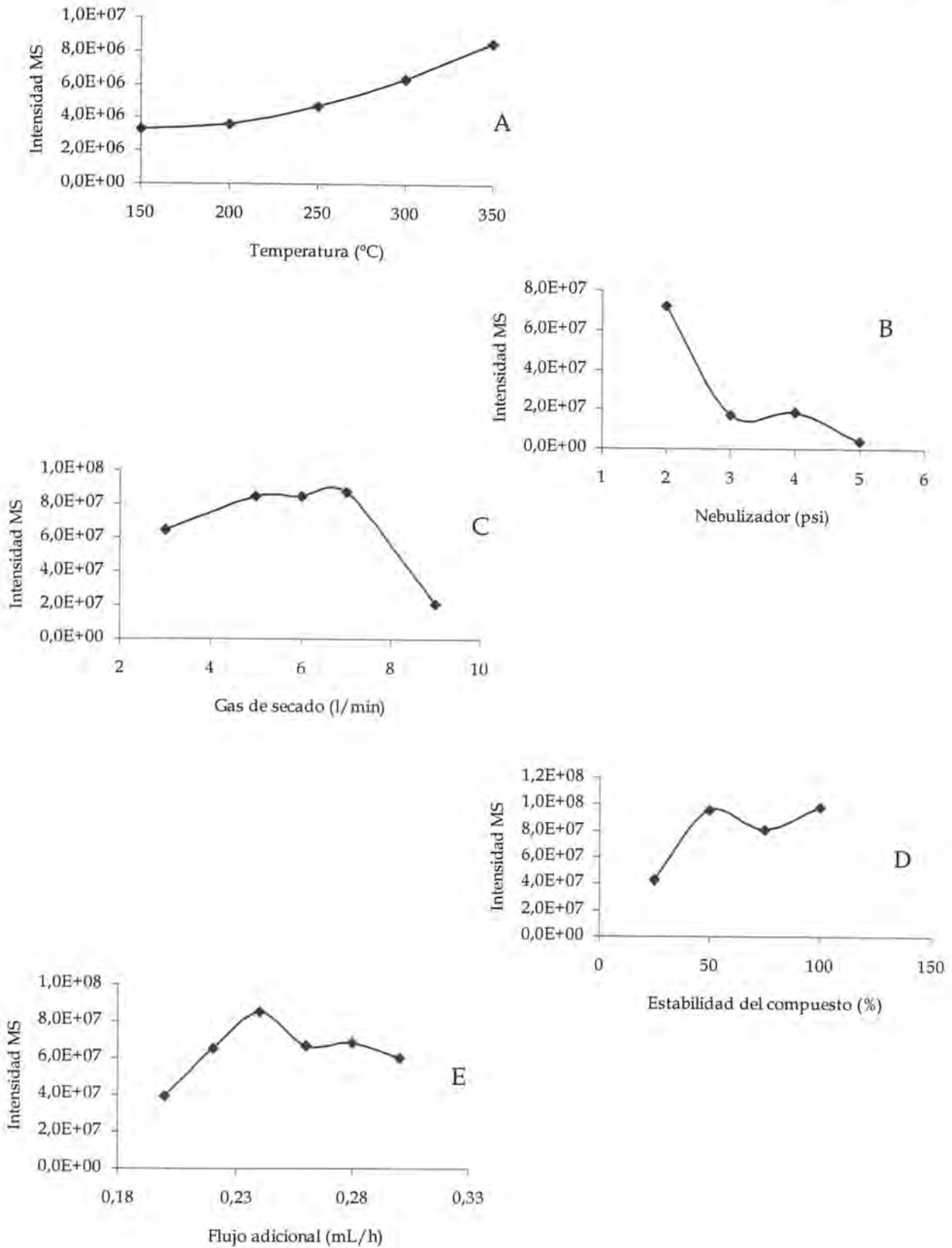


Figura VI.6. Optimización de los parámetros ESI-MS . (A) Temperatura del gas de secado, (B) Presión del gas de nebulización, (C) Flujo del gas de secado, (D) Estabilidad del compuesto, (E) Flujo adicional.

Bajo estas condiciones se obtuvieron separaciones CE-ESI-MS para estas fracciones-ASE de romero como las que se muestran en la Figura VI.7. La reproducibilidad de los análisis CE-ESI-MS, expresados por la DER% de cinco inyecciones consecutivas fue 1.04 % para el tiempo de análisis y 5.89 % para el área de pico.

3.2.2. Comparación entre CE-ESI-MS y HPLC-UV

Analizando la misma fracción de romero, el presente estudio se comparó con un procedimiento publicado anteriormente usando HPLC-UV³⁴. La Figura VI.7 muestra los resultados de ambos métodos. Puede verse que el cromatograma proporciona menos información, probablemente debido a la baja sensibilidad del HPLC por una parte, y quizás debido a la desfavorable alta polaridad de los compuestos involucrados, por otra. Se sabe que las fases reversas en HPLC no son adecuadas cuando se utilizan para analizar compuestos altamente polares porque no son retenidos y son eluidos con el volumen muerto, no separándose por este camino. El ácido carnósico, por ejemplo, el compuesto menos polar, tiene un tiempo de retención de unos 15 min bajo estas condiciones RP-HPLC (ver Figura VI.7.B), mientras el ácido rosmarínico - el compuesto más polar - eluye fácilmente. Por el contrario, el procedimiento CE-ESI-MS claramente se distinguen al menos seis compuestos diferentes (Figura VI.7.A). Además, la Figura VI.8. demuestra que es posible obtener espectros MS adecuados para todos los analitos.

A partir de estos resultados y los espectros de MS-MS grabados (no se muestran los datos), los picos 3 y 4 podrían ser inequívocamente identificados como ácido carnósico y rosmarínico. Además, basándose en la masa molecular medida, el pico 5 podría tentativamente ser asignado a la homoplantaginina ($[M-H]^- = 461.2$ m/z) y el pico 6 a la galocatequina ($[M-H]^- = 305.3$ m/z). Los otros dos compuestos (pico 1 y 2) no han podido ser identificados, aunque se han encontrado algunas estructuras posibles mediante experimentos de MS-MS.

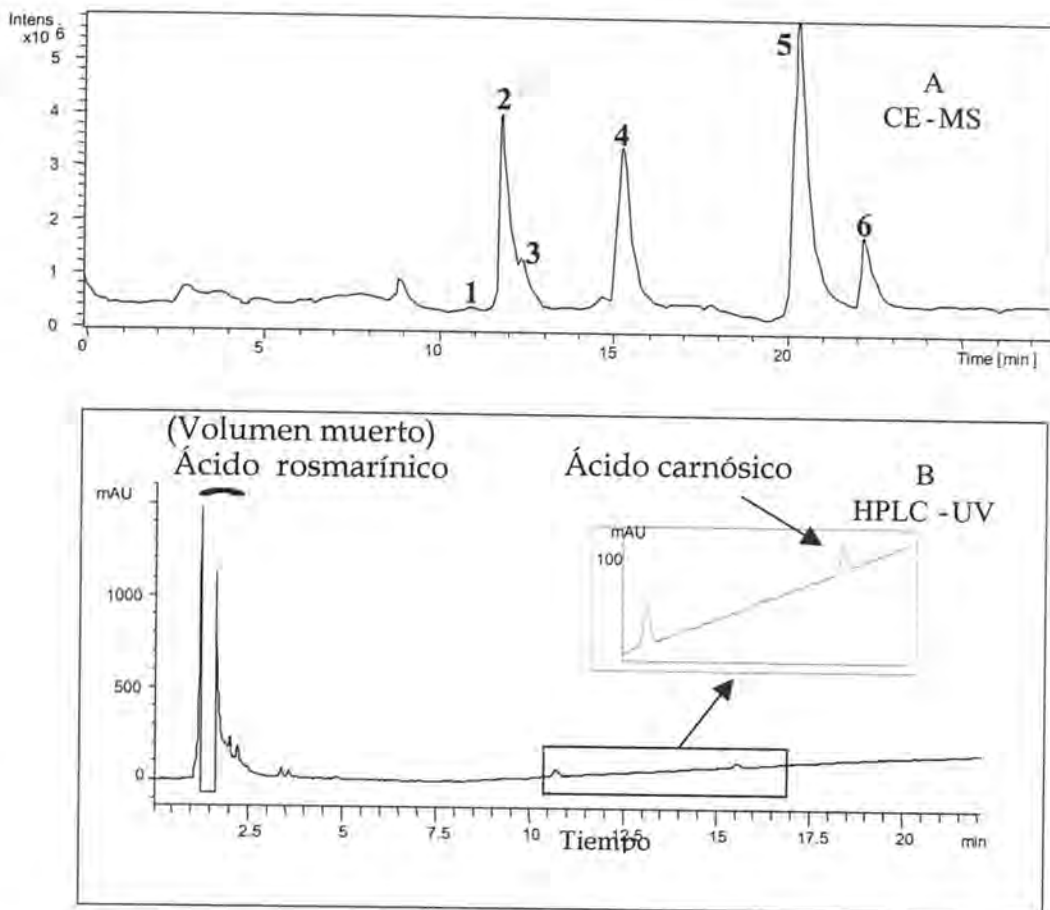


Figura VI.7. Comparación de HPLC-UV y CE-MS de un extracto de romero obtenido utilizando agua subcrítica a 100°C. Condiciones CE-MS: capilar de sílice fundida de 50 μm i.d., 87 cm de longitud total. Disolución reguladora de separación: 40 mM acetato amónico, ajustado a pH 9 con hidróxido amónico. Voltaje: 20 kV. Inyecciones: 10 s a 0.5 psi. Líquido adicional: 2-propanol/agua 60:40 (v/v) con 0.1 % (v/v) de trietilamina, velocidad de flujo 0.24 mL/h. Gas de secado: 7 L/min, 350 °C. Presión del gas de nebulización 2 psi. Los análisis de MS se llevaron a cabo utilizando polaridad negativa. Estabilidad del compuesto: 50 %. Barrido MS 200-500 m/z (centrada a un valor de 300 m/z). Muestra: Extracto de romero de concentración 10 mg/ml.

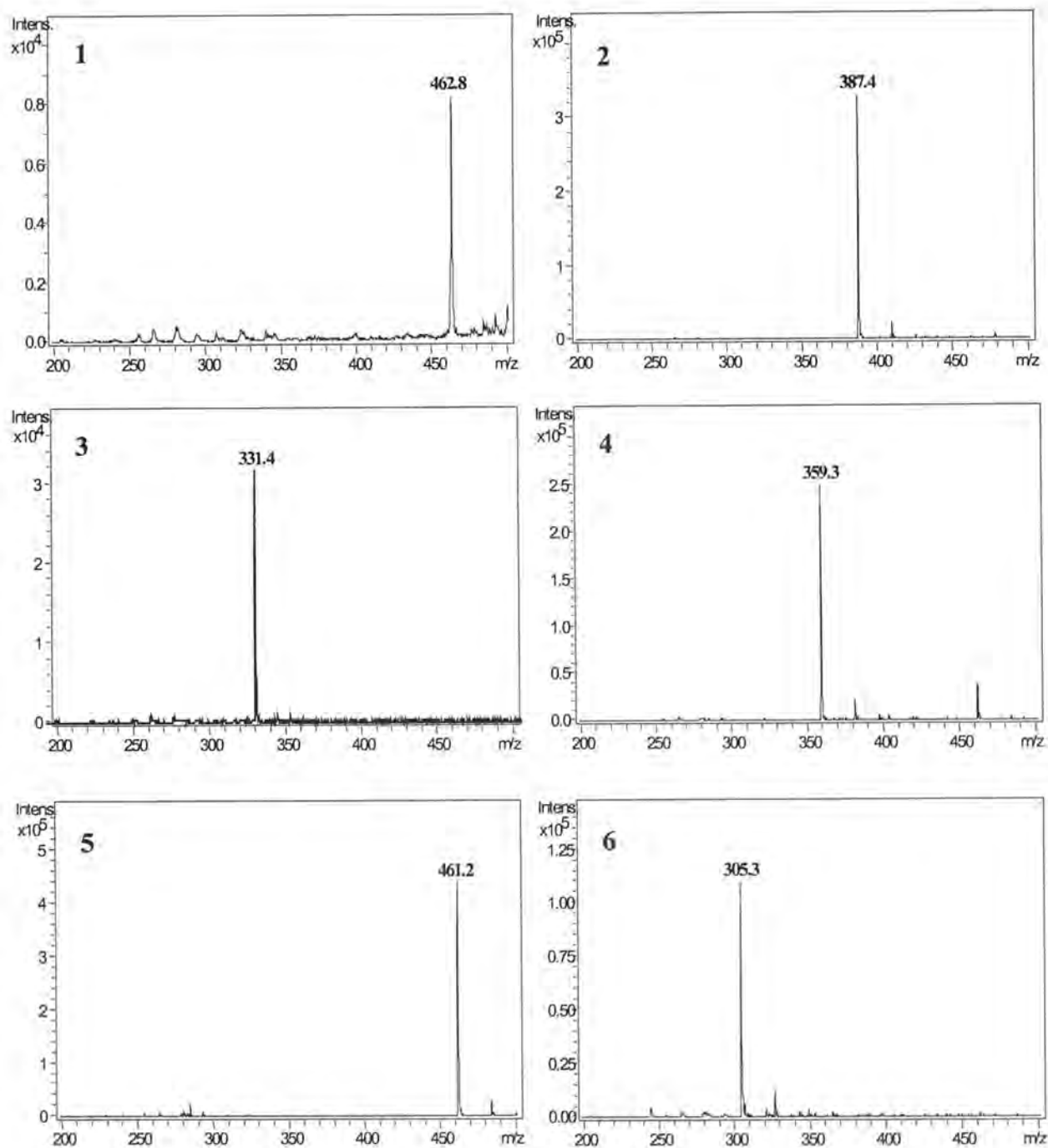


Figura VI.8. Espectros MS de los principales picos detectados en un extracto de romero obtenido utilizando agua subcrítica a 100°C. La notación de los picos y condiciones instrumentales y experimentales como en la Figura VI.7.A.

3.2.3. Caracterización de los extractos-ASE de romero mediante CE-ESI-MS

La combinación de la extracción de agua subcrítica-ASE y CE-ESI-MS fue aplicada para el análisis de extractos obtenidos a dos condiciones diferentes de extracción. Se usó agua subcrítica a 60 y 100 °C, manteniendo constante el resto de parámetros. La Figura VI.9 muestra los electroferogramas del ión extraído de las dos fracciones. Se puede deducir que la extracción del ácido carnósico se ve favorecida a altas temperaturas. La fracción-ASE de romero obtenida a 60 °C no contiene ácido carnósico en comparación con la fracción de 100 °C .

Estos resultados corroboran estudios previos realizados por E. Ibáñez *y col.*³⁴, donde se demostró la capacidad del agua subcrítica para extraer selectivamente y aislar diferentes compuestos antioxidantes de plantas dependiendo de la temperatura utilizada. Así, los compuestos más polares (como ácido rosmarínico) son preferentemente extraídos a bajas temperaturas mientras los compuestos menos polares (ácido carnósico) a altas temperaturas. El resultado dado en la Figura VI.9 demuestra la posibilidad de mejorar la selectividad para la extracción de antioxidantes usando diferentes temperaturas de agua subcrítica, siendo capaz de producir extractos de diversa composición y así diferentes actividades. El estudio desarrollado en nuestro laboratorio ofrece la posibilidad de la obtención y caracterización de fracciones de antioxidantes de fuentes naturales por un camino rápido y eficiente.

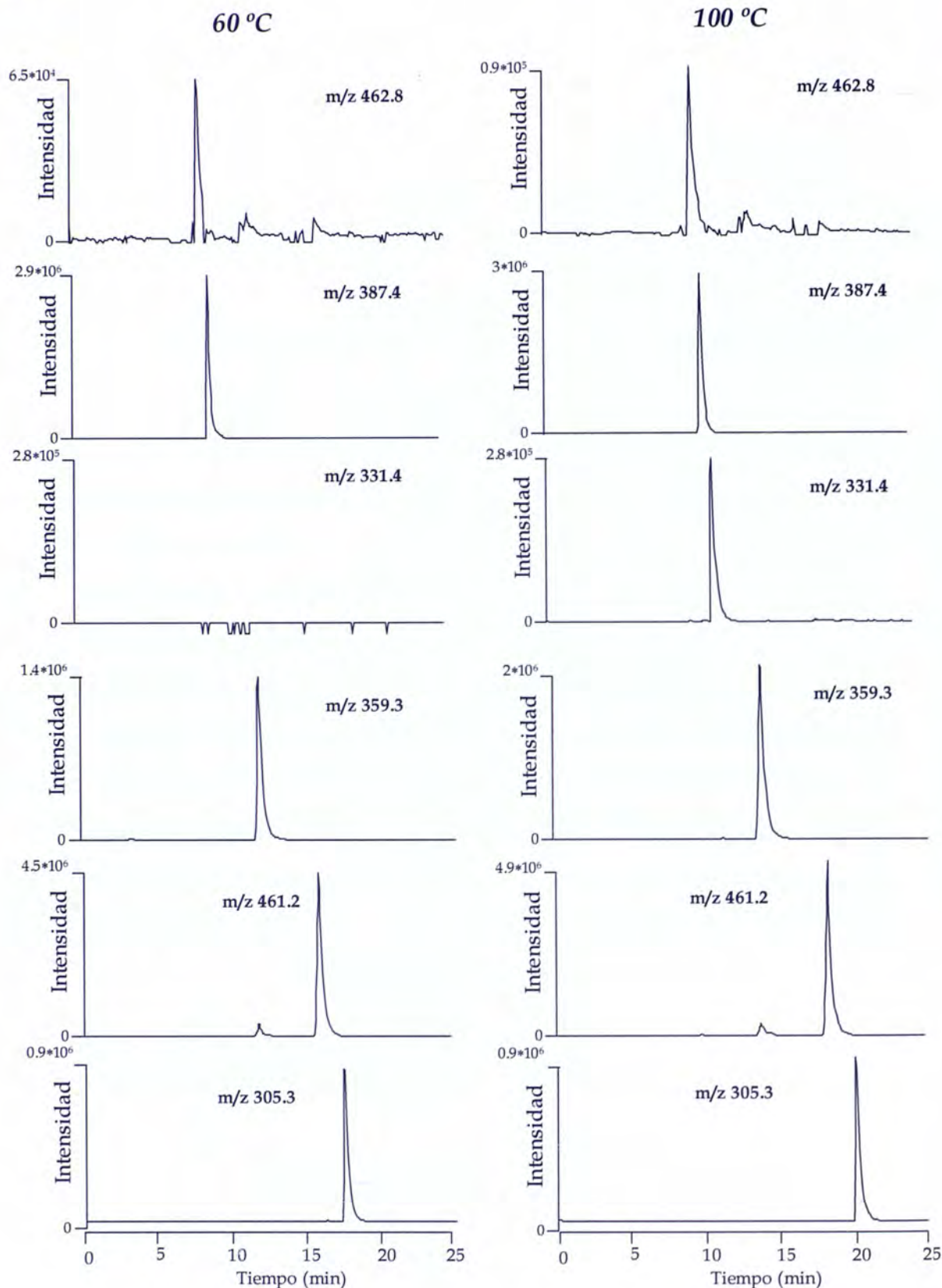


Figura VI.9. Electroferograma del ión extraído obtenido de dos extractos de romero diferentes utilizando agua subcrítica a 60 °C y 100 °C. Iones extraídos: 462.8 m/z; 387.4 m/z; 331.4 m/z (ácido carnósico); 359.3 m/z (ácido rosmarínico); 461.2 m/z; 305.3 m/z (todos +/- 0.5 m/z). Condiciones como en la Figura VI.7.A.

4. Acoplamiento, ventajas, inconvenientes y conclusiones

En este capítulo se ha puesto de manifiesto el acoplamiento entre la técnica CE y el sistema de detección por MS empleando como interfase ESI (Figura VI.10) para la caracterización de productos naturales en diferentes fracciones obtenidas por extracción acelerada mediante disolventes (ASE). Los parámetros se ajustaron permitiendo la separación y caracterización de diferentes compuestos del romero sin ningún tratamiento adicional.

En este estudio se empleó, dentro de las distintas modalidades de interfase del tipo electrospray, la de tipo coaxial con flujo adicional "coaxial liquid sheath-flow".

En esta unión se han optimizado los parámetros típicos para conseguir la nebulización del flujo procedente del equipo de electroforesis capilar. Hay que tener en cuenta que este flujo adicional origina la dilución de los compuestos a analizar, y por tanto la sensibilidad que se obtiene es inferior a la que proporciona la interfase sin flujo adicional. En esta unión entre esta técnica separativa y este sistema de detección se tiene que resolver un importante problema que es el transformar las muestras que se encuentran en fase líquida procedentes del equipo CE en muestras en estado gaseoso.



Figura VI.10. Imagen del equipo CE-ESI-MS.

Este tipo de interfase incorpora un flujo adicional (Figura VI.11). El capilar de separación está rodeado por un segundo tubo de acero inoxidable de un diámetro mayor por el que el flujo adicional, necesario para que se forme el electrospray es guiado ayudado por una bomba externa o hidrodinámicamente, y posteriormente se mezcla con la disolución reguladora directamente al final de estos tubos. Además se aplicó una diferencia de potencial entre la salida del capilar y el electrodo que se encuentra a la entrada de espectrómetro de masas para facilitar la entrada de los analitos al equipo MS. Estos dos tubos están rodeados por un tercer tubo de un diámetro mayor por el que fluye una corriente de gas llamado gas de nebulización, generalmente nitrógeno, utilizado para favorecer la nebulización de la muestra. Todo esto se encuentra situado en la cámara de nebulización, la cual se encuentra a una temperatura comprendida generalmente entre 100 y 350 °C (ver Figura VI.12 y VI.13).

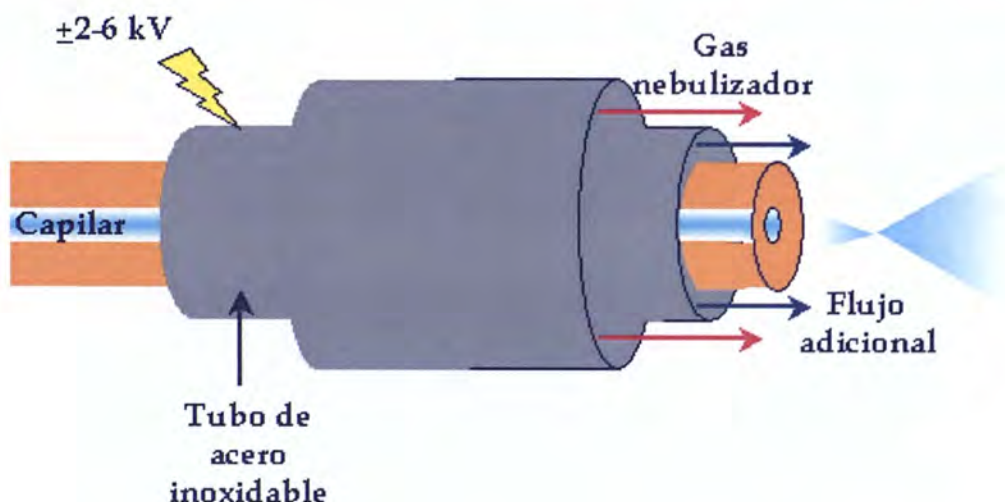


Figura VI.11. Diseño de la interfase coaxial con flujo adicional utilizada ("Coaxial liquid sheath-flow").

El líquido adicional utilizado es una disolución, la cual debe tener una conductividad eléctrica suficiente para permitir cerrar el circuito eléctrico, entre el electrodo del vial de entrada, el capilar y el tubo de acero inoxidable de la

propia interfase. No obstante, se puede trabajar con una disolución de líquido adicional de conductividad baja pero para ello la disolución reguladora de separación debe tener una conductividad alta.

Uno de los inconvenientes de esta interfase es que si se trabaja con fuerzas iónicas muy altas en el flujo adicional o disolución reguladora de separación, se pueden producir descargas eléctricas en la interfase y podría implicar que no se produjese la detección ya que se produciría fundamentalmente la ionización en fase gaseosa de estas especies, además de un aumento del ruido.

Además la naturaleza de este líquido adicional afecta de forma notable la formación del electrospray. Normalmente el flujo adicional suele estar compuesto de un porcentaje mayor o igual a un 50% de disolvente orgánico, con la adición de algún ácido o base en función de la naturaleza de los analitos y el modo (positivo o negativo) en que se quieran ionizar. También la velocidad de salida del flujo es otro factor importante a tener en cuenta ya que afectará de forma significativa a la relación señal/ruido de la detección por MS.

Otro aspecto importante a tener en cuenta, y que afecta de forma significativa a la formación del electrospray, es la distancia del capilar de separación con respecto a los tubos concéntricos del flujo adicional y del gas nebulizador ya que esta distancia es esencial para obtener una buena intensidad de señal. El posicionamiento óptimo del capilar, está en función del tipo y flujo de la disolución reguladora y del flujo adicional empleado.

Y por último, tener en cuenta que tanto la disolución reguladora de separación como el líquido adicional van a afectar de manera significativa a la señal obtenida. Con disoluciones reguladoras volátiles con la mínima concentración y fuerza iónica posible se obtienen generalmente las mejores señales ya que una alta cantidad de sales afecta negativamente a la formación del electrospray y reduce el rendimiento de ionización-desorción de las moléculas de interés. Por otro lado, el añadir aditivos a la disolución reguladora de separación (tensioactivos, selectores quirales, etc) va a afectar también, de manera negativa,

a la formación del spray y por lo tanto, a la eficacia de ionización de los analitos para su posterior detección por espectrometría de masas.

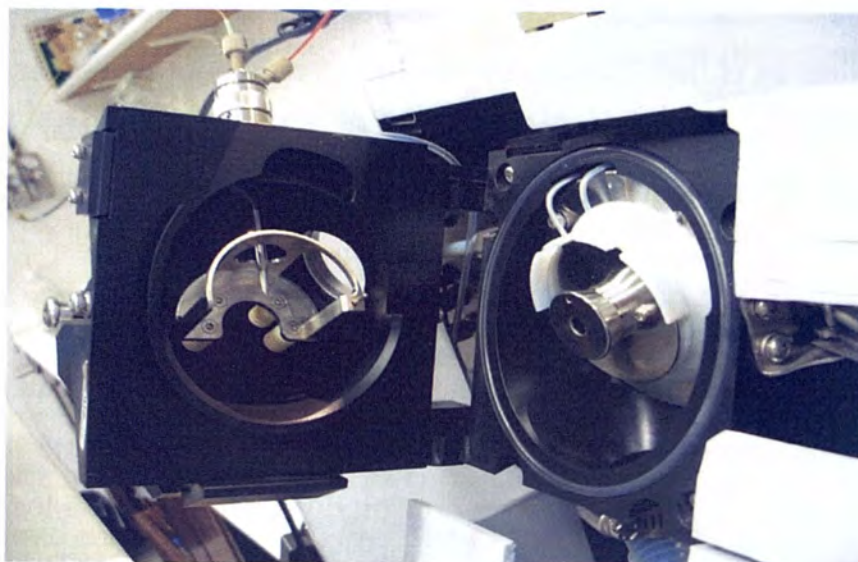


Figura VI.12. Imagen de la cámara de nebulización cerrada.

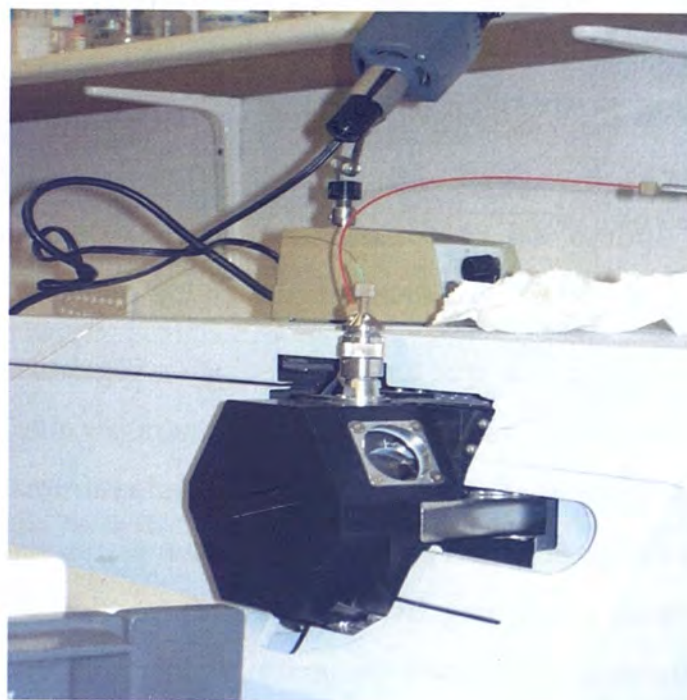


Figura VI.13. Imagen de la cámara de nebulización abierta.

Asimismo, un empleo continuado de estas sustancias poco volátiles puede llegar a originar la obstrucción de la interfase y/o de la entrada al espectrómetro.

En lo que se refiere a la disolución reguladora de separación es necesario llegar a una situación de compromiso entre una alta concentración de disolución reguladora que empeorará la señal obtenida por MS, y una baja concentración que producirá ensanchamientos de las bandas electroforéticas debido a diferencias en la conductividad entre la muestra y el electrolito de separación. Son ideales aquellas especies fácilmente volátiles en disolución acuosa o mezclas hidro-orgánicas, principalmente con acetonitrilo, etanol, propanol y/o metanol y como líquido adicional se suelen utilizar mezclas hidro-orgánicas (en general 1:1) con acetonitrilo, etanol, propanol, metanol y una pequeña cantidad de ácido o base (normalmente en porcentajes inferiores al 1%) en función del analito y de si la ionización se realiza en el modo positivo o negativo.

