

**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS
CAPILAR A LA DETERMINACIÓN DE
FENOTIAZINAS, QUINOLONAS Y TRIAZINAS**

TESIS DOCTORAL

Francisco J. Lara Vargas

Granada, 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Francisco J. Lara Vargas
D.L.: GR.899-2008
ISBN: 978-84-691-4578-4

**APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS
CAPILAR A LA DETERMINACIÓN DE
FENOTIAZINAS, QUINOLONAS Y TRIAZINAS**

por

Francisco Jesús Lara Vargas

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

MEMORIA presentada para aspirar al Grado de Doctor en Ciencias, Sección Químicas,
con mención de “Doctorado Europeo”

Fdo. Francisco Jesús Lara Vargas
Licenciado en Química

VISADA en Granada, a 17 de marzo de 2008

Directores de la Memoria,

Fdo. Prof. Dra. Ana M. García
Campaña
**Profesora Titular del Dpto. de
Química Analítica de la
Universidad de Granada**

Fdo. Prof. Dr. Fermín Alés Barrero
**Profesor Titular del Dpto. de
Química Analítica de la
Universidad de Granada**

Dña. Ana María García Campaña, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y responsable del grupo de investigación “Calidad en Química Analítica, Alimentaria, Ambiental y Clínica” (FQM-302)

CERTIFICA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de “APLICACIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR A LA DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS, QUINOLONAS Y TRIAZINAS”, ha sido realizado bajo mi dirección y la del Prof. D. Fermín Alés Barrero, en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, con mención de “Doctorado Europeo” dentro del programa de doctorado “Química”.

Granada, 17 de marzo de 2008

Este trabajo se ha realizado gracias a la concesión de una beca de formación de personal docente e investigador (orden 12/05/03) de la Junta de Andalucía, a un contrato de investigación de la Universidad de Granada, al apoyo del grupo de investigación FQM-302 y a la financiación obtenida en los siguientes proyectos de investigación en los que se enmarcan los resultados obtenidos y presentados en la memoria:

- “*Sistemas automatizados de análisis en Medicina: aplicación de quimioluminiscencia y electroforesis capilar en control de calidad de compuestos de interés biomédico y en su monitorización en fluidos biológicos*” (Ref.: PI021369, Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo).
- “*Implantación de nuevas estrategias analíticas, bajo criterios de calidad, para la determinación de residuos de fármacos y presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en leche, derivados lácteos y otros alimentos*” (Ref.: CAL03-096-C2-2, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, MCyT).
- “*Criterios de calidad en el control analítico de contaminantes en alimentos grasos de origen animal: aplicación a la detectores de masas, de fluorescencia inducida por láser y quimioluminiscentes a técnicas cromatográficas y de electroforesis capilar*” (Ref.: CAL03-087-C2-1, Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, MCyT).
- “*Nuevas estrategias basadas en técnicas miniaturizadas acopladas con detección por fluorescencia y espectrometría de masas para el control de pesticidas y fármacos en muestras ambientales y biológicas*” (Ref.: CTM2006-06363, Ministerio de Educación y Ciencia)

ÍNDICE

| | |
|--|----------|
| RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO | 1 |
|--|----------|

| | |
|--|----------|
| SUMMARY AND AIM OF THE THESIS | 7 |
|--|----------|

| | |
|---|-----------|
| PARTE 1: DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS | 13 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 1.- <i>Definición y clasificación de los fármacos</i> | <i>15</i> |
| 2.- <i>Control de calidad en los productos farmacéuticos.....</i> | <i>15</i> |
| 3.- <i>Ensayos en control de calidad de fármacos</i> | <i>18</i> |
| 4.- <i>Descubrimiento y desarrollo de las fenotiazinas</i> | <i>20</i> |
| 5.- <i>Perfil farmacológico de las fenotiazinas</i> | <i>22</i> |
| 6.- <i>Mecanismo de acción de las fenotiazinas estudiadas</i> | <i>23</i> |
| 7.- <i>Vías metabólicas de las fenotiazinas</i> | <i>24</i> |
| 8.- <i>Propiedades físicas de las fenotiazinas estudiadas</i> | <i>25</i> |
| 9.- <i>Métodos analíticos para la determinación de fenotiazinas</i> | <i>30</i> |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE TIAZINAMIO, PROMAZINA Y PROMETAZINA EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL | 35 |
|---|-----------|

| | |
|---|-----------|
| 1.- <i>Introducción</i> | <i>37</i> |
| 2.- <i>Reactivos y productos.....</i> | <i>38</i> |
| 3.- <i>Instrumentación y programas informáticos</i> | <i>38</i> |
| 4.- <i>Disoluciones y preparación de las muestras</i> | <i>39</i> |
| 5.- <i>Procedimiento electroforético propuesto</i> | <i>40</i> |
| 6.- <i>Optimización de las condiciones experimentales.....</i> | <i>40</i> |
| 7.- <i>Parámetros de calidad del método</i> | <i>46</i> |
| 7.1.- <i>Rectas de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación</i> | <i>46</i> |
| 7.2.- <i>Evaluación de la precisión</i> | <i>47</i> |
| 7.3.- <i>Especificidad</i> | <i>48</i> |
| 7.4.- <i>Robustez</i> | <i>49</i> |
| 7.5.- <i>Pureza de pico</i> | <i>50</i> |
| 8.- <i>Aplicación del método propuesto a la determinación de fenotiazinas en preparados farmacéuticos</i> | <i>51</i> |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN <i>ON-COLUMN</i> PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS EN ORINA | 53 |
| 1.- <i>Introducción</i> | 55 |
| 2.- <i>Reactivos y disoluciones</i> | 58 |
| 3.- <i>Instrumentación y programas informáticos</i> | 59 |
| 4.- <i>Procedimiento electroforético</i> | 59 |
| 5.- <i>Procedimiento de extracción en fase sólida para el análisis de fenotizinas en orina</i> | 60 |
| 6.- <i>Resultados y discusión</i> | 60 |
| 6.1.- <i>Optimización de las condiciones de separación electroforéticas</i> | 60 |
| 6.2.- <i>Optimización de la inyección de muestra con campo amplificado (FASI)</i> | 62 |
| 6.3.- <i>Optimización del procedimiento de extracción en fase sólida para el análisis de fenotizinas en orina</i> | 68 |
| 6.4.- <i>Rectas de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación</i> | 74 |
| 6.5.- <i>Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación</i> | 76 |
| 6.6.- <i>Evaluación de la precisión</i> | 77 |
| 6.7.- <i>Especificidad</i> | 78 |
| CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS CAPILAR CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y MUESTRAS DE ORINA | 79 |
| 1.- <i>Introducción</i> | 81 |
| 2.- <i>Reactivos y productos</i> | 84 |
| 3.- <i>Instrumentación y programas informáticos</i> | 85 |
| 4.- <i>Disoluciones y preparación de las muestras</i> | 88 |
| 5.- <i>Procedimiento electroforético propuesto</i> | 89 |
| 6.- <i>Resultados y discusión</i> | 89 |
| 6.1. <i>Validación del dispositivo CE-CL construido</i> | 89 |
| 6.2.- <i>Selección de la reacción quimioluminiscente para la determinación de fenotiazinas mediante CE-CL</i> | 91 |
| 6.3.- <i>Possible mecanismo de la reacción quimioluminiscente seleccionada</i> | 95 |
| 6.4.- <i>Optimización de la separación electroforética</i> | 96 |
| 6.5.- <i>Optimización de la detección quimioluminiscente</i> | 98 |
| 6.6.- <i>Rectas de calibrado y parámetros de calidad del método</i> | 100 |
| 6.6.1.- <i>Linealidad, límites de detección y cuantificación</i> | 100 |
| 6.6.1.A.- <i>Empleando inyección por gravedad</i> | 100 |
| 6.6.1.B.- <i>Empleando inyección por electrocinética</i> | 101 |
| 6.6.2.- <i>Estudio de la precisión</i> | 102 |
| 6.6.2.A.- <i>Empleando inyección por gravedad</i> | 102 |
| 6.6.2.B.- <i>Empleando inyección electrocinética</i> | 102 |
| 6.6.3.- <i>Robustez de las variables que afectan a la detección quimioluminiscente</i> | 103 |

| | |
|--|-----|
| <i>7.- Aplicaciones del método CE-CL propuesto a la determinación de fenotiazinas en preparados farmacéuticos y muestras de orina.....</i> | 104 |
| <i>7.1.- Análisis de compuestos farmacéuticos</i> | 104 |
| <i>7.2.- Análisis de muestras de orina</i> | 106 |

PARTE 2: DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS DE USO VETERINARIO 109

| | |
|---|------------|
| INTRODUCCIÓN | 111 |
| <i>1.- Evolución histórica de las quinolonas</i> | <i>111</i> |
| <i>2.- Clasificación química de las quinolonas</i> | <i>112</i> |
| <i>3.- Mecanismo y espectro de acción de las quinolonas</i> | <i>113</i> |
| <i>4.- Resistencia a las quinolonas.....</i> | <i>115</i> |
| <i>5.- Difusión y excreción de las quinolonas en organismos</i> | <i>115</i> |
| <i>6.- Características farmacocinéticas de las quinolonas.....</i> | <i>116</i> |
| <i>7.- Efectos adversos de las quinolonas</i> | <i>118</i> |
| <i>8.- Campo de aplicación de las quinolonas</i> | <i>118</i> |
| <i>9.- Uso de las quinolonas en medicina veterinaria y control en alimentos de origen animal.....</i> | <i>119</i> |
| <i>10. Propiedades físico-químicas de las quinolonas.....</i> | <i>122</i> |
| <i>11.- Métodos analíticos para la determinación de quinolonas en alimentos....</i> | <i>131</i> |

| | |
|---|------------|
| CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN MULTIRRESIDUO DE QUINOLONAS DE USO VETERINARIO EN LECHE CRUDA DE VACA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM (CE-MS/MS) | 133 |
| <i>1.- Introducción</i> | <i>135</i> |
| <i>2.- Reactivos, disoluciones y material.....</i> | <i>137</i> |
| <i>3.- Instrumentación y programas informáticos</i> | <i>137</i> |
| <i>4.- Procedimiento electroforético propuesto</i> | <i>138</i> |
| <i>5.- Interfase ESI</i> | <i>138</i> |
| <i>6.- Condiciones MS y MS/MS.....</i> | <i>139</i> |
| <i>7.- Preparación de la muestra de leche</i> | <i>141</i> |
| <i>8.- Resultados y discusión</i> | <i>142</i> |
| <i>8.1.- Optimización de la separación electroforética</i> | <i>142</i> |
| <i>8.2.- Optimización CE-ESI-MS(/MS)</i> | <i>145</i> |
| <i>8.3.- Optimización del tratamiento de muestra</i> | <i>151</i> |
| <i>8.4.- Validación del método CE-MS/MS propuesto</i> | <i>155</i> |
| <i>8.4.1.- Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación</i> | <i>155</i> |
| <i>8.4.2.-Estudio de la precisión</i> | <i>157</i> |
| <i>8.4.3.-Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación</i> | <i>158</i> |

| | |
|--|------------|
| CAPÍTULO 5. APLICACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA <i>IN-LINE</i> EN ELECTROFORESIS CAPILAR CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN CARNE MEDIANTE EXTRACCIÓN LÍQUIDA PRESURIZADA..... | 161 |
| 1.- <i>Introducción</i> | 163 |
| 2.- <i>Reactivos, disoluciones y material</i> | 167 |
| 3.- <i>Instrumentación y programas informáticos</i> | 168 |
| 4.- <i>Procedimiento electroforético propuesto</i> | 168 |
| 5.- <i>Interfase ESI</i> | 169 |
| 6.- <i>Condiciones MS y MS/MS</i> | 169 |
| 7.- <i>Construcción del concentrador in-line</i> | 171 |
| 8.- <i>Preparación de las muestras de músculo de pollo</i> | 172 |
| 9.- <i>Resultados y discusión</i> | 173 |
| 9.1.- <i>Acoplamiento in-line de la extracción en fase sólida y la electroforesis capilar</i> | 173 |
| 9.2.- <i>Modificación de la separación electroforética en presencia del concentrador</i> | 174 |
| 9.3.- <i>Optimización del método in-line SPE-CE-MS/MS para la determinación de quinolonas</i> | 175 |
| 9.4.- <i>Optimización del tratamiento de muestra mediante extracción líquida presurizada</i> | 177 |
| 9.5.- <i>Validación del método in-line SPE-CE-MS/MS propuesto</i> | 180 |
| 9.5.1.- <i>Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación</i> | 180 |
| 9.5.2.- <i>Estudio de la precisión</i> | 182 |
| 9.5.3.- <i>Evaluación de la eficacia del concentrador: recuperaciones in-line</i> | 184 |
| 9.6.- <i>Validación del método PLE-SPE- in-line SPE -CE-MS/MS en matriz</i> | 187 |
| 9.6.1.- <i>Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación</i> | 187 |
| 9.6.2.- <i>Estudio de la precisión</i> | 190 |
| 9.6.3.- <i>Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación</i> | 191 |

PART 3: DETERMINATION OF TRIAZINES 193

| | |
|---|------------|
| CHAPTER 6. EVALUATION OF A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS IN-LINE CONCENTRATOR FOR THE DETERMINATION OF ATRAZINE AND ITS DEGRADATION PRODUCTS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS | 195 |
| 1.- Introduction..... | 197 |
| 2.- Chemicals and solutions | 199 |
| 3.- Instrumentation..... | 199 |
| 4.- Electrophoretic procedure for normal CE | 199 |
| 5.- Electrophoretic procedure for CE with the concentrators | 200 |
| 6.- Construction of the in-line concentrator for CE using MIPs | 200 |
| 7.- Off-line solid-phase extraction using MIPs..... | 201 |
| 8.- Sample treatment of human urine | 201 |
| 9.- Results and discussion | 202 |
| 9.1.- Optimization of the electrophoretic separation | 202 |
| 9.2.- Optimization of the in-line concentrator device using MIPs | 205 |
| 9.3.- Optimization of the variables involved in the in-line concentration with MIPs | 205 |
| 9.4.- Validation of the in-line MISPE-CE method | 208 |
| 9.4.1.- Calibration curves, linearity and detection and quantification limits | 208 |
| 9.4.2.- Precision study | 209 |
| 9.5.- Application of the proposed in-line MISPE-CE method to human urine samples | 209 |
| 9.6.- Comparison between MIPs and Oasis® HLB sorbents as in-line concentrators | 210 |
| CONCLUSIONES | 213 |
| CONCLUSIONS..... | 219 |
| ANEXO: PUBLICACIONES | 225 |

**RESUMEN Y
JUSTIFICACIÓN DEL
TRABAJO**

RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

En las últimas décadas la electroforesis capilar (CE) se ha situado en un lugar destacado en el ámbito de las técnicas analíticas separativas, siendo posible actualmente su acoplamiento a diversos sistemas de detección, lo que ha favorecido el aumento exponencial de su campo de aplicación. La presente memoria se enmarca dentro de una de las líneas del grupo de investigación “Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica” (grupo FQM-302 del Plan Andaluz de Investigación), cuyo objetivo principal es demostrar la potencialidad de la CE en la resolución de distintos problemas relacionados con el análisis farmacéutico, clínico, alimentario y toxicológico. Se han incorporado diferentes sistemas de detección y se han desarrollado distintas metodologías para mejorar los límites de detección, considerando las limitaciones que presenta la técnica en cuanto a sensibilidad debido al reducido diámetro interno de los capilares, la pequeña cantidad de muestra inyectada y el hecho de que la detección se realiza en el mismo capilar.