En definitiva, para conseguir trabajar con un electrospray estable utilizando un flujo adicional es necesario que haya un equilibrio de múltiples parámetros como son la posición del capilar, el flujo del líquido adicional y composición del mismo, flujo del gas nebulizador y condiciones de la ionización por electrospray.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de la investigación descrita en la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. La técnica de separación CE ha sido acoplada a una gran variedad de sistemas de detección, de las cuales sólo dos de ellas son comerciales, la detección por UV-Visible y FIL. El gran interés de acoplar esta técnica de separación, que presenta importantes ventajas con respecto a otras técnicas de separación, a diferentes sistemas de detección es conseguir mejoras de sensibilidad, punto débil de esta técnica, y la obtención de una información extensa y variada de la matriz en estudio.
2. La adaptación de los sistemas de detección a CE se ha hecho a través de interfases, diferentes en cada caso, siendo en la mayoría de ellas el factor más crítico a tener en cuenta para un correcto acoplamiento entre ambas. En cada capítulo se hacen las correspondientes consideraciones
3. Se ha descrito un método con detección UV para el análisis de los pesticidas aldicarb, carbofurano y sus metabolitos, aldicarb sulfóxido, aldicarb sulfona y 3-hidroxicarbofurano en aguas de riego mediante cromatografía capilar electrocinética micelar. El estudio experimental se ha desarrollado empleando SDS a una concentración de 140 mM y una disolución reguladora de separación de 20 mM de borato/HCl a pH 8 con la cual se obtenía la mejor resolución en un tiempo de análisis menor a 20 minutos. Además se optimizaron los parámetros instrumentales como voltaje (23 kV), tiempo de inyección (12 segundos) y temperatura (25 °C). Los límites de detección obtenidos se sitúan entre 2-7.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ empleando extracción en fase sólida. Las muestras de agua fueron fortificadas y preconcentradas off-line y posteriormente analizadas

mediante MEKC dando lugar a unos porcentajes de recuperación entre 77 y 97% (n=4) y una desviación estándar relativa entre 2-7%.

4. Se ha desarrollado un método en zona muy sensible para el análisis y cuantificación de serotonina en orina mediante detección por fluorescencia inducida por láser en un tiempo de análisis inferior al minuto. Dicho método involucra un proceso de derivatización precolumna con fluoresceína isotiocianato (FITC) empleando un láser de ión argón cuya radiación se produce a 488 nm y un filtro de emisión a 520 nm. Se estudiaron las diferentes variables que afectan a la derivatización como son pH, concentración de FITC, tiempo de reacción y temperatura y a la separación como son concentración de la disolución reguladora de separación, pH, voltaje aplicado y tiempo de inyección. Se obtuvo un rango dinámico lineal entre 0 y 40 ng.mL⁻¹ con un límite de detección de 3.51 ng.mL⁻¹ y una desviación estándar relativa comprendida entre 2 y 9%. El método se aplicó al análisis de orina humana obteniéndose una concentración de 12.33 ng de serotonina en cada mL de orina.
5. Mediante cromatografía electrocinética usando ciclodextrinas como pseudofase, para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos nitrados y empleando la fosforescencia atenuada como sistema de detección, se ha propuesto un método basado en la atenuación dinámica de los analitos con un fosforóforo, el ácido 1-bromo-4-naftalen sulfónico (BrNS), presente en la disolución reguladora de separación. En este estudio se demuestra que con ese sistema de detección pueden ser usadas las ciclodextrinas aunque éstas reducen las constantes de la atenuación luminiscente. Los experimentos desarrollados indican que el BrNS reside mayormente en la fase acuosa, mientras que los analitos se encuentran distribuidos en ambas fases. En principio la atenuación debería aumentar por la interacción del BrNS

tanto con los analitos complejados como con los no complejados. Sin embargo, debido a la dependencia de la atenuación fraccional en el factor de capacidad se concluye que sólo la atenuación en fase acuosa contribuye significativamente a la atenuación observada. Aun así, la separación y la detección pueden ser consideradas totalmente compatibles, dado que los factores de capacidad encontrados son generalmente bajos. Empleando esta metodología se obtuvieron límites de detección del orden de 10^{-8} M para estos compuestos.

6. Se ha optimizado el acoplamiento off-column entre CE y la espectroscopía Raman de superficie aumentada (SERRS) para la separación y posterior identificación de los colorantes Basic Red 9, Acid Orange 7 y Food Yellow 3. Posterior a la separación mediante un método en zona empleando una disolución reguladora compuesta por borato 20 mM a pH 10 y 1 mM de hidróxido de tetraetilamonio, se realizó la detección Raman después de depositar los analitos separados en un substrato. Para este fin se desarrolló una nueva interfase empleando una aguja de acero inoxidable como cátodo. Después de la deposición en una placa TLC, se adicionaron a los analitos depositados diferentes tipos de coloides de plata y fueron irradiados a una longitud de onda de 514.5 nm mediante un láser de ión argón registrándose posteriormente la señal SERRS. Se probaron diferentes tipos de coloides como citrato (Lee y Meisel), borato y plata recubierto de oro. Con éstos, el compuesto Basic Red 9 (cargado positivamente) dio intensidades mucho más altas que los coloides Acid Orange 7 y Food Yellow 3 (cargados negativamente). Aun así, incluso para los colorantes cargados negativamente el coloide de citrato dio lugar a la mayor intensidad de la señal SERRS. En el acoplamiento CE-SERRS sólo se separaron y detectaron los compuestos cargados negativamente ya que el compuesto cargado positivamente se

quedaba retenido de forma indeseable en varios componentes del sistema de separación.

7. Hemos propuesto un método rápido multiresiduo para el análisis de siete herbicidas pertenecientes a la familia de las fenilureas mediante cromatografía electrocinética micelar en presencia de dos triazinas en aguas empleando una detección electroquímica end-column en combinación con un detector UV comercial. En ambos sistemas de detección se obtuvo un amplio rango dinámico lineal comprendido entre 1.4×10^{-5} y 3.0×10^{-4} M para las siete fenilureas empleando una disolución reguladora de separación compuesta por 0.020 M de ácido fosfórico a pH 7 y 0.020 M de SDS. Bajo estas condiciones se obtuvieron unos límites de detección por debajo de 5.0×10^{-6} M y los analitos fueron resueltos en menos de 30 minutos.
8. Se ha diseñado una metodología en zona empleando como interfase la ionización por electrospray (ESI) y detección por espectrometría de masas (MS) para la caracterización de productos naturales del romero en diferentes fracciones obtenidas mediante la extracción acelerada mediante disolventes. Los parámetros de CE-ESI-MS fueron optimizados, así las condiciones más favorables encontradas fueron 40 mM de acetato amónico ajustado a pH 9 con amoníaco, la composición del líquido adicional fue de 2-propanol/agua en proporción 60:40 y un 0.1% de trietilamina con un flujo de $0.24 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, un flujo de gas de secado de $7 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ a $350 \text{ }^\circ\text{C}$ empleando una presión de gas nebulizador de 2 psi y una estabilidad del compuesto del 50%, permitiendo la separación y caracterización de diferentes compuestos del romero en las fracciones obtenidas mediante ASE empleando agua subcrítica sin ningún tratamiento adicional.

9. Se ha demostrado la potencialidad de la CE como técnica analítica acoplada a diferentes sistemas de detección y se han puesto a punto métodos analíticos de gran resolución y sensibilidad consiguiendo de esta manera tener una visión más amplia acerca de las posibilidades que ofrece esta técnica separativa en el análisis y determinación de una gran variedad de compuestos cuando es acoplada a estos sistemas de detección.

PUBLICACIONES DERIVADAS

ANEXO I

Determination of aldicarb, carbofuran and some of their main metabolites in groundwater by application of micellar electrokinetic capillary chromatography with diode-array detection and solid-phase extraction

David Arráez-Román, Antonio Segura-Carretero, Carmen Cruces-Blanco and Alberto Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

Abstract: This paper describes a UV detection method for the pesticides aldicarb and carbofuran, and some of their main metabolites, aldicarb-sulfoxide, aldicarb-sulfone and 3-hydroxy-carbofuran, in ground waters. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) with diode-array detection was developed for their determination at 210 nm. The experimental study was performed using sodium dodecyl sulfate (SDS) at a concentration level of 140 mM, and a buffer of borax/HCl 20 mM at pH 8 which gives the best resolution with an analysis time of less than 20 min. Different instrumental parameters such as voltage (23 kV), injection time (12 s) and temperature (25 °C) were optimized. The detection limits were in the range 2–7.4 µg litre⁻¹ by solid-phase extraction (SPE) with a subsequent evaporation step. Groundwater spiked samples were pre-concentrated off-line with graphite carbon and subsequently analyzed by MEKC with diode-array detection yielding average recoveries between 77 and 97% (*n* = 4) with RSD between 2–7%.

© 2004 Society of Chemical Industry

Keywords: capillary electrophoresis; groundwater; pesticide; solid phase extraction

1 INTRODUCTION

N-Methylcarbamates (NMCs) have represented an important category of pesticides ever since their first introduction into the agrochemical market in the 1950s. They are used world-wide as insecticides, acaricides, nematocides and molluscicides on a large number of crops.¹ Due to their relatively biodegradable and less soil-persistent nature, there were few attempts to investigate their environmental fate in their early years of application.² Consequently, NMCs currently constitute a class of chemicals widely used in agriculture to combat a large number of pests in a great variety of crops, and their residues may be encountered in fruits and vegetables. Even though pesticides are indispensable chemicals in modern civilization, they are potentially toxic to animals and humans, so the presence of their residues in foodstuffs poses a potential hazard for consumers. Therefore, to watch over the safety of the food supply, government agencies of most countries have established maximum

residue levels (MRLs) of pesticides and set up monitoring programmes for pesticide residues on crops.³

Aldicarb and carbofuran are widely used in the soil for nematode control, and for insect or mites control as a result of their efficient translocation by the plant. The combination of high solubility and low sorption causes aldicarb and carbofuran to be mobile in groundwater, and their toxic degradation products aldicarb sulfoxide and aldicarb sulfone (aldicarb) and 3-hydroxy-carbofuran (carbofuran) are also soluble in water⁴ (Table 1). There is little information on analytical methodology for these very polar metabolites compared with aldicarb and carbofuran. The EU has set a maximum admissible concentration of 0.1 µg litre⁻¹ for individual pesticides and their related compounds in drinking water.^{5,6}

Among the various methods for monitoring NMCs in foodstuffs and environment bodies, chromatographic techniques have been employed

Contract/grant sponsor: Acciones Coordinadas de los Grupos de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Andalucía

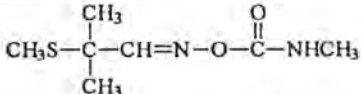
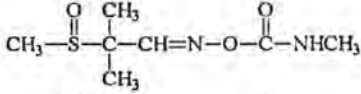
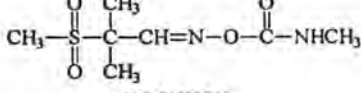
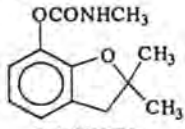
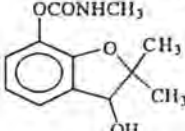
Contract/grant sponsor: Miniotenio de Ciencia y Tecnología; contract/grant number: BQU2002-0341B

(Received 27 January 2003; revised version received 14 October 2003; accepted 28 November 2003)

Published online 19 February 2004

© 2004 Society of Chemical Industry. *Pest Manag Sci* 1526–498X/2004/\$30.00

Table 1. Structural formulae and some characteristics of the compounds studied

| Compound | Formula | Vapour pressure (mPa) | Water solubility (g litre ⁻¹) | λ_{max} (nm) | ϵ_{200nm} (litre mol ⁻¹ m ⁻¹) |
|-------------------------|---|-----------------------|---|----------------------|---|
| Aldicarb (ALD) |  | 13 | 6 | 210 | 19 000 |
| Aldicarb-sulfoxide (SX) |  | — | 330 | 210 | 15 500 |
| Aldicarb-sulfone (SN) |  | 12 | 10 | 210 | 16 700 |
| Carbofuran (CARB) |  | 2.7 | 0.7 | 210 | 38 700 |
| 3-OH-Carbofuran (3-OH) |  | — | — | 210 | 47 000 |

extensively. Gas chromatography (GC) has provided good results,^{7,8} but problems sometimes arise because of the thermal lability of the analytes. Therefore, various precautionary measures have to be taken for curbing the thermal degradation of NMCs during GC analysis. These include performing derivatization, lowering column temperature, using short columns and adopting programmed temperature vapourization. Since the 1970s, high-performance liquid chromatography (HPLC) has become the preferred choice for the determination of NMCs, because, in this case, the thermal lability problem is obviated. Although normal-phase separations have been implemented successfully in many cases, reversed-phase HPLC (RP-HPLC) has been much more popular, due mainly to its operational simplicity and better performance.^{9–11} An additional advantage of RP-HPLC is its compatibility with aqueous samples, which allows on-column enrichment of NMCs in environmental analysis.²

Recently, capillary electrophoresis (CE)^{12,13} has achieved recognition as a separation technique for use in the separation of inorganic and organic compounds, and has also been reported as a novel approach for the determination of pesticides.^{14,15}

Among the different modes of operation which could be used with this technique, micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is a unique mode of CE initiated by Terabe *et al*¹⁶ in an effort to extend the use of CE to neutral molecules. With this technique, the separation of neutral compounds is realized on the basis of their differential affinity for the micellar pseudo-stationary phase. In recent years, application of this new technique to pesticide analysis has been receiving attention, especially for the separation and determination of different types of herbicide.^{17,18} With regard to NMC pesticides, the analysis of individual

carbamates in different pesticide mixtures has been the subject of sporadic work; only two recent papers on the separation and determination of NMC pesticides by MEKC appear to exist^{19,20} and only one recent paper has reported the separation of pesticides and metabolites.²¹

In the present work, we report the MEKC determination of aldicarb, carbofuran and some of their main metabolites in ground water samples at $\mu\text{g litre}^{-1}$ level by solid-phase extraction.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and samples

The pesticide standards aldicarb [2-methyl-2-(methylthio)propionaldehyde *O*-methylcarbamoyloxime; ALD] aldicarb-sulfoxide [2-methyl-2-(methylsulfonyl)propionaldehyde *O*-methylcarbamoyloxime; SX], aldicarb-sulfone [2-methyl-(2-methylsulfonyl)propionaldehyde *O*-methylcarbamoyloxime; SN], carbofuran [2,3-dihydro-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate; CARB] and 3-hydroxy-carbofuran [2,3-dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethylbenzofuran-7-yl methylcarbamate; 3-OH] (content > 99%) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Stock standard solutions of all the analytes were prepared by dissolving accurately weighed amounts in acetonitrile (500 mg litre⁻¹).

Working standard solutions were made by diluting aliquots of the stock standard solutions to the appropriate concentrations in water. Fresh solutions were prepared daily. Aliquots of these working standard solutions were used to prepare calibration standards and for spiking groundwater samples. The diluted solutions were kept in a refrigerator at 4 °C.

Acetonitrile (extra pure) and ethyl acetate (reagent grade), were obtained from Scharlau (Barcelona, Spain). All solutions were prepared in doubly distilled water obtained from a Millipore (Bedford, MA, USA) Milli-Q water purification system. A solution of borate 20 mM was prepared from Panreac (Barcelona, Spain) and buffer pH was adjusted to 8.0 with 0.1 M hydrochloric acid. Sodium dodecyl sulfate (SDS) was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The separation buffer was prepared by dilution of the corresponding stock solution with milli-Q water as required. The solid-phase extraction (SPE) cartridges were home-made using a syringe containing 500 mg of graphite carbon Carbo-pack™ 60/80 mesh obtained from Supelco (Madrid, Spain). All solutions were filtered through a 0.45- μm Millipore membrane filter before injection into the equipment.

2.2 Instrumental set-up

All CE experiments were performed with a P/ACE model 5500 instrument (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Beckman diode array detector. Beckman System Gold Software was used for system control, and for data collection and processing. A fused-silica capillary with 75- μm internal diameter (ID) and total length (L_T) of 57 cm (50 cm to the detector, (L_D)), 375 μm outer diameter (OD) were chosen.

At the beginning of each experimental session, the capillary was rinsed with sodium hydroxide (0.1 M) for 5 min, followed by 1 min with Milli-Q water. The capillary was equilibrated with the separation buffer for 4 min before sample injection, and rinsed with 0.1 M sodium hydroxide for 1 min and flushed with Milli-Q water for 1 min after each run with a 20.0 psi pressure.

Separations were made using a sodium borate/hydrochloric acid (20 mM; pH 8) buffer solution and 140 mM sodium dodecyl sulfate at 23 kV, the samples were injected hydrodynamically with a 0.5 psi (3.45 kPa) pressure injection for 12 s and detection was conducted by UV diode-array absorption at 210 nm in less than 17 min.

2.3 Solid-phase extraction

Extraction of the aqueous solutions was performed by solid-phase extraction (SPE) cartridges, containing 500 mg of graphite carbon with 60/80 mesh and 6 ml volume. The cartridges were preconditioned sequentially with ethyl acetate (10 ml), acetonitrile (15 ml) and Milli-Q water (10 ml) and subsequently dried. A water sample (250 ml) was percolated through a preconditioned 500-mg graphite carbon cartridge at a flow rate of 5 ml min⁻¹ and dried by passing air for 10 min.

A pre-conditioned cartridge was used to extract a 250 ml water sample containing concentrations ranging between 0 and 40 $\mu\text{g litre}^{-1}$ of each analyte.

After elution with acetonitrile (2 ml), the eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen. To the dry residue, 250 μl of a mixture of

140 mM SDS and 20 mM buffer solution were added and the solution directly transferred to the microvials, with a pre-concentration of one thousand in each case.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Development of the CE separation

A new method has been developed for the separation of aldicarb from two of its main metabolites, and another *N*-methylcarbamate, carbofuran, from one of its metabolites using capillary electrophoresis in the micellar mode of operation. The pH of the buffer systems tested was varied from 7 to 11 in steps of 1 unit and three different buffers were studied at the working pH selected. One was phosphate, another carbonate and the last borate, and it was found that the best resolution and efficiency were obtained with borate at pH 8. In an attempt to separate all the compounds under study, borate/HCl at 20 mM gave the best results, so this was chosen for the rest of the experimental work.

Because all the analytes are neutral compounds, the separation requires the addition of an organized medium such as 6-sulfonic calixarene or sodium dodecyl sulfate (SDS). In this work SDS, which is negatively charged and its electrophoretic mobility is opposite in direction to electro-osmosis, was selected as giving the best separation of analytes.

To select the optimum SDS concentration, a wide range of concentrations were tested. It was observed that at concentrations near the critical micelle concentration of SDS (3 mM), a poor resolution between first pair of peaks (SX and SN) was observed. For this reason, a study of the influence in resolution with higher concentrations (80–170 mM) was carried out (Fig 1). It was concluded that with a concentration of 140 mM (180 μA), the two cited peaks were resolved, so this was selected for the rest of the experimental work, giving good repeatability of results.

In respect of instrumental optimization, different voltages between 20 and 27 kV were tested, the best results and efficiency being obtained at 23 kV. The study of the injection time was carried out from 4 to 12 s and the best results were obtained at 12 s. The use of DAD detection allowed the selection of the wavelength used for the determination of the different

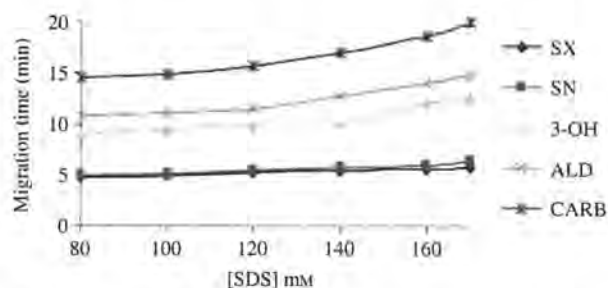


Figure 1. Migration time versus concentration of SDS. Conditions: 20 mM borax/HCl running buffer, pH 8; separation voltage: 23 kV; detection: 210 nm.

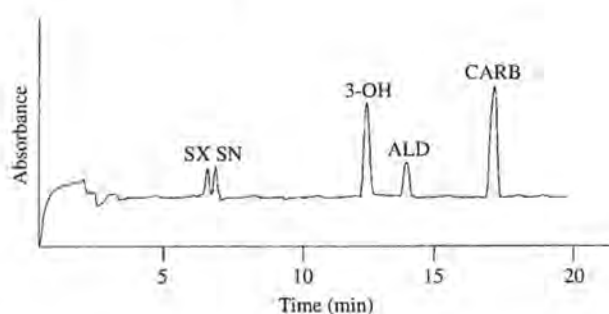


Figure 2. Electropherogram of the five compounds (30 ng ml^{-1}) under optimal conditions. Experimental and instrumental conditions as in Fig 1. SDS: 140 mM .

analytes between 190 and 400 nm , 210 nm being selected as the optimum. Samples were injected by application of 0.5 psi (3.45 kPa) using silica capillaries (L_D 50 cm , L_T 75 cm) at 25°C .

The selection of experimental and instrumental variables, particularly the high concentrations of SDS in the media, have achieved a very good resolution of the five compounds by MEKC with diode-array detection in less than 17 min (Fig 2).

3.2 Quantification by MEKC

Corrected peak areas were used for all quantifications using calibration with standard solutions of each analyte. For SX the range was between 2.30 and $40 \mu\text{g litre}^{-1}$, SN between 3.80 and $40 \mu\text{g litre}^{-1}$, 3-OH between 2.01 and $40 \mu\text{g litre}^{-1}$, ALD between 7.47 and $40 \mu\text{g litre}^{-1}$ and CARB between 5.11 and $40 \mu\text{g litre}^{-1}$ respectively. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated by the method of Cuadros Rodríguez *et al*;²² the 3-OH gives the lower LOD, while the figure for ALD was the highest obtained with a value of $7.47 \mu\text{g litre}^{-1}$. Method precision was determined by the assay of four separated sample preparations of each compound at a concentration of $30 \mu\text{g litre}^{-1}$, giving mean values of relative standard deviation of 4.08% . These values are good and similar to those obtained with chromatographic techniques. All the results are summarized in Table 2.

Table 2. Quality parameters of the MEKC method

| Parameter ^a | SX | SN | 3-OH | ALD | CARB |
|--|------|-------|------|-------|-------|
| Detection limits (LOD) ^b ($\mu\text{g litre}^{-1}$) | 2.30 | 3.80 | 2.01 | 7.47 | 5.11 |
| Analytical sensitivity ($\mu\text{g litre}^{-1}$) | 0.83 | 1.36 | 0.72 | 2.69 | 1.84 |
| Quantitation limits (LOQ) ^b ($\mu\text{g litre}^{-1}$) | 7.69 | 12.65 | 6.70 | 24.91 | 17.06 |
| Repeatability (%, peak area) | 2.25 | 3.72 | 1.96 | 7.19 | 5.27 |

^a Reference 23.

^b Reference 20.

Table 3. Water sample analysis

| Pesticide | Spiked level (ng ml^{-1}) | Concentration found (ng ml^{-1}) | Recovery (%) |
|-----------|---|---|-----------------|
| SX | 30 | 23.07 | 76.91 |
| SN | 30 | 27.64 | 92.14 |
| 3-OH | 30 | 29.00 | 96.67 |
| ALD | 30 | 27.33 | 91.10 |
| CARB | 30 | 24.24 | 80.81 |

3.3 Application to environmental samples

To show how the method can be applied to the analysis of real samples, and due to the fact that groundwater pollution by pesticides has stimulated the development of rapid and sensitive methods, groundwater samples taken from selected locations with intensive agricultural use in the region of Almería in South Spain that were analysed had a concentration lower than the detection limit of proposed method.

The water samples were spiked at a $30 \mu\text{g litre}^{-1}$ level with the five NMCs previously determined by MEKC. The applicability of the proposed methodology has been pointed out in real groundwater samples with percentage recoveries between 77 and 97% ($n = 5$) for the five compounds analyzed (Table 3).

4 CONCLUSIONS

The present data confirm the viability of MEKC in the detection and quantification of a family of well-known pesticides, the *N*-methylcarbamates, which are extensively used for the protection of a wide variety of crops in greenhouses in southern Spain, and whose pollution of groundwaters has to be controlled. These results demonstrated that the analysis are more economical than current methods due to the low solvent consumption (nanolitre order), cost of capillaries and minimal amounts of sample required with similar analysis times and resolutions. It can be concluded that this technique can compete favourably in routine analysis with the well-established chromatographic techniques. In general, CE application on a routine scale for the analysis of pesticides is restricted by the relatively fewer developed methods and literature sources on CE, mainly because of its much shorter history relative to the other chromatographic techniques.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors greatly appreciated the financial support of the Acciones Coordinadas de los Grupos de Investigación y Desarrollo Tecnológico de Andalucía and the project of the Ministerio de Ciencia y Tecnología (BQU2002-03418).

REFERENCES

- Molina M, Wiedmer SK, Jussila M, Silva M and Riekkola ML. Use of a partial filling technique and reverse migrating micelles

- in the study of *N*-methylcarbamate pesticides by micellar electrokinetic chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A* 927:191–202 (2001).
- 2 Wu YS, Lee HK and Li SFY, A fluorescence detection scheme for capillary electrophoresis of *N*-methylcarbamates with on-column thermal decomposition and derivatization. *Anal Chem* 72:1441–1447 (2000).
 - 3 Abad A, Moreno MJ, Pelegrí R, Martínez MI, Sáez A, Gamón M and Montoya A, Determination of carbaryl, carbofuran and methiocarb in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: an analytical comparison. *J Chromatogr A* 833:3–12 (1999).
 - 4 Munster CL, Skaggs RW and Pemmireddy VR, Effect of water table management on the fate of the pesticide aldicarb. *ASAE* 39:55–66 (1996).
 - 5 Martínez Vidal JL, Parrilla Vázquez P and Martínez Fernández J, Coupled column liquid chromatography for the rapid determination of *N*-methylcarbamates and some of their main metabolites in water. *Chromatographia* 51:187–192 (2000).
 - 6 EEC, Drinking Water Guideline, 80/779/EEC. *O J L229*:11–29 (1980).
 - 7 Verma KK, Louter AJH, Jain A, Pocurull E, Vreuls JJ and Brinkman UA, On-line solid-phase extraction gas chromatography ion trap tandem mass spectrometric detection for the nanogram per litre analysis of trace pollutants in aqueous samples. *Chromatographia* 44:372–380 (1997).
 - 8 Ballesteros E, in *Handbook of water analysis*, ed by Nollet LML, Marcel Dekker, New York, p 537 (2000).
 - 9 Yang SS, Goldsmith AI and Smetena I, Recent advances in the residue analysis of *N*-methylcarbamate pesticides. *J Chromatogr A* 754:3–16 (1996).
 - 10 Nunes GC and Barceló M, Analysis of carbamate insecticides in foodstuffs using chromatography and immunoassay techniques. *Trends Anal Chem* 18:99–107 (1999).
 - 11 Wang N and Budde JL, Determination of carbamate, urea and thiourea pesticides and herbicides in water. *Anal Chem* 73:997–1006 (2001).
 - 12 Jandik P and Bonn G, *Capillary electrophoresis of small molecules and ions*, VCH, Weinheim (1993).
 - 13 Engelhardt H, Beck W and Schmitt T, *Kapillarelektrophorese*, Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden (1994).
 - 14 El Rassi Z, Capillary electrophoresis of pesticides. *Electrophoresis* 18:2465–2481 (1997).
 - 15 Karcher A and El Rassi Z, Capillary electrophoresis and electrochromatography of pesticides and metabolites. *Electrophoresis* 20:3280–3296 (1999).
 - 16 Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A and Ando T, Electrokinetic separation with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* 56:111–113 (1984).
 - 17 Jung M and Brumley WC, Trace analysis of fluorescein-derivatized phenoxy acid herbicides by micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 717:299–308 (1995).
 - 18 Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Muñoz-Domínguez A, Domínguez-Álvarez J and Hernández-Méndez J, Determination of triazine herbicides in water by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A* 733:349–360 (1996).
 - 19 Wu YS, Lee HK and Li SFY, Separation and determination of pesticides by capillary electrophoresis. I. Rapid separation of fifteen *N*-methylcarbamates insecticides via micellar electrokinetic chromatography. *J Microcol Sep* 10:239–247 (1998).
 - 20 Wu YS, Lee HK and Li SFY, Separation and determination of pesticides by capillary electrophoresis. II. Determination of *N*-methylcarbamates in drinking water by micellar electrokinetic chromatography with SPE and on-column enrichment. *J Microcol Sep* 10:529–535 (1998).
 - 21 Molina M, Pérez-Bendito D and Silva M, Multi-residue análisis of *N*-methylcarbamates pesticide and their hydrolytic metabolites in environmental waters by use of solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 20:3439–3449 (1999).
 - 22 Cuadros Rodríguez L, García Campaña AM, Jiménez Linares C and Román Ceba M, Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Anal Lett* 26:1243–1258 (1993).
 - 23 IUPAC, prepared by Currie LA, IUPAC Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations in evaluation of analytical Methods including detection and quantification capabilities, *Pure Appl Chem* 67:1699–1723 (1995).

ANEXO II

Subminute and sensitive determination of the neurotransmitter serotonin in urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection

David Arráez Román, Antonio Segura Carretero, Carmen Cruces Blanco and Alberto Fernández Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Spain

Received 26 June 2003; revised 5 August 2003; accepted 5 September 2003

ABSTRACT: In this work, a sub-minute and sensitive capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) method was developed for the analysis and quantitation of the neurotransmitter 5-hydroxytryptamine (5-HT) or serotonin in urine. The method involves precolumn derivatization with fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) using an excitation light from an argon ion laser of 488 nm and a 520 nm band pass emission filter. Different variables that affect derivatization (pH, FITC concentration, reaction time and temperature) and separation (buffer concentration, pH, applied voltage and injection time) were studied. The linear dynamic range obtained was between 0 and 188 nM with a detection limit of 16 nM with a RSD between 2 and 9%. The applicability of the proposed method was demonstrated by analysis of 5-HT in human urine, establishing a concentration of 57 nM in control urine. The method was validated by standard-addition methodology. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: 5-hydroxytryptamine; precolumn derivatization; fluorescein isothiocyanate

INTRODUCTION

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a heterocyclic amine that was first isolated from enterochromaffin cells originated from the gastric and intestinal mucosa. It was characterized by its ability to cause smooth muscle contraction and was named enteramine. After purification, structure elucidation and chemical synthesis, enteramine was found to be identical to serotonin. Serotonin is synthesized from the essential amino acid tryptophan (Grahame-Smith, 1988; Ruthven and Sandler, 1979), but studies about its physiological role to elucidate some of its functions are still the subject of intensive investigation, which will not be possible without the development of accurate, precise and sensitive methods for the analysis of serotonin and its metabolites in biological matrices (Kema *et al.*, 2000).