La memoria se estructura en tres partes en las que se proponen nuevos métodos analíticos para la determinación de diferentes familias de compuestos, en función de los objetivos de los proyectos de investigación en los que se enmarcan los estudios.

En la primera parte, se proponen diversas metodologías para la determinación de fenotiazinas, englobando 3 capítulos, con objeto de justificar algunos de los objetivos del proyecto “*Sistemas automatizados de análisis en medicina: aplicación de quimioluminiscencia y electroforesis capilar en control de calidad de compuestos de interés biomédico y en su monitorización en fluidos biológicos*” (Ref.: PI021369, Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo).

Así, en el capítulo 1 se ha desarrollado y validado un método utilizando electroforesis capilar zonal (CZE) para el análisis cuantitativo de tres fenotiazinas: metilsulfato de tiazinamio (TMS), hidrocloruro de promazina (PMH) e hidrocloruro de prometazina (PTH) en preparados farmacéuticos. Los parámetros que afectan a la separación electroforética (pH y concentración del tampón, porcentaje de acetonitrilo, temperatura del capilar y voltaje aplicado) se han estudiado por medio de una optimización multivariante empleando un diseño de experimentos donde el objetivo es obtener la máxima eficacia posible. El método permite la separación de las fenotiazinas estudiadas en 5 min. en condiciones óptimas (tampón 100 mM tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) a pH 8'0 y con un 15% de acetonitrilo). El capilar empleado tenía una longitud de 58'5 cm y estaba termostatizado a una temperatura de 25°C. El voltaje aplicado fue de 30 kV. La detección se llevó a cabo a una longitud de onda de 254 nm. Con la utilización de un patrón interno se consiguieron valores aceptables de precisión (la desviación estándar relativa, DER, fue del 5'3%) y de linealidad. Los límites de detección (LOD) fueron 2'8 µg/mL para TMS y 3'3 µg/mL para PMH y PTH. El método se aplicó satisfactoriamente al análisis de preparados farmacéuticos.

En el capítulo 2 se decidió extender la aplicación de la CZE con detección UV-visible a la determinación de cinco fenotiazinas (metilsulfato de tiazinamio (TMS), promazina

(PMH), clorpromazina (CPH), tioridazina (THZ) y prometazina (PTH)), pero en este caso se pretendió la aplicación del método a muestras de orina humana con objeto de plantear la monitorización terapéutica de tales fármacos. Se consiguió una separación óptima en capilar burbuja de 64'5 cm de longitud total \times 75 μm de diámetro interno. El tampón de separación consistió en una disolución 150 mM de Tris(hidroximetil)aminometano que contenía un 25% de acetonitrilo a un pH aparente de 8'2. La temperatura de separación fue de 25°C y el voltaje aplicado de 20 kV. Se utilizó hidrocloruro de nafazolina como patrón interno (IS). Para mejorar la sensibilidad, considerando el bajo contenido de los analitos estudiados en muestras de orina, se ha aplicado una metodología de preconcentración *on-line* denominada inyección de muestra de campo amplificado (*field amplified sample injection*, FASI), considerando la influencia de los parámetros que afectan a dicha preconcentración (naturaleza del bolo de pre-inyección, composición del disolvente de la muestra, voltaje y tiempo de inyección). Debido a las interacciones significativas entre estos parámetros, proponemos por primera vez la aplicación de una metodología multivariante para llevar a cabo este estudio. Las condiciones óptimas obtenidas consistieron en la inyección de un bolo de agua durante 7 s a 50 mbar, la inyección electrocinética se realizó aplicando 6'2 kV durante 40 s a una muestra que contenía 32 μM de H₃PO₄. Se desarrolló también un procedimiento de extracción en fase sólida (SPE) que junto con la preconcentración *on-line*, permitió obtener unos límites de detección y una selectividad adecuados para conseguir la determinación en muestras de orina. La combinación de SPE y FASI-CE-UV permitió obtener una linealidad adecuada, bajos límites de detección (desde 2 ng/mL hasta 5 ng/mL) y una precisión satisfactoria (DER entre 3'0-7'2 %) con niveles de recuperación válidos para demostrar la utilidad del método en este tipo de muestra.

Finalmente en el capítulo 3 se pretende demostrar la posibilidad del acoplamiento de la detección quimioluminiscente (CL) en CE. Considerando que no existe ningún equipo comercial que incorpore esta detección, en este capítulo se propone el diseño y montaje de un equipo de CE con detección CL para determinar conjuntamente PTH y PMH en muestras reales. Se observó un importante aumento de la emisión CL del luminol en su reacción con ferricianuro potásico en presencia de estas fenotiazinas, así que este sistema fue seleccionado para la detección de estos compuestos tras la separación electroforética previa. Los parámetros que afectan a la separación electroforética se optimizaron de manera univariante, mientras que aquellos que afectan a la detección CL se optimizaron de manera multivariante empleando el diseño de experimentos. También se llevó a cabo un estudio de la robustez de los factores que influyen en la detección CL. El método permite la separación de las fenotiazinas en menos de 4 min., logrando límites de detección de 80 ng/mL para PMH y 334 ng/mL para PTH si se utilizaba la inyección por gravedad. Con objeto de obtener menores límites de detección y así poder determinar estos compuestos en muestras biológicas se empleó la inyección electrocinética. La aplicabilidad del método de CE-CL se ha demostrado mediante la determinación de PTH en preparados farmacéuticos y de PMH en muestras de orina. En este último caso se empleó la inyección electrocinética y el procedimiento de SPE

descrito en el capítulo anterior, consiguiendo límites de detección de 1 ng/mL con recuperaciones superiores al 85%.

La segunda parte de la tesis, que incluye los capítulos 4 y 5, aborda un nuevo problema analítico mediante CE: la detección de residuos de antibióticos, concretamente de quinolonas, en alimentos de origen animal. Estos estudios se enmarcan en los proyectos “*Implantación de nuevas estrategias analíticas, bajo criterios de calidad, para la determinación de residuos de fármacos y presencia de organismos genéticamente modificados (OGMs) en leche, derivados lácteos y otros alimentos*” (Ref.: CAL03-096-C2-2, en colaboración con Puleva Biotech) y “*Criterios de calidad en el control analítico de contaminantes en alimentos grasos de origen animal: aplicación a la detectores de masas, de fluorescencia inducida por láser y quimioluminiscentes a técnicas cromatográficas y de electroforesis capilar*” (Ref.: CAL03-087-C2-1, en colaboración con el grupo FQM-170 de la Universidad de Almería), ambos financiados por el Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, MCyT).

Así, en el capítulo 4 se ha propuesto y validado un método analítico basado en CZE con detección por espectrometría de masas en tandem (CZE-MS/MS) para la identificación y cuantificación simultáneas de ocho quinolonas de uso veterinario en leche cruda de vaca. Las quinolonas estudiadas son danafloxacina (DAN), sarafloxacina (SAR), ciprofloxacina (CP), marbofloxacina (MAR), enrofloxacina (ENR, difloxacina (DIF), ácido oxolínico (OXO) y flumequina (FLU) cuyos límites máximos de residuos (LMRs) en tejidos animales comestibles están establecidos por la Regulación del Consejo Europeo 2377/90. Se optimizaron parámetros como la composición de tampón de separación y las condiciones del electrospray mediante la metodología del diseño de experimentos con objeto de obtener tanto una adecuada separación electroforetica como una alta sensibilidad. Con objeto de lograr el mínimo número de puntos de identificación requeridos por la Decisión Europea 2002/657/EC para conseguir una identificación inequívoca de estos residuos se llevaron a cabo experimentos MS/MS, utilizando un analizador de trampa de iones en modo MRM (monitorización de respuesta múltiple). Para la cuantificación de los compuestos en muestras de leche cruda de vaca se desarrolló un procedimiento de SPE en dos pasos empleando cartuchos Oasis® MAX y HLB, sin necesidad de llevar a cabo una precipitación de proteína previa. Se obtuvieron resultados satisfactorios en términos de linealidad (R^2 entre 0'989 y 0'992) y precisión (DER por debajo del 18%). Los límites de detección y cuantificación (por debajo de 6 y 24 ng/mL, respectivamente) fueron en todos los casos inferiores a los LMRs tolerados para estos compuestos en leche. Las recuperaciones estaban comprendidas entre el 81 y el 110 % lo que indica el potencial de la CZE-MS/MS para la determinación de quinolonas reguladas y su aplicación en control de calidad y seguridad alimentaria.

En el capítulo 5 se ha desarrollado y validado un método de CE-MS/MS empleando un dispositivo de extracción en fase sólida *in-line*, también denominado concentrador de analitos (AC), para determinar las ocho quinolonas de uso veterinario anteriormente mencionadas. Se estudiaron diferentes parámetros que afectan al rendimiento del AC

Resumen y justificación del trabajo

tales como su diseño (en este caso empleamos un AC sin fritas), el tipo de sorbente (Oasis® MCX), pH de la muestra, volumen y composición del bolo de elución, y el tiempo de inyección. La validación del método empleando disoluciones patrón mostró unos límites de detección entre 17 y 59 ng/L. Finalmente, se desarrolló un método para determinar estos antibióticos en muestras de músculo de pollo empleando la extracción líquida presurizada (PLE). El método analítico completo fue validado en términos de linealidad ($R^2 \geq 0.992$), estudios de recuperación (63-112%), repetibilidad y precisión intermedia (DER $\leq 20\%$), límites de detección (40-140 ng/kg) y cuantificación (130-470 ng/kg). Los resultados obtenidos demuestran la utilidad de la combinación de la SPE *in-line* con la CE, la detección con espectrometría de masas en tandem y la extracción líquida presurizada para la identificación y cuantificación simultánea de las ocho quinolonas reguladas en músculo de pollo a bajos niveles de concentración.

Finalmente en la tercera parte de la memoria se propone una nueva metodología para la determinación de triazinas. Así, el capítulo 6 describe el trabajo realizado en colaboración con el grupo del Prof. Pat Sandra durante la estancia predoctoral en el *Laboratorio de Ciencias Separativas del Dpto. de Química Orgánica de la Universidad de Gante (Bélgica)*, relacionado con los objetivos del proyecto “*Nuevas estrategias basadas en técnicas miniaturizadas acopladas con detección por fluorescencia y espectrometría de masas para el control de pesticidas y fármacos en muestras ambientales y biológicas*” (Ref.: CTM2006-06363, Ministerio de Educación y Ciencia).

En este trabajo se ha continuado con la aplicación de los preconcentradores *in-line* pero en este caso se ha evaluado el empleo de un polímero impreso molecularmente (MIP) como sorbente para la extracción en fase sólida *in-line* con la CE. Concretamente este desarrollo se ha aplicado a la determinación simultánea de herbicidas triazínicos: atrazina (ATZ) y sus tres productos de degradación: desetilatrazina (DEA), desisopropilatrazina (DIA) y desetildesisopropilatrazina (DEIA) en muestras de orina. Inicialmente se optimizó la separación electroforética de estos compuestos. El electrolito consistió en una disolución acuosa de 75 mM de ácido fosfórico ajustado a pH 2'1 que contenía 0'7 mM de bromuro de cetiltrimetilamonio. Después de la fabricación y el montaje del concentrador en el capilar se aplicaron las condiciones óptimas de separación para evaluar el rendimiento de esto dispositivo. Se consiguieron eficacias de 40.000 hasta 55.000 platos con un tiempo de separación de 1 h. Se optimizaron diversos parámetros que afectan a la extracción usando MIPs *in-line* con la CE, tales como la composición y el volumen del bolo de elución. El método se evaluó en términos de linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación. El concentrador *in-line* construido utilizando MIPs como sorbente se comparó con otro similar al descrito en el capítulo anterior, empleando como sorbente partículas de un cartucho de SPE Oasis® HLB. La mayor selectividad de los MIPs se demostró a través de una inyección directa de muestras de orina dopadas con 10 µg/mL de ATZ, DEA, DIA y DEIA. Las recuperaciones estuvieron comprendidas entre el 92 y el 102 % comparando las señales con las obtenidas para una muestra en disolución acuosa, demostrándose así la validez de la metodología propuesta.

SUMMARY AND AIM OF THE THESIS

SUMMARY AND AIM OF THE THESIS

In the last decade, capillary electrophoresis (CE) has become a very important separation analytical technique that can be coupled with different detection systems, which makes that CE is gaining more and more importance, increasing the number of applications in many fields. The main goal of this thesis is to demonstrate the potential of CE in the resolution of different problems related with pharmaceutical, clinical, food and toxicological analysis using several detection systems and methodologies to improve the limits of detection, regarding the limitations of CE in this sense due to the small inner diameter of the capillaries, the reduced amount of injected sample and considering that the detection is carried out in the same capillary. The experimental work has been carried out in the research group: “Quality in Food, Environmental and Clinical Analytical Chemistry” (FQM-302 group of the Plan Andaluz de Investigación).

This thesis presents three parts including new analytical methodologies to determine different types of compounds related with the goals of the research projects of this group.

The first part is focused on the determination of phenothiazines, which includes three chapters justifying the research project: “*Automated analytical systems in Medicine: Application of chemiluminescent and capillary electrophoresis in quality control of biomedical compounds and their clinical monitoring in biological fluids*” (Ref.: PI021369, Ministerio de Sanidad y Consumo).

In chapter 1, a method using capillary zone electrophoresis (CZE) for the quantitative analysis of three phenothiazines: thiazzinamium methylsulphate (TMS), promazine hydrochloride (PMH) and promethazine hydrochloride (PTH) in pharmaceutical formulations has being proposed and validated. The influence of various parameters affecting the CZE separation (buffer pH and concentration, acetonitrile percentage, capillary temperature and applied voltage) was investigated by means of multivariate optimization using experimental designs so as to obtain the highest efficiency. The method allows the separation of the studied phenothiazines in 5.0 min at optimized conditions: 100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (TRIS) buffer at a pH 8.0, 15 % acetonitrile, capillary with 58.5 cm in length at 25 °C and a voltage of 30 kV. Detection occurred at 254 nm. Acceptable precision (relative standard deviation, RSD, 5.3 %) and linearity were achieved using the internal standard (IS). The limits of detection (LOD) were 2.8 µg/mL for TMS and 3.3 µg/mL for PMH and PTH. The method has been successfully applied in the analysis of pharmaceutical formulations.

In chapter 2, a capillary zone electrophoresis (CZE) method with UV-visible detection has been established and validated for the determination of five phenothiazines: thiazzinamium methylsulphate (TMS), promazine (PMH), chlorpromazine (CPH), thioridazine (THZ) and promethazine (PTH) in human urine. The aim of this study was to apply the developed method to urine samples for therapeutic drug monitoring purposes. Optimum separation was obtained on a 64.5 cm × 75 µm bubble cell capillary using a buffer containing 150 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane and 25 %

acetonitrile at apparent pH 8.2, with temperature and voltage of 25 °C and 20 kV, respectively. Naphazoline hydrochloride was used as an internal standard (IS). An on-line preconcentration methodology, so-called field amplified sample injection (FASI), has been applied to improve the sensitivity of the detection taking into account the low content of these compounds in urine samples. Considering the influence of parameters affecting the on-line preconcentration (nature of pre-injection plug, sample solvent composition, injection times and injection voltage) and due to the significant interactions among them, in this chapter we propose for the first time the application of a multivariate approach to carry out the study. The optimized conditions were: pre-injection plug of water for 7 s at 50 mbar, electrokinetic injection for 40 s at 6.2 kV and 32 µM of H₃PO₄ in the sample solvent. Also, a solid phase extraction (SPE) procedure is developed to obtain low detection limits and an adequate selectivity together with the in-line preconcentration proposed for urine samples. The combination of SPE and FASI-CE-UV allows adequate linearity, low detection limits (from 2 ng/ml to 5 ng/ml) and satisfactory precisions (3.0-7.2 % for intermediate RSD %) with adequate recovery levels showing the usefulness of this method in this kind of sample.