Since the introduction of the first commercial capillary electrophoresis (CE) instrument a decade ago, CE applications have become widespread. Today, CE, in its different versions, represents a powerful separation technique which has proved competitive/complementary to high-performance liquid chromatography (HPLC).

Based on the simultaneous action of electromigration and electroosmotic flow, this approach offers a wide range of conditions under which successful separations and quantitations can be obtained (Cruces-Blanco, 1998; Arce *et al.*, 1998; Fernández-Gutiérrez *et al.*, 2000; Cruces-Blanco *et al.*, 2001). The lack of CE applications to real-world samples has been principally caused by insufficient sensitivity, usually from the widely used diode-array detector. An interesting alternative to enhance sensitivity, limits of detection and linearity is the application of laser-induced fluorescence (LIF) detection to CE separation. CE-LIF is considered to have the highest reported sensitivity as a detection mode for separations (Albin *et al.*, 1993) and numerous applications in different fields have been published (Flaherty *et al.*, 2002; Armstrong and He, 2001).

When the analytes do not present native fluorescence or the instrumentation is limited (laser λ_{exc}), a previous derivatization process with a high-efficiency fluorophore is needed. One of the most widely used fluorescent derivatization agents for primary and secondary amines in the biochemical fields is fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC; Shintani and Polansky, 1997; Yu and Dovichi, 1989), which was first used for CE in 1988 (Cheng and Dovichi, 1988). Different CE-LIF determinations have been found in the literature using FITC as precolumn derivatization reagent to determine polyamines (Mattusch *et al.*, 1995), biogenic amines (Nouadje *et al.*, 1995a,b, 1996, 1997; Paez *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 1996) or some aliphatic amines in water samples (Brumley and Kelliher, 1997).

Abbreviations used: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; FITC, fluorescein isothiocyanate isomer I.

Contract/grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología; Contract/grant number: BQU-03418.

Contract/grant sponsor: University of Granada.

Published online 12 November 2003

Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

We report here the separation and determination of the biogenic amine serotonin by CE-LIF prior to fluorescent derivatization reaction with FITC which, to the best of our knowledge, is the first report of derivatization of the amine to carry out fluorescent detection in capillary electrophoresis. Previous works dealing with CE demonstrate that serotonin can be analysed by this technique using other detection procedures such as electrochemical detection (Chen *et al.*, 2001) or indirect chemiluminescence (Tsai and Whang, 1999). The present optimized method was applied to the determination of serotonin in human urine samples in 1 min.

EXPERIMENTAL

Reagents. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) standard was obtained from Sigma-Aldrich. A stock standard solution of 1.0×10^{-3} M was prepared by dissolving the required amount of the analyte in doubly distilled water. FITC stock solution (0.1 M) was prepared by dissolving fluorescein isothiocyanate isomer I in acetone. This solution was diluted with acetone to furnish solutions of lower concentration (1.0×10^{-2} M). The diluted solutions were kept in the refrigerator at 4°C. Fresh solutions were prepared daily. Aliquots of these working standard solutions were used to prepare calibration standards. Reagent-grade acetone was obtained from Scharlau. A 0.2 M sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9) was used for the derivatization procedure while a borate/HCl buffer (15 mM, pH 9) was selected for the separation was prepared from Panreac, Barcelona. All solutions were filtered through a 0.45 µm Millipore (Bedford, MA, USA) membrane filters before injection into the equipment. Doubly distilled water was obtained by Milli-Q water purification system.

Instrumental setup. All CE experiments were performed with a P/ACE model 5500 instruments (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Beckman LIF detector with the anode on the injection side and the cathode on the detection side, since the negatively charged FITC-derivatized serotonin migrates towards the cathode under the influence of the electroosmotic flow. The exciting light (488 nm) was provided by an argon ion laser source and a 520 nm band pass emission filter was used. Beckman System Gold Software was used for system control and for the data collection and processing.

Derivatization procedure. Aliquots between 5 and 20 µL of the serotonin stock solution (1.0×10^{-3} M) were mixed with 495 µL of the 0.2 M carbonate buffer (pH 9), and 400 µL of FITC solution (1.0×10^{-2} M). The mixture was introduced in a thermostatic bath for 2 h at 45°C and 109 µL of the resulting solution were diluted to a final volume of 10 mL with doubly distilled water before the analysis. The final solution was introduced in the CE-LIF for the analysis.

Electrophoretic procedure. Separation was performed in an uncoated fused silica capillary of 75 µm internal diameter

(i.d.) and a total length of 32 cm (25 cm to the detector), which was installed in a temperature-controlled (25°C) cartridge especially designed for the LIF detector. Capillary conditioning was carried out by flushing the columns for 1 min with 0.1 M sodium hydroxide, then for 1 min with water, and finally for 4 min with the separation buffer. All buffers were prepared with doubly distilled water. Separations were made using a 15 mM sodium borate/hydrochloride acid (pH 9) buffer solution. The voltage applied was 25 kV and the current achieved was 50 µA. Samples were injected hydrodynamically, with a 0.5 psi pressure injection for 12 s and the electropherograms to the determination of serotonin were obtained in 1 min at 488 nm wavelength excitation and 520 nm emission.

RESULTS AND DISCUSSION

CE with LIF detection has been largely used to determine primary amines and amino acids. The reagents most commonly used as derivatizing agents for primary amines and amino acids are FITC, naphthalenedicarboxaldehyde, *o*-phthalaldehyde, 3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinoline carboxaldehyde and fluorescamine. Among them FITC was selected for labelling serotonin because the fluorescence derivative is one of the most intensely fluorescent molecules and the excitation wavelength exactly matches the 488 nm light from the argon laser, and the use of long-wavelength excitation light reduces problems with light scattering and thus enhances sensitivity (Pérez-Ruiz *et al.*, 2000).

Optimization of derivatization conditions

The general aim of these experiments was to achieve the best possible fluorescence intensity of serotonin derivative to improve the detection limit. To optimize derivatization conditions, several parameters affecting the reaction were studied, including the chemical composition, concentration and pH of the buffer used, the amount of FITC, addition of organic solvents, reaction time and temperature. Also, it is necessary to indicate that the appearance of side reaction products was not fundamental because, in all cases, serotonin quantitation was possible.

The effect of pH, type and concentration of the buffer solution on the efficiency of the derivatization of serotonin with FITC was studied using four buffer systems (sodium carbonate, sodium borate, CAPSO and ammonium chloride) at different pH values containing 10% (v/v) acetone. As it can be seen in Fig. 1, there is a large influence of the pH values over the area of the electrophoretic peak, the best results being obtained at pH 9 when sodium carbonate buffer was used.

It was also observed that the reaction rate was not significantly affected by changing the concentration

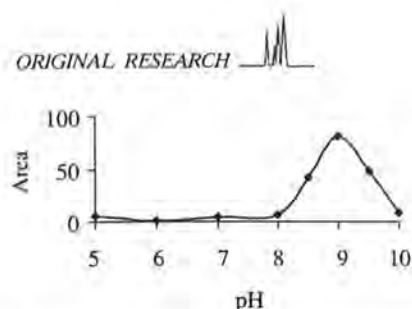


Figure 1. Influence of pH of the sodium borate buffer solution on the peak area of serotonin.

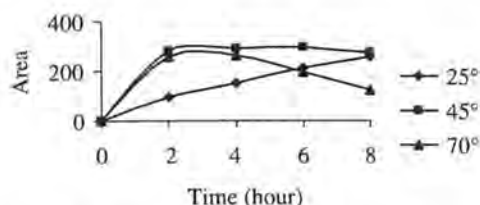


Figure 2. Effect of reaction time and temperature on the derivatization reaction of 5-HT with FITC on the peak area.

of the carbonate buffer in the range between 50 and 400 mM present in the reaction solution. Taking into account these results, a 100 mM carbonate buffer solution at pH 9 was selected for the rest of the experimental work.

Because organic solvents can enhance or quench the fluorescence emission of derivatized compounds (Wehry, 1990), the influence of different solvents of different characteristics such as acetone, acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran (THF) and dimethylformamide (DMF) has been selected for the present study. The selection was carried out based on the solubility of FITC.

It was observed that the best fluorescence signal intensity was obtained using acetone as organic solvent. The different percentages of acetone present in the media affect the emission, so a careful study between 15 and 60% was carried out. The signal intensity was similar when the reaction medium contained acetone percentages of 15–40%, while a reduction was observed with percentages over 50%. Thus, 20% acetone in the solution was selected for further experiments.

As reported previously (Yu and Dovichi, 1989), the derivatization reaction of primary and secondary amines using FITC is relatively slow, an incubation time usually being necessary for the derivatization reaction of 12 h. In order to shorten this longer reaction time, a carefully study of the reaction time as a function of different temperatures was carried out. As expected (Lalljie and Sandra, 1995), the rate of reaction of serotonin with FITC increased with increasing temperature. As it can be seen in Fig. 2, at room temperature (25°C), the reaction will be completed in 8 h while working at 45°C; the maximum fluorescence is reached in 2 h at 70°C but with this higher temperature a

decomposition of the derivatized products occurs with heating. As can be deduced from this figure, the derivatization of serotonin was practically completed after 2 h at 45°C, which is significantly smaller than other times and temperatures previously reported for this type of derivatization reaction.

Choice of electrophoretic conditions

Optimization of the electrophoretic conditions (concentration of buffer, applied voltage, injection time and length of capillary) was achieved through testing the migration behaviour, the highest sensitivity, the shortest analysis time and the shape of serotonin peak. First of all the buffer pH was varied from 8 to 11 in steps of 1, and the best efficiency was obtained with pH 9. Various buffers were investigated in an attempt to improve the resolution. Although several of the buffers showed some separation, borate/HCl at 15 mM was chosen.

The effect of the applied voltage was also investigated at 20–30 kV, resulting in selecting a running voltage of 25 kV. Increasing the injection time can further increase sensitivity of the developed procedure achieved. A detailed study of the injection time was carried out from 2 to 14 s and the best results were obtained at 12 s. The sample was introduced hydrodynamically with a pressure injection of 0.5 psi (1 psi = 6894.76 Pa) using silica capillaries (L_D 25 cm, L_T 32 cm) at 25°C.

Calibration curves by CE-LIF

The selection of all instrumental and experimental parameters permitted the optimum determination of the serotonin in 1 min. The quantitation by CE-LIF was carried out using measurements of peak areas and the calibration curve for serotonin was established. The linear dynamic range obtained was between 0 and 188 nM (correlation coefficient 0.995) with a detection limits of 16 nM and a RSD of 2–9%.

Application

Determination of neurotransmitter serotonin in biological fluids is of great importance for biomedical research, medical diagnostics and the pharmaceutical industry because it plays a very important role in control and regulation of a variety of functions in both the central and peripheral nervous systems.

The present method has been validated using an added-standard calibration which was used to identify and determine serotonin in urine samples. The use of added-standard calibration to validate the analytical method involves the existence of a constant bias, because a component of proportional error invalidates the accuracy check.

The urine samples were centrifugated at 3500 rpm and treated as indicated under 'derivatization reaction'. It is shown in Fig. 3 that the electropherograms of the blank correspond to the FITC derivatization reagent in the presence of 94 nM 5-HT. As can be observed, despite different peaks appearing in the derivatization reagent, they do not interfere with the 5-HT determination that can be done in 1 min free from any reagent interference.

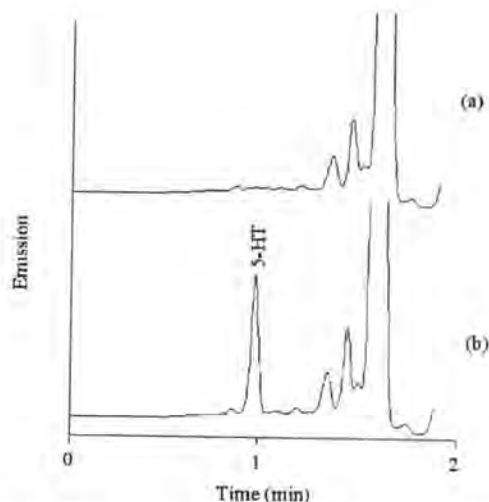


Figure 3. Electropherograms of the (a) FITC labelling reagent and (b) the FITC derivative with serotonin at 94 nM. Electrophoretic conditions: 15 mM borate/HCl at pH 9, applied voltage at 25 kV and 12 s injection time.

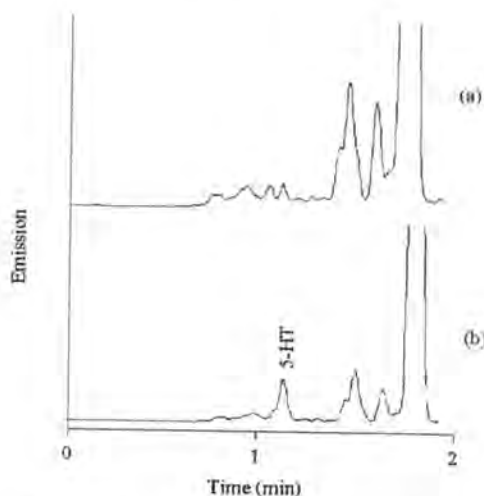


Figure 4. Application of the FITC derivative reaction to the determination of serotonin in urine samples. (a) Blank urine sample; (b) spiked urine sample with 94 nM 5-HT. Electrophoretic conditions: 15 mM borate/HCl at pH 9, applied voltage at 25 kV and 12 s injection time.

To check the similarity of the slopes Student *t*-test (Rodríguez *et al.*, 1995) was applied. The statistic for slopes calculated was 0.666 whilst the statistic for slopes tabulated was 2.776 at 4 degrees of freedom and $\alpha = 0.01$. Therefore, the slopes are essentially the same. The applicability of the proposed method was demonstrated by the analysis of 5-HT in human urine obtaining a concentration of 57 nM in control urine. As can be seen in Fig. 4, the peak corresponding to serotonin in the urine sample is clearly identified and permits its quantitation in real samples in only 1 min.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Ministerio de Ciencia y Tecnología (project BQU-03418) and the grant support of University of Granada (Apoyo Técnico a la investigación).

REFERENCES

- Albin M, Grossman PD and Moring SE. Sensitivity enhancement for capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* 1993; **65**: 489A.
- Arce L, Segura-Carretero A, Ríos A, Cruces C, Fernández-Gutiérrez A and Varcarel MJ. Use of calixarene compounds as selectivity modifiers in capillary electrophoresis separations. *Journal of Chromatography A* 1998; **816**: 243.
- Armstrong DW and He LF. Determination of cell viability in single or mixed samples using capillary electrophoresis laser-induced fluorescence microfluids systems. *Analytical Chemistry* 2001; **73**: 4551.
- Brumley WC and Kelliher V. Determination of aliphatic amines in water using derivatization with fluorescein isothiocyanate and capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology* 1997; **20**: 2193.
- Chen G, Cheng JS and Ye JN. Application of a novel micro-injector in the determination of indole derivatives in the rat pineal gland by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 2001; **370**: 930.
- Cheng YF and Dovichi NJ. Subattomole amino-acid analysis by capillary zone electrophoresis and laser-induced fluorescence. *Science* 1988; **242**(4878): 562.
- Cruces Blanco C. *Electroforesis Capilar*. Universidad de Almería, Spain, 1998.
- Cruces Blanco C, Carretero AS, Mata LG and Gutierrez AF. Simultaneous determination, by capillary zone electrophoresis of multiple components of different industrial products. *Chromatographia* 2001; **53**: 414.
- Fernández-Gutiérrez A, Cruces-Blanco C, Cortacero-Ramírez S and Segura-Carretero A. Sensitive determination of inorganic at trace levels in samples of snow waters from Sierra Nevada (Granada, Spain) by capillary ion electrophoresis using calyx[4]arene as selective modifier. *Chromatographia* 2000; **52**: 413.
- Flaherty S, Wark S, Street G, Farley JW and Brumley WC. Investigation of capillary electrophoresis-laser induced fluorescence as a tool in the characterization of sewage effluent for fluorescent acids: determination of salicylic acid. *Electrophoresis* 2002; **23**: 2327.
- Grahame-Smith DG. Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). *Quarterly Journal of Medicine* 1988; **67**: 459.
- Kema IP, de Vries EGE and Muskiet FAJ. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography B* 2000; **747**: 33.
- Lalljie SPD and Sandra P. Practical and quantitative aspects in the analysis of FITC and DATF amino-acid derivatives by capillary electrophoresis and LIF detection. *Chromatographia* 1995; **40**: 519.



- Mattusch J, Huhn G and Wennrich R. Sensitive laser-induced fluorescence detection of polyamine-fluoresceinisothiocyanate-derivatives after capillary zone electrophoretic separation. *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 1995; **351**: 732.
- Nouadje G, Nertz M, Verdeguer P and Couderc F. Ball-lens laser-induced fluorescence detector as an easy-to-use highly sensitive detector for capillary electrophoresis—application to the identification of biogenic-amines in dairy-products. *Journal of Chromatography A* 1995a; **717**: 335.
- Nouadje G, Rubie H, Chatelut E, Canal P, Nertz M, Puig P and Couderc F. Child cerebrospinal-fluid analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1995b; **717**: 293.
- Nouadje G, Simeon N, Nertz M *et al.* Capillary electrophoresis and laser induced fluorescence: Different detection modes and their application in analysis of highly sensible amines and amino acids. *Analisis* 1996; **24**: 360.
- Nouadje G, Simeon N, Dedieu F and Couderc F. Determination of twenty eight biogenic amines and amino acids during wine aging by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1997; **765**: 337.
- Paez X, Rada P, Tucci S, Rodriguez N and Hernandez L. Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection of amphetamine in the brain. *Journal of Chromatography A* 1996; **735**: 263.
- Pérez-Ruiz T, Martínez-Lozano C, Sanz A and Bravo E. Analysis of glutamate in beverages and foodstuffs by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Chromatographia* 2000; **52**: 599.
- Rodríguez I, Lee HK and Li SFY. Separation of biogenic amines by micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 1996; **745**: 255.
- Rodríguez LC, Campaña AMG, Barrero FA, Linares CJ and Ceba MR. Validation of an analytical instrumental method by standard addition methodology. *Journal of AOAC International* 1995; **78**: 471.
- Ruthven CRJ and Sandler M. *Chemical Diagnosis of Disease*, Brown SS, Mitchell FL and Young DS (eds). Elsevier: Amsterdam, 1979: 1217.
- Shintani H and Polansky J. *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*. Blackie: London, 1997.
- Tsai HC and Whang CW. Capillary electrophoresis of monoamines and catechol with indirect chemiluminescence detection. *Electrophoresis* 1999; **20**: 2533.
- Wehry EL. *Practical Fluorescence*, Guilbault GG (ed.). Dekker, New York, 1990; 135.
- Yu M and Dovichi NJ. Attomole amino-acid determination by capillary zone electrophoresis with thermo-optical absorbance detection. *Analytical Chemistry* 1989; **61**: 37.

ANEXO III

Quenched Phosphorescence Detection in Cyclodextrin-Based Electrokinetic Chromatography

Jacobus Kuijt,[†] David Arraez Roman,[‡] Freek Ariese,[†] Udo A. Th. Brinkman,[†] and Cees Gooijer[†]

Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Vrije Universiteit, de Boelelaan 1083, NL-1081 HV Amsterdam, The Netherlands, and Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Calle Severo Ochoa S/N 18071, Granada, Spain

Quenched phosphorescence detection is a sensitive detection method recently introduced in capillary zone electrophoresis. It is based on the dynamic quenching interaction of the analytes (quenchers) with a phosphorophore, 1-bromo-4-naphthalenesulfonate (BrNS), present in the separation buffer. In this study, it is shown that this detection method can also be used in cyclodextrin-based electrokinetic chromatography (CD-EKC) despite the presence in the buffer solution of cyclodextrins, which are known to reduce the luminescence quenching rate constants. Experiments indicate that BrNS mainly resides in the aqueous phase, while the analytes are distributed between both phases. In principle, the observed quenching might arise from the interaction of BrNS with uncomplexed as well as complexed analytes. However, from the dependence of the fractional quenching on the capacity factor (the normalized fractional quenching was found to be equal to the fraction of analyte in the aqueous phase), it was concluded that only aqueous-phase quenching contributes significantly to the observed quenching. Nevertheless, separation and detection can be regarded as fully compatible, because the capacity factors encountered in CD-EKC are generally low (in this study they ranged from about 0.1 to 2.5). Indeed, with nitroaromatic compounds as the target analytes, limits of detection in the 10^{-8} M range were achieved.

Since its introduction in 1984 by Terabe et al.¹ electrokinetic chromatography (EKC) has become an important capillary electrophoretic technique for the separation of neutral analytes. Initially, the technique made use of a micellar "pseudophase" in the separation buffer (MEKC), the separation being based on the partitioning of the analytes between the micellar and the aqueous phase. Subsequently, it was found that derivatized, anionic cyclodextrins (CDs) can also be used to separate neutral analytes² and this technique—cyclodextrin-based electrokinetic chromatog-

raphy (CD-EKC)—has been widely used ever since.^{2–5} In addition, much work was done on the use of charged (and uncharged) CDs for the separation of enantiomeric compounds.^{5–7}

As in other modes of CE, there is an obvious need for sensitive detection in CD-EKC. In previous papers, we introduced quenched phosphorescence detection in capillary zone electrophoresis (CZE) and obtained limits of detection (LODs) down to 10^{-8} M.^{8–10} In the present work, the coupling of CD-EKC and quenched phosphorescence detection was studied. The method is based on the dynamic quenching interaction between the analytes (quenchers) and the phosphorophore, 1-bromo-4-naphthalenesulfonate (BrNS). For this purpose, a manually switched buffer deoxygenation/sample injection device was constructed. The small buffer volume of this system was expected to provide rapid deoxygenation and, thus, short start-up times. Moreover, it allowed the use of expensive buffer constituents such as CDs.

The suitability of quenched phosphorescence detection for CD-EKC is far from evident: early studies on CD-induced phosphorescence reported partial protection against quenching by oxygen for compounds included in the cavity of the CD.^{11,12} More detailed reports on the protection of CDs against luminescence quenching by aqueous-phase quenchers have appeared in the literature also.^{13–15} Although the situation in our system is considered to be reversed, with the quenchers partly in the CD phase and BrNS in the aqueous phase, the protective effect can be similar.

- (3) Sepaniak, M. J.; Copper, C. L.; Whitaker, K. W.; Anigbogu, V. C. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2037–2041.
- (4) Szolar, O. H. J.; Brown, R. S.; Luong, J. H. T. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3004–3010.
- (5) Tanaka, Y.; Yanagawa, M.; Terabe, S. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1996**, *19*, 421–433.
- (6) Lurie, I. S.; Klein, R. F. X.; Dal Cason, T. A.; LeBelle, M. J.; Brenneisen, R.; Weinberger, R. E. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4019–4026.
- (7) Verleysen, K.; Sandra, P. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2798–2833.
- (8) Kuijt, J.; van Teylingen, R.; Nijbacker, T.; Ariese, F.; Brinkman, U. A. Th.; Gooijer, C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5028–5029.
- (9) Kuijt, J.; Brinkman, U. A. Th.; Gooijer, C. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1305–1311.
- (10) Kuijt, J.; Brinkman, U. A. Th.; Gooijer, C. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 1384–1390.
- (11) Scypinski, S.; Cline Love, L. J. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 322–327.
- (12) Scypinski, S.; Cline Love, L. J. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 331–336.
- (13) Hashimoto, S.; Thomas, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4655–4662.
- (14) Sadlej-Sosnowska, N.; Sliemiarczuk, A. *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, *138*, 35–40.
- (15) Evans, C. H.; De Feyter, S.; Vlaene, L.; van Stam, J.; De Schryver, F. C. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 2129–2135.

[†] Vrije Universiteit.

[‡] Universidad de Granada.

(1) Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 111–113.

(2) Terabe, S.; Ozaki, H.; Otsuka, K.; Ando, T. *J. Chromatogr.* **1985**, *332*, 211–217.

Nevertheless, sensitive detection was achieved using nitroaromatic compounds as the target analytes. These compounds were chosen because of their relevance in environmental analysis: nitropolyaromatic compounds are well known for their carcinogenic and mutagenic properties. In addition, their concentration levels are usually much lower than those of the parent PAHs. Sensitive detection methods are therefore required. GC and LC—combined with several detection methods—have been used most often,^{16–18} but MEKC separations with bile salts in the separation buffer have also been reported.^{19,20} Nitromonoaromatic compounds are also known for their toxicity; they are targeted in environmental analysis and for explosives detection using GC,^{21,22} LC,²³ and MEKC.^{24,25}

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. Carboxymethyl- β -cyclodextrin (CM- β -CD; degree of substitution 3.0–3.5) and 9-nitroanthracene (9-NA; ~95%) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Nitrobenzene (NB; 99+%), 2-nitrotoluene (2-NT; 99+%), 3-nitrotoluene (3-NT; 99%), 4-nitrotoluene (4-NT; 99%), 1,3-dinitrobenzene (1,3-DNB; 97%), 2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT; 97%), 2-nitrofluorene (2-NF; 98%), 1-nitronaphthalene (1-NN; 99%), 1-nitropyrene (1-NP; 99%), anthracene (99%), and γ -cyclodextrin were purchased from Aldrich (St. Louis, MO). Boric acid and methanol were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). For the preparation of standard solutions and buffers, demineralized and distilled water was used. 1-Bromo-4-naphthalenesulfonic acid was synthesized in house.⁸

Analytical Procedures. Fresh stock solutions of the target analytes (10^{-3} M in methanol) and buffers containing CM- β -CD were prepared weekly. Standard solutions in water/methanol (20:80 v/v) were prepared each day. For some experiments, water/methanol (50:50 v/v) was used. Buffers containing CM- β -CD and stock solutions were stored at 4 °C. The buffers were filtered over 0.2- μ m syringe filters (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Capillaries were rinsed for 15 min (1000 mbar) with 0.1 M NaOH at the start of each day.

Capillary Electrophoresis. A Prince CE system (Prince Technologies, Emmen, The Netherlands) was used with 50- or 75- μ m-inner diameter, uncoated capillaries (BGB Analytik, Anwil, Switzerland) with a total length of 120 cm and an effective length of 60 cm. Because of the adapted CE setup (vide infra), a negative voltage was applied to perform separations.

Detection. For detection, an LS-40 luminescence detector (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) was used in the time-resolved mode with a delay time of 0.05 ms and a gating time of 5.00 ms. Excitation of BrNS, present in the separation buffer, was performed at 294 nm and emission was collected by means of the

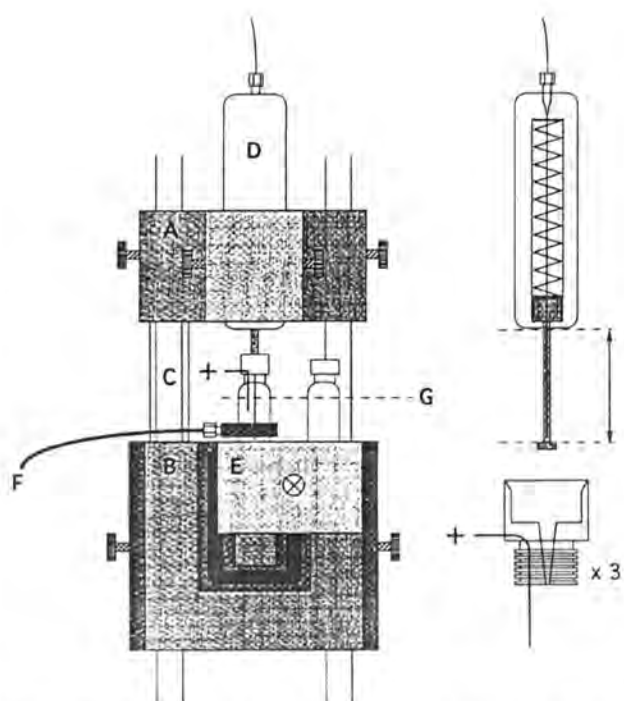


Figure 1. Manually switched buffer deoxygenation/sample injection device. (A, B) adjustable blocks; (C) spacer; (D) cylinder with capillary connection and spring-loaded piston; (E) two-position block; (F) nitrogen gas inlet; (G) liquid level. The inside of part D is drawn also to show the spring-loaded piston through which the capillary is led. The cap of the buffer vial is drawn in 3-fold enlargement to show the anode connection and the opening for the capillary in full detail.

Table 1. Typical CE Program Used for CD-EKC with Quenched Phosphorescence Detection

| step | vial position ^a | pressure (mbar) | voltage (kV) | duration (min) |
|------|----------------------------|-----------------|--------------|----------------|
| 1 | B | 0 | -20 | 2.0 |
| 2 | B—S | 0 | 0 | 0.1 |
| 3 | S | -50 | 0 | 0.1 |
| 4 | S—B | 0 | 0 | 0.1 |
| 5 | B | 0 | -20 | 20.0 |

^a B, buffer vial; S, sample vial.

total emission mirror (TEM) and 390 nm cutoff filter provided with the instrument.^{8,9} Electropherograms of CM- β -CD were obtained with a UV absorption detector (SpectraPhysics, Mountain View, CA) at 200 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Buffer Deoxygenation/Sample Injection Device. A device was designed to allow for injection of samples, while the deoxygenated buffer conditions required for obtaining phosphorescence were maintained (Figure 1). Deoxygenation of the separation buffer was achieved by purging with nitrogen gas. The nitrogen gas flow was continuously measured during experiments using a flow meter (Porter, Hatfield, PA). The CE program typically used is presented in Table 1. During step 1 of the program, a voltage is applied for 2 min, after which the positions of the vials are exchanged during step 2 to allow injection (step 3). During step

- (16) Hayakawa, K. *Biomed. Chromatogr.* **2000**, *14*, 397–405.
 (17) Schlemitz, S.; Pfannhauser, W. *Food Addit. Contam.* **1996**, *13*, 969–977.
 (18) Schlemitz, S.; Pfannhauser, W. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1996**, *203*, 61–64.
 (19) Jia, L.; Yan, J.; Gao, J.; Chen, X.; Hu, G.; Wang, Y.; Xu, M.; Wang, X. *Microchem. J.* **1998**, *59*, 364–371.
 (20) Jia, L.; Yan, J.; Gao, J.; Chen, X.; Wang, Y.; Hu, G.; Wang, X. *Anal. Lett.* **1998**, *31*, 1461–1472.
 (21) Walsli, M. E. *Talanta* **2001**, *54*, 427–438.
 (22) Einmrich, M.; Lahrz, T.; Spyrä, W. *J. Chromatogr., A* **2001**, *918*, 121–126.
 (23) Hilmi, A.; Luong, J. H. T.; Nguyen, A.-L. *J. Chromatogr., A* **1999**, *844*, 97–110.
 (24) Oehrl, S. A. *J. Chromatogr., A* **1996**, *745*, 233–237.
 (25) Wallenborg, S. R.; Bailey, C. G. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1872–1878.