Finally, in chapter 3 we tried to demonstrate the usefulness of the coupling of chemiluminescence (CL) detection with CE. Taking into account that there is not any commercial instrument with this kind of detection, a home-made CE device coupling CL detection was designed and constructed for the determination of PTH and PMH in real samples. An important enhancement of the CL emission of luminol with potassium ferricyanide was observed in the presence of these phenothiazines, so this system was selected for their detection after CE separation. Parameters affecting the electrophoretic separation were optimized in a univariate way, while those affecting CL detection were optimized by means of a multivariate approach based on the use of experimental designs. Robustness of the factors influencing the post-column CL detection was also controlled. The method allows the separation of the phenothiazines in less than 4 min., achieving limits of detection (LOD) of 80 ng/mL for PMH and 334 ng/mL for PTH, using sample injection by gravity. Electrokinetic injection was used to obtain lower LODs for the determination of the compounds in biological samples. The applicability of the CE-CL method was demonstrated in the determination of PTH in pharmaceutical formulations and in the analysis of PMH in human urine, using a previous SPE procedure, achieving a LOD of 1 ng/mL and recoveries higher than 85 %.

The second part of this thesis (chapters 4 and 5) is focused on the determination of quinolone antibiotic residues in foodstuff of animal origin. These studies are related with the following projects: “*New analytical methodologies, under quality criteria, for the determination of pharmaceutical residues and genetically modified organisms in milk, dairy products and other food*” (Ref.: CAL03-096-C2-2 in collaboration with Puleva Biotech) and “*Quality criteria in the analytical control of pollutants in fatty food of animal origin. Application of mass spectrometry, laser induced fluorescence and chemiluminescence detections to chromatographic and capillary electrophoresis techniques*” (Ref.: CAL03-087-C2-1) in collaboration with the FQM-170 group of the

University of Almería. Both projects were supported by the Instituto Nacional de Investigación Tecnológica Agraria y Alimentaria, INIA, (MCyT).

In chapter 4, a new analytical method based on capillary zone electrophoresis – tandem mass spectrometry (CZE-MS/MS) is established and validated for the identification and simultaneous quantification of eight quinolones for veterinary use in bovine raw milk. The studied quinolones include danofloxacin (DAN), sarafloxacin (SAR), ciprofloxacin (CIP), marbofloxacin (MAR), enrofloxacin (ENR), difloxacin (DIF), oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU) whose maximum residues limits (MRLs) are regulated by the EU Council Regulation no. 2377/90 in animal edible tissues. Different parameters (i.e., separation buffer composition and electrospray conditions) were optimized in order to obtain both an adequate CE separation and a high sensitivity, using experimental design methodology to consider the interactions among the studied variables. MS/MS experiments using an ion trap as analyzer operating in the multiple reaction monitoring (MRM) mode were carried out to achieve the minimum number of identification points according to the 2002/657/EC European Decision and to get unambiguous identification of these residues. For the quantification of these residues in bovine raw milk samples, a two-step SPE procedure was developed using Oasis MAX and HLB cartridges without protein precipitation. Satisfactory results were obtained in terms of linearity (R^2 between 0.989 and 0.992) and precision (RSD below 18 %). The limits of detection and quantification (below 6 and 24 ng/mL, respectively) were in all cases lower than the MRLs tolerated for these compounds in milk, the recoveries ranging from 81-110 %, indicating the potential of the CZE-MS/MS for the analysis of regulated quinolone antibiotics in the food quality and safety control areas.

In chapter 5 we have developed and validated a capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) method using an in-line SPE device (analyte concentrator, AC) to determine the eight quinolones of veterinary use previously mentioned. Different parameters affecting the AC performance, such as its design (in this case frit-free), the kind of sorbent (Oasis® MCX), sample pH, volume and composition of the elution plug and injection time were studied. The method was validated using standard solutions, obtaining limits of detection between 17 - 59 ng/L. Finally, a pressurized liquid extraction (PLE) method was developed to determine these antibiotics in chicken muscle samples. The whole analytical method was validated in terms of linearity ($R^2 \geq 0.992$), recoveries (63-112%), repeatability and intermediate precision (RSD $\leq 20\%$), limits of detection (40-140 ng/kg) and quantification (130-470 ng/kg), showing the usefulness of the combination of in-line SPE-CE-MS/MS with PLE for the identification and simultaneous quantification of the eight regulated quinolones in chicken muscle at very low concentration levels.

In the last part of this thesis, a new methodology is proposed to determine triazines. In chapter 6 an experimental work carried out in collaboration with Prof. Sandra group's during a pre-doc stay in the *Laboratory of Separation Sciences of the Organic Chemistry Department of Ghent University (Ghent, Belgium)* is described. This work is related with the project: “*New strategies based on miniaturized techniques coupled to*

fluorescence and mass spectrometry detection for the monitoring of pesticides and drugs in environmental samples” (Ref.: CTM2006-06363, Ministerio de Educación y Ciencia).

In this chapter we continue with the use of ACs *in-line* with CE but, in this case, we have evaluated the use of a molecularly imprinted polymer (MIP) as sorbent for the construction of an in-line solid phase extraction concentrator in CE to be applied in the monitoring of triazine herbicides: atrazine (ATZ) and its three metabolites desethylatrazine (DEA), desisopropylatrazine (DIA) and desethyldesisopropylatrazine (DEIA). Initially, the electrophoretic separation of these compounds was optimized. The electrolyte consists of an aqueous solution of 75 mM phosphoric acid adjusted to pH 2.1 and containing 0.7 mM cetyl trimethylammonium bromide. After the fabrication and assembly of the concentrator into the capillary, this optimal CE conditions were applied to evaluate the performance of this device. Efficiencies of 40,000 to 55,000 plates could be achieved and the separation time was around one hour. Different parameters affecting the in-line molecularly imprinted solid-phase extraction in capillary electrophoresis such as composition and volume of the elution plug were optimized. The method was evaluated in terms of linearity, precision and limits of detection and quantification. MIPs were compared with Oasis® HLB particles for the in-line coupling of SPE and CE. The superior selectivity of MIPs is demonstrated through direct injection of a urine sample spiked with 10 µg/mL of ATZ, DEA, DIA and DEIA. Recoveries were between 92 and 102% compared to an aqueous solution, showing the usefulness of the proposed methodology.

PARTE 1:

DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS

Introducción

1.- Definición y clasificación de los fármacos

Por “fármaco” se entiende cualquier sustancia que cura, previene o alivia una enfermedad. Se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios:

- 1) Según su estructura química.
- 2) Según el receptor sobre el que actúan.
- 3) Según la enfermedad que curan:
 - *Agentes quimioterápicos*: para enfermedades infecciosas y anticancerígenos.
 - *Agentes farmacodinámicos*: son los que se emplean para corregir una disfunción en el organismo causada por una enfermedad. Ej.: analgésicos.
- 4) Según el grado en el que la estructura afecta a la actividad biológica:
 - *Inespecíficos estructuralmente*: su actividad no está directamente subordinada a la estructura química, solamente en el grado en que esta estructura afecta a las propiedades físicas del fármaco (solubilidad, constante de ionización, etc.). Actúan por un mecanismo físico y físico-químico. Su actividad depende de la actividad termodinámica. Se administran en altas concentraciones, poseen estructuras muy variadas y pequeñas modificaciones en dicha estructura no originan cambios en la actividad.
 - *Específicos estructuralmente*: Se caracterizan porque su actividad depende de la estructura química. Su actividad biológica se basa en la interacción con un receptor. Actúan por un mecanismo químico. Su actividad no depende de la actividad termodinámica. Se administran en bajas concentraciones. Compuestos con la misma actividad tienen estructuras muy semejantes, y si le afectan a la actividad pequeños cambios en la estructura química. Es el caso de las fenotiazinas, compuestos que han sido abordados en la presente memoria.

2.- Control de calidad en los productos farmacéuticos

Los orígenes de los fármacos pueden ser naturales, generalmente provenientes de plantas (de cualquiera de sus partes: raíces, tallos u hojas), o bien sintéticos. Si se pretende un uso comercial del fármaco es preferible la vía sintética puesto que las plantas suelen generar cantidades muy pequeñas. Esta vía consiste en generar el fármaco, una vez que se conoce el principio activo, a partir de estructuras más sencillas por síntesis total. Otra vía es la semisintética, que consiste en hacer pequeñas modificaciones químicas a un producto natural. También se pueden obtener a partir de

microorganismos. Sea cual sea la vía elegida para la obtención del producto final es, indudablemente, muy importante controlar todo el proceso. Es aquí donde aparece el concepto de calidad. La Guía ISO [1] define calidad como: “totalidad de rasgos y características de un producto, proceso o servicio que inciden en su capacidad de satisfacer necesidades reguladas o implícitas”. Si la calidad es un proceso importante en todos los sectores industriales, ésta es aún de más relevancia en la industria farmacéutica. Por la finalidad y naturaleza de los productos farmacéuticos, la exigencia de calidad en éstos es mayor, debido a los posibles efectos perjudiciales para la salud. La calidad de un producto farmacéutico puede atribuirse a dos condiciones básicas:

- Que el producto farmacéutico en cuestión sea efectivo ante una determinada patología.
- Que no provoque efectos perjudiciales o no deseados, es decir, que sea seguro para la salud.

Una mayor exigencia de calidad se traduce en controles de calidad más estrictos y en el cumplimiento de normativas específicas, como Buenas Prácticas de Fabricación (*Good Manufacturing Practices*, GMPs) y Buenas Prácticas de Laboratorio (*Good Laboratories Practices*, GPLs). Los fabricantes europeos de medicamentos deben cumplir las “Normas para la correcta fabricación de medicamentos de uso humano y medicamentos veterinarios de la Unión Europea” [2,3]. Esta normativa establece, de forma explícita, la obligación de llevar a cabo un control de calidad.

A lo largo del siglo XX una serie de sucesos han propiciado la aparición de organismos reguladores para controlar la calidad de los productos farmacéuticos, con la finalidad de que éstos cumplan unos requisitos de calidad y seguridad. A principios de siglo, la escasa y dispersa normativa sobre control de calidad y de seguridad de los medicamentos, no imponía condiciones estrictas a las industrias farmacéuticas en la fabricación y comercialización de sus productos. En EEUU, la *Federal Pure Food and Drug Act*, de 1906 legislaba sobre el transporte interestatal de alimentos y medicamentos adulterados. Esta ley no obligaba a las compañías farmacéuticas a establecer ni la eficacia ni la seguridad de los medicamentos que comercializaba.

En 1938 más de 100 niños murieron en EEUU como consecuencia de la comercialización de una solución de sulfanilamida en dietilénglico, que es un excelente disolvente pero a la vez muy tóxico. Este desgraciado hecho dio origen ese mismo año a la enmienda del acta federal de 1906, a partir de la cual se incluyó el concepto de seguridad de los medicamentos, siendo la *Food and Drug Administration* (FDA) la encargada de su aplicación práctica. A partir de ese momento, se comenzaron a exigir

[1] ISO, Guide 25, General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories, 1990.

[2] Normas sobre Medicamentos de la Unión Europea, Volumen 4: *Normas de Correcta Fabricación. Medicamentos de Uso Humano y Medicamentos Veterinarios*, 1999.

[3] Directiva 91/356/CEE. *Principios y Directrices de las Prácticas de la Correcta Fabricación de los Medicamentos de Uso Humano*, 1991.

estudios de toxicidad a los fármacos existentes, a la vez que era necesario que la FDA diera su visto bueno (*New Drug Application*, NDA) a un fármaco nuevo para que pudiera ser fabricado y distribuido. Sin embargo, aún no se exigían pruebas de eficacia de un medicamento para darle el permiso de comercialización. Además un fármaco pasaba de los ensayos en animales a los ensayos en humanos sin la aprobación de la FDA.

En la década de los 60, el desastre de la talidomida, medicamento promovido para ser utilizado durante el primer trimestre de embarazo y que resultó ser altamente teratogénico, marcó un antes y un después en lo referente a la normativa farmacéutica. Se introdujeron, en todos los países desarrollados, leyes que exigían seguridad y eficacia demostrada con ensayos clínicos controlados. En los EEUU la respuesta fue una enmienda al “Acta de alimentos, medicamentos y cosméticos” en 1962 que requiere que se presente suficiente investigación farmacológica y toxicológica en animales antes que un nuevo fármaco pueda ser aprobado en humanos. En Europa, los países irían paulatinamente adaptando su legislación: Noruega y Suecia (1964), Inglaterra (1968), Suiza (1971) y Alemania (1976). Las nuevas leyes exigían a los productos farmacéuticos pruebas que demostraran la eficacia y la seguridad relativa del nuevo medicamento en términos de la relación riesgo/beneficio.

Los nuevos requisitos de estas leyes determinaron que el tiempo total de desarrollo de un fármaco nuevo se extendiera de 8 a 9 años. En los últimos años los organismos reguladores de los medicamentos se han visto envueltos en un debate con grupos de consumidores y las compañías farmacéuticas en relación a la demora en la aprobación de aquellos fármacos para enfermedades con riesgo vital (SIDA, esclerosis múltiple, etc.). Estos organismos se encuentran ante la difícil tarea de equilibrar, por un lado, su misión de garantizar la seguridad y eficacia de los nuevos medicamentos y, por otro, la necesidad de la sociedad de disponer de los medicamentos útiles en un tiempo razonable.

En Europa, la situación a lo largo de la primera mitad del siglo XX ha sido de una total descentralización de los organismos reguladores farmacéuticos. Cada estado, por medio de sus respectivos ministerios de sanidad, regulaba la producción y comercialización de los medicamentos en su territorio, así como los controles de eficacia y seguridad que debían cumplir. Desde 1965 la Comunidad Económica Europea ha desarrollado una intensa actividad de armonización, desarrollando directivas y recomendaciones referentes a los medicamentos con medidas en defensa de los intereses de los pacientes y de los consumidores. Desde la constitución de la Unión Europea (UE) en 1995, los organismos normativos del medicamento se han agrupado en la *European Agency for the Evaluation of Medicinal Drugs* (*European Medicinal Agency*, EMEA). Los gobiernos europeos y las industrias farmacéuticas coincidieron en un punto de común interés: “poner en el mercado medicamentos seguros y efectivos, dándose prioridad a la seguridad, en el menor tiempo posible para beneficio de los pacientes”. La EMEA dispone el marco normativo que atañe a los productos farmacéuticos para todos los estados que conforman la UE.

En España, el organismo encargado de regular todo lo relacionado con los productos farmacéuticos es la Agencia Española del Medicamento. Esta organización, creada en 1997, unifica por primera vez las actividades de evaluación, autorización, registro y control de los medicamentos de uso humano y veterinario en España. La Agencia Española del Medicamento es un organismo autónomo, adscrito al Ministerio de Sanidad y Consumo, cuyo objetivo esencial es garantizar que los medicamentos autorizados y registrados en España respondan a estrictos criterios de calidad, seguridad y eficacia, según lo establecido en la normativa sobre medicamentos de la Unión Europea y en las normativas españolas.

3.- Ensayos en control de calidad de fármacos

En esta apartado se describen algunos de los test más habituales que se realizan durante el control de calidad que se lleva a cabo en el proceso de producción de fármacos.