Table 2. Nitrogen Flows Applied for Deoxygenation under Different CE Conditions

| capillary i.d. (μm) | [CM- β -CD] (M) ^a | current (μA) ^b | nitrogen flow (mL/min) |
|----------------------------------|------------------------------------|--|------------------------|
| 75 | 5.0 | -17 | 24 |
| 50 | 5.0 | -7 | 13 |
| 50 | 10.0 | -12 | 18 |
| 50 | 12.5 | -14 | 18 |
| 50 | 12.5 | -23 (-30 kV) | 24 |

^a Buffer: 25 mM borate, 1 mM BrNS, pH 8.5. ^b Separation voltage, -20 kV.

4, the vial positions are changed again, and next, the separation is started (step 5).

Since the LODs in phosphorescence detection are strongly dependent on the oxygen concentration in the separation buffer, one should quantify this parameter under various experimental conditions. When the buffer deoxygenation/sample injection device is used, the total oxygen production ($\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) in a fixed volume of deoxygenated buffer is equal to the influx of oxygen from outside and the oxygen produced at the anode

$$d[\text{O}_2]/dt = \varphi_{\text{ox}} + I/4FV \quad (1)$$

where φ_{ox} is the influx ($\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) of oxygen from outside, I the current ($\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$) generated during separation, F the Faraday constant ($\text{C}\cdot\text{mol}^{-1}$), and V the volume (L) of the buffer. The number of oxygen molecules generated per second equals $I/4$, since 4 electrons are required to produce 1 oxygen molecule.¹⁰ Thus, division by F and V gives the number of moles per liter per second. Equation 1 is slightly different from that used before, because of differences in the setups used. In the former setup, deoxygenated buffer flowed through the interface (anode), where oxygen is generated during electrophoresis, resulting in a steady-state oxygen concentration.¹⁰ To obtain a low oxygen concentration in the present setup, the nitrogen gas flow used for deoxygenation must be high enough to counterbalance both contributions from eq 1. It was observed that the influx of oxygen from outside can be quite high during exchange of the vial positions, when the buffer is exposed more directly to the outside air. As a result, the phosphorescence signal directly after the electroosmotic flow (EOF) signal can become smaller; however, the effect is eliminated almost completely when an adequate nitrogen flow is used. The flow required is also dependent on the buffer system, separation voltage, and inner diameter of the capillary used, since they determine the current that is generated. Nitrogen gas flows found to be adequate for different separation conditions are presented in Table 2.

After filling the capillary, a voltage can be applied and a stable baseline is obtained within only 20 min due to the small buffer volume. This is a significant improvement compared to the system we used before to couple CZE and quenched phosphorescence (start-up time, 2 h).¹⁰

Determination of Capacity Factors. In this section, equations are given for the calculation of the capacity factors, K' , (and the fractions of analytes in the aqueous phase, R) for neutral and anionic compounds. For the neutral compounds, k' values have

to be known to establish the dependence of the detection sensitivity on the degree of inclusion in the CD phase. The equations for anionic compounds are needed to determine in which phase(s) the phosphorophore, BrNS, will be present. The capacity factor in a CD-EKC system is given by

$$K' = n_{\text{CD}}/n_{\text{aq}} = K(V_{\text{CD}}/V_{\text{aq}}) \quad (2)$$

where n_{CD} and n_{aq} are the number of molecules in each phase and V_{CD} and V_{aq} are the corresponding volumes; K is the distribution coefficient for the partitioning process. The capacity factor is related to the fraction of the analytes in the aqueous phase, R , by the well-known equation $R = 1/(1 + k')$. For neutral compounds, mobility is induced only during the time they are in the (negatively charged) CD phase. The induced mobility, μ_{ind} ($\text{cm}^2 (\text{V}\cdot\text{s})^{-1}$), is therefore given by

$$\mu_{\text{ind}} = (1 - R)\mu_{\text{CD}} \quad (3)$$

where μ_{CD} is the mobility of the CD. Upon rearrangement this gives¹

$$R = (\mu_{\text{CD}} - \mu_{\text{ind}})/\mu_{\text{CD}} \quad (4)$$

For anionic compounds, the mobility in the presence of CD, $\mu_{\text{i,CD}}$, is given by²⁶

$$\mu_{\text{i,CD}} = R\mu_{\text{i,fs}} + (1 - R)\mu_{\text{CD}} \quad (5)$$

where $\mu_{\text{i,fs}}$ is the mobility of the anion in the absence of CD, i.e., in free solution. Rearranging gives

$$R = (\mu_{\text{i,CD}} - \mu_{\text{CD}})/(\mu_{\text{i,fs}} - \mu_{\text{CD}}) \quad (6)$$

In these equations, it is assumed that inclusion of a guest molecule does not significantly change the mobility of the CD.^{26,27} The mobilities are all intrinsic values, i.e., values corrected for μ_{EO} (mobility induced by electroosmosis). With phosphorescence detection in CE, μ_{EO} can easily be determined because t_{EO} is marked by a large dip in the baseline, due to the fact that the samples are not deoxygenated.⁸⁻¹⁰ Unfortunately, it is well known that the determination of μ_{CD} is the main problem in calculating capacity factors in CD-EKC.^{2,3} This is because the derivatized CDs are in general complex mixtures with different degrees of substitution and different positional isomers, although one recent report describes the use of single-isomer anionic CD derivatives.²⁷ Indirect absorption detection has been used in CE to characterize charged CDs, but an average value of μ_{CD} was not provided in that study.²⁸ Approximate values for the mobilities of charged CDs

(26) Khalefi, M. G.; Smith, S. C.; Strasters, J. K. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1820-1830.

(27) Culha, M.; Fox, S.; Sepaniak, M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 88-95.

(28) Tail, R. J.; Skanchy, D. J.; Thompson, D. P.; Chetwyn, N. C.; Dunshie, D. A.; Rajewski, R. A.; Stella, V. J.; Stobaugh, J. F. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1992**, *10*, 615-622.

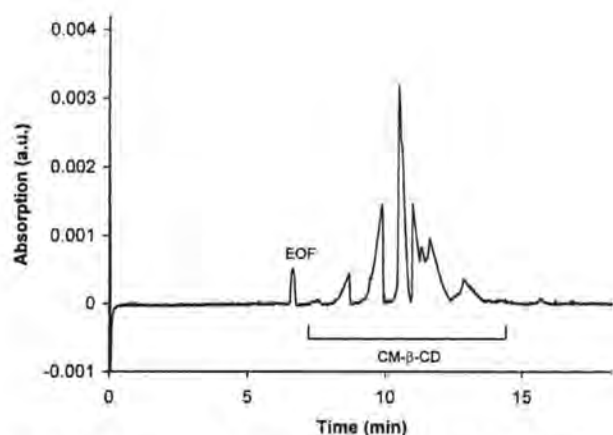


Figure 2. Electropherogram of 10 mM CM- β -CD. Buffer, 25 mM borate, pH 8.5; separation voltage, -20 kV; detection, UV absorption at 200 nm; EOF, electroosmotic flow signal.

have been inferred from the induced mobility of anthracene, based on the assumption that inclusion of this hydrophobic compound in the CD cavity is almost complete.³

We observed that the anthracene peak shifted toward the front of the electropherogram when the methanol content of the injected anthracene solution was increased. Consequently, μ_{CD} may be underestimated when this procedure is used. Instead, we recorded electropherograms of CM- β -CD to obtain μ_{CD} , using direct UV absorption detection at 200 nm. An electropherogram of 10 mM CM- β -CD, obtained with a 25 mM borate, pH 8.5 buffer, is presented in Figure 2. To calculate the average value of μ_{CD} , the center of mass of the cluster of peaks was determined from the electropherograms. To this end, the areas of the peaks were corrected for the migration time (division by t_i) and for their estimated degree of substitution; the latter correction is needed because the absorption at 200 nm is dominated by the carboxymethyl groups. It was assumed that the degree of substitution is roughly proportional to the observed mobilities.²⁷ The average value of μ_{CD} was thus estimated to be $3.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 (\text{V}\cdot\text{s})^{-1}$ (RSD: 1.3%; $n = 4$). It should be noted that the buffer used to determine μ_{CD} is not exactly the same as the buffer used in the actual separations, to which BrNS (1 mM) and CM- β -CD (concentrations from 5 to 12.5 mM) were added. Consequently, the mobility determined in this way might be higher than in the buffer used to separate the test compounds, due to the lower ionic strength.²⁹ BrNS was not added because it interferes with absorption detection of the weakly absorbing CM- β -CD. Moreover, electropherograms of 50 mM CM- β -CD, recorded with 5 mM CM- β -CD in the separation buffer, showed a broad featureless peak, inhibiting reliable determination of μ_{CD} . However, the calculated mobility obtained in this way was similar to the above value, which indicates that the addition of CM- β -CD does not exert a large influence on μ_{CD} .

Separation of Test Analytes. For a first assessment of the feasibility of our technique, four nitropolyaromatic compounds were used as test analytes: 1-NN, 2-NF, 9-NA, and 1-NP. Electropherograms obtained with a 25 mM borate, 1 mM BrNS, 5

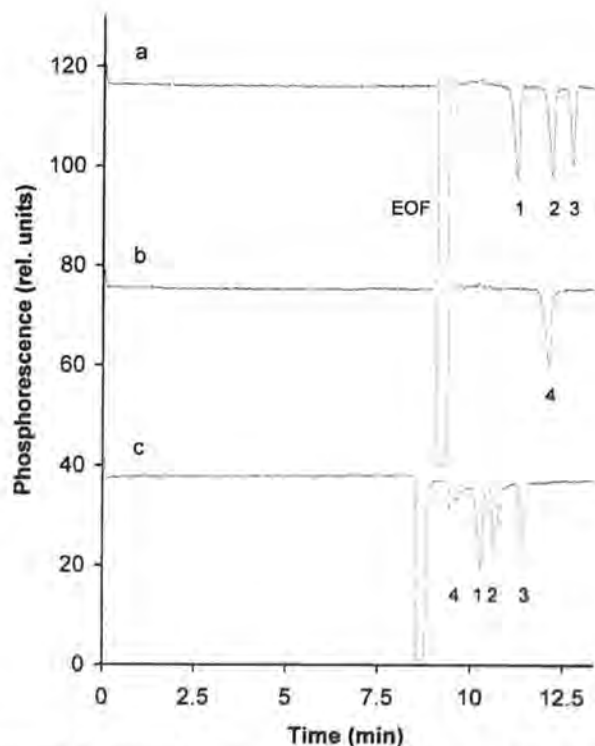


Figure 3. Electropherograms of selected nitropolyaromatic compounds ($\sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) detected with quenched phosphorescence. **1**, 1-Nitronaphthalene; **2**, 9-nitroanthracene; **3**, 2-nitrofluorene; **4**, 1-nitropyrene. EOF, electroosmotic flow signal; separation voltage, -20 kV (-17 μA). Buffer: (a) and (b) 25 mM borate, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, pH 8.5; (c) 25 mM borate, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, 0.5 mM γ -CD, pH 8.5.

mM CM- β -CD buffer at pH 8.5, using a 75- μm -i.d. capillary, are shown in Figure 3 (traces a and b). 1-NN (K , 0.57), 9-NA (K , 0.98), and 2-NF (K , 1.30) were separated, but 1-NP (K , 0.96) almost completely overlapped with 9-NA. The hydrophobic polyaromatic moieties of 1-NN and 2-NF fit well into the cavity with the nitro group remaining outside, which is energetically the most favorable situation. Nevertheless, the capacity factor of 1-NN is rather low because this compound is not very hydrophobic. For 9-NA and 1-NP, the hydrophobic part of the molecule will be partially excluded from the cavity, which explains the relatively small interaction of these strongly hydrophobic compounds with the CD. In accordance with this explanation, addition to the separation buffer of a small amount of underivatized γ -CD—which has a larger cavity—resulted in a strong shift of the 1-NP and 9-NA peaks toward the front of the electropherogram. Thus, all four compounds were separated when 0.5 mM γ -CD was added to the buffer. However, the peak for 1-NP became ~ 2 -fold broader and showed significant tailing (Figure 3, trace c), which may be due to slow mass transfer from the hydrophobic CD cavity to the aqueous phase.³

The LODs (3σ ; root-mean-square noise) were determined using a standard with low concentration ($2 \times 10^{-7} \text{ M}$), because the response in quenched phosphorescence detection is linear over a relatively short concentration range. This can be read from the rearranged form of the well-known Stern–Volmer equation ($I_0/I = 1 + k_q[Q]\tau^0$), in which the fractional quenching, $(I_0 - I)/I_0$, is

(29) Kuhn, R.; Hoffstetter-Kuhn, S. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*; Springer: Berlin, 1993; Chapter 3.

given by

$$\frac{I_0 - I}{I_0} = \frac{k_q [Q] \tau^0}{1 + k_q [Q] \tau^0} \quad (7)$$

where I and I_0 are the phosphorescence intensities in the presence and absence of quencher, respectively, and k_q is the bimolecular quenching rate constant, $[Q]$ the quencher (analyte) concentration, and τ^0 the phosphorescence lifetime in the absence of quencher. A plot of the fractional quenching versus the product $k_q [Q] \tau^0$ is linear only for low values of this product.⁹

The LODs were found to be $\sim 2 \times 10^{-8}$ M for all test analytes, although a slight dependence on the capacity factor was observed. These values are close to the lowest LODs obtained in CZE with quenched phosphorescence detection (1×10^{-8} M).⁹ When 0.5 mM γ -CD was present in the separation buffer, the LOD of 1-NP was increased ~ 3 -fold, i.e., to 6×10^{-8} M. Electropherograms of nitropolyaromatic compounds were also obtained using 50- μ m-i.d. capillaries. In this case, the relative noise of the baseline is increased, which will lead to higher LODs. Nevertheless, concentration LODs were still as low as $\sim 5 \times 10^{-8}$ M, while absolute LODs were ~ 0.1 pg for all compounds. An advantage of using 50- μ m-i.d. capillaries is the better long-term baseline stability, which is due to the smaller nitrogen flow required for deoxygenation (cf. Table 2).

As a second example, six nitromonoaromatic compounds (1,3-DNB, 2,4-DNT, NB, 4-NT, 2-NT, 3-NT) were subjected to CD-EKC (-20 kV). All these compounds easily fit into the cavity of the CM- β -CD with their nitro groups outside. Nevertheless, smaller k' values can be expected since they are less hydrophobic than the nitropolyaromatic compounds. Indeed, with a 25 mM borate, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, pH 8.5 buffer, k' values ranged from 0.07 to 0.48. The peak of 1,3-DNB partially overlapped with the EOF signal, and 4-NT and 2-NT also showed overlap (Figure 4, trace a).

The separation was improved by increasing the concentration of CM- β -CD (Figure 4, traces b and c), which increased k' for all compounds without changing the migration order and resulted in better resolution. When 12.5 mM CM- β -CD was used in the separation buffer, 4-NT and 2-NT were resolved almost completely, but the analysis time was significantly increased. As shown in trace d of Figure 4, the analysis time can be reduced while the increased resolution as well as the migration order is maintained, by using a higher voltage (-30 kV). However, an adequate separation was achieved also by using 10 mM CM- β -CD (Figure 4, trace b). Figure 4 also serves to illustrate the room for optimization of separations in CD-EKC with quenched phosphorescence detection. Higher concentrations of CM- β -CD lead to higher currents and, consequently, to increased oxygen production at the anode during electrophoresis. This in turn leads to a decrease in the phosphorescence background and quenching efficiency,^{9,10} both resulting in increased LODs. However, as can be observed from Figure 4, the effect of increased CM- β -CD appears to be small over the concentration range considered here. In other words, separations can be optimized without seriously compromising the detection. With a 25 mM borate, 1 mM BrNS, 10 mM CM- β -CD, pH 8.5 buffer, LODs of $(4-5) \times 10^{-8}$ M were obtained for all nitromonoaromatics, except 2-NT (8×10^{-8} M). That is, quenched

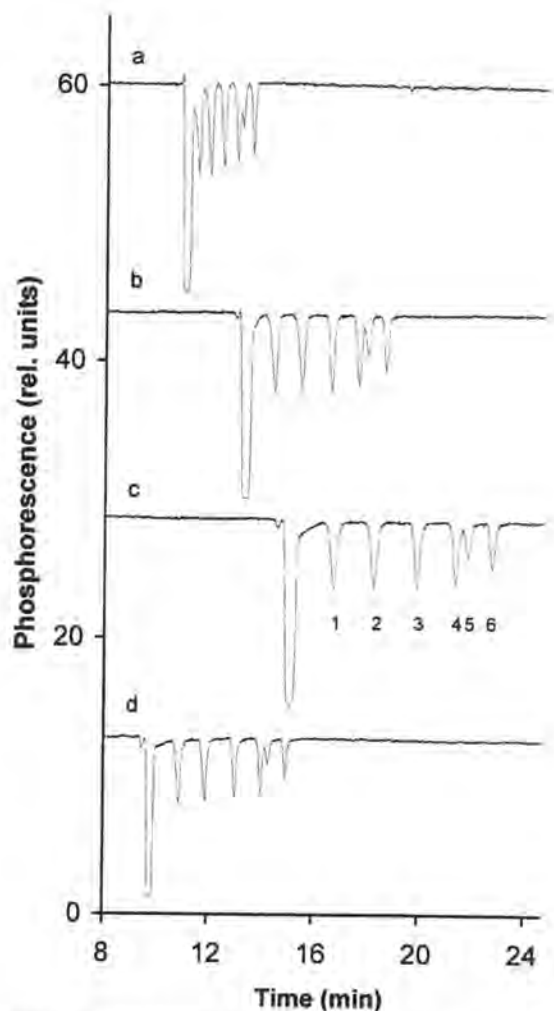
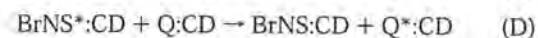
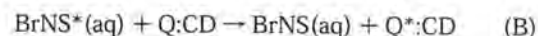


Figure 4. Electropherograms of selected nitromonoaromatic compounds ($\sim 1 \times 10^{-6}$ M) detected with quenched phosphorescence. 1, 1,3-Dinitrobenzene; 2, 2,4-dinitrotoluene; 3, nitrobenzene; 4, 4-nitrotoluene; 5, 2-nitrotoluene; 6, 3-nitrotoluene. Buffer: 25 mM borate, 1 mM BrNS, pH 8.5 with (a) 5 mM CM- β -CD; (b) 10 mM CM- β -CD; (c) and (d) 12.5 mM CM- β -CD. Separation voltage: -20 kV, except for trace d, -30 kV. For currents, see Table 2.

phosphorescence is ~ 10 -fold more sensitive for these compounds than UV absorption detection in CE.²⁴

Quenching Mechanism and Sensitivity. The favorable LODs obtained in this study indicate that quenching is efficient, even when CDs are present. In this section, an explanation for this will be provided. In principle, four mechanisms are possible for the quenching of the BrNS phosphorescence by a quencher, Q, in the presence of CM- β -CD:



Mechanism A describes free solution quenching. This has been

shown to occur at diffusion-limited rates for various compounds, resulting in sensitive detection in CZE.^{8–10} Mechanism B may well contribute much less to the overall quenching process than does mechanism A because of shielding by the CD molecules. Several detailed studies on luminescence quenching of luminophores included in CDs by aqueous-phase quenchers have been published.^{13–15} Most of these discuss fluorescence quenching,^{13,14} but phosphorescence quenching has also been studied.¹⁵ It was proposed that the quenching mechanism—whether being long range or short range in nature—and the degree of screening by the host molecule determine the reduction of the quenching efficiency.¹³ Triplet quenching by electron transfer of α -terthiophene included in β -CD was observed to be reduced 3–4 fold.¹⁵

To investigate whether mechanism B plays a significant role, the dependence of k_q on k' was measured for the test compounds and anthracene. The former group induces phosphorescence quenching of BrNS by electron transfer while anthracene causes quenching by triplet–triplet energy transfer. All compounds can be assumed to yield diffusion-controlled quenching, although some scatter in the data may be induced by this assumption for the nitromonoaromatics, because of the influence of substituents on the quenching rate constants.^{30,31} To obtain the observed (average) quenching rate constant, $k_{q,av}$, in a system containing CDs, it is assumed that $k_{q,av}$ is equal to the weighted average of the quenching rate constants in the aqueous and CD phase. The weighing factors are given by the fraction of quenchers in both phases (R and $(R - 1)$ for the aqueous and CD phase, respectively). From this, and from comparison with eq 5, it is clear that

$$k_{q,av} = Rk_{q,fs} + (1 - R)k_{q,CD} \quad (8)$$

where $k_{q,fs}$ and $k_{q,CD}$ are the quenching rate constants for quenchers in the aqueous (“free solution”) and CD phase, respectively. In the special case that $k_{q,CD}$ is negligibly small compared to $k_{q,fs}$, eq 8 becomes

$$k_{q,av} = Rk_{q,fs} \quad (9)$$

Since at low quencher concentration the bimolecular quenching rate constant, k_q , is proportional to the fractional amount of quenching (see eq 7), $(I_0 - I)/I_0$ can be taken as a measure of k_q . Figure 5 shows the experimentally found dependence of $(I_0 - I)/I_0$ on the fraction of quencher in the aqueous phase, R . The values of $(I_0 - I)/I_0$ were normalized to give unity for $R = 1$. In Figure 5a, the results for the nitropolyaromatic compounds and anthracene are presented. Clearly, the fit through the data points ($y = 0.9943x + 0.0057$; $r^2 = 0.85$) closely resembles the theoretical line $y = R$ as predicted by eq 9, with y being the normalized fractional quenching. Therefore, it can be concluded that quenching by analytes in the CD phase does not significantly contribute to the overall quenching. This conclusion is confirmed by the results obtained for the nitromonoaromatics (Figure 5b): in this

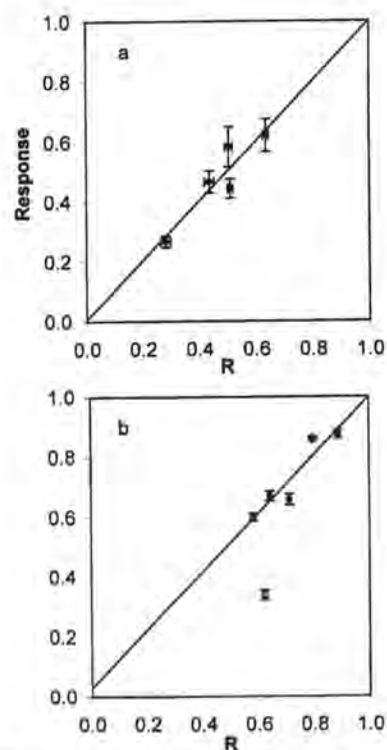


Figure 5. Response (normalized fractional quenching) as a function of the fraction of quencher in the aqueous phase. (a) Nitropolyaromatic compounds and anthracene: buffer, 25 mM borate, 1 mM BrNS, 5 mM CM- β -CD, pH 8.5; capillary i.d., 75 μ m. (b) Nitromonoaromatic compounds: buffer, 25 mM borate, 1 mM BrNS, 10 mM CM- β -CD, pH 8.5; capillary i.d., 50 μ m.

case, the fit through the data points is given by the line $y = 0.9705x + 0.0295$ ($r^2 = 0.88$). The outlying result for 2-NT was not included in the fit. For this compound, the sensitivity is \sim 2-fold less than for the other nitromonoaromatics, which may be due to steric hindrance (ortho effect).³⁰ On the other hand, such a steric effect was not observed for the quenching of BrNS by 2-, 3-, and 4-nitrophenol: similar responses were obtained for these compounds.

Mechanisms C and D can probably be excluded, since BrNS is expected to have poor interaction with CM- β -CD because of electrostatic repulsion (both molecules are negatively charged). This assumption is supported by the following observations: first, the observed phosphorescence lifetime, τ^0 , was \sim 300 μ s, which is very similar to that in buffer systems without CDs under similar electrophoretic conditions.⁸ In other words, no protective effect of the CDs on the phosphorophore was observed, which points to poor complexation of BrNS with CM- β -CD. Second, the mobilities of BrNS in the presence and absence of 5 mM CM- β -CD (25 mM borate buffer, pH 8.5) were found to be equal within experimental error; values of 2.7×10^{-4} and 2.8×10^{-4} $\text{cm}^2 (\text{V}\cdot\text{s})^{-1}$ were obtained for $\mu_{i,CD}$ and $\mu_{i,fs}$, respectively, again suggesting that the degree of inclusion of BrNS in the CD phase is close to zero. Therefore, mechanisms C and D can probably be excluded. It should be noted that mechanism D is also ruled out by the observation that mechanism B does not play an important role, since in both cases the quenchers are included in the cavity of the CD; obviously, mechanism D is even more unlikely because

(30) Chapman, N. B.; Shorter, J., Eds. *Advances in Linear Free Energy Relationships*; Plenum Press: London, 1972; Chapters 1 and 2.

(31) Ramaraj, R.; Mahesh Kumar, V.; Retna Raj, C.; Ganesan, V. *J. Inclusion Phenom.* 2001, 40, 99–104.

in this case the phosphorophore is included in the CD phase also. Thus, the overall conclusion is that quenching predominantly occurs in the aqueous phase.

The above conclusion is in marked contrast to that of a recent study on the quenching behavior of nitromonoaromatic compounds in the absence and presence of β -CD.³¹ Here, it was concluded that the quenching of a tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) complex was not significantly reduced by the β -CD because the nitro groups are not included in the CD. However, in our opinion, this conclusion is not justified, since the authors also reported that the interaction of these quenchers with β -CD was rather weak (K_f typically ~ 100). This implies that the largest fraction of the quenchers will be present in the aqueous phase. Therefore, it is not surprising that the observed quenching rate constants are not much lower than those obtained in the absence of CDs. In other words, the data do not conflict with our conclusion that aqueous-phase quenching is the most important mechanism in the phosphorophore/quencher/CM- β -CD system. Moreover, it should be noted that the inhibition of efficient quenching can be even stronger for CM- β -CD than for neutral β -CD, because of electrostatic repulsion between the negatively charged BrNS and CM- β -CD.

CONCLUSIONS

The use of quenched phosphorescence detection in CE, which until now was restricted to charged analytes (CZE), has been extended to the detection of neutral analytes by using CD-EKC as the separation technique. Although efficient quenching appears to be restricted to the aqueous phase, quenched phosphorescence detection can provide sensitive detection in CD-EKC with LODS of $\sim (2-5) \times 10^{-8}$ M, due to the low-capacity factors encountered. For a more detailed study of the quenching interaction in the presence of CDs, it may be advantageous to use single-isomer charged CD derivatives, which recently became commercially available.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dick van Iperen and Klaas van Altena for designing and constructing the buffer deoxygenation/sample injection device and the Dutch Foundation for the Advancement of Science (NWO) for financial support (Grant 344-006).

Received for review April 25, 2002. Accepted July 5, 2002.

AC020270V

ANEXO IV

Journal: Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC), sent for publication.

Interfacing capillary electrophoresis and surface-enhanced resonance Raman spectroscopy for the determination of dye compounds

D. ARRÁEZ ROMÁN^{1*}, E. EFREMOV^{2*}, F. ARIESE², A. SEGURA CARRETERO¹ AND C. GOOIJER²

¹*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/ Fuentenueva s/n E-18071 Granada, Spain*

²*Department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Laser Centre, Vrije Universiteit Amsterdam, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands*

*These authors contributed equally to this work

Abstract

The at-line coupling of capillary electrophoresis (CE) and surface-enhanced resonance Raman spectroscopy (SERRS) was optimized for the separation and subsequent spectroscopic identification of charged analytes, using the dyes Basic Red 9, Acid Orange 7 and Food Yellow 3 as test compounds. After CE separation in a 20 mM borate buffer at pH = 10, Raman detection was done following deposition of the electropherogram on a moving substrate. To this end a new interface was developed using a stainless steel needle as (grounded) cathode. The outlet end of the CE capillary was inserted into this metal needle; CE buffer touching the needle tip served as electrical connection for the CE separation. A translation table was used to move the TLC plate at a constant speed during the deposition. The distance between the tip of the fused silica column and the TLC plate was kept as small as possible to establish a constant bridge-flow, while avoiding direct contact.

After deposition, concentrated silver colloid was added to each analyte spot, followed by irradiation with 514.5 nm light from an argon ion laser to record the SERRS signal using a Raman microscope. Different types of silver colloids were tested; Lee-Meisel type (citrate), borate and gold-coated silver. Basic Red 9 (positively charged) gave much more intense SERRS spectra than the two negative dyes. Unexpectedly, even for the negatively charged dyes the citrate-coated Lee-Meisel colloid yielded the most intense SERRS spectra. The CE—SERRS system was used to separate and detect the negatively charged dyes.

Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation technique that is usually coupled to UV absorption or fluorescence detectors for quantification purposes or to a mass spectrometer (MS) if identification is the main issue [1,2]. For identification or peak identity confirmation a detection technique complementary to MS would be welcome. Raman spectroscopy (RS) is a laser-based technique that has become a versatile analytical tool in the last decade, mainly because of recent instrumental developments in the field of laser technology and detection systems [3-5]. Raman signals are obtained by irradiating a sample with monochromatic radiation and measuring the small portion of inelastically scattered radiation. Its vibrational information has, in principle, an analyte identification potential similar to that of IR spectroscopy. Interestingly, in contrast to IR, RS can also be used for aqueous solutions, which is highly beneficial for on-line detection in reverse-phase LC and CE.

A major disadvantage of RS is its low sensitivity [6], due to the inherently low probability of the Raman scattering process (small cross section). In order to improve the sensitivity of RS, special modes can be exploited, such as Resonance Raman Spectroscopy (RRS) and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) or even their combination, Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy (SERRS). Resonance enhancement can be achieved if the excitation wavelength of the laser overlaps with an electronic absorption band of the analyte. The signal enhancing mechanism is the coupling of some vibrations to an electronic transition; the sensitivity gain over conventional RS can be a factor of 10^3 . For surface enhancement the analytes have to be adsorbed on a metallic substrate with a sub-micrometer roughness, usually a silver colloid. In favourable cases the signal is intensified with a factor of 10^5 - 10^6 without a serious simultaneous increase of the background: the silver particles also cause fluorescence quenching [7,8]. Unfortunately, SERS is less widely applicable than conventional RS since not all analytes adsorb well to the silver colloid particles. However, for adsorbing compounds, spectacular results have been reported, especially in cases where resonance and surface enhancement effects are combined (SERRS) [9].

In recent years much effort has been devoted to the combination of CE and SER(R)S [10,11]. Sepaniak and co-workers performed on-line CE—SERS by using run buffers containing colloidal silver [12]. More recently, the same group studied an at-line approach by depositing the CE effluent onto a SERS-active substrate using electro-filament transfer, while a coaxial liquid sheath provided the electrical contact [8]. He et al. [13] developed at-line CE—SERS by adapting the metallized outlet capillary designed by Sweedler to achieve electrical contact [14]. This metallic coating is easily made by removing the outer coating from the last few mm of the capillary tip and applying conducting silver paint [10], but in our experience this setup was not very robust (especially when cleaning the capillary with NaOH) and electrical contact was often lost during the experiments.

In the present paper, CE is coupled with SERRS in the at-line mode using a stainless steel needle as (grounded) cathode and thin layer chromatography (TLC) plates as substrates. Silver sol is applied to the deposited spots for SERRS analysis. Different types of silver colloids were tested: Lee-Meisel type (citrate), borate and gold-coated silver. Also the charge of the analyte was expected to have a major impact on the SERRS intensities [15,16]. The following dyes were used as model compounds: Basic Red 9, Acid Orange 7, and Food Yellow 3 (see Fig. 1 for structures and abbreviations used in this paper).

Experimental

Reagents

Molecular structures of the dyes, Basic red 9 (CI 42500), Acid Orange 7 (CI 15510), and Food Yellow 3 (CI 15985), are shown in Fig. 1. These dyes show a moderately strong absorption at 514.5 nm, but the Raman excitation line does not coincide with their absorption maxima, see Fig. 1. Stock solutions of 1 mg/mL were prepared by dissolving the required amount of the analyte in doubly distilled water. Aliquots of these stock solutions were used to prepare calibration standards. All solutions were kept in a refrigerator at 4 °C; diluted solutions were prepared fresh daily. Borate buffer, a mixture of boric acid and disodium tetraborate (20 mM, pH 10, Baker Analyzed® Reagents) and tetraethylammonium hydroxide solution (1 mM) from Sigma Aldrich were selected for the CE separation. All solutions were filtered through a 0.45 μm membrane filter before injection into the equipment.

Figure 1

Three types of silver colloids were used: citrate (Lee and Meisel); borate, and gold-coated silver. For the citrate reduction [17], 45 mg of AgNO_3 was brought to boiling in 250 ml water and 5 ml of a 1 % (v/w) trisodium citrate dihydrate solution was added. The solution was kept boiling for 1 hour. The sodium borohydride reduction was carried out as described by Creighton [18]. 18 ml of 2.2 mM AgNO_3 was added dropwise to 150 ml of a 1.2 mM ice-cold sodium-borohydride solution. The mixture was stirred for 45 minutes. Afterwards, 18.7 ml of a 3.9 mM solution of trisodium citrate dihydrate was added. The Au-coated Ag sols were made as described by Rivas et al [19] by dropwise adding different aliquots (between 0.2 ml and 1.5 ml) of a 0.3 mM HAuCl_4 -solution to 20 ml of a preformed citrate-reduced silver sol (see above). After addition of an appropriate amount of sodium citrate solution, the mixture was boiled and stirred for five minutes.

All colloids were preconcentrated by means of centrifugation at 6000 rpm for 30 min; the most concentrated fraction (ca. 3 %) at the bottom was removed with a pipette and stored for future use; the more diluted supernatants were discarded.

Instrumental setup

A PrinCE CE system (Lauerlabs, Emmen, the Netherlands) was used with on-line UV detection at 500 nm (model SP8480XR, Spectra-Physics, Mountain View, CA, USA). A 75- μm inner diameter fused silica capillary was used with 100 cm total length and a window for absorption detection at 82 cm from the inlet. Samples were introduced hydrodynamically, by applying a pressure injection of 50 mbar for 10 s over the capillary. Capillary conditioning was carried out by flushing the columns for 1 min with 0.1 M sodium hydroxide, then for 2 min with water, and finally for 4 min with the separation buffer. In order to allow for deposition of the separated compounds, the outlet buffer vial had to be removed. The capillary outlet was fitted inside a stainless steel needle that also served as electrical contact (see Fig. 2A). The deposition process and needle distance were constantly monitored using a 12x magnifying video camera; optimization of the height of the needle above the substrate will be described below. A

modified Camag (Muttens, Switzerland) Linomat III translation table was used to move the TLC plate during the effluent deposition. Silica TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany) with aluminium backing and fluorescence indicator were used as deposition substrate.

The Raman set-up consisted of a Spectra Physics Series 2000 argon ion laser, a Spectra Physics Model 336 beam expander, a Zeiss (Oberkochen, Germany) UEM microscope optically coupled to a SPEX (Metuchen, NJ, USA) 1877 triplemate monochromator and a CCD camera (Andor Technology, Model DV420-OE, Belfast, UK). For a schematic representation of the Raman set-up see Fig. 2B.

Figure 2

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of electrophoretic conditions.

An analyte mix of the three dyes at a concentration of 35 mg/L each was prepared. The electrophoretic conditions (concentration of tetraethylammonium, concentration of buffer, applied voltage) were optimized based on the following criteria: migration behaviour, sensitivity, analysis time and peak shape. First the tetraethylammonium concentration was varied from 0.1 to 9 mM in order to optimize the shape of the first peak (BR9, positively charged dye). A strong influence on the peak shape was observed and the presence of tetraethylammonium was found to be essential. Ultimately a concentration of 1 mM was chosen. The buffer pH was varied from 7 to 11 in steps of 1; the pH was also found to influence the peak shape for the three dyes studied. In general, at higher pH narrower peaks were obtained and the best resolution and peak shape was obtained with pH 10. The concentration of borate buffer was varied from 10 to 80 mM in an attempt to improve the resolution and minimize the analysis time; finally 20 mM was selected. The applied voltage was varied between 10-30 kV and a voltage of 20 kV was selected. The CE separation under these optimized conditions is shown in Fig. 3. With this CE configuration (positive voltage to the inlet buffer, outlet grounded) the positively charged dye (BR9) migrated faster than the electro-osmotic flow (EOF), whereas the negatively charged dyes migrated slower.

Figure 3

Deposition procedure (interface)

Deposition onto the moving TLC plate was started at a predetermined delay time after the first analyte passed the UV detector. An interface was developed, in which the outlet of the capillary was inserted into a stainless steel needle for improved ruggedness. The needle supplied the electrical connection, through wetting of the end of needle tip with separation buffer (see Fig. 2A) Silica plates have an excellent water absorption capacity (no extensive spreading of liquid over the surface), which resulted in relatively small analyte spots. The deposited CE traces had a width of ca 1 mm, and the analyte spots a length of ca 2 mm, with some dependence on the translation speed of the TLC plate. Typically a translation speed of 6 mm/min was used.

The needle tip of the capillary should not touch the TLC plate, since otherwise silica particles can be scraped off from the surface, enter the capillary and disturb the electric

current. On the other hand, the distance between the capillary outlet and the moving plate should be as small as possible in order to deposit the effluent in a narrow trace on the TLC plate. If not, there is a risk of the effluent accumulating at the tip of the capillary, forming relatively large droplets in which the separated analytes can mix again. Ideally, the effluent is deposited in the form of a constant flow, bridging the needle tip and the substrate, rather than dropwise (see Fig.2A).

Comparison of different colloid types

Three types of silver colloids known from the literature [17-19], citrate, borate and gold-coated silver, were tested for their Raman performance in combination with a silica TLC plate. These experiments were carried out using manual spotting with micropipettes, 1 μL of dye solution followed by 1 μL of one of the colloids. The laser power was 7 mW, the area interrogated by the laser was about 10 μm in diameter. Spectra were recorded at five locations within the spot (for each spectrum ten accumulations of 1 s) and averaged. For the cationic dye BR9 the resulting SERRS spectra are shown in Fig. 4 (bottom). The highest intensities were obtained for the traditional citrate colloid (Lee & Meisel type), followed by the gold-coated colloid; the borate colloid performed much worse. Interestingly, the relative intensities of the different vibrational bands in Fig. 4 (bottom) are not identical. For example, the bands at 810, 905 and 1510 cm^{-1} are of similar intensity for the citrate and gold coated colloids, while for most other bands the citrate colloid gives the highest intensity. This is probably due to different adsorption configurations on the colloids, affecting the surface enhancement factors. From an analytical perspective it is important to emphasize that the band positions are not colloid-dependent, and these positions provide the most important information for analyte identification.

For AO7 (negatively charged test compound) the resulting SERRS spectra are shown in Fig. 4 (top). The overall intensities are much lower than for the positive dye BR9. This is most probably related to the charge: adsorption to the colloid is strongest for cationic compounds [15,20]. Unexpectedly, also for AO7 the citrate colloid performed best, in spite of the fact that these colloidal particles have a negatively charged surface. The borate colloid was second best, followed by the gold-coated silver colloid. The last compound, FY3, did not show any Raman spectra with this three types of colloids probably due to the non-adsorption to the colloids [20].

Figure 4

CE-SERRS

For the coupling of CE to at-line SERRS detection we used the optimized separation conditions described above and the citrate-coated Lee-Meisel colloid. In agreement with earlier findings [21], it turned out to be difficult to handle analytes with very different SERRS responses in a single run. Even a minor trace of BR9 (for instance from tailing) would overwhelm the much weaker SERRS spectra of the AO7 and FY3 spots. We therefore focused on the anionic dyes; after CE separation of the two negative dyes AO7 and FY3, the effluent was deposited on a moving TLC plate. Citrate-coated colloid and 1 μL of 1 M nitric acid was added to improve the adsorption of negatively charged dyes to the colloid after the separation analytes[10]. The SERRS spectra were recorded at-line using the Raman microscope and are shown in Fig 5. AO7 (bottom) yielded a much stronger signal than FY3 (top), even though the structures are very similar. This is most

probably related to the different charge (adsorption), since the differences in molar concentrations and molecular absorption coefficients at 514 nm are much smaller.

Figure 5

Conclusions

A new interface was developed for the coupling of CE and SERRS and was found to be much more robust than the silver-painted prototype used in earlier work. Whereas the previously used silver-painted tip end was often damaged when flushing the capillary with NaOH, such problems were not encountered with the new design. When comparing the sensitivity of the various types of colloids, it was found that in all cases, even for negatively charged dyes, the classical Lee-Meisel type gave the best results in terms of signal intensity.

Samples containing both positively and negatively charged dyes were difficult to handle in a single run. With the colloids tested here the positive dye gave much stronger SERRS signals, so that even minor tailing effects could seriously hamper the SERRS detection of the negative dyes in the same run. With analytes of the same charge such problems were not encountered. Under such conditions the at-line coupling of CE-SERRS performed very well. It should be mentioned that in practice SERRS will be used for identification and/or peak purity confirmation; for quantitation an in-line UV-VIS absorption detector (as used in this work) will be more appropriate.

Acknowledgement

The dyes were kindly donated by J.W. Wegener (Institute of Environmental Studies, Vrije Universiteit Amsterdam). This work was carried out during a temporary research visit of D.A.R. to the Laser Centre Vrije Universiteit Amsterdam, made possible by the EU Access to Large Scale Research Infrastructures programme, contract # HPRI-CT-1999-00064.

References

1. I.D. Wilson & U.A.Th Brinkman. *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 325-356.
2. P. Schmitt-Kopplin and M. Frommberger. *Electrophoresis* 24 (2003) 3837-3867.
3. S.A. Asher, C.H. Munro, Z. Chi, *Laser Focus World* 33 (7) (1997) 99-109.
4. C. Gooijer, A.J.G. Mank, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 281-295.
5. Laserna J.J., "Modern techniques in Raman Spectroscopy", Wiley, New York. ISBN 0-471-95774-7.
6. W.K. Kowalchuk, P.A. Walker, and M.D. Morris. *Appl. Spectr.* 49 (1995) 1183-1188.
7. W.F. Nirode, G.L. Devault, M.J. Sepaniak, *Anal.Chem.*, 72 (2000) 1866-1871.
8. G.L. DeVault, M.J. Sepaniak, *Electrophoresis* 22 (2001) 2303-2311.
9. K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, M.S. Feld M.S., *Phys. Rev. Lett.* 78 (1997) 1667-1670.
10. R.M. Seifar, R. J. Dijkstra, A. Gerssen, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 1-6.
11. K Carron, R. Milofsky, B. Kennedy, J. Jiang, T. Deschaine, M. Dickey, M. Lewis. *Proc. Soc. Photo-Optical Instr.* 2835 (1996) 54.
12. W.F. Nirode, G.L. Devault, M.J. Sepaniak, *Anal.Chem.*, 72 (2000) 1866-1871.
13. L. He, M.J. Natan, C.D. Keating, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5348-5355.
14. J.V. Sweedler, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2382-2389.
15. C.H. Munro, W.E. Smith, P.C. White. *Analyst* 118 (1993) 731-733.
16. X. Dou, Y.M. Jung, Z.-Q. Cao, Y. Ozaki. *Appl. Spectr.* 53 (1999) 1440-1447.
17. P.C. Lee, D.J. Meisel, *Phys.Chem.*, 86 (1982) 3391-3395.
18. J.A. Creighton, C.G. Blatchford, M.G. Albrecht, *J.Chem.Soc. Faraday Trans.* 75 (2) (1979) 790-798.
19. L. Rivas, S. Sanchez-Cortes, J.V.Garcia-Ramos, G. Morcillo. *Langmuir* 16 (2000) 9722-9728.
20. T. de Beer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 971 (2002) 1.
21. R.M. Seifar, J.M. Verheul, F. Ariese, U.A.T. Brinkman, C. Gooijer. *Analyst* 126(2001) 1418-1422.

Figure captions

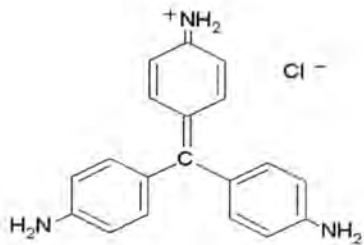
Fig. 1: Molecular structures, abbreviations, absorption maxima, and molar extinction coefficients at 514 nm of the three test compounds.

Fig. 2: Frame A: deposition interface, showing the wetting of the needle tip for electrical contact and the bridge-shaped eluent flow to the substrate. Frame B: schematic of Raman microscope set-up.

Fig. 3: CE electropherogram, showing the separation of the three dyes. Separation conditions: 20 mM boric acid pH 10, 1 mM tetraethylammonium, 10 s injection time, 20 kV, room temperature, absorption detection at 500 nm. The minor peak at 520 s corresponds to an unknown impurity.

Fig. 4: SERRS spectra of manually spotted dyes on TLC plate with three different types of colloids; spectrum accumulation time 10 x 1 s. Top: AO7; bottom: BR9.

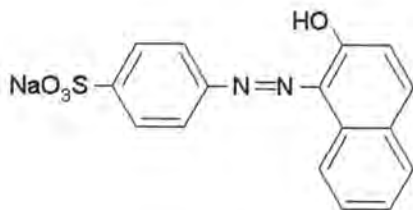
Fig. 5: SERRS spectra of CE-separated spots, recorded on TLC plate after deposition and addition of 1 μ L of silver citrate colloid and 1 μ L of 1 M of nitric acid; spectrum accumulation time 10 x 1 s. Top: FY3; bottom: AO7.



Basic Red 9 (BR9)

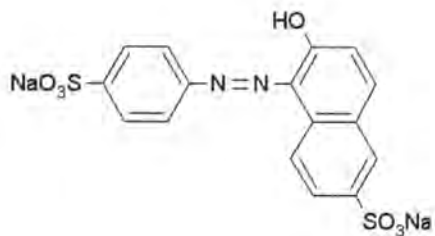
$\lambda_{\max} = 544 \text{ nm}$

$\epsilon_{514} = 2.1 \times 10^4$



Acid Orange 7 (AO7)

$\lambda_{\max} = 483 \text{ nm}$



Food Yellow 3 (FY3)

$\lambda_{\max} = 482 \text{ nm}$

Fig. 1

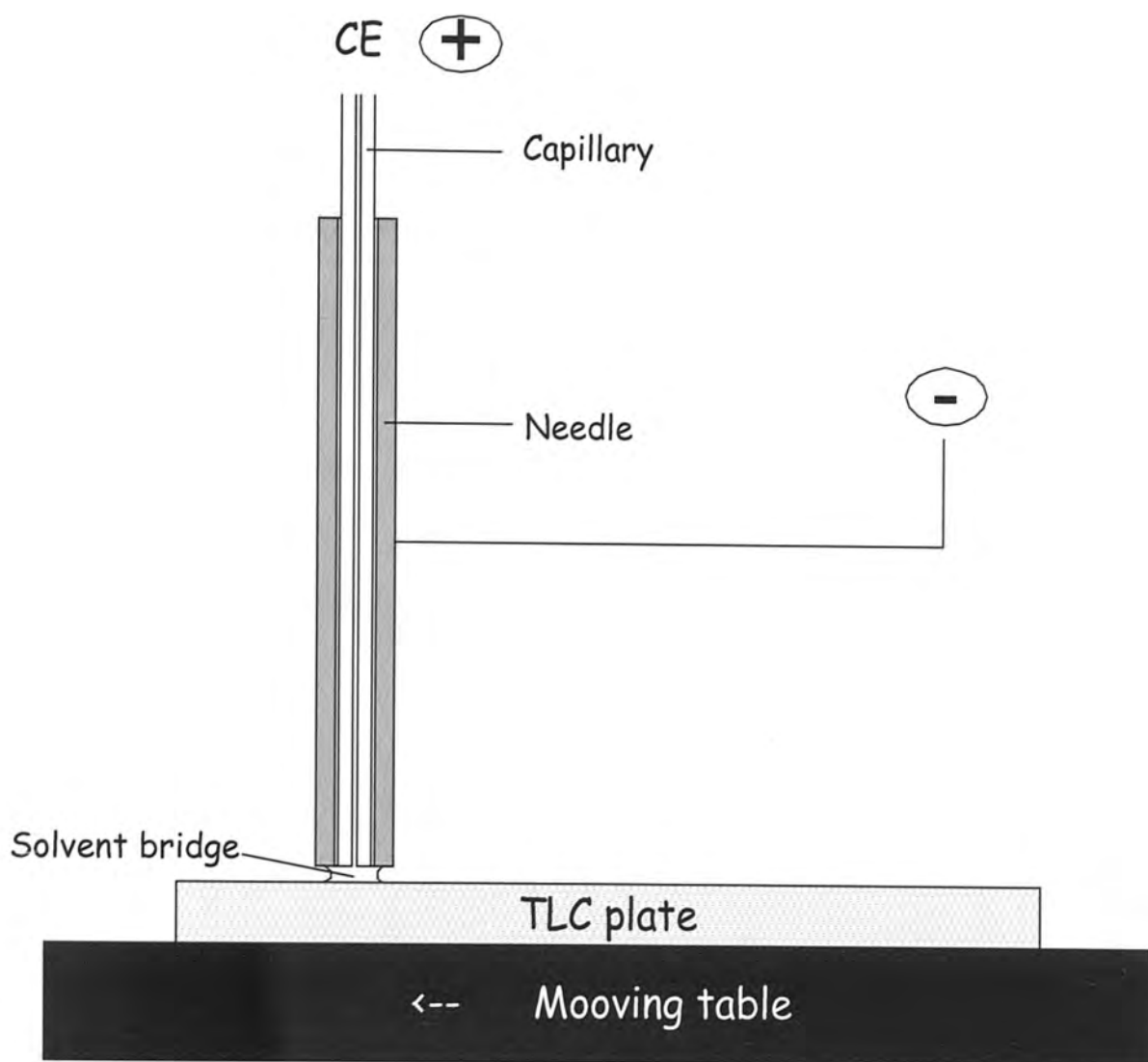


Fig. 2A

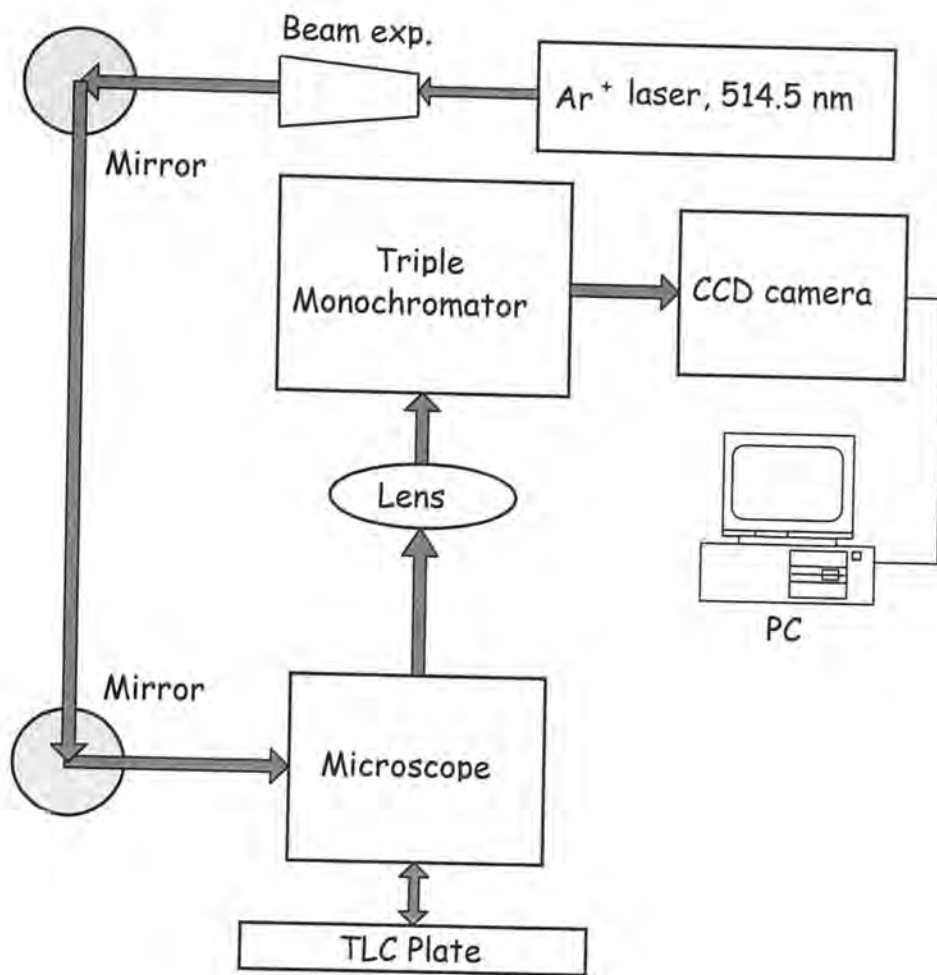


Fig. 2B

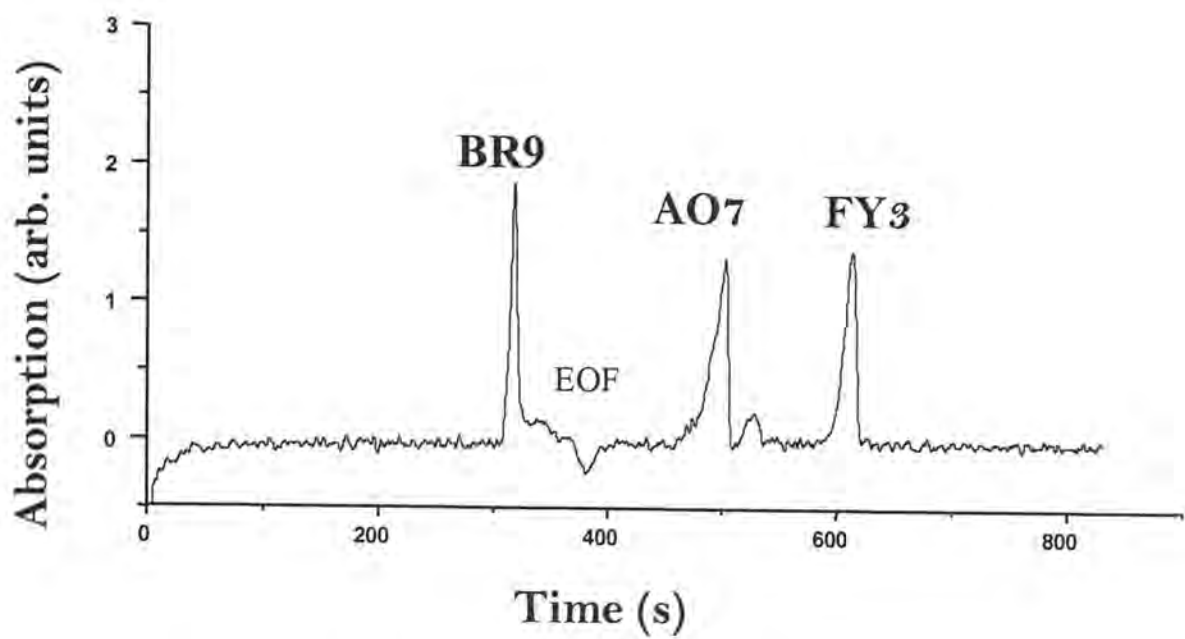


Fig. 3

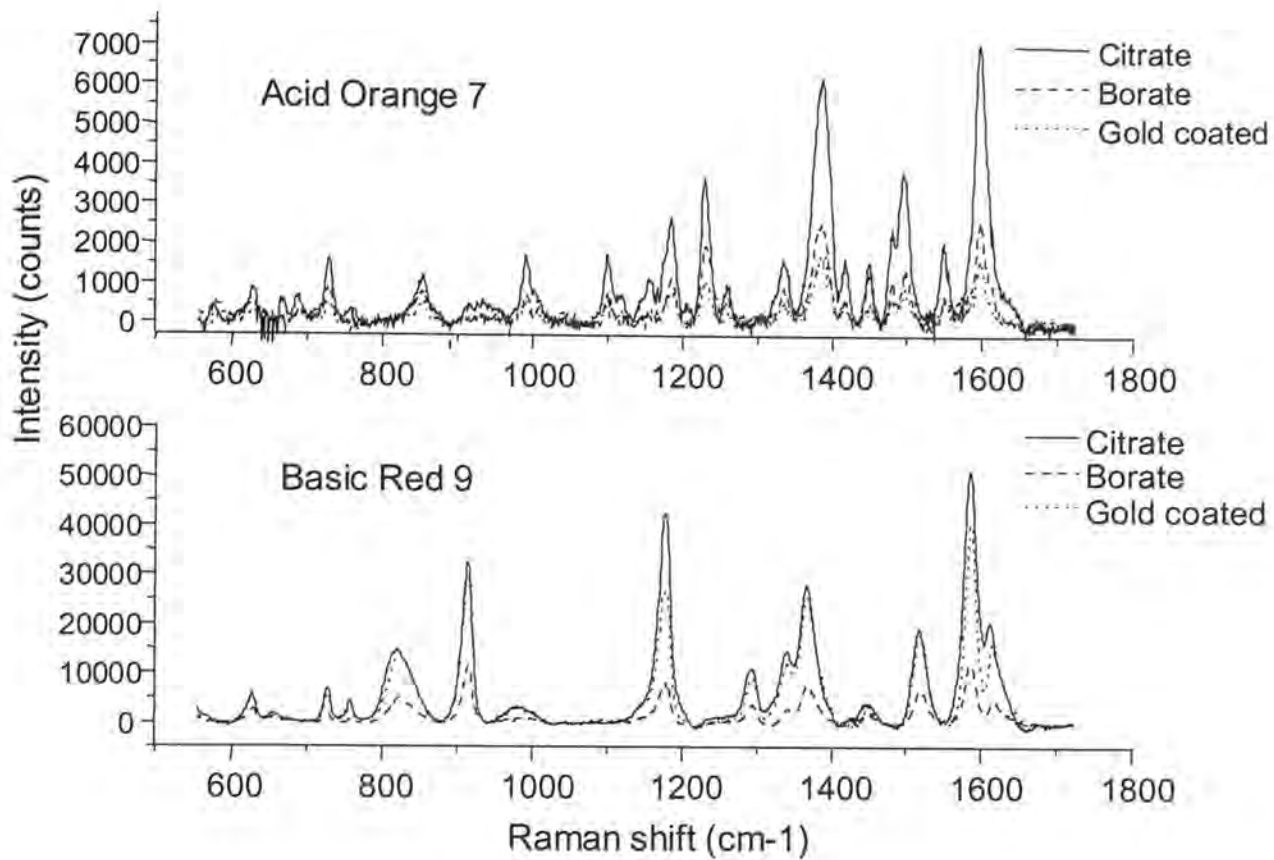


Fig. 4

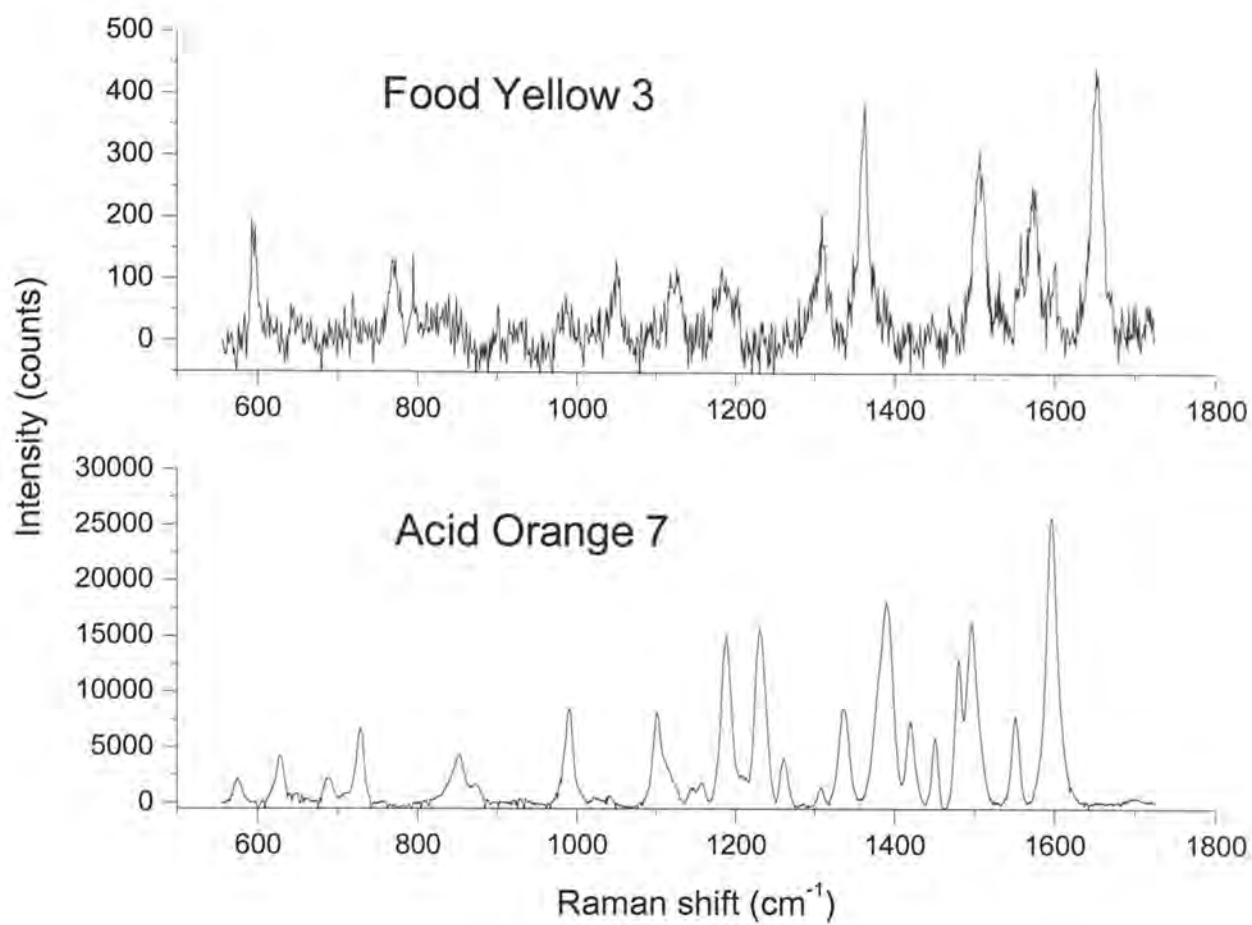


Fig. 5

ANEXO V

Journal: Analytical and Bioanalytical Chemistry (ABC), in press.