- *Aspecto*: se trata de realizar una inspección cualitativa del producto, tanto si es materia prima como producto final o intermedio. Se comprueban distintas características del producto como: apariencia (sólido, líquido, suspensión...), color, forma, tamaño, etc. Suele realizarse mediante una simple inspección visual del producto.
- *Identificación*: los test de identificación deben establecer la identidad del producto analizado y ser capaces de discriminar entre compuestos parecidos o de estructura relacionada que pueden formar parte de la muestra. Este test debe ser lo más específico posible. Si un solo método no fuese capaz de identificar se puede emplear una combinación de varios.
- *Ensayo de contenido*: consiste en una determinación cuantitativa del producto, para establecer su grado de pureza o bien para determinar el contenido de uno o más componentes de la muestra. Una vez realizada la determinación se comprueba si el valor obtenido coincide con las especificaciones del producto.
- *Sustancias relacionadas*: bajo este nombre se recogen las posibles impurezas que pueda contener una muestra (orgánicas e inorgánicas), tanto derivadas de la degradación de alguno de los componentes de la muestra como del proceso de producción (caso de disolventes residuales). Se debe disponer de métodos adecuados que permitan determinar los bajos niveles de concentración de este tipo de sustancias en los productos farmacéuticos para demostrar que éstos se encuentran por debajo de los valores establecidos como aceptables.
- *Propiedades físico-químicas*: es muy común llevar a cabo la determinación de algunas propiedades físico-químicas de los productos farmacéuticos. Las propiedades a determinar varían en función de la naturaleza del producto. De esta forma, en preparados líquidos (bebibles o inyectables) se suelen realizar controles de pH, mientras

que en productos sólidos se realizan controles de tamaño de partícula (granulometría), control de dureza, etc.

- *Test de disolución:* es una medida que indica como el principio activo es liberado del producto farmacéutico. Es una prueba muy importante en control de calidad de preparados sólidos, ya que da una aproximación del comportamiento del fármaco en el cuerpo una vez consumido.
- *Test de uniformidad de contenido:* es una medida de la homogeneidad del producto. También se la puede denominar homogeneidad del lote, puesto que se comprueba que distintas partes de un mismo lote contengan la misma cantidad de principio activo.
- *Ensayos biológicos:* este tipo de ensayos se realizan utilizando organismos microbiológicos para evaluar determinadas propiedades del fármaco. Se suelen realizar para muestras líquidas de las cuales debe evaluarse su esterilidad, o en vacunas para evaluar su efectividad. Son muy diversos y suelen ser específicos para cada fármaco.

La mayoría de los test que se han descrito se suelen realizar mediante métodos instrumentales de análisis. La tendencia actual de la farmacopea es a introducir nuevos métodos de análisis que permitan obtener resultados de forma más sencilla, rápida, fiable, preferiblemente automatizables y que no requieren personal muy cualificado. Por todo ello, es habitual que el Departamento de Control de Calidad disponga de un número considerable de técnicas instrumentales de análisis para el control de rutina. Las más habituales son cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectrofotometría UV-Vis, de infrarrojos, de absorción y/o emisión atómica de llama y polarimetría. Últimamente están surgiendo nuevas técnicas instrumentales que intentan resolver los problemas o limitaciones de las técnicas más clásicas. De este modo, es muy común la hibridación de técnicas: conjunción de técnicas separativas con técnicas espectroscópicas para aunar las ventajas de ambas.

En esta parte de la memoria se desarrollarán nuevos métodos para la determinación de compuestos pertenecientes a la familia de las fenotiazinas. En las metodologías establecidas se plantea la aplicación de técnicas menos utilizadas y que constituyen una interesante alternativa a la resolución los problemas analíticos que se presentan en los laboratorios farmacéuticos y clínicos: la electroforesis capilar y la quimioluminiscencia. Ambas técnicas presentan un gran potencial analítico y una gran versatilidad en su posible aplicación y en esta parte se demostrará su potencial tanto en control de calidad, analizando compuestos farmacéuticos que contienen fenotiazinas como principios activos, como en su monitorización clínica en fluidos biológicos. Por ello, previamente se describen algunos aspectos generales de estos compuestos.

4.- Descubrimiento y desarrollo de las fenotiazinas

Una de cada cinco prescripciones que se dispensan en los EEUU es un fármaco destinado a modificar los procesos mentales, sea a través de la estimulación, sedación u otro cambio de comportamiento. Los fármacos que interfieren principalmente con los procesos mentales pueden dividirse en tres categorías, según su empleo clínico: los neurolépticos, los antidepresivos y los ansiolíticos. Cada una de estas clases comprende compuestos químicos de estructura no relacionada entre sí pero que, sin embargo, afectan a las mismas estructuras anatómicas y reacciones bioquímicas, por lo que producen efectos clínicos similares. Los neurolépticos, que también se han denominado antipsicóticos, atarácticos o “tranquilizantes mayores”, se emplean en el tratamiento de las psicosis. Uno de los representantes más destacados de este grupo son las fenotiazinas. Desde el punto de vista clínico, dichos agentes contrarrestan las alucinaciones y quimeras, alivian la excitación psicomotora, activan a los pacientes retraídos y facilitan su reajuste social. En cuanto a la acción bioquímica, su efecto esencial consiste en una reducción de la actividad dopaminérgica en el sistema nervioso central [4].

La indicación principal del uso los agentes neurolépticos consiste en el control de la esquizofrenia. Reducen la agitación, hostilidad, combatividad e hiperactividad y asimismo mejoran los estados de alucinación, pensamiento y percepción desordenados, retraining emocional y social, síntomas paranoides y descuido personal. Muchos de estos agentes reducen el umbral de convulsiones y disminuyen la actividad psicomotora. También afectan al control motor extrapiramidal. Las clases químicas más importantes, dentro de los fármacos con actividad antipsicótica, son las fenotiazinas, tioxantenos y butirofenonas.

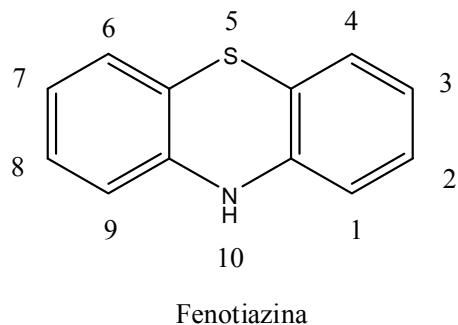


Figura 1. Anillo de fenotiazina.

[4] Foye, W.O., Principios de Química Farmacéutica, Editorial Reverté, Barcelona, 1991, p. 222.

Las fenotiazinas, cuya estructura básica se muestra en la figura 1, constituyen uno de los grupos neurolépticos más empleados y pueden dividirse en tres subclases: alifáticos, piperidinas y piperazinas, de acuerdo con las diferencias en su estructura química, acción farmacológica y potencia. Aunque la fenotiazina se sintetizó en 1883 y se ha empleado durante muchos años como antihelmíntico, no posee una actividad antipsicótica. El descubrimiento de esta clase de fármacos antipsicóticos proporciona un destacado ejemplo en la historia del desarrollo de los fármacos modernos y asimismo pone de manifiesto el carácter impredecible de la actividad biológica de aquellas moléculas que proceden de la modificación de un fármaco prototípico. El tipo estructural básico del que se originaron las fenotiazinas antipsicóticas es el correspondiente a los antihistamínicos derivados del benzodioxano I (figura 2). Bovet y Staub [5] establecieron en 1937 la hipótesis de que debían existir sustancias capaces de antagonizar la acción de la histamina y ensayó diversos compuestos de los que se conocía su acción sobre el sistema nervioso autónomo; fue el primero en reconocer la actividad antihistamínica. Con los benzodioxanos como punto de partida, se llevaron a cabo en varios laboratorios un gran número de modificaciones moleculares, dirigidas a la búsqueda de otros tipos de antihistamínicos. Los benzodioxanos condujeron a los éteres de etanolamina del tipo II, los cuales a su vez fueron modificados hasta los éteres del bencidrilo, caracterizados por la difenhidramina (III), un antihistamínico con utilidad clínica, o bien hasta las etilendiaminas (IV), que condujeron a fármacos como la tripelenamina (V). Una modificación posterior de las etilendiaminas antihistamínicas dio lugar a la incorporación de uno de los átomos de nitrógeno a un sistema de fenotiazina, lo que condujo a la fenotiazina (VI), con propiedades antihistamínicas y, como otros muchos fármacos con dicha acción, con un fuerte efecto sedante. La dietazina (VI) es más útil para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson que en las alergias, mientras que la prometazina (VII) se utiliza clínicamente como antihistamínico. En un esfuerzo dirigido a exaltar los efectos sedantes de estas fenotiazinas, Charpentier, dirigiendo la parte química, y Simone Courvoisier, a cargo de la farmacológica, evaluaron un gran número de modificaciones de la prometazina. Esta investigación condujo en 1950 a la síntesis de la clorpromazina (VIII), en la compañía de Rhône-Poulenc [6]. Poco después el cirujano francés Laborit y col. [7] describieron la capacidad de este compuesto para potenciar la acción de los anestésicos y producir “hibernación artificial”. Observaron que la clorpromazina por sí sola no produce una pérdida de conciencia sino únicamente una tendencia al sueño y un profundo desinterés por el entorno.

[5] Bovet, D., Staub, A.M., *C. R. Soc. Biol.* 1937, 124, 547-549.

[6] Charpentier, P., U.S. Pat. 2,519,886; 2,530,451 (1950); P. Charpentier et al., *C.R. Acad. Sci.*, 1952, 59, 325.

[7] Laborit, H., Huguernard, P., Allvanume, R., *Presse Med.*, 1952, 60, 206-208.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

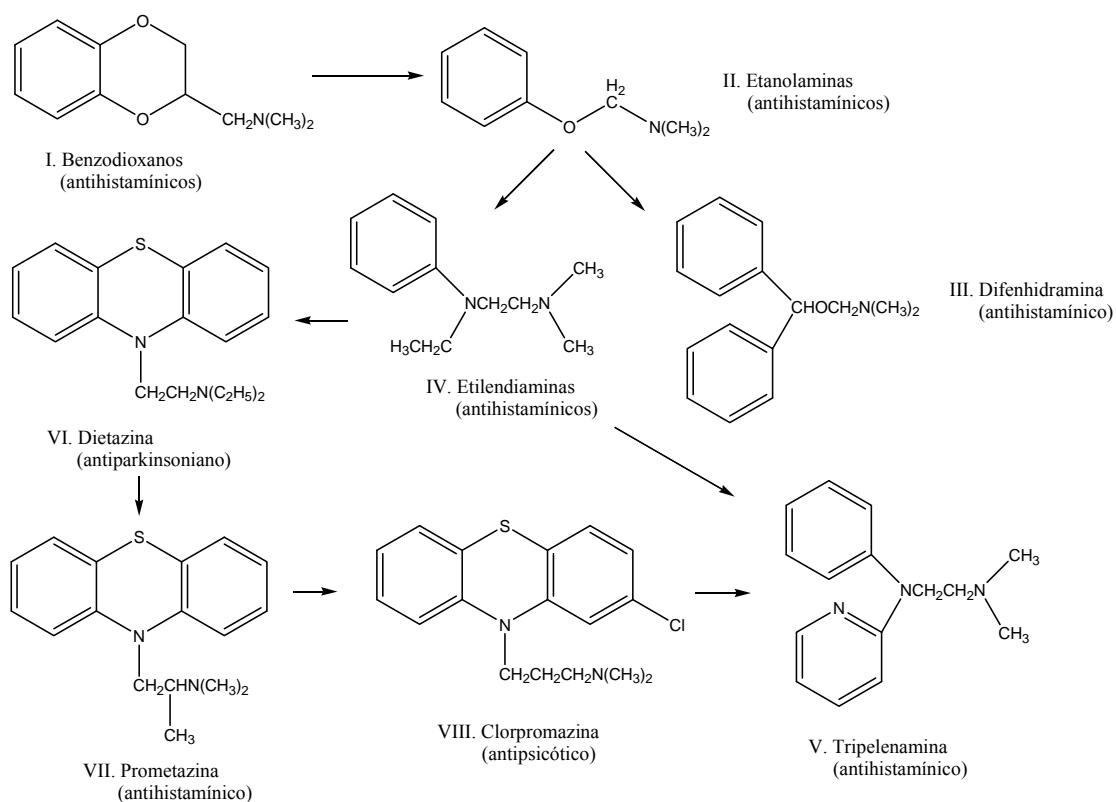


Figura 2. Diagrama del desarrollo estructural de las fenotiazinas.

La primera comunicación acerca del tratamiento de las enfermedades mentales por medio de la clorpromazina sola se debe a Delay y col. [8]. Así lo que inicialmente sólo suponía una serie de modificaciones moleculares menores de un antihistamínico, que producía “efectos secundarios” de tipo sedante, dio lugar al desarrollo de un grupo farmacológico principal que inició una nueva era en la farmacoterapia de las enfermedades mentales. Las fenotiazinas y aquellos fármacos relacionados han influido más positivamente sobre el destino de los esquizofrénicos que cualquier otro avance en la historia de la psiquiatría. Han permitido que muchos pacientes, antes relegados de por vida a la reclusión en una institución mental, puedan asumir un papel cada vez más importante en la sociedad.

5.- Perfil farmacológico de las fenotiazinas

En su aspecto farmacológico, las fenotiazinas son extremadamente complejas. Segundo la dosis empleada, se origina un gran número de respuestas farmacológicas:

- Efecto antipsicótico: reducen la psicosis.

[8] Delay, J., Deniker, T., Harl, J.M., *Ann. Med. Psychol.*, 1952, 110, 112-117.

- Efectos antiadrenérgicos, anticolinérgicos, antihistamínicos y antiserotoninícos: unas fenotiazinas reducen el efecto vasopresor de la epinefrina y otras son eficaces antialérgicos.
- Potenciación de fármacos: incrementan la acción de barbitúricos y aumentan la duración de la anestesia con éter. Disminuyen la toxicidad de la anfetamina y el LSD.
- Efectos antieméticos: evitan la emesis producida por la apomorfina.
- Efectos antiparkinsonianos: sólo dos fenotiazinas son eficaces en el síndrome de Parkinson: la prometazina y la etopropazina.
- Efecto relajante muscular: producen sedación.
- Efectos cardiovasculares y respiratorios: la clorpromazina provoca hipotensión y en dosis pequeñas estimula la respiración, pero en dosis elevadas es fatal.
- Efecto sobre la temperatura corporal: reducen dicha temperatura quizás debido al efecto relajante muscular, pero no se pueden considerar antipiréticos.
- Otros efectos: estimulan el apetito y originan una ganancia de peso considerable.

6.- Mecanismo de acción de las fenotiazinas estudiadas

A continuación discutiremos el mecanismo de acción de las fenotiazinas estudiadas en la presente memoria: promazina, clorpromazina y tioridazina (efecto antipsicótico) y metilsulfato de tiazinamio y prometazina (efecto antialergénico).