MULTIRESIDUE ANALYSIS OF PHENYLUREA HERBICIDES IN ENVIRONMENTAL WATERS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS USING ELECTROCHEMICAL DETECTION

M. Chicharro^a, E. Bermejo^a, A. Sánchez^a, A. Zapardiel^b, D. Arráez^{a,c} and A. Fernández^c

^aDepartamento de Química Analítica y Análisis Instrumental. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. 28049-Madrid. Spain.

^bDepartamento de Ciencias Analíticas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Educación a Distancia. 28040-Madrid. Spain.

^c Permanent address: Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. 18071-Granada. Spain.

ABSTRACT

A rapid multiresidue method has been developed for the analysis of seven phenylurea herbicides in the presence of two s-triazines in environmental waters. A simple end-column electrochemical detector was used in combination with an available commercial capillary electrophoresis instrument with UV detection. The determination of phenylurea pesticides using micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) with electrochemical detection is the first time that is reported. In both detection systems, a wide linear range was obtained for the seven phenylurea herbicides (1.4×10^{-5} to 3.0×10^{-4} mol l⁻¹), in 0.020 mol l⁻¹ phosphoric acid at pH 7.0 and containing 0.020 mol l⁻¹ of sodium dodecylsulfate, to obtain selectivity in the additional separation by micellar distribution process. Under these conditions a lower detection limit than 5.0×10^{-6} mol l⁻¹ (0.25 pmol of pesticide) was achieved for the most of them. The pesticides are resolved in less than 30 min.

KEYWORDS: Micellar electrokinetic capillary chromatography, Electrochemical detection, Phenylurea herbicides, Environmental waters.

INTRODUCTION

The use of phenylurea herbicides in agriculture imposes a high risk of these herbicides entering the food chain by means of contaminated water and fodder. Their extensive use also causes other problems, including the requirement for increased doses of herbicides as a result of pest adaptation and the introduction of new herbicides with a higher activity and specificity. Progressive increase in production and application of this kind of herbicides for plant protection has converted the problem of water quality into an international and national issue. Cases of incidental pesticide pollution of water reservoirs have become more numerous in recent years [1].

Especial attention in pesticide development has been shifted from the non-polar, persistent, long-life pesticides to the more polar and degradable short-life pesticides [2]. From the inherently higher environmental mobility of the polar pesticides arises the necessity of the supplementation of the public health legislation regulating the levels allowed in drinking water supplies. All these changes make necessary the implantation of analytical techniques for residue detection in aqueous samples. The intensive use of pesticides in the last years has increased the agricultural productivity. It has generated pesticide residues in natural waters at concentration levels which exceed the legal limits. Pesticides with different chemical structures can be found in ground and surface waters, e.g.: triazines, phenylurea compounds.

The 1989 European Community (EC) Water Act states that the maximum admissible concentration of all pesticides in drinking water should be lower than 500 ng/L and that the maximum individual pesticide concentration is 100 ng/L. Therefore,

the detection limits required for the analysis of drinking water need to be at the low-nanogram level [3].

Phenylureas are selective systemic herbicides commonly used in agriculture, alone or in combinations, for pre-emergence treatment of soil. Due to their polar nature, the increased possibility of leaching from the surface to the water supply and water reserves, together with the emergence of potential toxic degradation and metabolic products, may constitute a risk to human health. Several techniques have been reported for phenylurea determinations [4-7].

On the other hand, S-triazine herbicides are among the most widely used pesticides to control broadleaf and grassy weeds in corn and other crops. Due to their extensive use and their relatively high persistence, chlorotriazines like symazine, contaminate the aquatic environment through agricultural runoff, direct applications, and leaching into ground water, in concentrations that are increasing. Many efforts have been devoted to develop rapid assays for the quantification of triazine herbicides at low levels in water [8].

Nowadays, the application of capillary electrophoresis (CE) for the separation of analytes in different samples has become increasingly widespread because of its minimal sample volume requirement, short analysis time and high separation efficiency. Most frequently a UV absorbance detector is used which is standard on commercial capillary electrophoresis instruments. For UV absorbance measurements performed in the on-column configuration detector, induced band broadening can be neglected when a portion of the capillary serves for detection. On the other hand, the short optical path length leads to relatively high concentration detection limits. Lower detection limits can be achieved by laser induced fluorescence detection. However,

the laser equipment is rather expensive and in most of the cases derivatization is necessary which complicates the analytical process, particularly if small samples have to be analyzed.

Electrochemical detection has the advantage that concentration limits are not compromised by miniaturization. Steady-state measurements with perfectly prepared voltammetric microelectrodes may even lead to lower detection limits than the ones that obtained with macroelectrodes. Electrochemical detection typically operated in the amperometric mode can be coupled with CE to provide high sensitivity and selectivity for the determination of electroactive substances [9-11]. The required components for amperometric detection are rather simple and inexpensive. Moreover, electrochemical detection is applicable to a broad range of important analytes, owing to the variety of electrode materials and electrochemical processes that can be used for detection. The two commonly used CE modes for the analysis of herbicides are free capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), both with UV detector [4]. In addition, MEKC with ED with a carbon electrode has been applied for the detection, UV and electrochemical, of asulam in environmental water [12].

In this work, MEKC with simultaneous UV and electrochemical detection has been employed for the separation and detection of different kind of herbicides (figure 1). They belong to two herbicide groups (phenylureas and s-triazines) and are the following: fenuron, chlorotoluron, monuron, monolinuron, Isoproturon, diuron, linuron, atrazine and symazine. The working electrode was a carbon paste electrode, inserted in a handy, simple and versatile electrochemical detection cell for an available commercial capillary electrophoresis system. This device has many

advantages and it was described in a previous paper [12,13]. Effects of several important factors were investigated to find the optimum conditions. The proposed method has been applied to determine seven phenylurea herbicides in the presence of two triazines in environmental water samples, collected from the Alberche River in Comunidad Autónoma de Madrid (Madrid, Spain).

EXPERIMENTAL

Reagents

Fenuron, Chlorotoluron, Monuron, Monolinuron, Isoproturon, Diruon, Linuron, Atrazine and Symazine grade Pestanal® were purchased from Riedel de Haën (Madrid, Spain). The herbicide stock solutions, 1.0×10^{-2} mol l⁻¹, were prepared dissolving an appropriate amount of the compound in methanol:water. All stock solutions were kept away from the light and stored under refrigeration. Diluted solutions were prepared daily from the stock solutions. Methanol grade Pestanal® purchased from Riedel de Haën (Madrid, Spain) was used as solvent. All other chemicals used for buffer and supporting electrolyte preparation were of analytical-reagent grade. Water for preparation of solutions was purified with a Milli-Q Milli-RO water system (Millipore, Spain). Buffers and samples were sonicated for 5 minutes and microfiltered through a 0.45 µm MFS-13 filters (Advantec MFS, Inc. USA).

Apparatus and electrodes

All electrochemical measurements were performed in the three electrode mode using an electrochemical analyzer BAS 100B connected to a 386/PC computer. Data storage and conversion to a "txt" files were performed by BASCOM 2.21 software (BAS, West Lafayette, USA). A silver wire and a platinum wire were employed as pseudo-reference and counter electrode respectively. All potentials

given in this work were measured with respect to this reference system. All experiments were carried out at room temperature applying the desired operating potential. Current was allowed to reach a stable baseline prior to amperometric monitoring.

A capillary electrophoresis with dual detection system (UV and electrochemical) has been described previously [12]. Capillary electrophoresis experiments were carried out with a SpectraPHORESIS 100 (Thermo Quest Corporation, Spain) equipped with a SC100 variable-wavelength UV/vis detector (Thermo Quest Corporation, Spain). Data acquisition and processing were accomplished using a 486/PC equipped with two channels and a Chrom-Card software package (Thermo Quest Corporation, Spain). None variation was introduced on the original commercial set up. A 100 cm fused silica column with a 2 cm Nafion tubing decoupler [14] was used for electrophoresis separations with electrochemical and UV detection (effective length 70 cm). This column had an I.D. of 75 μm and an O.D. of 365 μm and was supplied by Supelco, cat. No. 77500 (Bellefonte, USA).

Carbon paste electrodes with 500 μm diameter were handmade prepared by mixing graphite powder (Acheson 38#, Fischer Scientific. Code no. G/0900/60) and mineral oil (Aldrich Chemical Co. no. 16/140-3). The ratio of graphite powder to mineral oil was 70:30. The bodies of the CPE were a 20 mm length PTFE tube with an I.D. of 0.5 mm and O.D. of 1.6 mm, filled with the carbon paste. Electrical contact was established with a cooper wire. Special activation of the paste was not necessary.

Solid phase extraction procedure

Fortified samples were prepared by addition of appropriate amounts of the standard solutions of herbicide to the water to yield the desired final concentrations (1.0×10^{-7} to 4.0×10^{-7} mol l⁻¹). In all cases, a blank sample was submitted to the same procedure for comparison. Then the water samples were treated using the solid phase extraction technique for its preconcentration and purification. C18 cartridges were conditioned with 2 ml of methanol and 2 ml distilled water. One hundred milliliters water samples were passed through the C18 cartridges. Under these conditions, phenylurea herbicides are retained in the adsorbent [15]. Herbicides recuperation was carried out with 2 ml of methanol. The extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and subsequently diluted to a final volume of 100 μ l with methanol: water (18:82) the same percentage of methanol: water used for the stock solutions of the herbicides. The reconstituted samples were prepared in triplicate and 100 μ l sample microvials were used to introduce the sample into the electrophoretic system.

The water samples were collected from different sites along the Alberche River. All the samples were collected following the EPA's recommendations. The analysis of the samples was carried out in the first 48 hours after the collection in the rivers.

RESULTS AND DISCUSSION

Cyclic and hydrodynamic voltammograms

Cyclic voltammetry is a suitable technique for studying the electrochemical behaviors of electroactive compounds. It can help to select the potential of the

working electrode. Figure 2 shows the cyclic voltammograms of the seven investigated electroactive phenylurea herbicides in 0.05 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0. It is obvious that the other two s-triazine herbicides were no electroactive, therefore simultaneous UV and electrochemical detection was employed in this work, only in order to observe the important interference of the s-triazines in the UV detection of phenylurea herbicides. According to cyclic voltammograms, the oxidations of all herbicides were irreversible with anodic peak potentials ranging from 850 to 1110 mV.

The effect of the scan rate, between 5 and 100 mV s^{-1} , on analytical signal was investigated for $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ herbicide concentration in 0.05 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0. A proportional dependence of the peak current on square root of the scan rate was observed for all phenylurea herbicides (not shown). This fact is indicative of a diffusional process.

The potential applied to the working electrode directly affects the sensitivity and detection limits of this method and it is necessary to determine the hydrodynamic voltammograms for the electroactive herbicides to obtain the optimum potential. As shown in figure 3, the peak current increases rapidly at a potential of 600 mV for chlorotoluron, and 700 mV for the other phenylureas. When the applied potential exceeds 850 mV, the peak currents of all herbicides increase more slowly. Although an applied potential greater than 950 mV results in higher peak currents, both the baseline noise and the background current increase substantially for potential higher than 1000 mV, due to the solvent oxidation. The high background current leads to an unstable baseline, which is a disadvantage for sensitive and stable detection in electrochemical detection of the herbicides. The potential applied to the working

electrode was maintained at 950 mV, under this condition the background current is not too high and the signal-to-noise ratio is the highest. The reproducibility and stability of the analytical signal were studied for a series of ten $5.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ sample injections (a total of 300 min of analysis time), resulting in a R.S.D. of 6.1%. Higher analysis times imply a slight electrode poisoning and a signal decay (20% from the initial signal for analysis time higher than 420 min). The cell provides stable measurements within reasonable long analysis times under the experimental conditions, despite the non-ideality redox behavior of the electroactive herbicides.

Analytical conditions of separation and quantification

Electrophoretic method development was based on the application of the micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), useful in the case for the separation of neutral compounds, such as phenylurea herbicides. Sodium dodecyl sulfate was chosen as the micelle-forming agent able to form a pseudophase into which the analyte molecules were partitioned. Our works start out for the M. Barroso et al. [16] studies, using a mixture of 0.004 mol l^{-1} sodium tetraborate, 0.012 mol l^{-1} potassium dihydrogenphosphate and 0.030 mol l^{-1} SDS at pH 7.0. The potential applied for the separation was 30 kV, resulting in a current of approximately $30 \mu\text{A}$. Under these experimental conditions, we do not obtain a useful separation, and the resolution of the peaks was very poor. In order to obtain an efficient separation of our phenylurea herbicides, different buffer natures were proved. The subsequent studies were carried out in absence of sodium tetraborate and different concentrations of phosphate buffer (0.005 to 0.050 mol l^{-1} phosphate buffer solutions) were tested. The separation was achieved only when the concentration of phosphate buffer solutions was higher than 0.020 mol l^{-1} . Similar studies were carried out for SDS concentration, in all cases the separation was efficient when the SDS concentration was higher than

0.020 mol l⁻¹. A mixture of 0.020 mol l⁻¹ potassium dihydrogenphosphate and 0.020 mol l⁻¹ SDS adjusted to pH 7.0 was found to be the optimum running electrolyte composition and was used for the subsequent analysis. After these experiments, the studies of the most suitable applied voltage for the herbicide separation revealed that the resolution improved with increasing the voltage from 5 to 20 kV, thus selecting for the subsequent studies a running voltage of 18 kV (current 34 μA) in order to avoid the possibility of Joule's heating and allowing that the time of analysis was 30 min. In this point of the investigation is important to make notice about the impossibility of the isoproturon and atrazine separation. These herbicides appeared at the same migration time and the UV detection was impossible. When the electrochemical detection was used for the analysis of these compounds, detection and quantification of isoproturon was possible, due to atrazine is not electroactive.

It has been demonstrated in previous studies described in literature [12,13] that the electrochemical device used in connection with commercial capillary electrophoresis system could give good analytical results, for electrochemically reversible and irreversible analytes, in a simple way without the need of complicated precision apparatus. No distortion on analytical signals was observed and stable baselines were obtained in all measurements. In this work, and under optimal conditions for the electrochemical device already described, one more study was performed. In order to obtain the best signal to noise ratio for the electrochemical determination, different buffer solutions and buffer concentrations were checked in the detection cell. We detected that in a continuously separation process a poisoning in the buffer solution of the electrochemical cell were not produced. In conclusion, the best conditions were obtained using the same solution used in the running electrolyte composition. On another hand, we observed also that a replacement of

the buffer solution every six analysis give the best signal to noise ratio and the best sensitivity was obtained.

Hydrodynamic injection was chosen to introduce the herbicides samples and the water samples into the capillary column. The stock solution of the herbicide was prepared in methanol, subsequently the effect of the sample composition on hydrodynamic injection was studied. Different aliquots containing the herbicides were mixed with water to obtain the same concentration of herbicides and different proportions of methanol/water, between 0.5 and 25 % (v/v). The resolution variation for the herbicides and also the electrochemical detection were critical when the methanol proportion was higher than 20%. The migration time was almost constant for fenuron, monuron, monolinuron, symazine and chlorotoluron, but very different in the case of isoproturon, atrazine, diuron and linuron. The peak area decreased considerably when the proportion of methanol was increased. The loss of resolution must be due to the greater longitudinal diffusion of the sample in the capillary, owing to the different thermophysical properties of the sample and the separation buffer containing SDS, leading to a widening of the size of the injected sample [17]. Moreover, the presence of methanol affects the micelle formation which has naturally consequences for the final separation.

The hydrodynamic injection volume was optimized with respect to peak height and peak area at two different concentration levels (5.0×10^{-5} and 1.0×10^{-4} mol l⁻¹) containing 18% (v/v) methanol-water. Although, in some cases, peak area was linear with injection volumes over 75 nl and resolution was maintained, peak height response did not increase and peaks became broader with a decrease in the number of theoretical plates. An injection volume of 50 nl (1.0 second) provided the best

results at the herbicides concentration studies. Moreover, the electrochemical detection presented a best background signal than the UV detection, therefore the detection limits for electrochemical detection will be lower than the detection limits when the UV will be used.

Figure 4 shows the typical electrophoretic separations for the nine herbicides in both detection systems. It is very important to make notice about the difference in the electroactive herbicides migration registered time in both electropherograms. In the UV detection, the effective length of the capillary column is 70 cm while the effective length in the electrochemical detection is the same as the total length of the capillary column, 100 cm. Also, electrochemical detection electropherogram shows seven peaks, corresponding with the phenylurea herbicides, in the UV detection electropherogram we can observed eight peaks, corresponding with the seven phenylurea and one s-triazine (isoproturon and atrazine appeared at the same migration time).

Base calibration curves on peak area were prepared with introduced volumes of 50 nl and were used to quantify the seven phenylurea herbicides, using only electrochemical detection. In table 1 the regression equations, correlation coefficients, and detection limits for all the herbicides are listed. Each point was reported as the average of six analyses. The UV detector response at 210 nm and the electrochemical one at +950 mV were linear for the most of the cases (with exception of isoproturon and simazine) in the range of sample concentration between 1.4×10^{-5} and 3.0×10^{-4} mol l⁻¹. Also, linearity was maintained at higher concentrations but it was not considered of practical use taking into account the expected concentration levels for these compounds in environmental water samples. The

detection limits, calculated at a signal to noise ratio of 3 are listed in table 1 for all herbicides. In the case of isoproturon, UV detection and quantification was almost impossible, only the electrochemical detection can be used for its quantification.

The migration time and the peak response reproducibility were evaluated at a concentration of 5.0×10^{-5} mol l⁻¹ of each herbicide to check the performance of the MEKC system for these phenylureas. The relative standard deviation values obtained were below 5.5% for the peak areas in electrochemical detection, lower than 4.7% for the peak areas in UV detection and below 1.1% for the migration times. The high reproducibility indicates that this method is accurate and rugged.

Application and recovery in environmental water samples

Under the optimum conditions the applicability of the proposed MEKC method using electrochemical detection, for the determination of the studied phenylurea in real samples was demonstrated in environmental water samples from Alberche River (Comunidad Autónoma de Madrid, Spain). The real water samples were prepared by addition of appropriate amounts of the standard solutions of herbicide to the water to yield the desired final concentrations (1.0×10^{-7} to 4.0×10^{-7} mol l⁻¹). In all cases, a blank sample was submitted to the same procedure for comparison. Then the water samples were treated using the solid phase extraction technique for its preconcentration and purification. C18 cartridges were conditioned with 2 ml of methanol and 2 ml distilled water. One hundred milliliters water samples were passed through the C18 cartridges. Under these conditions, phenylurea herbicides are retained in the adsorbent [15]. Herbicides recuperation was carried out with 2 ml of methanol. The extracts were evaporated to dryness under a nitrogen stream and subsequently diluted to a final volume of 100 µl with methanol: water (18:82); the

same percentage of methanol: water used for the stock solutions of the herbicides. The reconstituted samples were prepared in triplicate and 100 µl sample microvials were used to introduce the sample into the electrophoretic system.

The water samples were collected from different sites along the Alberche River. All the samples were collected following the EPA's recommendations. The analysis of the samples was carried out in the first 48 hours after the collection in the rivers. Figure 5 shows the obtained electropherograms, with electrochemical detection, for a river water sample and the same sample spiked with 3.0×10^{-7} mol l⁻¹ level of the herbicides studied.

Percent recoveries ranged from 85 to 102 for all herbicides using electrochemical detection. The relative standard deviations for samples spiked at 1.0×10^{-7} mol l⁻¹ were of 5.6%

CONCLUSIONS

A new method using electrochemical detection of phenylurea using MEKC, is presented. A handy electrochemical cell, designed to maintain a reliable operation at capillary electrophoresis flow rates, has been used. The electrochemical device could be easily coupled to available commercial capillary electrophoresis equipment in which no special modifications are needed on its original configuration.

The joint detection with both UV detector and electrochemical detector was performed. The UV detection was in usual configuration, on-column, while the amperometric detection was in end-column configuration. Such a combined method shows very good versatility and selectivity. Using this possibility the electroactive and non-electroactive compounds could be detected by electrochemical and UV detection system at the same time.

The reported data show that MEKC is suitable for mono and multiresidue analysis of different kinds of herbicides (in this case phenylurea herbicides) in environmental water samples using electrochemical detection system. The determination of seven phenylurea herbicides was achieved under the best conditions for their separation and detection. The detection limits of all the herbicides were closer than 5.0×10^{-6} mol l⁻¹ (0.25 pmol of herbicide) using electrochemical detection systems. When the method was applied to river water samples, collected from Alberche River (Comunidad Autónoma de Madrid, Spain) spiked to different concentration levels of herbicides, very good results were obtained using an addition standard method. Future applications of the electrochemical device used in this paper will be reported in the field of herbicide determination in environmental samples, using a previous extraction procedure with different cartridges types in order to obtain detection limits (5.0×10^{-9} mol l⁻¹) close to the maximum residue levels allowed for the European Union.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Ministerio de Ciencia y Tecnología de España, Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea and Comunidad Autónoma de Madrid for financial support to this project (BQU2001-0949 and BQU2003-03418; 07M/0040/2001 and 07G/0013/2003).

REFERENCES

1. W. Mathys, *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* **1994**, 196, 338
2. A.J. Greenland, H.B. Hayes, *The Chemistry of Soil Processes*, John Wiley & Sons, Ltd, London **1981**
3. Naish-Chamberlain P.J, Cooke A.R (1991) *LC-GC Int.* 4:38
4. Süsse H, Müller H (1996) *J. Chromatogr. A.* 730:337
5. Sherma J (1997) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 80:283
6. Goger B, Kunert O, Seger C, Rinelli R, Winstersteiger R (2001) *Electroanalysis* 3:1335
7. Farran A, Ruiz S (2004) *J. Chromatogr. A.*,1024:267
8. Dean J.R, Wade G, Barnabas I.J (1996) *J. Chromatogr. A.* 733:295
9. Chen G, Ye J.N, Cheng J.S (2000) *Chromatographia* 52:137
10. Chen G, Luo H.F, Ye J.N, Hu C.Q (2001) *Talanta* 54:1067
11. Huang X, You T, Yang X, Wang E (1999) *Talanta*, 49:425
12. Chicharro M, Zapardiel A, Bermejo E, Sánchez A (2002) *Anal. Chim. Acta.* 469:243
13. Chicharro M, Zapardiel A, Bermejo E, Sánchez A, González R (2004) *Electroanalysis* 16:311
14. O'Shea T.J, Greenhagen R.D, Lunte S.M, Lunte C.E, Smyth M.R, Radzik D.N, Watanabe N (1992) *J. Chromatogr. A.* 593:305
15. Quirino J.P, Inour N, Terabe S (2000) *J. Chromatogr. A.* 892:187
16. Barroso M.B, Konda L.N, Morovjan G (1999) *J. High Resol. Chromatogr.* 22:171
17. Grushka E, McCormick R (1989) *J. Chromatogr. A.* 471:421

LIST OF THE FIGURES

Figure 1.- Structures, name and registry number of the Chemical Abstract for the herbicides studied.

Figure 2.- Cyclic voltammograms for phenylurea herbicides at carbon paste electrode. Background obtained in 0.02 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0 (dotted lines); $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ herbicide in 0.02 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0 (solid lines). Scan rate 50 mV s^{-1} . Initial potential: -200 mV . Final potential: 1300 mV .

Figure 3.- Hydrodynamic voltammograms for $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ of phenylurea herbicides obtained under MEKC experiments. Unfused silica capillary column $75 \mu\text{m}$ i.d. x 100 cm length; working electrode: $500 \mu\text{m}$ diameter carbon paste electrode. Running buffer: 0.02 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0 containing 0.025 mol l^{-1} SDS. Separation voltage 20.0 kV . Hydrodynamic injection 1.5 s .

Figure 4.- Electropherograms for $7.0 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ of fenuron (1); monouron (2); monolinuron (4); chlortoluron (5); isoproturon (6); diuron (7) and linuron (8); and for $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ of symazine (3); atrazine (6) in purified water using UV (A) and electrochemical (B) detection under optimal conditions. Conditions: electrode working potential $+950 \text{ mV}$; UV detection at 210 nm ; capillary column i.d. $75 \mu\text{m}$, effective length: 70 cm UV detection and 100 cm for electrochemical detection; running buffer 0.02 mol l^{-1} phosphate buffer at pH 7.0 and 0.02 mol l^{-1} SDS; applied voltage 18.0 kV . Other conditions as in figure 3.

Figure 5.- Electropherograms of Alberche River water samples. (A) River water sample using an amperometric detector: a) blank sample, b) spiked sample. The Alberche River sample was spiked with a $3.0 \times 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ concentration of phenylurea herbicides. Other conditions as in figure 4.