El efecto antipsicótico se fundamenta en un bloqueo de los receptores de la dopamina, según propusieron por primera vez Carlsson y Lindquist [9]. De hecho, hay estudios de rayos X que han demostrado que en la conformación preferida de las fenotiazinas son superponibles parcialmente a la dopamina. Estos autores observaron que la clorpromazina y los neurolépticos relacionados elevan la concentración de los metabolitos de la dopamina, como el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilacético o el ácido vanilmandélico. La fenotiazina antihistamínica prometazina no es efectiva en el tratamiento de la esquizofrenia y no provoca alteraciones en las concentraciones de estos metabolitos metilados, una explicación posible es que el hecho de que sólo contenga dos átomos de carbono entre los dos nitrógenos hace que su estructura no sea superponible a la de la dopamina. Carlsson y Lindquist razonaron que las fenotiazinas bloquean los receptores de las catecolaminas, con lo que se emite un mensaje, a través de una retroalimentación neuronal, hacia las restantes neuronas corporales: “los receptores no estamos recibiendo suficiente cantidad de neurotransmisor ¡enviad más catecolaminas!”. En consecuencia, las neuronas productoras de catecolaminas

[9] Carlsson, A., Lindquist, M., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1963, 20, 140-144.

incrementan su velocidad de funcionamiento y, a la vez, se origina un aumento de la síntesis de metabolitos de las catecolaminas. Este aumento es proporcional a la eficacia clínica de las fenotiazinas. La cuestión es que el bloqueo del receptor dopamínérigo por parte de algunas fenotiazinas origina una deficiencia funcional de la dopamina lo que explica los destacados efectos secundarios extrapiramidales semejantes a los observados en la enfermedad de Parkinson. Sin embargo hay fenotiazinas, como es el caso de la tioridazina, cuyos efectos extrapiramidales son menores. Una explicación puede ser su mayor afinidad por los receptores muscarínicos del cerebro, con los consecuentes efectos anticolinérgicos. Se sabe que los fármacos anticolinérgicos han tenido una especial eficacia a la hora de combatir los efectos secundarios extrapiramidales de las fenotiazinas. Su eficacia terapéutica en la enfermedad de Parkinson refleja la existencia de un equilibrio entre la dopamina y la acetilcolina, de modo que antagonizar los efectos de la acetilcolina es equivalente a exaltar los de la dopamina, y viceversa. Por tanto, cuando un paciente esquizofrénico que está siendo tratado con clorpromazina sufre de efectos extrapiramidales graves, se le puede suministrar tioridazina, que es de todas las fenotiazinas la de mayor poder anticolinérgico, para contrarrestar dichos efectos.

El efecto antialergénico se explica mediante la interacción de estos fármacos con algún lugar del receptor de la histamina y evitan con ello que la histamina manifieste sus repuestas. La histamina pueden actuar sobre dos receptores: H₁ y H₂. Si antagonizamos los receptores de la histamina en H₁ conseguimos un efecto antialérgico, y si lo hacemos en H₂ es un efecto antiúlcera. Las fenotiazinas actúan sobre H₁. Es necesario un nivel de investigación mayor para saber qué es lo que ocurre cuando la histamina se une al receptor H₁, pero es probable que la histamina interaccione con las membranas celulares dando lugar a un incremento de la permeabilidad de la membrana a los iones inorgánicos y que esto produzca la diversidad de acciones farmacológicas. La facilitación de la entrada de Ca²⁺ explica el efecto estimulante de la histamina sobre la contracción del músculo liso. Las fenotiazinas podrían unirse al receptor H₁ en otro sitio distinto al que lo hace la histamina. Tal como ocurre con los enzimas sería un lugar alostérico. Tal unión podría producir una pequeña perturbación molecular reversible en la proteína y cambiar la naturaleza estructural y química del centro activo al que normalmente se une la histamina. Puede ocurrir que la histamina no se una al centro activo alterado o que si lo hace no manifieste su actividad.

7.- Vías metabólicas de las fenotiazinas

Para el químico analítico es importante conocer las vías metabólicas de un fármaco porque de esta manera puede decidir correctamente cual es la matriz más idónea para realizar el análisis en caso de una monitorización terapéutica y qué otros metabolitos puede encontrar además del principio activo. La mayoría de los compuestos biológicamente activos que son extraños al organismo son liposolubles y, antes de ser excretados, los enzimas metabolizadores de fármacos los alteran químicamente,

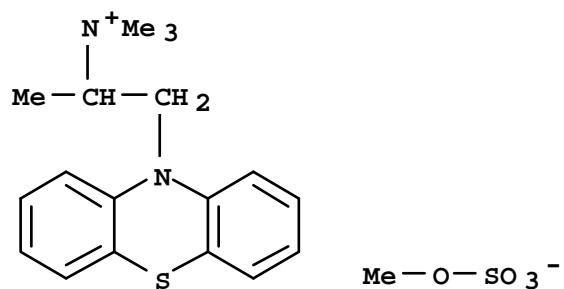
convirtiéndolos normalmente en sustancias menos tóxicas y más hidrosolubles. La formación de conjugados con ácido glucurónico es particularmente efectiva a la hora de aumentar la polaridad de los fármacos. La ruta principal de excreción de fármacos y sus metabolitos es la orina. Si los fármacos no se metabolizasen así, las sustancias con un coeficiente de reparto lípido/agua alto podrían reabsorberse fácilmente de la orina al plasma y continuarían circulando, con los que sus efectos farmacológicos se podrían prolongar. A menudo las moléculas muy polares o altamente ionizadas se excretan por la orina sin modificación. Las modificaciones que sufren las fenotiazinas son: N-desmetilación, sulfoxidación, hidroxilación en las posiciones 3 y 7, y conjugación con el ácido glucurónico.

8.- Propiedades físicas de las fenotiazinas estudiadas

A continuación describiremos las propiedades físicas de las fenotiazinas estudiadas en esta tesis: metilsulfato de tiazinamio (TMS) y los hidrocloruros de promazina (PMH), clorpromazina (CPH), tioridazina (THZ) y prometazina (PTH).

El metilsulfato de tiazinamio es un sólido cristalino blanco, inodoro que cambia de color por exposición a la luz.

Su estructura es la siguiente:



Sus características más destacables se recogen en la tabla 1.

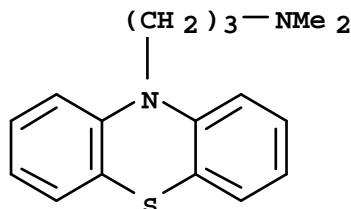
Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Tabla 1. Propiedades físicas del metilsulfato de tiazinamio.

| | |
|-------------------------|--|
| Número CAS: | 58-34-4 |
| Nombre químico: | <i>N,N,N,α-tetrametil-10H-fenotiazina-10-</i> etanaminio metil sulfato. |
| Solubilidad: | Muy soluble en agua y prácticamente insoluble en éter. |
| Punto de fusión: | 206 °C |
| Log P: | 2'7 |
| pK_a | --- |
| Dosis | Normalmente desde 0'6 a 1'2 g diarios. |

El hidrocloruro de promazina es un sólido cristalino blanco y ligeramente higroscópico. Se afecta por el aire, la luz y trazas de metales pesados. Las disoluciones degradadas pueden ser de color rosa, rojo o azul.

Su estructura es la siguiente:



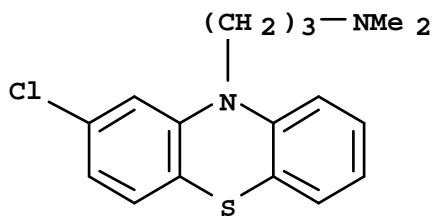
En la tabla 2 recogemos algunas de sus características más destacables.

Tabla 2. Propiedades físicas del hidrocloruro de promazina.

| | |
|-------------------------|---|
| Número CAS: | 53-60-1 |
| Nombre químico: | Hidrocloruro (1:1) de <i>N,N</i> -dimetil-3-(10 <i>H</i> -fenotiazin-10-il)propan-1-amina. |
| Solubilidad: | Muy soluble en agua, metanol y cloroformo. Prácticamente insoluble en éter. |
| Punto de fusión: | 181 °C |
| Log P: | 2'5 |
| pK_a | 9'4 |
| Dosis | Habitualmente hasta 400 mg de hidrocloruro de promazina diariamente. Más de 1 g diario puede ser peligroso. |

El hidrocloruro de clorpromazina es sólido blanco que se oscurece si se expone de manera prolongada a la luz.

Su estructura es la siguiente:



• HCl

En la tabla 3 recogemos algunas de sus características más destacables.

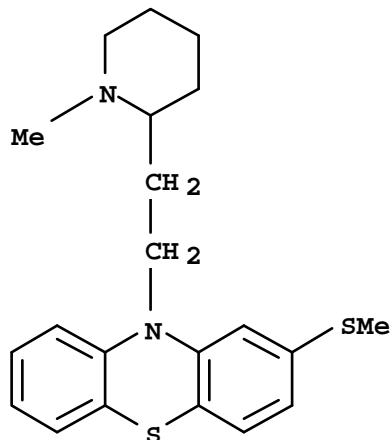
Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Tabla 3. Propiedades físicas del hidrocloruro de clorpromazina.

| | |
|-------------------------|--|
| Número CAS: | 69-09-0 |
| Nombre químico: | Hidrocloruro (1:1) de 3-(2-Cloro-10H-fenotiazina-10-il)-N,N-dimetilpropan-1-amina. |
| Solubilidad: | Prácticamente insoluble en agua si no es en forma de hidrocloruro. |
| Punto de fusión: | 170 °C |
| Log P: | 3'4 |
| pK_a | 9'3 |
| Dosis | Normalmente la dosis es de 75 a 300 mg diarios, aunque en pacientes psicóticos se puede alcanzar 1 g diario. |

El hidrocloruro de tioridazina es un polvo blanco o ligeramente amarillo.

Su estructura es la siguiente:



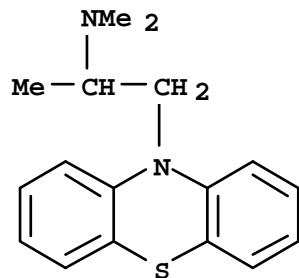
Sus características más destacables son las que se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades físicas del hidrocloruro de tioridazina.

| | |
|-------------------------|--|
| Número CAS: | 130-61-0 |
| Nombre químico: | 10-(2-(1-metilpiperidin-2-il)ethyl)-2-(metiltio)-10 <i>H</i> -fenotiazina. |
| Solubilidad: | Soluble en agua y metanol. Prácticamente insoluble en éter. |
| Punto de fusión: | 160 °C |
| Log P: | 5'9 |
| pK_a | 9'5 |
| Dosis | Normalmente la dosis diaria suele ser de 50 a 300 mg, como máximo puede llegar a los 600 mg/día. |

El hidrocloruro de prometazina es un sólido blanco o débilmente amarillo que se oxida lentamente si se expone al aire. Las disoluciones se vuelven azules cuando se degradan.

La estructura de la prometazina es la siguiente:



• HCl

Sus características más destacables son las que se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades físicas del hidrocloruro de prometazina.

| | |
|-----------------------------|--|
| Número CAS: | 58-33-3 |
| Nombre químico: | Hidrocloruro (1:1) de <i>N,N</i> -dimetil-1-(10 <i>H</i> -fenotiazin-10-il)propan-2-amina. |
| Solubilidad en agua: | Ligeramente soluble en agua si no es en forma de hidrocloruro. |
| Punto de fusión: | 230 °C |
| Log P: | 2'9 |
| pK_a | 9'1 |
| Dosis | Habitualmente desde 20 a 100 mg diarios. La dosis letal mínima es de 200 mg/kg. |

9.- Métodos analíticos para la determinación de fenotiazinas

Los escasos métodos que se han desarrollado para la determinación de TMS se basan en el empleo de detección amperométrica [10], espectrofotométrica [11], atenuación de la fluorescencia [12], cromatografía de gases [13] o cromatografía de capa fina [14]. La cromatografía líquida (HPLC) en fase inversa con detección ultravioleta-visible (UV-Vis) se ha empleado también para su control farmacéutico [15].

PMH y PTH han sido determinadas mediante métodos espectrofotométricos empleando detección UV-Vis [16 , 17] o fluorimétrica [18 - 20]. La quimioluminiscencia electrogenerada se ha empleado para la detección de diferentes antidepresivos tricíclicos entre los que se incluyen algunas fenotiazinas (promazina y clorpromazina). El mecanismo se basa en la reacción entre el complejo tris(2,2'-bipiridil)rutenio (II) y la amina terciaria de estos compuestos [21].

-
- [10] Beral, H., Wermescher, B., Murea, L., Madgearu, M., Cuciureanu, A., *Rev. Chim.* 1964, 15, 764.
[11] Dessouky, Y.M., Mousa, B.A., El-Dim, H.M.N., *Die Pharmazie* 1974, 29, 579-580.
[12] Nikolic, K., Sablic, L., *Tehnika* 1967, 22, 693-694.
[13] Jonkman, J.H.G., Wijsbeek, J., Brouwer-de Boer, S.H., De Zeeuw, R.A., Van Bork, L.E., Orie, N.G.M., *J. Pharm. Pharmacol.* 1975, 27, 849-854.
[14] Jonkman, J.H.G., Wijsbeek, J., Greving, J.E., Van Gorp, R.E., De Zeeuw, R.A., *J. Chromatogr.* 1976, 128, 208-211.
[15] Smet, E., Baeyens, W.R.G., Van der Weken, G., Kiekens, F., Vervaet, C., Remon, J.P. , *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 175.
[16] Puzanowska-Tarasiewicz, H., Wolyniec, E., Kojlo, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14, 267-271.
[17] Daniel, D., Gebhardt, I., Gutz, R., *Anal. Chim. Acta* 2003, 494, 215-224.
[18] Dembinski, B., Szydłowska-Czerniak, A., Kurzawa, M., *Acta Poloniae Pharm.* 1997, 54, 415-419.
[19] Martínez, C., García, S.T., *Pharmazie* 1992, 47, 557-558.
[20] De la Peña, L., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 893-896.
[21] Greenway, G.M., Dolman, S.J.L., *Analyst* 1999, 124, 759-762.

Se han publicado varios métodos de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente para la determinación de fenotiazinas basados en oxidaciones directas [22, 23], quimioluminiscencia sensibilizada [24, 25], quimioluminiscencia indirecta [26] y exaltación de la quimioluminiscencia [27, 28]. También se han empleado métodos de cromatografía en capa fina (TLC) [29, 30], cromatografía líquida [31- 36], cromatografía de gases [37] y métodos electroquímicos [38, 39].