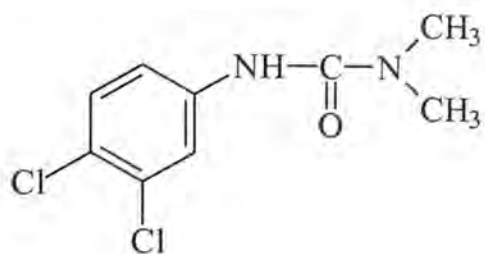
Table 1
Results of regression analysis on calibration curves and the detection limits^a

| HERBICIDE | REGRESSION EQUATION ^b | CORRELATION COEFFICIENT (n=10) | DETECTION LIMIT (mol l ⁻¹) | LINEAR RANGE (mol l ⁻¹) |
|--------------|--|--------------------------------|--|---|
| FENURON | $y = -0.1 \pm 0.3 + (6.5 \pm 0.4) \times 10^4 x$ | 0.998 | 3.80×10^{-6} | $1.4 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| MONURON | $y = -0.5 \pm 0.1 + (5.1 \pm 0.1) \times 10^4 x$ | 0.9998 | 4.85×10^{-6} | $1.6 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| MONOLINURON | $y = +1.0 \pm 0.2 + (4.0 \pm 0.1) \times 10^4 x$ | 0.9990 | 6.10×10^{-6} | $2.0 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| CHLORTOLURON | $y = +0.1 \pm 0.3 + (4.2 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.998 | 5.64×10^{-6} | $1.9 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| ISOPROTURON | $y = +0.6 \pm 0.4 + (4.4 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.997 | 5.57×10^{-6} | $1.8 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| DIURON | $y = -0.1 \pm 0.5 + (3.8 \pm 0.3) \times 10^4 x$ | 0.996 | 6.59×10^{-6} | $2.1 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |
| LINURON | $y = +0.7 \pm 0.3 + (1.2 \pm 0.2) \times 10^4 x$ | 0.994 | 1.97×10^{-5} | $6.6 \times 10^{-5} - 3.0 \times 10^{-4}$ |

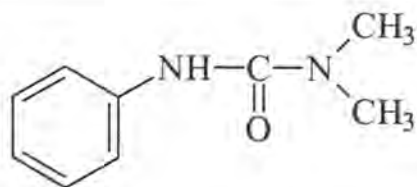
a) working potential was 950 mV using electrochemical detection

b) Where y is peak area (nA min) and x is the concentration of the herbicides (mol l⁻¹) respectively

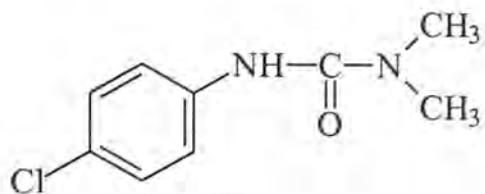
c) The detection limits corresponding to concentrations giving signal-to-noise ratio of 3



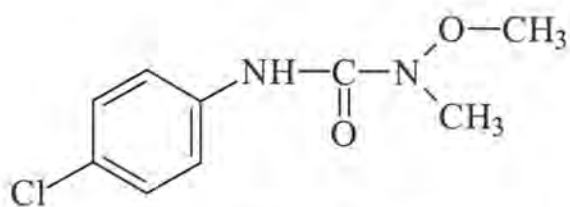
DIURON [330-54-1]



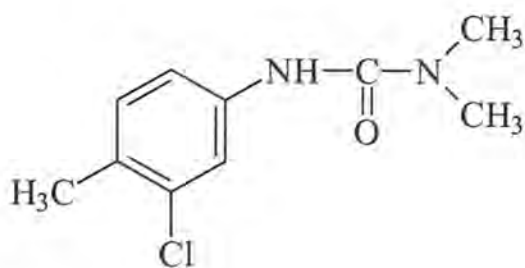
FENURON [101-42-8]



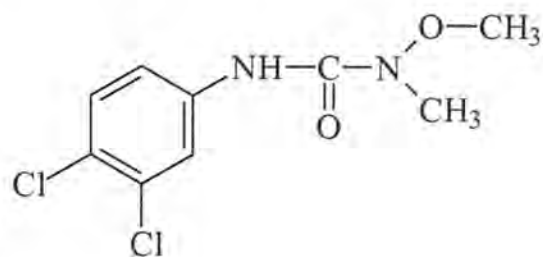
MONURON [150-68-5]



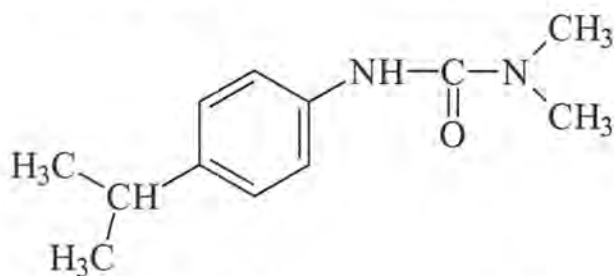
MONOLINURON [1746-81-2]



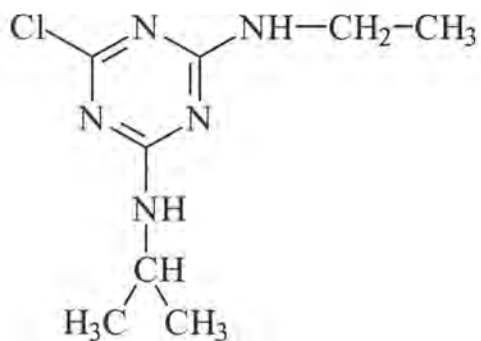
CHLORTOLURON [15545-48-9]



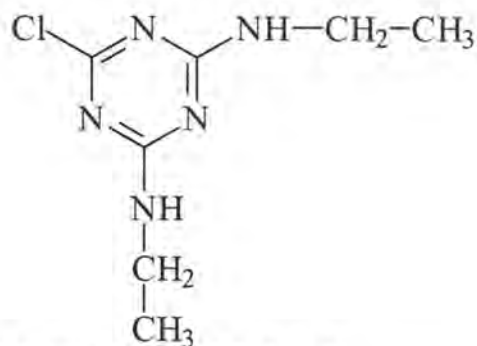
LINURON [330-55-2]



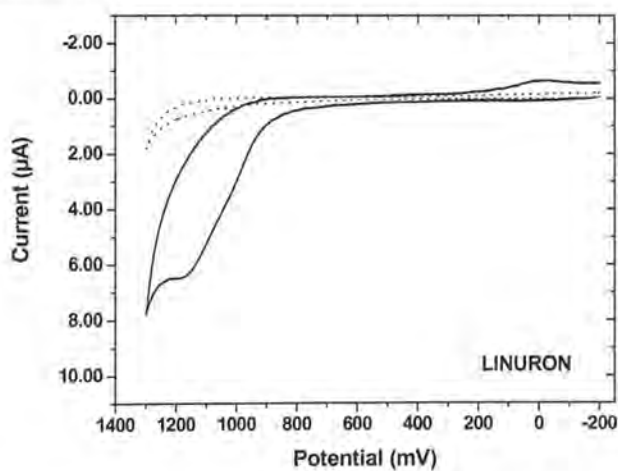
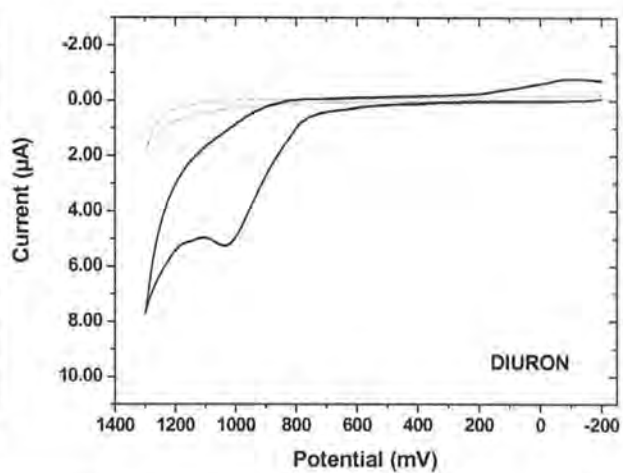
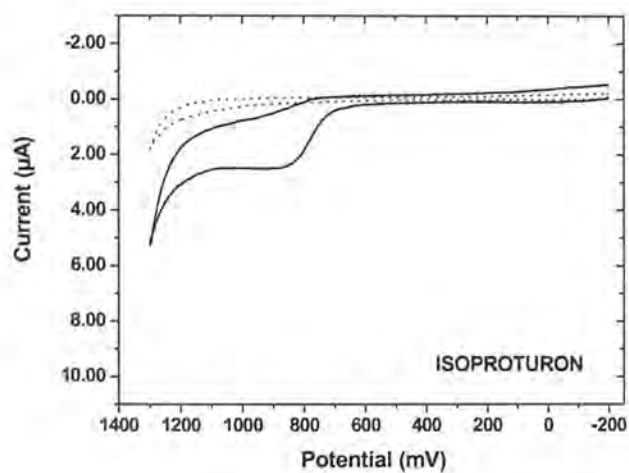
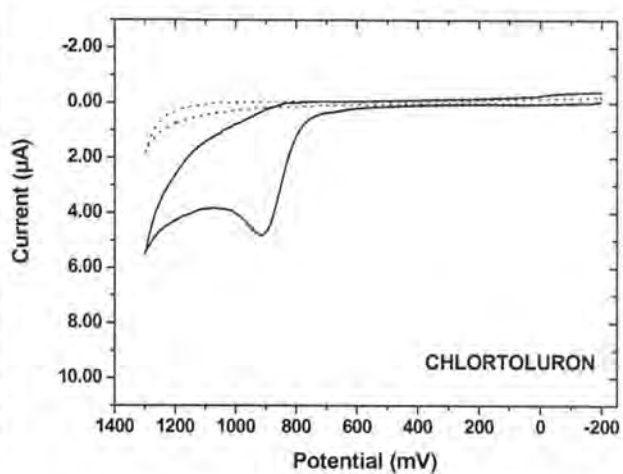
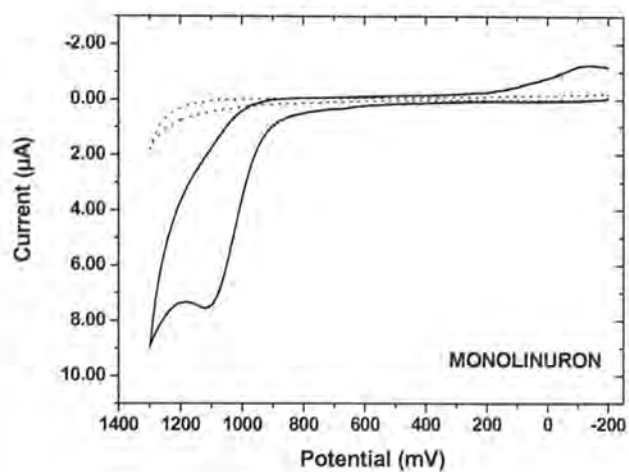
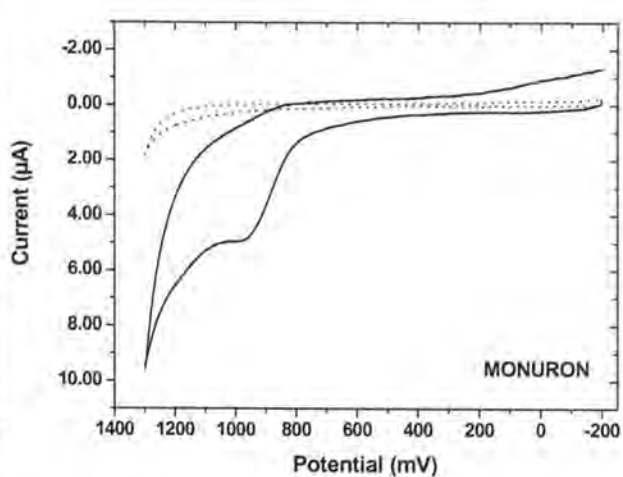
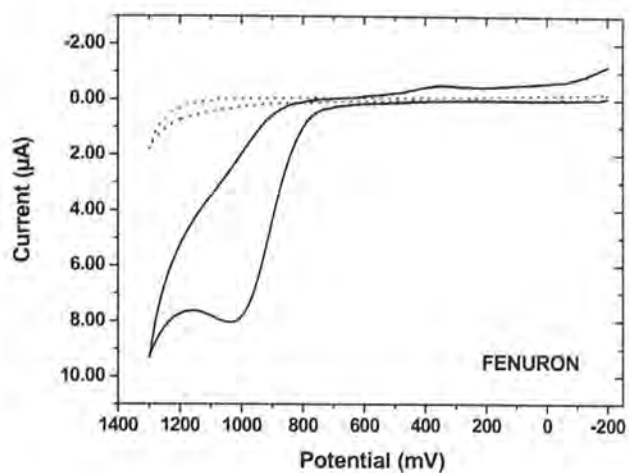
ISOPROTURON [341235-59-6]

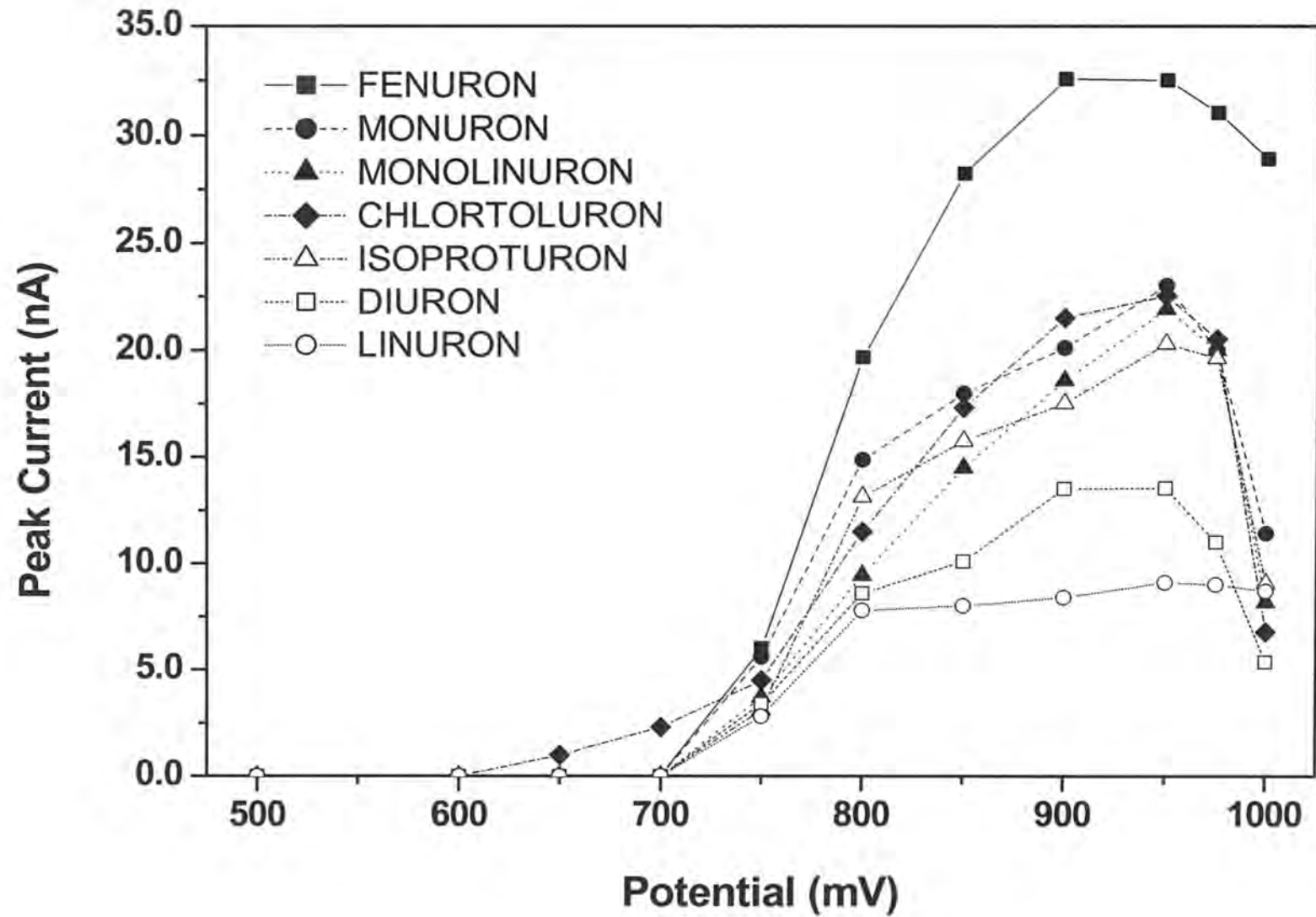


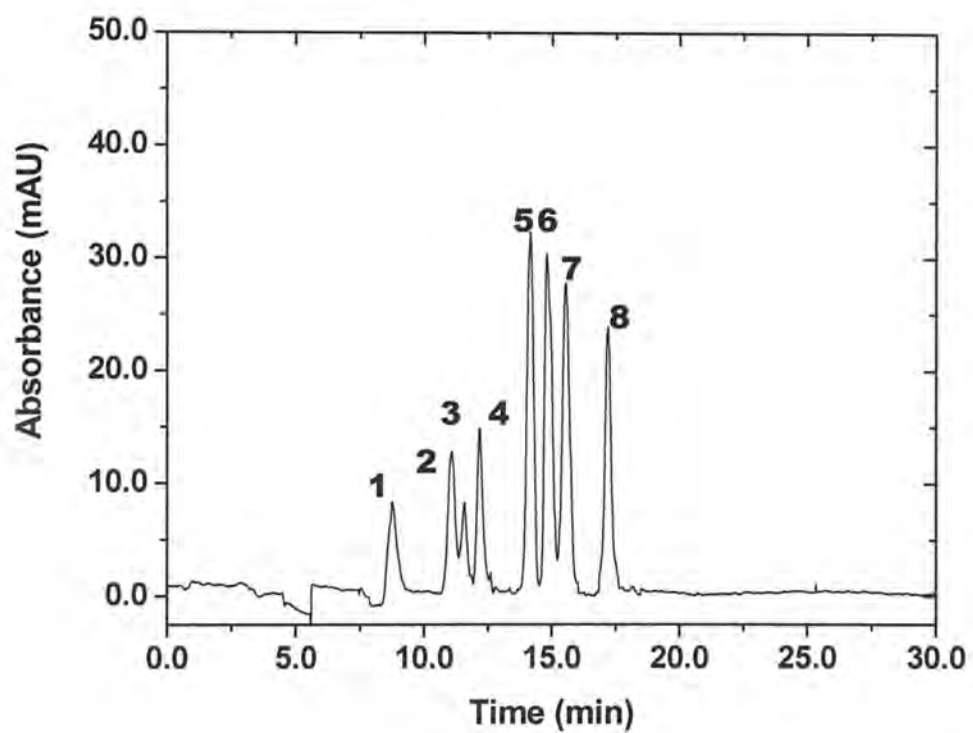
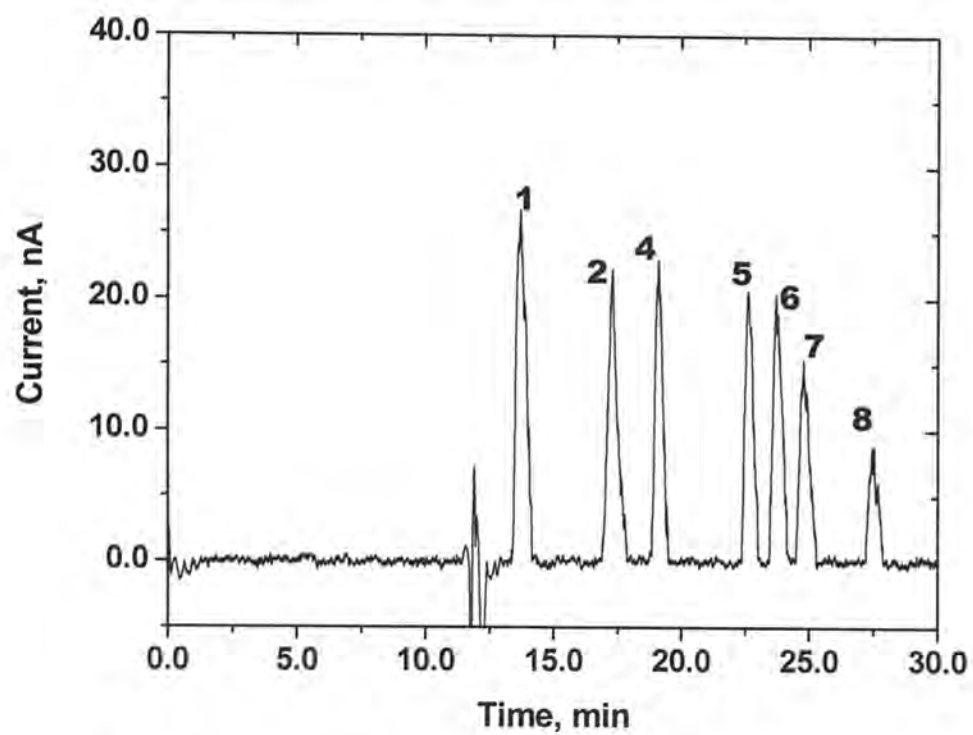
ATRAZINE [1912-24-9]

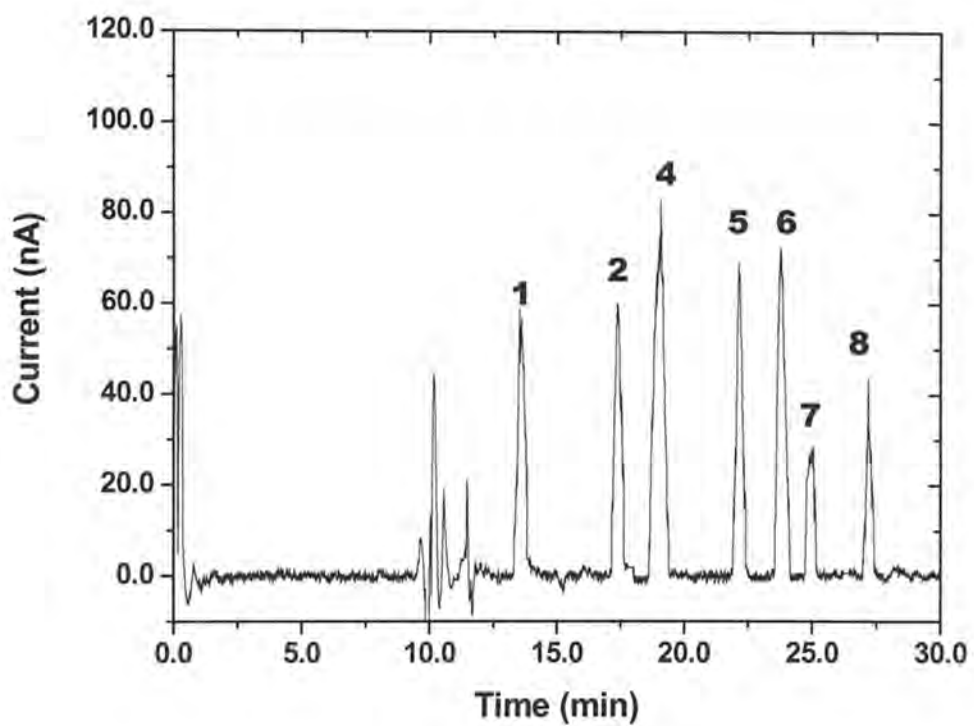
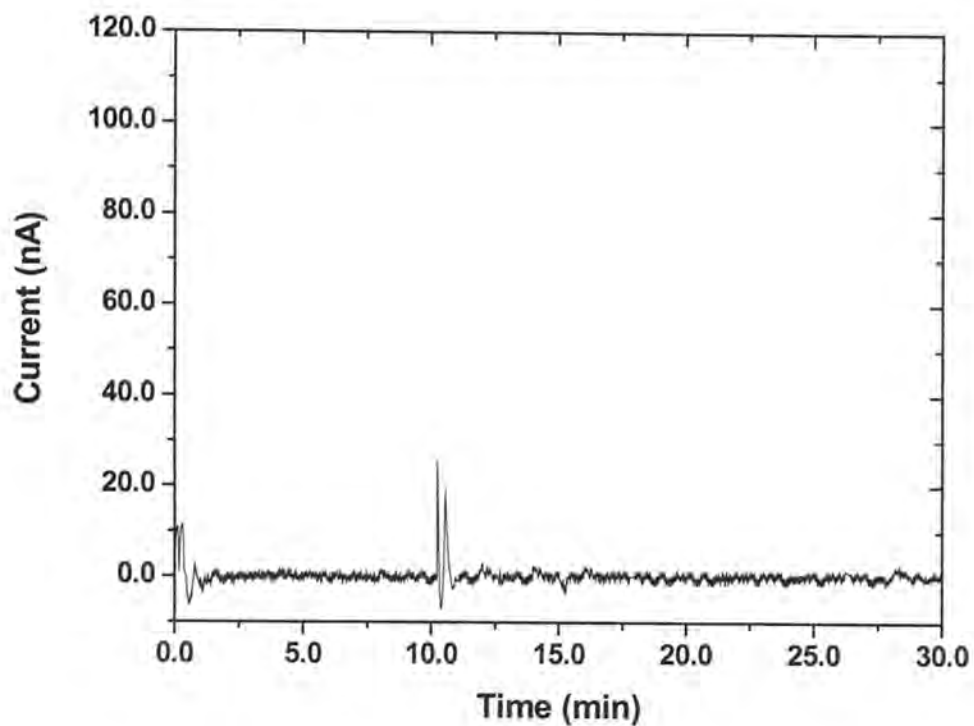


SYMAZINE [122-34-9]









ANEXO VI

Journal: Journal of Chromatography A, sent for publication.

**CAPILLARY ELECTROPHORESIS-MASS SPECTROMETRY OF ROSEMARY
EXTRACTS OBTAINED BY ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION USING
SUBCRITICAL WATER**

Miguel Herrero¹, David Arráez-Román², Antonio Segura², Ernst Kenndler³, Beatrice Gius^{3,4}, Maria Augusta Raggi⁴, Elena Ibáñez¹, Alejandro Cifuentes¹

¹*Department of Food Analysis, Institute of Industrial Fermentations (CSIC), Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.*

²*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, 18071 Granada, Spain.*

³*Institute of Analytical Chemistry, University of Vienna, Währingerstr. 38, Vienna, Austria.*

⁴*Department of Pharmaceutical Sciences, University of Bologna, Vie Belmeloro 6, Bologna, Italy*

ABSTRACT

Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry (CE-ESI-MS) was used to characterize natural products in different fractions obtained by accelerated solvent extraction (ASE) from rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*). The parameters of CE-ESI-MS were adjusted allowing the separation and characterization of different compounds from rosemary in the ASE fractions obtained using subcritical water. For this purpose, the different CE-ESI-MS parameters varied, namely the nature, pH and concentration of separation buffer, as well as electrospray parameters (dry gas temperature and flow, nebulizing gas pressure, and make-up flow). The following analytical conditions were found most favorable: aqueous CE buffer (40 mM ammonium acetate, adjusted to pH 9 with ammonium hydroxide); sheath liquid containing 2-propanol/water 60:40 (v/v) and 0.1 % (v/v) triethylamine, delivered by a microsyringe pump at a flow rate of 0.24 mL/h; drying gas flow rate 7 L/min at 350 °C, nebulizing gas pressure 2 psi, using a compound stability of 50%. Different antioxidant compounds (e.g. rosmarinic acid and carnosic acid) could be detected in the rosemary extracts by CE-ESI-MS without any additional treatment. CE-ESI-MS is able to differentiate the subtle variations in the rosemary extracts induced by the different ASE conditions (i.e., 60 and 100 °C). To our knowledge, this work is the first application on the combined use of ASE and CE-ESI-MS.

1. INTRODUCTION

At present, the demand of natural antioxidants has risen notably because of the growing interest that has been paid to natural food. Natural antioxidants, products that have a non-synthetic origin and are able to prevent or retard oxidation of fats and oils are usually applied by food industry not only because of their usefulness or preservation methods, but also because of their beneficial effects on human health as recently described [1]. Among the natural antioxidants, rosemary turned out being one of the spices with highest antioxidant activity [2]. Several previous studies have described the antioxidative constituents of rosemary [3-6]. These compounds have been isolated and identified as phenolic diterpens such as carnosol, rosmanol, 7-methyl-epirosmanol, isorosmanol, rosmadial, carnosic acid, methyl carnosate, and other phenolic acids such as rosmarinic acid.

Among the several methods to extract antioxidants from aromatic plants, those that use environmentally friendly solvents are supercritical fluid extraction (SFE) [7-11] and subcritical water extraction (SWE) [12]. The latter method is based on the extraction with hot water under a pressure sufficient to maintain water in the liquid state; it has been commonly employed to extract soil samples and plant material. Recently, the possibility of using subcritical water has been demonstrated to extract antioxidant compounds from rosemary [12]. With small changes in water temperature different extracts were obtained that contain different compounds enriched therein.

To characterize the isolated fractions obtained using the mentioned extraction methods from different samples, HPLC has been widely applied [11,13]. In previous work, we have demonstrated the suitability of this methodology to identify the antioxidant fraction of rosemary obtained by SFE [14] or SWE [12]. Nevertheless, under typical RP-HPLC conditions, the most polar compounds (as e.g. rosmarinic acid) might frequently be hardly determinable because they elute with the dead

volume, i.e. they are unretained under RP-HPLC conditions. In the literature, in addition to the known antioxidant activity from carnosic acid and carnosol, the biological activity from other polar compounds has been pointed out [15-17]. This limitation can reduce considerably the information about the composition of the extracts, especially when the procedure is based on relatively polar conditions, as is the case in SWE.

In order to overcome this limitation, the use of capillary electrophoresis (CE) can be an interesting alternative [18-22]. CE provides high efficiencies in short migration times for the separation of ionic and neutral compounds of very different nature. The utility of CE is greatly enhanced by mass spectrometry detection (CE-MS) and particularly, electrospray ionization mass spectrometry (CE-ESI-MS). This soft-ionization technique allows the production of ions even of labile compounds, as natural antioxidants are. Moreover, MS provides the sensitivity and detectability required for CE working conditions, in addition to the compound identification capability, what makes CE-ESI-MS one of the most powerful analytical techniques. CE-ESI-MS procedures have already been developed for the analysis of phenolic compounds from different samples [23,24]. Although various methods have been previously developed to analyze rosemary extracts by CE [25-26], none of these procedures are compatible with ESI-MS. Therefore, a new CE-MS method has to be developed to analyze the accelerated solvent extraction (ASE) fractions from rosemary obtained with subcritical water, containing natural antioxidants. This is the goal of the present paper.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Chemicals and samples

All chemicals were of analytical reagent grade and used as received. Ammonium acetate was obtained by Panreac (Barcelona, Spain), and ammonium hydroxide from E. Merck (Darmstadt, Germany), both were used for the CE running BGE at different concentrations and pHs. BGEs were prepared by weighting ammonium acetate at the concentrations indicated and adding ammonium hydroxide (0.5 M) to adjust the pH. The BGEs were stored at 4° C and brought to room temperature before use. Distilled water was deionized by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). Ethanol (HPLC grade) and sodium hydroxide were purchased from E. Merck. Triethylamine (Sigma, St. Louis, MO) and 2-propanol (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, Spain) were used in the sheath flow.

The rosemary samples (*Rosmarinus officinalis L.*) consisted of dried rosemary leaves obtained from an herbalist's shop (Murcia, Spain) dried using a traditional method as described previously [27]. Samples were ground under cryogenic carbon dioxide and stored (for two months maximum) in amber flasks at -20°C until use.