Se han publicado diversos métodos para la determinación de fenotiazinas en orina mediante fluorescencia convencional [40, 41], inmunoensayo [42], fotometría [43, 44], cromatografía de gases [45, 46] y cromatografía líquida con detección UV-Vis [47, 48] y espectrometría de masas [49 - 52]. La electroforesis capilar (CE) ha sido poco empleada para el estudio de fenotiazinas y derivados. Existe un método de electroforesis capilar zonal (CZE) para la determinación de tioridazina y prometazina utilizando como electrolito Tris-ácido acético a pH 5'0 y con un surfactante catiónico fluorado para

-
- [22] Kojlo, A., Michalowski, J., Wolyniec, E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22, 85–91.
[23] Sultan, S. M., Hassan, Y. A. M., Abulkibash, A. M., *Talanta* 2003, 59, 1073–1080.
[24] Huang, Y., Chen, Z., *Talanta* 2002, 57, 953–959.
[25] Aly, F. A., Alarjaf, N. A., Alwarthan, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1998, 358, 255–262.
[26] Alwarthan, A. A., Al-Tamrah, S. A., Akel, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1993, 282, 169–174.
[27] Li, Y., Niu, W., Lu, J., *Talanta* 2007, 71, 1124-1129.
[28] Yang, J., Huang, Y., *Yaowu Fenxi Zazhi* 2002, 22, 453–456.
[29] Curea, E., Martinovici, M., *Ann. Pharm. Fr.* 1975, 33, 505–511.
[30] Temerdashev, Z. A., Kiseleva, N. V., Klishchenko, R. A., Udalov, A.V., *J. Anal. Chem.* 2006, 61, 2-5.
[31] Quintana, M.C., Blanco, M.H., Lacal, J., Hernández, L., *Talanta* 2003, 59, 417-422.
[32] Vanapalli, S.R., Kambhampati, S.P., Putcha, L., Bourne, D.W.A., *J. Chromatogr. Sci.* 2001, 39, 70-72.
[33] Ponder, G.W., Stewart, J.T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 1161-1166.
[34] Zhang, G., Terry, Alvin V., Bartlett, M. G., *J. Chromatogr. B*, 2007, 856, 20-28.
[35] Ojanperae, S., Tuominen, S., Ojanperae, I., *J. Chromatogr. B*, 2007, 856, 239-244.
[36] Tanaka, E., Nakamura, T., Terada, M., Shinozuka, T., Hashimoto, C., Kurihara, K., Honda, K., *J. Chromatogr. B* 2007, 854, 116-120.
[37] Leelavathi, D.E., Dressler, D.E., Soffer, E.F., Yachetti, S.D., Knowles, J.A., *J. Chromatogr.* 1985, 339, 105-115.
[38] Belal, F., El-Ashry, S.M., Shehata, I.M., El-Sherbeny, M.A., El- Sherbeny, D.T., *Mikrochim. Acta* 2000, 135, 147-154.
[39] Baxter, R.I., Svehla, G., Kerr, B., Woolfson, A.D., *Anal. Chim. Acta* 1984, 164, 171-180.
[40] Laassis, B., Aaron, J. J., Mahedero, M. C., *Anal. Chim. Acta* 1994, 290, 27–33.
[41] Laassis, B., Maafi, M., Aaron, J. J., Mahedero, M. C., *Anal. Lett.* 1997, 30, 1541–1554.
[42] Mounsey, A., Strachan, D., Rowell, F. J., Rowell, V., Tyson, J. D., *Analyst* 1996, 121, 955–958.
[43] Aman, T., Ali, A., Khokhar, I., Rashid, A., *Mikrochim. Acta* 1997, 126, 295–300.
[44] Feng, S., Li, C., Fan, J., Chen, X., *J. Anal. Chem.* 2007, 62, 233-237.
[45] Olmos-Carmona, M. L., Hernández-Carrasquilla, M., *J. Chromatogr. B* 1999, 734, 113–120.
[46] Pujadas, M., Pichini, S., Civit, E., Santamarina, E., Perez, K., De la Torre, R., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 594-601.
[47] Sobhi, H.R., Yamini, Y., Abadi, R. H. H. B., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 45, 769-774.
[48] Mercolini, L., Grillo, M., Bartoletti, C., Boncompagni, G., Raggi, M.A., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388, 235-243.
[49] Kumazawa, T., Seno, H., Watanabe-Suzuki, K., Hattori, H., Ishii, A., Sato, K., Suzuki, O., *J. Mass Spectrom. Sep.* 2000, 35, 1091–1099.
[50] Zhang, G., Terry, A. V., Bartlett, M.G., *J. Chromatogr. B* 2007, 854, 68-76.
[51] Kirchherr, H., Kuehn-Velten, W. N., *J. Chromatogr. B*, 2006, 843, 100-113.
[52] Zhang, Z. L., Zhou, J. L., *J. Chromatogr. A* 2007, 1154, 205-213.

invertir el flujo electroosmótico (EOF) [53]. Prometazina y tioridazina se han separado y detectado en orina dopada mediante CZE y detección amperométrica *end-column*, consiguiendo límites de detección del orden de 10^{-8} M [54]. Igualmente se ha utilizado la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) con tampón citrato a pH 3'5 conteniendo ciclodextrinas para la separación de tioridazina, trimeprazina, prometazina, etopropazina y metotriimeprazina [55]. Más recientemente, se ha empleado como surfactante un éter de monodeciloctaelenglicol para la separación de 12 fenotiazinas [56]. Se han llevado a cabo diferentes estudios para establecer la influencia de diferentes selectores quirales tales como ciclodextrinas [57- 63] o proteínas [64- 67], así como también para estudiar la influencia de las β -ciclodextrinas [68] en fenotiazinas relacionadas estructuralmente. La influencia del pH en el comportamiento electroforético de varias fenotiazinas y los valores de pK_a también han sido determinados mediante CZE [69]. La quimioluminiscencia electrogenerada se ha empleado como sistema de detección para determinar CPH consiguiendo límites de detección de 1'5 ng/mL y recuperaciones entre el 83 y el 89 % para muestras de orina [70].

Igualmente se ha utilizado la electroforesis capilar no acuosa (NACE) para la determinación de cuatro fenotiazinas (PTH, dioxiprometazina, CPH y trifluoroperazina) usando N,N-dimetilformamida como medio de separación [71] o siete derivados de fenotiazinas en sangre [72], obteniéndose límites de detección de 0'08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para promazina y 0'15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el resto de compuestos estudiados. Recientemente se ha determinado CPH junto con otros fármacos mediante cromatografía electrocinética no

-
- [53] Muijselaar, P.G.H.M., Claessens, H.A., Cramers, C.A., *J. Chromatogr. A* 735 1996, 395-402.
 - [54] Wang, R., Lu, X., Wu, M., Wang, E., *J. Chromatogr. B* 1999, 721, 327-332.
 - [55] Lin, C., Chen, K., Hsiao, Y., Liao, W., Chen, C., *J. Chromatogr. A* 2002, 971, 261-266.
 - [56] Le, D. C., Morin, C. J., Beljean, M., Siouffi, A. M., Desbène, P. L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1063, 235-240.
 - [57] Wang, F., Kaledi, M.G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 3460-3467.
 - [58] De Boer, T., Bijma, R., Ensing, K., *J. Cap. Elec.* 1998, 5, 65-71.
 - [59] Lin, C., Chen, K., *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 155-163.
 - [60] Chankvetadze, B., Kartozia, I., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Luftmann, H., Blaschke, G., *Chromatographia* 2001, 53, 290-294.
 - [61] Chen, K., Lin, C., Liao, W., Lin, W., Hsiao, Y., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 399-408.
 - [62] Wang, R., Lu, X., Xin, H., Wu, M., *Chromatographia* 2000, 51, 29-36.
 - [63] Liao, W.S., Lin, C.H., Chen, C.Y., Kuo, C.M., Liu, Y.C., Wu, J.C., Lin, C.E., *Electrophoresis* 2007, 28, 3922-3929.
 - [64] Sandra, B., Johan, K., Hans, P., *J. Chromatogr.* 1993, 635, 119-126.
 - [65] Zhang, X., Hong, F., Chang, W., Ci, Y., Ye, Y., *Anal. Chim. Acta* 1999, 392, 175-181.
 - [66] Martínez-Gómez, M. A., Sagrado, S., Villanueva-Camanas, R. M., Medina-Hernández, M. J., *Anal. Chim. Acta* 2007, 582, 223-228.
 - [67] Martínez-Gómez, M.A., Villanueva-Camanas, R. M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J., *Electrophoresis* 2006, 27, 4364-4374.
 - [68] Chen, K., Lin, C., Liao, W., Lin, W., Hsiao, Y., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 399-408.
 - [69] Lin, C., Liao, W., Chen, K., Lin, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154-3159.
 - [70] Li, J., Zhao, F., Ju, H., *Anal. Chim. Acta* 2006, 575, 57-61.
 - [71] Wang, R., Lu, X., Xin, H., Wu, M., *Chromatographia* 2000, 51, 29-36.
 - [72] Madej, K., Wozniakiewicz, M., Kala, M., *Chromatographia* 2005, 61, 259-263.

acuosa (NAEKC) y detección por espectrometría de masas empleando una interfase basada en ionización por electrospray [73].

[73] Mol, R., Servais, A.C., Fillet, M., Crommen, J., de Jong, G.J., Somsen, G., W., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1159, 51-57.

CAPÍTULO 1

DETERMINACIÓN DE TIAZINAMIO, PROMAZINA Y
PROMETAZINA EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS
MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

1.- Introducción

La electroforesis capilar (CE) es una técnica separativa que se fundamenta en las diferencias que distintos compuestos presentan en la movilidad electroforética, en el coeficiente de reparto entre fases, en el valor del punto isoeléctrico (pI), en el tamaño molecular o en una combinación de varias de estas propiedades cuando se inyectan en un tubo capilar lleno de una disolución conductora y se aplica un campo eléctrico, de modo que podrán ser separados en función de la diferencia en el tiempo de migración, que es el tiempo necesario para que cada compuesto alcance un detector situado en la parte final del tubo capilar.

Numerosos textos recogen las características de la técnica, sus diversos modos, el acoplamiento con diversos sistemas de detección y sus aplicaciones en distintos ámbitos como el alimentario, farmacéutico, clínico, toxicológico, medioambiental, etc. [74 - 82].

En el presente capítulo se propone el empleo de la electroforesis capilar zonal (CZE) para la determinación de tres fenotiazinas en preparaciones farmacéuticas: metilsulfato de tiazinamio (TMS), hidrocloruro de promazina (PMH) e hidrocloruro de prometazina (PTH).

El TMS, (10-[2-trimetilamonio-propil]-fenotiazina-metilsulfato), tiene propiedades antihistamínicas y anticolinérgicas. Se administra por medio de inyecciones intramusculares a pacientes que sufren de enfermedades respiratorias crónicas. El PMH, 10- [3-dimetilamino-propil]-fenotiazina, es un agente neuroléptico con fuertes efectos anticolinérgicos, hipotensivos y sedativos. Se utiliza principalmente como agente antipsicótico y antiemético y, en ocasiones, como agente complementario en pacientes con dolor severo. Se administra mediante inyecciones intramusculares. El PTH, (10-[2-dimetilamino-propil]-fenotiazina), es ampliamente utilizado como antihistamílico y para el alivio sintomático de reacciones de hipersensibilidad o para aumentar los efectos analgésicos, anestésicos o sedantes de otros fármacos. Normalmente se administra como pastillas, cremas o soluciones inyectables.

[74] Li, S.F.Y., "Capillary Electrophoresis: Principles, Practice and Applications", Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1992.

[75] Kuhn, R., Hoffstetter-Kuhn, S., "Capillary Electrophoresis: Principles and Practice", Springer-Verlag, Berlin, 1993.

[76] Landers, J.P. (Ed.), "Handbook of Capillary Electrophoresis", CRC, Boca Ratón, 1994.

[77] Altria, K.D., "Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation and Applications", Humana Press, Totowa, 1995.

[78] Cruces Blanco, C., "Electroforesis Capilar", Serie Monografías, Universidad de Almería, Servicio de publicaciones, Almería, 1998.

[79] Khaledi, M.G. (Ed.), "High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, techniques and applications", John Wiley&Sons, Chemical Analysis, vo. 146, New York, 1998.

[80] Dabrio, M.V. (Ed.). "Cromatografía y Electroforesis en Columna", Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 2000.

[81] Marina, M.L., Rios, A., Valcárcel, M. (Eds.), "Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis", Elsevier, Amsterdam, 2005.

[82] Fernández Gutiérrez, A., Segura Carretero, A. (Eds.), "Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección", Editorial Universidad de Granada, Granada, 2006.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

El método de CZE desarrollado en este capítulo para la determinación de TMS, PTH y PMH se ha establecido llevando a cabo una optimización sistemática de todas las variables influyentes mediante la metodología de superficies de respuesta, usando el diseño de experimentos. El método ha sido validado y cumple con los requerimientos de la guía ICH [83] para la industria.

2.- Reactivos y productos

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. Acetonitrilo (MeCN), metanol e hidróxido sódico se suministraron por Panreac-Química (Madrid, España). El ácido clorhídrico fue suministrado por Scharlaub (Barcelona, España). Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris) fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). El metilsulfato de tiazinamio (TMS) y el hidrocloruro de prometazina (PTH) se obtuvieron de Alfa Pharma (Bélgica) y el hidrocloruro de promazina (PMH) de Federa (Bélgica). El propilparabén se utilizó como patrón interno y fue suministrado por Fluka (Steinheim, Alemania).

Las ampollas de TMS (65 mg de TMS, 1 mg de EDTA·2Na, 2 mg de ácido ascórbico, 14 mg de NaCl en 1 mL de agua) fueron suministradas por un hospital universitario (Universidad de Gante, Bélgica). Las pastillas de PTH (FRINOVA®: 25 mg de PTH y excipientes: almidón, lactosa, cera, sacarosa, levilite y estearato magnésico) fueron compradas en una farmacia local y son producidas por Rhône-Poulenc. Las ampollas de PMH se prepararon en nuestro laboratorio mezclando 50 mg de hidrocloruro de promazina, 3'6 mg de citrato sódico, 0'75 mg ácido cítrico y 1'0 mg de sulfoxilato formaldehido sódico con 1 mL de agua.

El agua desionizada ($18'2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$) fue preparada con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

3.- Instrumentación y programas informáticos

Los experimentos de CE fueron realizados en un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con detector de fila de diodos. Los datos se trataron con el programa HP ChemStation, versión A.09.01.

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España).

[83] ICH International Conference on Harmonization, Guidelines Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, London, November 1996.

Se empleó StatGraphics [84] para la estimación del modelo de regresión y para la aplicación del diseño de experimentos en el procedimiento de optimización multivariante. La pureza de pico fue evaluada a través del programa ChemStation [85]. El análisis de datos para evaluar los parámetros de calidad del método se realizó mediante el programa Alamín [86].

4.- Disoluciones y preparación de las muestras

Las disoluciones madre de fenotiazinas (1 mg/mL) se prepararon en agua desionizada y la de propilparabén (1 mg/mL) se preparó en una mezcla agua:metanol (6:4 v/v). Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de las madres con agua desionizada. El propilparabén se eligió como patrón interno porque es estable, está disponible comercialmente con un alto grado de pureza, es barato, no es tóxico, posee una aceptable absorción UV-Vis en la longitud de onda de absorción de los analitos, y además la forma de pico es buena con el tampón de separación. Todas las soluciones fueron almacenadas en botes color topacio a 4 °C. En estas condiciones, eran estables al menos un mes. Las soluciones de electrolito fondo se filtraban a través de una membrana de PTFE (Millex-GN, Millipore) con un diámetro de poro de 0'2 μm.

La preparación de la muestra en el caso de las ampollas de TMS se llevó a cabo del siguiente modo: 800 μL de una disolución inyectable (con un contenido nominal de 32'5 mg/mL en TMS) se diluyeron hasta 100 mL con agua (260 μg/mL). Una alícuota de 770 μL de esta disolución se dopó con 500 μL de la disolución madre de propilparabén (1 mg/mL) y se diluyó con agua desionizada hasta un volumen final de 5 mL. De esta manera se esperaba obtener una concentración final de TMS y propilparabén de 40 μg/mL y 100 μg/mL, respectivamente.

Una alícuota de 200 μL de la ampolla de PMH, preparada como se indica en el apartado 2, se diluyó hasta 10 mL, y 500 μL de esta disolución se doparon con 1 mL de la disolución madre de propilparabén (1 mg/mL) y se añadió agua desionizada hasta completar un volumen final de 10 mL. De esta manera, las concentraciones finales debían ser 50 μg/mL para PMH y 100 μg/mL para propilparabén.

En el caso del análisis de PTH, varias pastillas del fármaco (contenido nominal: 25 mg por unidad) fueron finamente divididas y homogeneizadas en un mortero. A continuación, la cantidad correspondiente al peso medio de una pastilla se disolvió en un volumen aproximado de 70 mL de agua desionizada, se sonicó durante 15 min., se filtró a través de un papel de filtro y se enrasó hasta 100 mL. Un volumen de 1 mL de este filtrado se diluyó con agua desionizada hasta un volumen final de 5 mL. Las

[84] STATGRAPHICS 5.0 Statistical Graphics Corporations, Rockville, MD, 2000.

[85] Agilent ChemStation A.09.01, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.

[86] García-Campaña, A.M., Cuadros-Rodríguez, L., Alés-Barrero, F., Román-Ceba, M., Sierra-Fernández, J.L., *Trends Anal. Chem.* 1997, 16, 381-385.

concentraciones finales de PTH y propilparabén debían ser 50 µg/mL y 100 µg/mL, respectivamente.

5.- Procedimiento electroforético propuesto

Los analitos se monitorizaron a 254 nm con un ancho de banda de 30 nm. La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida 58'5 cm × 50 µm i.d. (longitud efectiva 50 cm) en modo normal y aplicando un voltaje de 30 kV.

La inyección de la muestra se hizo hidrodinámicamente aplicando 50 mbar durante 5 s. El tampón electroforético, una vez optimizado, consistía en una disolución acuosa de 100 mM de Tris con un 15 % de acetonitrilo (v/v) ajustado a un pH aparente de 8'0 con ácido clorhídrico.

Los capilares nuevos se acondicionaban durante 20 min. con una disolución de NaOH 1M, seguido de 30 min. con agua desionizada. Al principio de cada día, el capilar se pre-acondicionaba durante 2 min. con NaOH 0'1 M, 3 min. con agua y 7 min. con tampón electroforético. Después de cada análisis, el capilar se post-acondicionaba durante 1 min. con NaOH 0'1 M, 4 min. con agua desionizada y 3 min. con tampón electroforético para mantener una adecuada repetibilidad entre análisis.

6.- Optimización de las condiciones experimentales

La metodología tradicional univariante con fines de optimización no suele tener en cuenta las posibles interacciones entre factores, implicando un gran número de análisis independientes si se pretenden considerar éstas. Para evitar esta desventaja, aplicamos la estrategia del diseño de experimentos en la optimización de las variables principales, es decir, aquellas que afectan a la separación y cuantificación de las tres fenotiazinas en estudio por CZE. Estas son: pH y concentración de tampón electroforético, presencia y concentración de modificador orgánico, voltaje de separación y temperatura del capilar.

En nuestro caso decidimos emplear un diseño Draper-Lin compuesto y centrado en las caras, con tres puntos centrales y un total de 25 experiencias. Aunque este diseño se ha empleado poco en química analítica lo seleccionamos como el más adecuado porque el número de niveles a considerar para cada factor (variable) es adecuado para un estudio riguroso de los intervalos experimentales de estudio de las variables seleccionadas y porque su eficacia es superior a la de otros diseños como el diseño compuesto completo Box-Wilson o el diseño compuesto fraccionado Box-Hunter [87]. La estrategia del diseño Draper-Lin reduce el número de puntos del diseño factorial, obteniendo lo que se denomina “pequeño diseño compuesto” y en el que se requiere un mínimo trabajo experimental para calcular los coeficientes de la función matemática de la superficie de

[87] Gámiz-Gracia, L., Cuadros-Rodríguez, L., Almansa-López, E., Soto-Chinchilla, J.J., García-Campaña, A.M., *Talanta* 2003, 60, 523-534.

respuesta. El criterio para seleccionar los valores óptimos de las variables estudiadas se basó en la obtención de un máximo para una función de respuesta múltiple, en nuestro caso, establecida como una combinación de las eficacias de pico correspondientes a los tres compuestos (TMS, PMH y PTH) debido a que estos ya eran fácilmente separados mostrando una adecuada resolución y cortos tiempo de análisis. Para este propósito se siguió la estrategia descrita por Derringer y Suich [88], donde cada respuesta se trasforma en una única función que varía entre 0 y 1. Todas las funciones de deseabilidad individuales, definidas para cada respuesta, d_i , conforman una función de respuesta múltiple, o deseabilidad global, D , que se optimiza como si fuera una respuesta simple. Esta deseabilidad global D podría ser definida como la media geométrica ponderada de todas las deseabilidades individuales y ha sido aplicada en distintos sistemas analíticos para encontrar las condiciones experimentales más apropiadas [89-91].

Para el caso concreto de este sistema se calcula del siguiente modo:

$$D = \sqrt[3]{d_{TMS} \cdot d_{PMH} \cdot d_{PTH}}$$

Donde d_{TMS} es la deseabilidad individual para el TMS y en este caso concreto se calcula con la siguiente expresión:

$$d_{TMS} = \frac{Eficacia_i - Eficacia_{min}}{Eficacia_{max} - Eficacia_{min}}$$

El resto de deseabilidades individuales para PMH y PTH se calculan de manera análoga.

El dominio experimental para las variables estudiadas fue definido en función de diferentes consideraciones. Para predecir el intervalo de pH óptimo para la separación de las fenotiazinas estudiadas, es necesario identificar los valores de pH en los que las diferencias de movilidad electroforética son mayores y por tanto los compuestos migrarán más separadamente. Los valores de pK_a son 9'1 para PTH y 9'4 para PMH [92] debido a la amina terciaria de la cadena alifática. La forma neutra está principalmente presente a valores de pH por encima del pK_a mientras que con valores inferiores lo que predomina es la forma catiónica. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el pH fue modificado en el intervalo de 7 a 9 porque valores de pH inferiores a 7 no producían una buena resolución entre los compuestos, y con valores de pH superiores a 9 se producía la precipitación de PTH y PMH. Se seleccionó tris(hidroximetil)aminometano como tampón ya que tiene un valor de pK_a de 8'01, baja conductividad y una transparencia UV-Vis suficiente a la longitud de onda utilizada. Con otros tampones como borato y fosfato (60 mM y pH 8'01) no se consiguió una

[88] Derringer, G., Suich, R., *J. Qual. Tech.* 1980, 12, 214-218.

[89] Rueda, M.E., Sarabia, L.A., Herrero, A., Ortíz, M.C., *Anal. Chim. Acta* 2003, 479, 173-184.

[90] Rueda, E., Ortíz, M.C., Sarabia, L.A., Herrero, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 498, 119-131.

[91] Ortíz, M.C., Herrero, A., Sanllorente, S. Reguera, C., *Talanta* 2005, 65, 246-254.

[92] Lin, C., Liao, W., Chen, K., Lin, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154-3159.

adecuada separación de los tres compuestos. La concentración de tampón se modificó entre 50 y 150 mM para obtener una corriente eléctrica que no superara los 100 μ A, evitando así las consecuencias negativas en la separación del efecto Joule.

La adición de disolventes orgánicos al tampón electroforético fue considerada porque esto afecta a varios parámetros como la viscosidad, la constante dieléctrica y el potencial zeta. Los mejores resultados se obtuvieron en presencia de MeCN, consiguiéndose una mejora significativa en la separación electroforética (figura I-1). En este estudio, el porcentaje de MeCN fue variado entre un 5 y un 25 %.

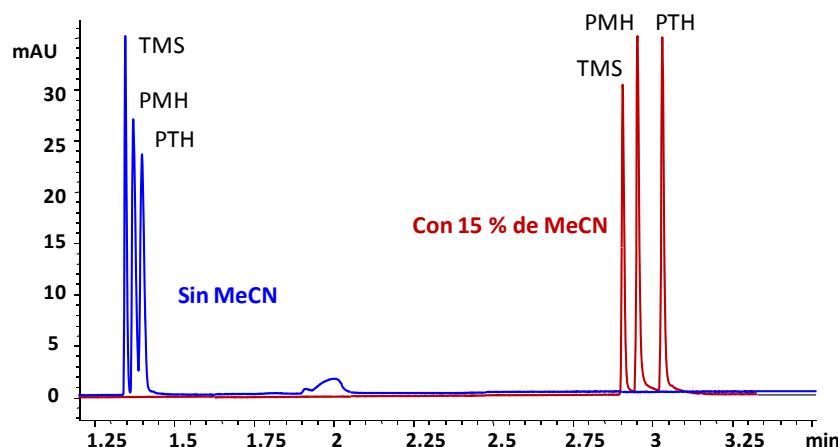


Figura I-1. Influencia de la presencia de acetonitrilo en el tampón de separación.

El voltaje se modificó entre 30 y 10 kV para obtener un buen compromiso entre separación y tiempo de análisis. La temperatura de separación se varió en torno al valor de la temperatura ambiente para evitar gradientes en el capilar (de 20 a 30 °C).

Todas las experiencias del diseño de experimentos fueron realizadas con disoluciones de trabajo que contenían 50 μ g/mL para cada fenotiazina. La matriz de experimentos correspondiente a este diseño se muestra en la tabla I-1.

Tabla I-1. Matriz del diseño en la optimización de la separación de TMS, PMH y PTH.

| Experiencia | pH | Concentración (mM) | % Acetonitrilo | Voltaje (kV) | Temperatura (°C) |
|-------------|----|--------------------|----------------|--------------|------------------|
| 1 | 8 | 100 | 15 | 20 | 25 |
| 2 | 8 | 100 | 15 | 20 | 30 |
| 3 | 9 | 50 | 25 | 30 | 20 |
| 4 | 9 | 150 | 5 | 30 | 30 |
| 5 | 9 | 50 | 25 | 30 | 30 |
| 6 | 7 | 150 | 25 | 30 | 20 |
| 7 | 9 | 150 | 25 | 10 | 20 |
| 8 | 9 | 150 | 5 | 10 | 20 |
| 9 | 9 | 50 | 5 | 10 | 30 |
| 10 | 7 | 50 | 5 | 30 | 20 |
| 11 | 7 | 50 | 25 | 10 | 30 |
| 12 | 7 | 150 | 5 | 30 | 30 |
| 13 | 8 | 100 | 15 | 20 | 25 |
| 14 | 7 | 150 | 25 | 10 | 30 |
| 15 | 7 | 50 | 5 | 10 | 20 |
| 16 | 7 | 100 | 15 | 20 | 25 |
| 17 | 9 | 100 | 15 | 20 | 25 |
| 18 | 8 | 50 | 15 | 20 | 25 |
| 19 | 8 | 150 | 15 | 20 | 25 |
| 20 | 8 | 100 | 5 | 20 | 25 |
| 21 | 8 | 100 | 25 | 20 | 25 |
| 22 | 8 | 100 | 15 | 10 | 25 |
| 23 | 8 | 100 | 15 | 30 | 25 |
| 24 | 8 | 100 | 15 | 20 | 20 |
| 25 | 8 | 100 | 15 | 20 | 25 |

A partir del procedimiento de optimización multivariante, se encontraron como variables significativas que afectan a la señal analítica seleccionada (eficacia de pico): pH, concentración de tampón y voltaje de separación (figura I-2).

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

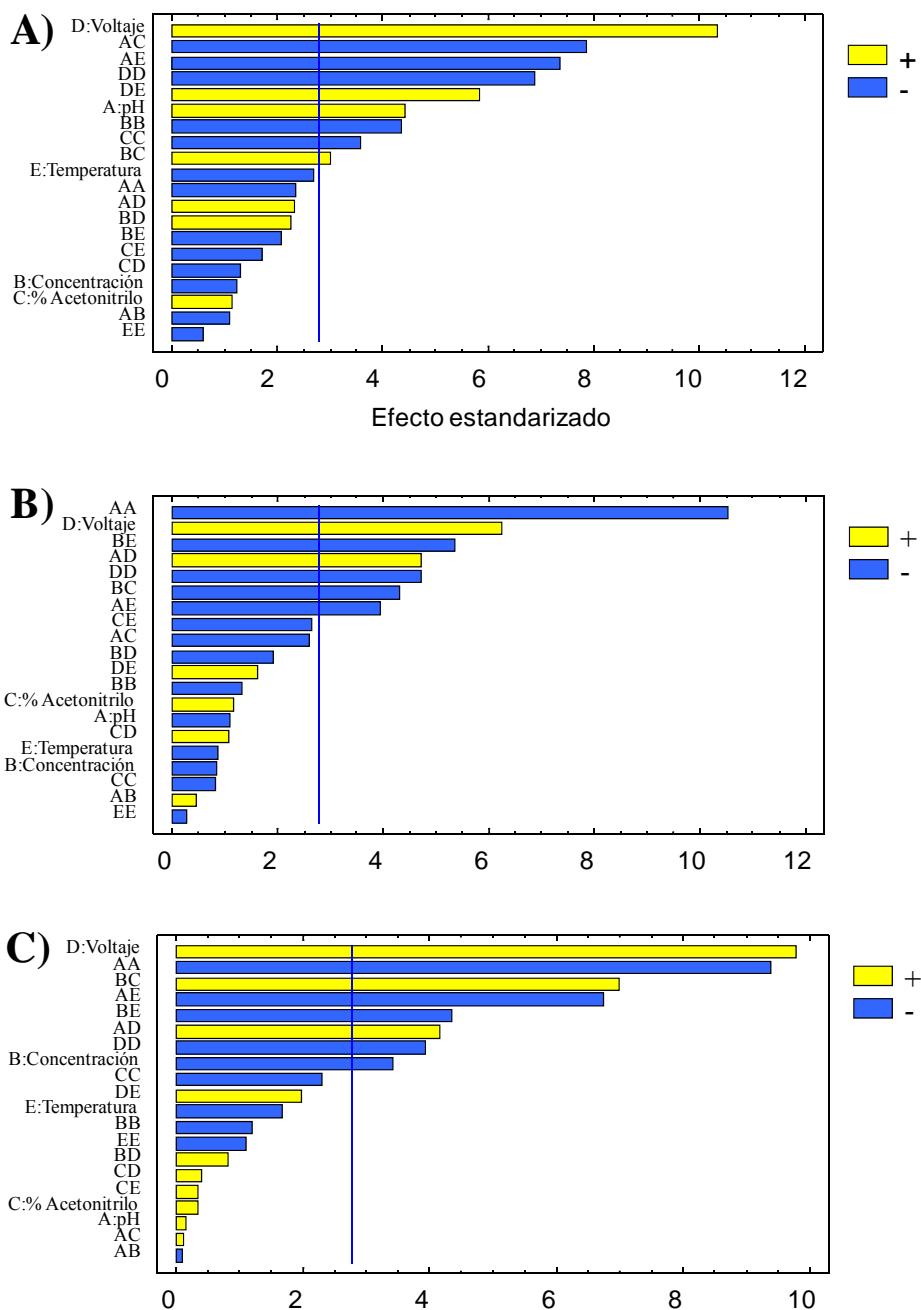


Figura I-2. Gráficas de Pareto obtenidas del diseño de cribado en el estudio de las variables significativas sobre la función deseabilidad en el caso de: A) TMS; B) PMH y C) PTH. La línea vertical muestra el límite de decisión para considerar los efectos significativos (se basa en el efecto estandarizado = efecto estimado/error estándar, valor de $P = 0'05$ a un nivel de confianza del 95%).

Los valores óptimos obtenidos fueron: concentración de tampón Tris, 100 mM; pH, 8'0; voltaje, 30 kV. La temperatura del capilar se estableció en 25 °C y la concentración de MeCN en 15 % (v/v). En estas condiciones, se obtenían eficacias mayores de 500.000 y una buena resolución (mayor de 1'5), además los tiempos de migración estaban en torno

a 3 min. Algunas de las superficies de respuesta, a partir de las que se obtuvieron los anteriores valores óptimos, se muestran en la figura I-3.