2.2. Accelerated solvent extraction (ASE).

Subcritical water extraction was performed in an Accelerated Solvent Extraction system (ASE 200, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) equipped with a solvent controller. Rosemary extractions were carried out at two different temperatures (60°C and 100°C) for 25 minutes. Previous to each extraction, an extraction cell heat-up time was completed for 5 minutes. Likewise, all extractions were performed in 11 mL extraction cells, containing 2.0 g of sample. Extraction

procedure was as follows: i) sample was loaded into cell, ii) cell was filled with water up to 1500 psi, iii) heat-up time was applied, iv) static extraction was undertaken, in which all system valves were closed, v) cell was rinsed with 60 % of cell volume with water, vi) water was purged from cell with gaseous N₂ and vii) depressurization took place. A rinse of the complete system was made between extractions. The extracts obtained were immediately protected from light and stored under refrigeration until dried. For this purpose, a Freeze Dryer (Unitop 400 SL, Virtis, Gardiner, NY, USA) was used. Subcritical water extracts from rosemary were freeze-dried, then 10 mg of each dry extract were freshly dissolved in 1 ml of water and immediately injected into CE-MS without further purification. Water was deoxygenated by purging with He for 15 min prior its use as extraction solvent.

2.3 HPLC conditions.

Samples to be analyzed by HPLC were prepared by dissolving 10 mg of freeze-dried rosemary extract in 1 mL of Milli-Q water. The separation was carried out following a published method [12] using an instrument (HP 1090 Liquid Chromatograph, Agilent, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode array detector and an autosampler (injection volume: 60 µL). Column was Nova-Pack C18 (Waters, Madrid, Spain; 3.9 x 150 mm, 4 µm particle size). The mobile phase was a mixture of solvent A (1 % acetic acid in water) and solvent B (1 % acetic acid in acetonitrile) according to a step gradient, changing from 50 % B at 5 minutes to 70 % B at 15 minutes and to 100 % B at 40 minutes, at a constant flow rate of 0.7 mL/min. The detection wavelength was 230 nm.

2.4. Capillary electrophoresis

Analyses were carried out in a CE apparatus (P/ACE 5500, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) equipped with an UV-Vis detector working at 200 nm and coupled with an orthogonal electrospray interface (ESI) to the MS detector. The CE instrument was controlled by a PC running System GOLD software from Beckman. A commercial coaxial sheath-flow interface was used (*vide infra*). The bare fused-silica capillary with 50 μm I.D. was purchased from Composite Metal Services (Worcester, England). The detection length to the UV detector was 20 cm, the total length (corresponding to the MS detection length) was 87 cm. Injections were made at the anodic end using N_2 pressure of 0.5 psi for 10 s (1 psi = 6894.76 Pa). All separations were done using 20 kV as running voltage.

Capillary conditioning was carried out by flushing for 1 min with 0.1 M sodium hydroxide, then for 2 min with water, and finally for 3 min with the separation buffer. Before first use, capillaries were conditioned using a 20 min rinse with 0.1 M NaOH followed by a water rinse for other 10 min. At the end of the day the capillary was rinsed as follows: 10 min (flush) H_2O , and 5 min (flush) air.

2.5. Mass spectrometry

MS experiments were performed with a ion-trap mass spectrometer (Esquire 2000TM, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) equipped with an orthogonal electrospray interface (model G1607A, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Electrical contact at the electrospray needle tip was established via a sheath liquid composed of 2-propanol-water (60:40, v/v) containing 0.1% (v/v) triethylamine and was delivered at a flow rate of 0.24 mL/h by a syringe pump (74900-00-05, Cole Palmer, Vernon Hills, Illinois, USA). The mass spectrometer was operated in the negative ion

mode. The spectrometer was scanned at 200-500 m/z range at 13000 u/s during separation and detection (target mass 350 m/z). Electrospray operating conditions were optimized as described under Results and Discussion. The instrument was controlled by a PC running the Esquire NT software from Bruker Daltonics.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Development of CE-ESI-MS method for rosemary fraction analyses.

Although there are already two different published CE procedures for the separation of rosemary compounds [25,26], these methods are not suitable for CE-ESI-MS, since the first one uses a micellar electrokinetic approach with SDS and the second applies a running buffer composed of sodium tetraborate, substances that are known to be incompatible with ESI-MS [28]. Moreover, these two published methods deal with rosemary extracts obtained using supercritical CO₂ or methanol, which means that the composition of these extracts is expected to be different from our fractions obtained using subcritical water. This can be deduced taking into account both, the different extraction procedures (i.e., supercritical extraction, direct extraction and subcritical extraction) and the different dielectric constant of the three fluids involved (i.e., CO₂, methanol and water, see Table 1). Therefore, a CE-MS method had to be developed for the extracts under consideration.

Initially, different BGEs compatibles with CE-ESI-MS were tested containing different concentrations of ammonium acetate at high pH values. Under basic conditions the compounds expected to be extracted using subcritical water (mainly polyphenols) can acquire some negative charge, that could favour their separation by CE. Ammonium acetate concentrations from 10 to 100

mM (in steps of 30) and pH values from 8 to 10 (in steps of 0.5) were tested. A rosemary extract obtained using subcritical water at 100 °C was used as sample. The best conditions in terms of efficiency, peak resolution and analysis speed were obtained with 40 mM ammonium acetate at pH 9.0, and these conditions were chosen for the subsequent optimization of the ESI parameters.

It has repeatedly been demonstrated that optimization of the ESI parameters play a key role in the achievement of adequate MS signals for any analyte [29-30]. In order to carry out the optimization for the detection of the compounds extracted from rosemary, an univariate method was applied; the sum of the peak intensities of the four major compounds from the ASE extract obtained at 100 °C was used as output parameter. Initially, four different types of sheath flow liquids were tested. They consisted of 2-propanol/water 60:40 (v/v), 2-propanol/water 80:20 (v/v) with and without 0.1 % (v/v) of triethylamine. Using the 80:20 sheath liquid with and without triethylamine, the current broke down very frequently indicating a poor electrical contact between the CE and ESI electrical circuits probably caused by the high organic content of this solution. The solution containing a ratio of 60:40 of 2-propanol/water provided higher stability; moreover, addition of 0.1% (v/v) triethylamine resulted in a higher MS signal. Therefore, 2-propanol/water 60/40 (v/v) with 0.1% (v/v) triethylamine was selected as sheath liquid. Next, other ESI-MS parameters were optimized with the height of the MS signal for the main compounds detected in the rosemary extract as the criterion: Dry gas temperature (Figure 1A) and flow (Figure 1C), nebulizing gas pressure (Figure 1B), compound stability (Figure 1D) and sheath liquid flow (Figure 1E). As can be seen, the highest temperature at which the instrument can work (i.e., 350 °C) provided the best signal, and the optimum of the nebulizer gas pressure was obtained at 2 psi (i.e., the minimum required in order to obtain an stable spray). Optimum dry gas flow was achieved at 7 l/min This optimum is seemingly the result of both, the siphoning effect induced by higher pressures (bringing about lower efficiencies and, therefore, MS signals) and the lower ionization yield achieved at lower pressures.

It was also observed that the compound stability played an important role for this type of compounds. Thus, at higher percentages (i.e., indicating a lower electric field into the capillary skimmer) the number of molecules that are transferred into the MS is too low, while at higher electric fields some of the compounds (mostly the compound marked as 4, *vide infra*) become unstable, indicated by a decreasing of their peak intensity. Therefore, a balance was found using a compound stability percentage of 50%. The optimum sheath liquid flow also was at 0.24 mL/h. This effect has been also mentioned in the literature [30] indicating that at low sheath liquid flows the ionization yield is reduced due to instability of the spray, while at higher flows the high dilution of the electrophoretic bands emerging from the capillary can be too high and the intensity of the MS signal for these compounds is therefore reduced. As a result, the following CE-ESI-MS conditions were finally selected: 40 mM ammonium acetate / ammonium hydroxide, pH 9, as running BGE; a sheath liquid consisting of 2-propanol/water 60:40 (v/v) and 0.1 % (v/v) triethylamine delivered at a flow rate of 0.24 ml/h; a drying gas flow rate at 7 l/min and at 350 °C, nebulizing gas pressure of 2 psi; MS analyses were carried out using a compound stability of 50 %.

Under these conditions, CE-ESI-MS separations as the one given in Figure 2A were obtained for these rosemary ASE-fractions. The reproducibility of the CE-ESI-MS analysis, expressed by the RSD% of five consecutive injections was 1.04 % for the analysis time and 5.89 % for the peak area, both measured for peak.

3.2 Comparison of CE-ESI-MS and HPLC-UV.

Analyzing the same rosemary fraction, the present approach was compared with a published HPLC-UV procedure [12]. Figure 2 shows the results of both methods. It can be seen that the chromatogram provides less information, probably due the lower sensitivity of HPLC on the one

hand, and perhaps due to the unfavorably high polarity of the compounds involved, on the other hand. It is known that reverse phase-HPLC has drawbacks when applied to analyze highly polar compounds [17] because they are unretained and elute with the dead volume, not being separable in this way. Carnosic acid e.g., the less polar compound, has a retention time of about 15 min under these RP-HPLC conditions (see Figure 2B), whereas rosmarinic acid – the higher polar compound – indeed elutes unretained [12,17]. In contrast, the CE-ESI-MS procedure clearly distinguishes at least six different compounds (Figure 2A). Moreover, Figure 3 demonstrates that it is possible to obtain adequate MS spectra for all analytes.

From these results and the MS-MS spectra recorded (data not shown), peaks 3 and 4 could be unequivocally identified as carnosic and rosmarinic acid,. Moreover, based on the molecular mass measured, peak 5 could tentatively be assigned as homoplantagenin ($[M-H]^- = 461.2$ m/z) and peak 6 as galocatechin ($[M-H]^- = 305.3$ m/z). The other two compounds (peak 1 and 2) could not be identified, although some possible structures come out after carrying out the MS-MS experiments. A clearer assignment of these compounds is now being carried out in our lab.

3.3 Characterization of rosemary ASE-extracts by CE-ESI-MS.

The combined ASE-subcritical water extraction and CE-ESI-MS was applied analyzing the extracts obtained at two different extraction conditions. Subcritical water was used at 60 and 100 °C, keeping constant the other parameters. Figure 4 shows the extracted ion electropherograms of the two fractions. It can be deduced that the extraction of carnosic acid is favoured at higher temperatures. The ASE-fraction obtained from rosemary at 60 °C does not contain carnosic acid, in contrast to the 100 °C fraction that does. These results corroborate previous studies performed at our laboratory [12], where the ability of subcritical water to selectively extract and isolate different antioxidant

compounds from plants depending on the temperature used was demonstrated. Thus, the more polar compounds (such as rosmarinic acid) are preferentially extracted at lower temperatures while the less polar compounds (e.g., carnosic acid) were extracted at higher temperatures. The result given in Figure 4 demonstrates the possibility of tuning the selectivity for antioxidant extraction by using different water temperatures, being able to yield extracts of diverse composition, and thus different activity. The approach developed in our laboratory offers the possibility of obtaining and characterizing antioxidant fractions from natural sources in a fast and efficient way.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank to Dr. Gerard Bruin and Novartis Pharma AG (Basel, Switzerland) for the gift of the P/ACE 5500 instrument used in this work. Financial support from a bilateral project Spanish MCYT-University of Vienna (HU2002-0042) and a CICYT-AGL2002-04621-C02-02 project is acknowledged. M.H. thanks MCYT for an FPI grant. The grant for B.G. from ERASMUS is acknowledged.

5. REFERENCES

- [1] D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe, Food antioxidants, Marcel Dekker, New York, 1996, p.1
- [2] J.R. Chipault, G.R. Mizumo, J.M. Hawkins, W.O. Lundberg, The antioxidant properties of natural spices. Food res. 17 (1952) 46
- [3] R. Inatani, N. Nakatani, H. Fuwa, Agric. Biol. Chem. 47 (1983) 521
- [4] K. Schwarz, W. Ternes, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195 (1992) 95
- [5] K. Schwarz, W. Ternes, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195 (1992) 99
- [6] K. Schwarz, W. Ternes, Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195 (1992) 104
- [7] Z. Djamarti, R.M. Jankov, E. Schwirtlich, B. Djulinac, A. Djordjevic, J. Am. Oil Chem. Soc. 68 (1991) 731
- [8] U. Nguyen, G. Evans, G. Frankman, in: S.S.H. Rizvi (Ed), Supercritical fluid processing of food and biomaterials, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK, 1994, p103
- [9] T. Muehlnikel, Food Marketing Technol. 6 (1992) 37
- [10] D. Gerard, K. Quirin, E. Schwarz, Food Marketing Technol. 9 (1995) 46
- [11] M.T. Tena, M. Valcárcel, P. Hidalgo, J.L. Ubera, Anal.Chem. 69 (1997) 521
- [12] E. Ibañez, A. Kubátová, F.J. Señoráns, S. Cavero, G. Reglero, B. Hawthorne, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 375
- [13] M.E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, J. Am. Oil Chem. Soc. 73 (1996) 546
- [14] F.J. Señorans, E. Ibañez, S. Cavero, J. Tabera, G. Reglero, J. Chromatogr. A 870 (2000) 491
- [15] Z. Wei, Y.W. Shiow, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5165
- [16] R. Cervellati, C. Renzulli, M.C. Guerra, E. Speroni, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 7504
- [17] M.J. del Baño, J. Lorente, J. Castillo, O. Benavente-García, J.A. del Río, A. Ortuño, K.W. Quirin, D. Gerard, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 4247
- [18] W.G. Kuhr, Anal. Chem. 62 (1990) 403R

- [19] W.G. Kurh, C.A. Monnig, *Anal. Chem.* 64 (1992) 389R
- [20] C.A. Monnig, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 66 (1994) 280R
- [21] S.C. Beale, *Anal. Chem.* 70 (1998) 279R
- [22] R.L. St. Claire, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 569R
- [23] G. Vanhoenacker, A. De Villiers, K. Lazou, D. De Keukeleire, P. Sandra, *Chromatographia* 54 (2001) 309
- [24] F. Lafont, M.A. Aramendia, I. García, V. Borau, C. Jimenez, J.M. Marinas, F.J. Urbano, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1991) 562
- [25] E. Ibañez, A. Cifuentes, A.L. Crego, F.J. Señorans, S. Cavero, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4060
- [26] R. Sáenz-López, P. Fernández-Zurbano, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 251
- [27] E. Ibañez, A. Oca, G. de Murga, S. Lopez-Sebastian, J. Tabera, G. Reglero, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1400
- [28] C. Simó, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 24 (2003) 834
- [29] J.C. Severs, R.D. Smith, in: R.B. Cole (Ed.), *Capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry*, John Wiley & Sons, New York, 1997 p. 38
- [30] S. Cherkaoui, L.C. Veuthey, *Electrophoresis* 23 (2002) 442

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Optimization of ESI-MS parameters. For details see text.

Figure 2. Comparison of HPLC-UV and CE-MS base peak trace of a rosemary extract obtained using subcritical water at 100°C. CE-MS conditions: 50 μm i.d. fused silica capillary, 87 cm total length. BGE: 40 mM ammonium acetate, adjusted at pH 9 with ammonium hydroxide. Voltage: 20 kV. Injections: 10 s at 0.5 psi. Sheath liquid: 2-propanol/water 60:40 (v/v) containing 0.1 % (v/v) triethylamine, flow rate 0.24 mL/h. Drying gas: 7 L/min, 350 °C. Nebulizing gas pressure 2 psi. MS analyses were carried out using negative polarity. Compound stability: 50 %. MS scan 200-500 m/z (target mass=300 m/z). Sample: rosemary extract, 10 mg/ml concentration. For other conditions see text.

Figure 3. MS spectra of the main peaks detected in a rosemary extract obtained using subcritical water at 100°C. Peak notation and conditions as in Figure 2A.

Figure 4. Extracted ion electropherograms obtained from two different rosemary extracts obtained using subcritical water at 60 °C and 100 °C. Extracted ions: 462.8 m/z; 387.4 m/z; 331.4 m/z (carnosic acid); 359.3 m/z (rosmarinic acid); 461.2 m/z; 305.3 m/z (all +/- 0.5 m/z). Conditions as in Figure 2A.

Table 1. Dielectric constant of the three fluids involved at each extraction conditions.

| Solvent | Dielectric Constant | Temperature (°C) | Pressure (atm) |
|-----------------|---------------------|------------------|----------------|
| Methanol | 32.6 | 25 | 1 |
| CO ₂ | 1.00 - 1.60 | 0 -100 | 1 |
| Water | 58.5 | 100 | 100 |
| Water | ~ 65.0 | 60 | 100 |

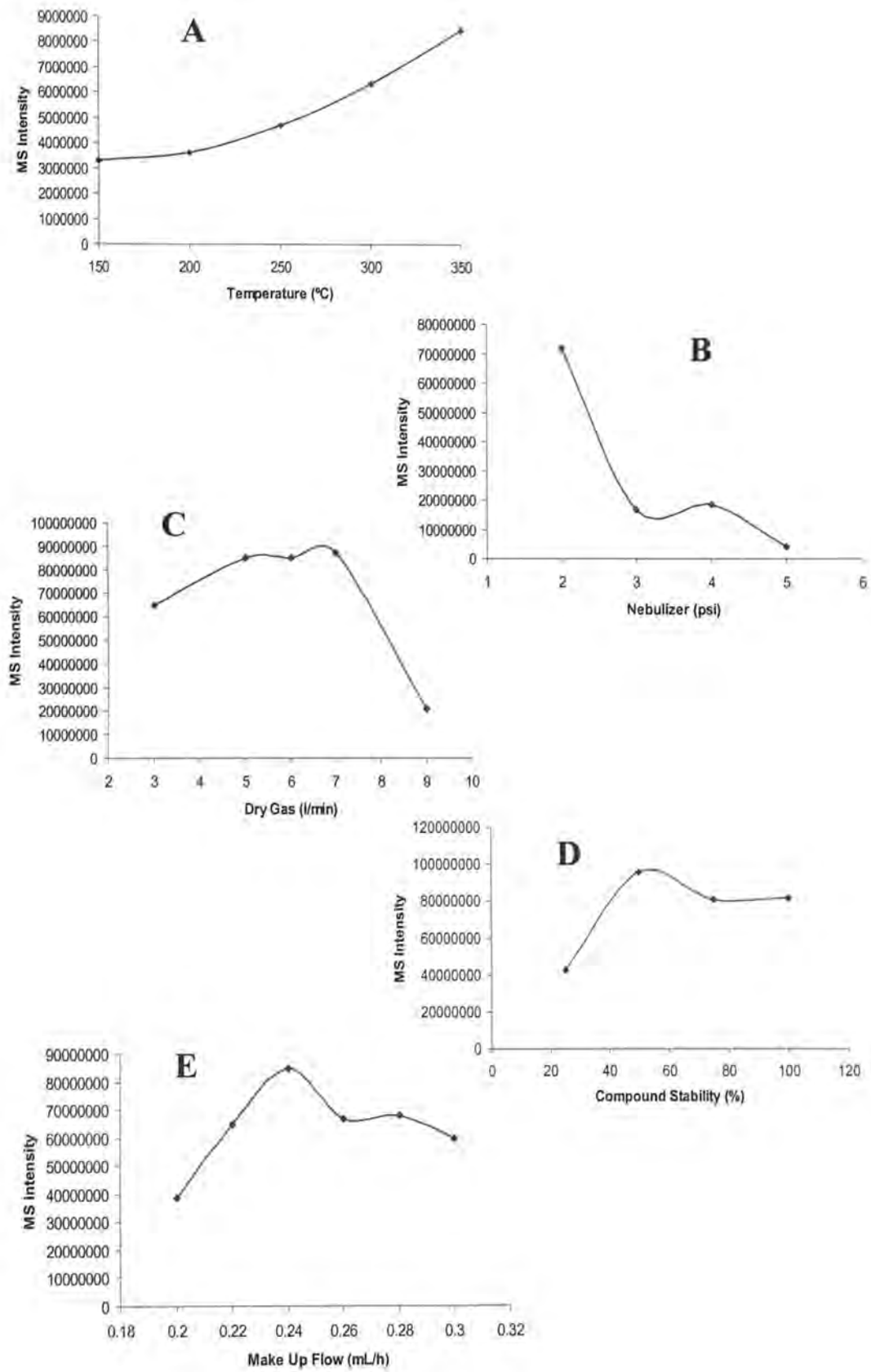


Figure 1

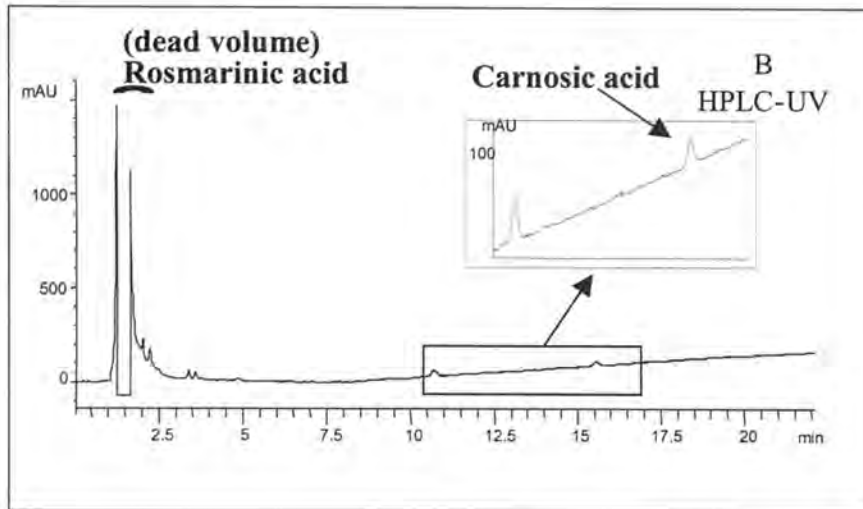
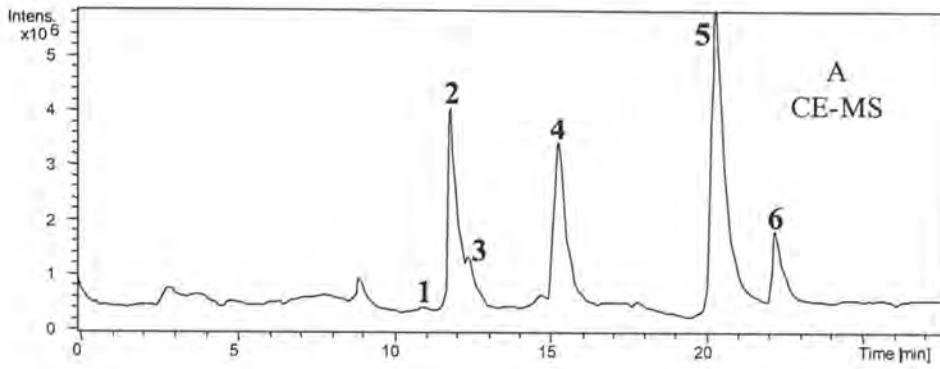


Figure 2

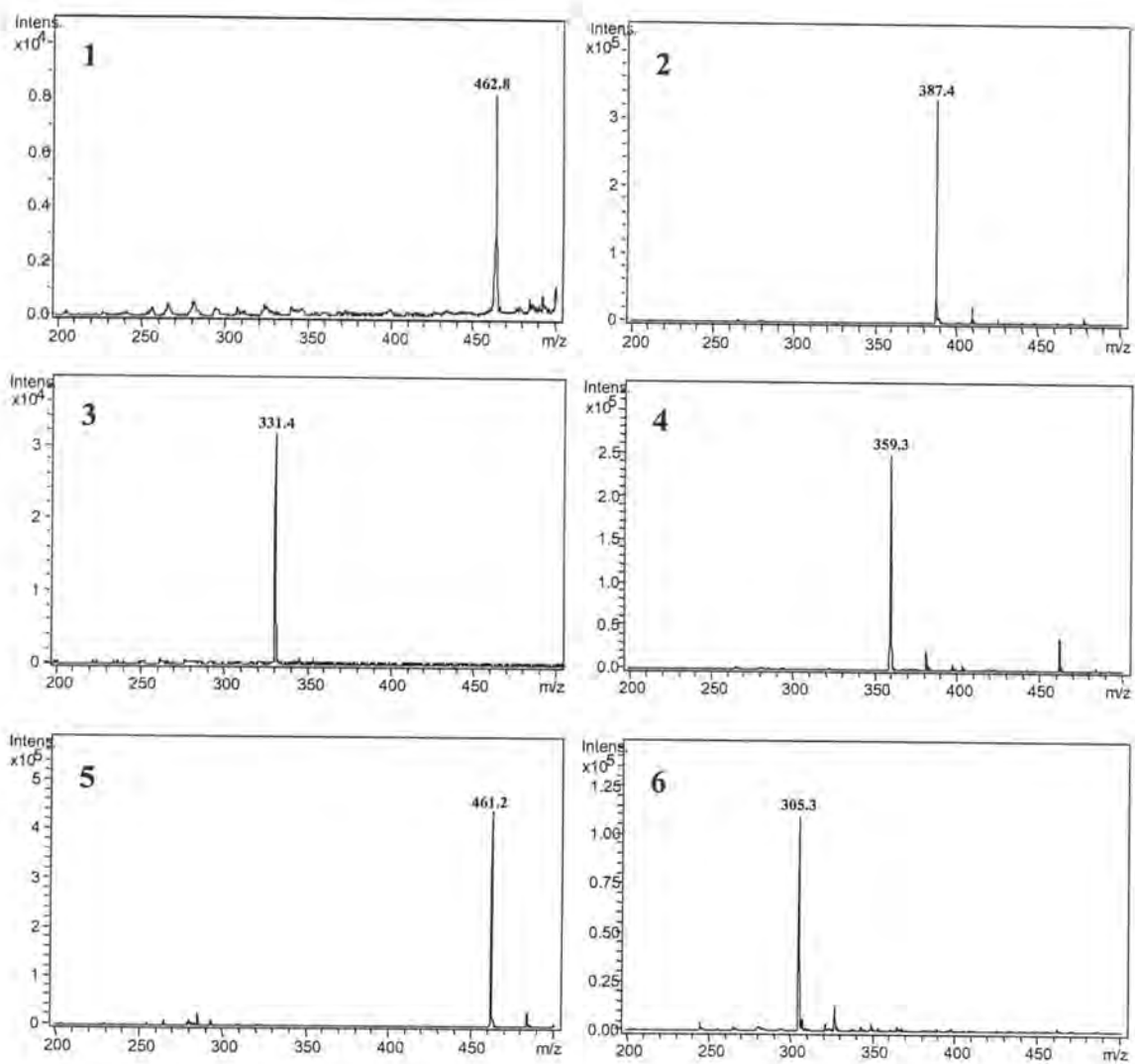


Figure 3

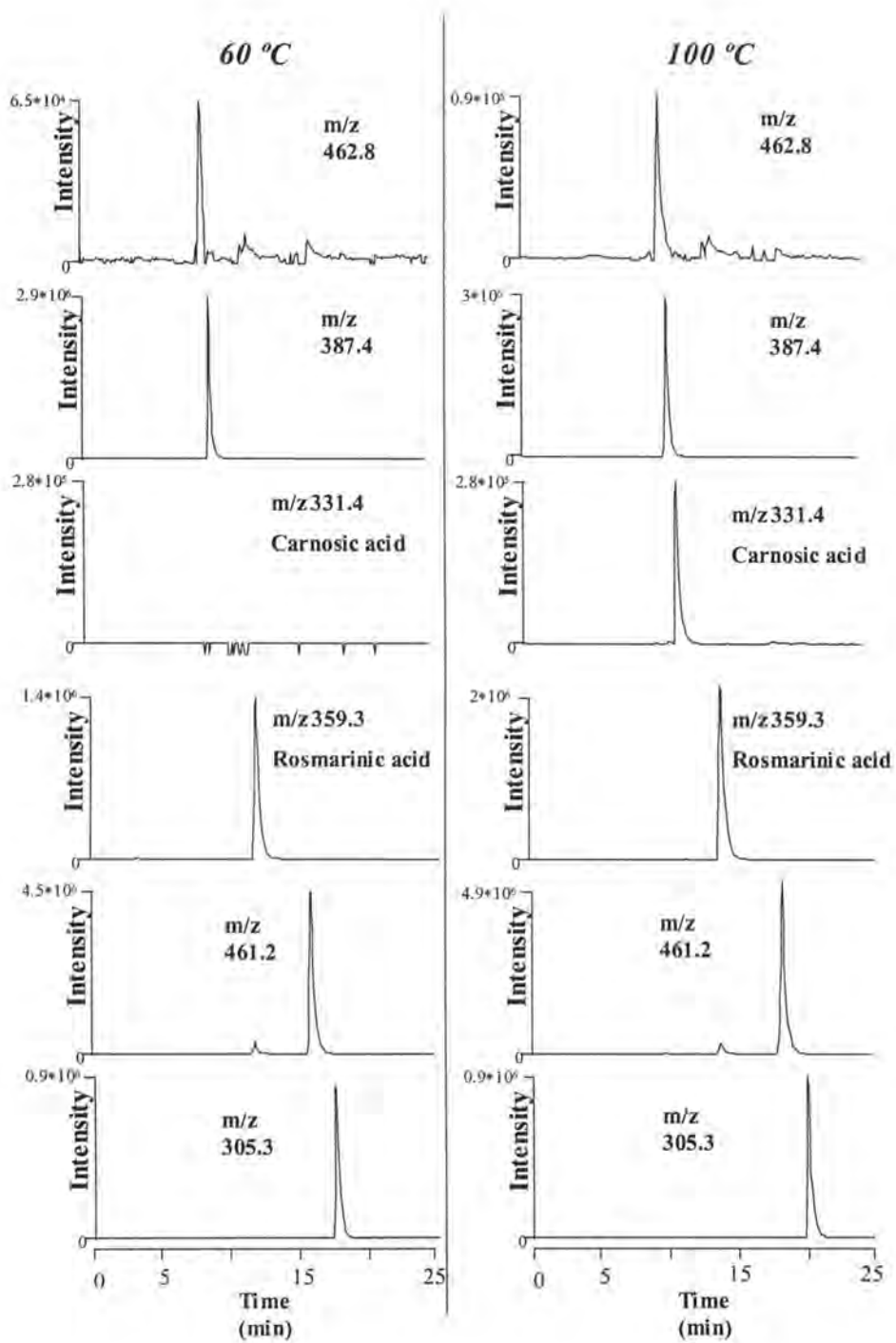


Figure 4