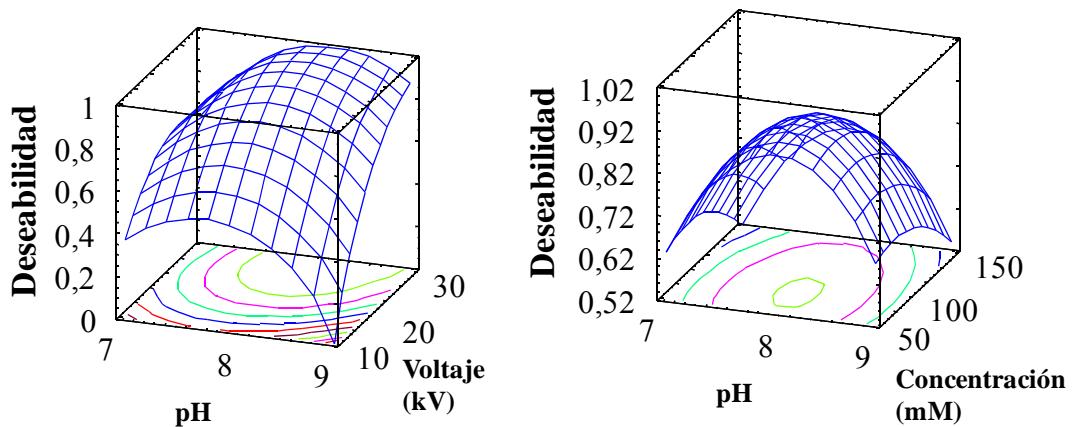


Figura I-3. Superficies de respuesta obtenidas en el proceso de optimización multivariante.

La figura I-4 muestra un electroferograma correspondiente a la separación de los tres compuestos estudiados en condiciones óptimas.

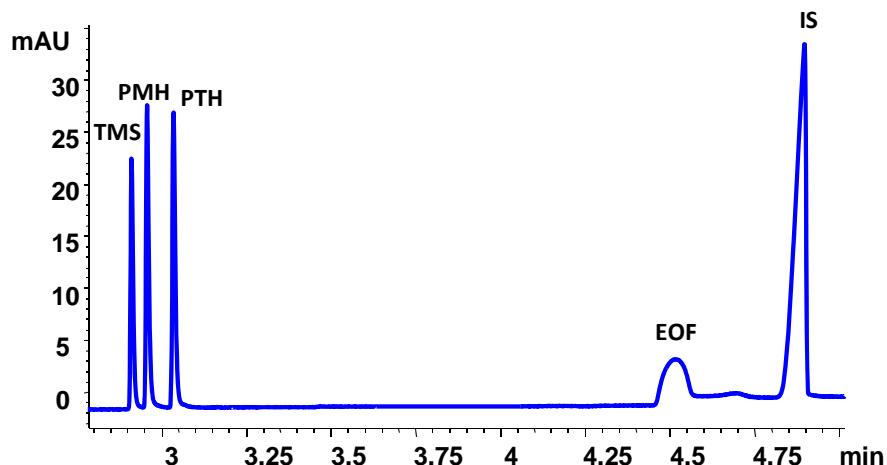


Figura I-4. Separación mediante CZE de TMS, PMH y PTH en condiciones óptimas: 100 mM Tris con 15 % (v/v) de acetonitrilo ajustado a pH 8'0. Voltaje de separación: 30 kV y temperatura del capilar 25 °C. EOF: Flujo electroosmótico; IS: Patrón Interno

7.- Parámetros de calidad del método

Para demostrar la conveniencia de este método en el control de calidad farmacéutico se realizó una validación en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), precisión, exactitud, especificidad, robustez y pureza de pico de acuerdo con las recomendaciones de la guía ICH [83] en las condiciones óptimas de separación.

7.1.- Rectas de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación

Se prepararon seis disoluciones patrón para establecer las correspondientes rectas de calibrado, de las siguientes concentraciones: 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/mL de cada fenotiazina, todas ellas incluyendo una concentración constante de propilparabén que se utilizó como patrón interno. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración y cada réplica fue inyectada por triplicado. Las rectas de calibración se establecieron considerando como respuesta las áreas relativas de pico corregidas, es decir, la razón (área de pico de analito/tiempo de migración: área de pico de patrón interno/tiempo de migración), en función de la concentración de analito (figura I-5).

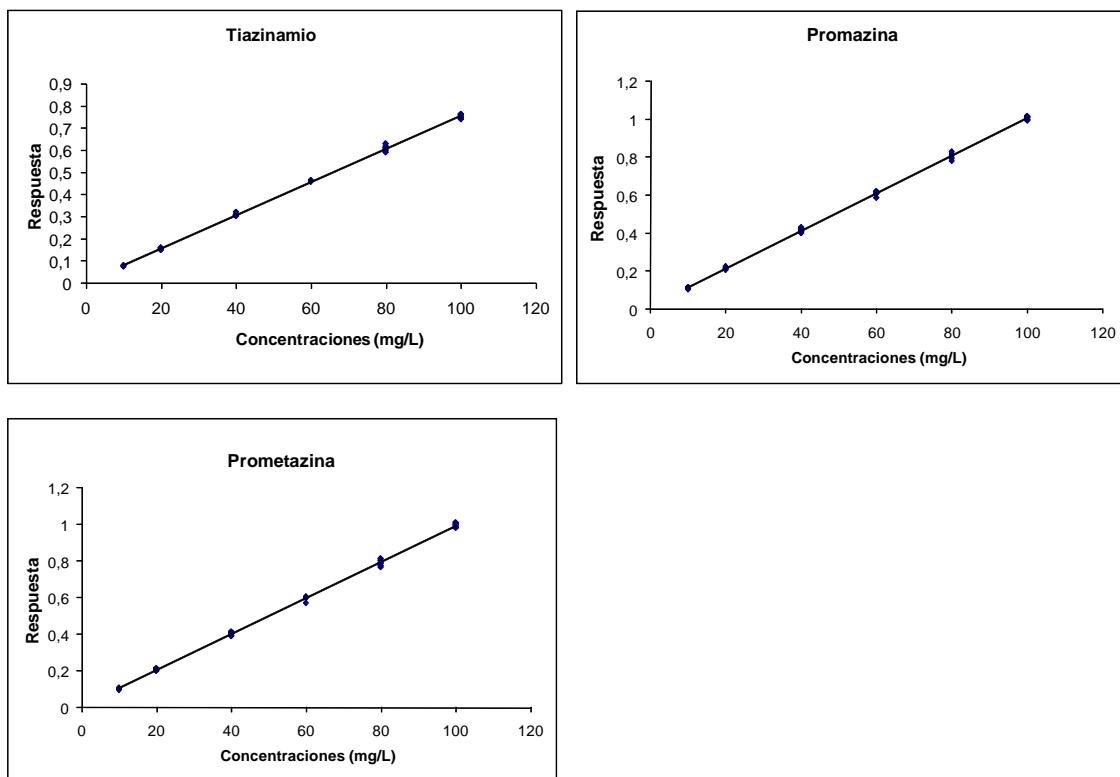


Figura I-5. Rectas de calibrado para tiazinamio, promazina y prometazina.

La tabla I-2 resume los parámetros del calibrado obtenidos a partir la regresión por mínimos cuadrados así como los parámetros de calidad calculados a partir de los datos del calibrado para cada compuesto, utilizando el programa Alamín. Los límites de detección y cuantificación fueron evaluados con este programa que considera las recomendaciones de la IUPAC y que utiliza una propuesta basada en el estudio de los residuales de la curva de regresión ajustada para estimar una desviación estándar de una señal que puede ser considerada como blanco para técnicas cromatográficas o electroforéticas [93]. Los valores de P para el test de fallo de ajuste ($\alpha = 0'05$) en el análisis de la varianza (ANOVA) muestran ausencia de curvatura. La linealidad expresada como coeficiente de determinación (R^2 , %) fue satisfactoria en todos los casos.

Tabla I-2. Parámetros de calidad del método propuesto.

| Analito | Rango lineal ($\mu\text{g/mL}$) | Ordenada | Pendiente ($\text{mL}/\mu\text{g}$) | Fallo ajuste ($P\%$) | R^2 | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) | LOD ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------|---|----------|--|------------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| TMS | 10-80 | 0'0091 | 0'0075 | 57'3 | 0'9987 | 9'4 | 2'8 |
| PMH | 10-100 | 0'0111 | 0'0099 | 77'1 | 0'9989 | 10'9 | 3'3 |
| PTH | 10-100 | 0'0084 | 0'0098 | 67'3 | 0'9988 | 11'0 | 3'3 |

7.2.- Evaluación de la precisión

La precisión, en términos de áreas relativas corregidas, se evaluó con una mezcla de disoluciones patrón a tres niveles de concentración (10, 50 y 80 $\mu\text{g/mL}$ de cada compuesto) mediante el estudio de la repetibilidad (intra-día) y precisión intermedia (entre-días). Para los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo cinco experimentos replicados en el mismo día. Para la precisión intermedia, se llevaron a cabo tres réplicas experimentales de cada nivel de concentración durante cinco días seguidos. Los resultados expresados como desviación estándar relativa (DER) se dan en la tabla I-3. Los tiempos de migración medios obtenidos en condiciones de precisión intermedia fueron 3'05 min. (1'5 % DER) para TMS, 3'10 min. (1'6 % DER) para PMH y 3'18 min. (1'7 % DER) para PTH. En las concentraciones estudiadas, el método proporcionó una precisión aceptable.

[93] García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., Van der Weken, G., Cuadros-Rodríguez, L., Alés-Barrero, F., *Biomed. Chromatogr.* 1998, 12, 177-178.

Tabla I-3. Estudio de la precisión del método propuesto.

| Analito | 10 µg/mL | 50 µg/mL | 80 µg/mL |
|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Intra-día DER (%) (n = 5) | | | |
| TMS | 4'6 | 3'6 | 3'0 |
| PMH | 4'1 | 4'4 | 3'5 |
| PTH | 4'4 | 3'9 | 3'6 |
| Entre-días DER (%) (n = 15) | | | |
| TMS | 4'7 | 5'1 | 5'1 |
| PMH | 3'4 | 3'7 | 3'7 |
| PTH | 4'7 | 5'3 | 5'2 |

7.3.-Especificidad

La especificidad del método fue investigada mediante la observación de interferentes potenciales entre fenotiazinas y productos de degradación cuando disoluciones patrón (50 µg/mL) de fenotiazinas se sometían a estrés ácido, básico, oxidativo, térmico y de radiación UV. Los productos de degradación de TMS, PMH y PTH se obtienen bajo condiciones oxidantes y de radiación UV. Las fenotiazinas se oxidan fácilmente; el proceso de reacción oxidativa tiene lugar en dos pasos. El primero es reversible y produce un catión-radical coloreado, entonces, el exceso de oxidante conduce a la generación de un sulfóxido incoloro [94], este último paso es irreversible. Bajo estrés térmico, la disolución de PTH se vuelve azul pero no se encontró ningún pico a la longitud de onda de 254 nm en el electroferograma aunque el área del pico del PTH se redujo. La formación de sulfóxidos se pone de manifiesto mediante un espectro UV-Vis característico. En la figura I-6 se muestra un electroferograma típico de una disolución de fenotiazinas irradiadas con luz UV-Vis. No se observaron productos de degradación bajo condiciones de estrés ácido, y en condiciones básicas PMH y PTH precipitan.

[94] Karpinska, J., *Anal. Sci.* 2001, 17, 249-253.

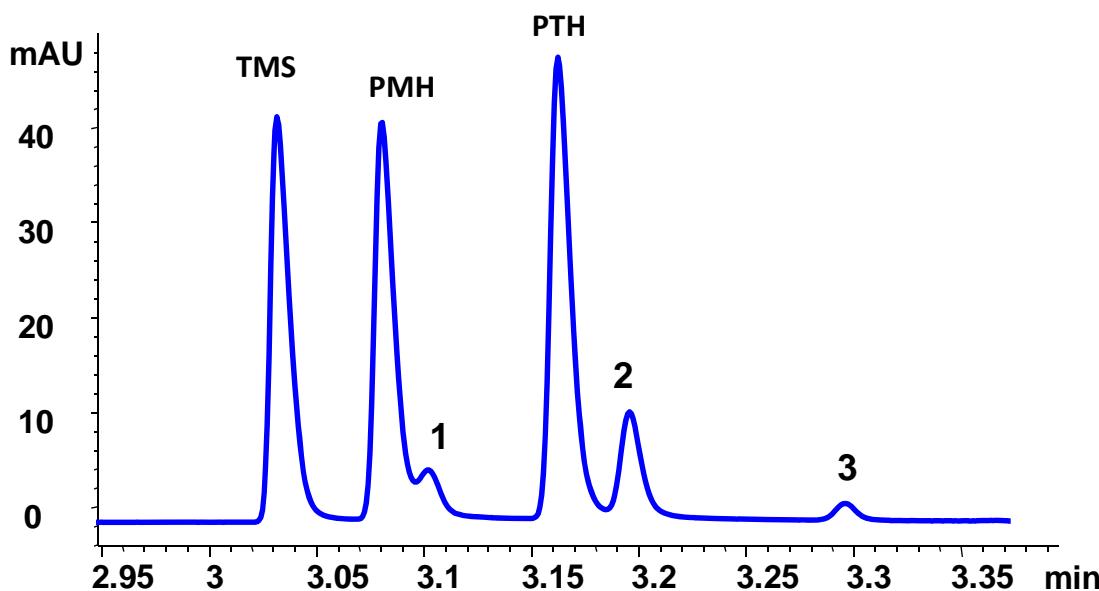


Figura I-6. Electroferograma CZE de una disolución de 50 µg/mL de cada fenotiazina tras irradiación UV-Vis. Identificación de picos: 1, producto de degradación del TMS; 2, producto de degradación de PMH; 3, producto de degradación de PTH.

7.4.- Robustez

La robustez de un método analítico se define como la capacidad de producir resultados constantes e imparciales cuando dicho método es aplicado bajo diferentes condiciones operatorias [95]. Para determinar la robustez es necesario cambiar ligeramente las condiciones intrínsecas de operación del método en un estudio intra-laboratorio. Estos cambios pequeños y deliberados [83] implican cualquier desviación de un parámetro del procedimiento respecto a su valor nominal y óptimo descrito en el método analítico. La robustez del método analítico propuesto respecto a ligeras modificaciones de los valores óptimos se estudió empleando un diseño factorial fraccionado saturado 2^{7-4} , considerando las cinco variables evaluadas que se recogen en la tabla I-4. Esto supuso un total de ocho experiencias llevadas a cabo en orden aleatorio, siendo posible introducir dos variables “fantasma” para poder evaluar las posibles interacciones. Para llevar a cabo los experimentos se empleó una disolución que contenía 50 µg/mL de cada fenotiazina (TMS, PMH y PTH).

Teniendo en cuenta el conocimiento previo obtenido a partir de los experimentos de optimización se encontró que el pH del tampón electroforético era muy crítico y por tanto se varió $\pm 0'1$ unidad de pH alrededor del valor nominal considerado como óptimo. Otros parámetros como la concentración de tampón, el porcentaje de MeCN y la temperatura del capilar se variaron un $\pm 10\%$ alrededor del valor nominal. El tiempo

[95] Bosque-Sendra, J.M., Nechar, M., Cuadros-Rodríguez, L., *Fresen. J. Anal. Chem.* 1999, 365, 480-488.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

de inyección fue introducido también en este estudio, con la misma variación que el resto de parámetros, porque la inyección es uno de los factores más irreproducibles en los métodos electroforéticos, lo que puede conducir a una falta de robustez y afectar, por tanto, a la resolución y a la precisión. Las dos variables “fantasma” introducidas se confundieron con las siguientes interacciones: fantasma 1 = pH-fantasma 2, concentración de tampón-porcentaje de acetonitrilo, tiempo de inyección-temperatura del capilar; fantasma 2 = pH-fantasma 1, concentración de tampón-temperatura, tiempo de inyección-porcentaje de acetonitrilo. El hecho de que los efectos sean significativos o no para estos cambios se estimó de acuerdo con la varianza de las áreas de pico relativas para las concentraciones seleccionadas de fenotiazinas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla I-4 que demuestra que el método es robusto (valor $P > 5\%$) para variaciones del 10% en la concentración de tampón, porcentaje de acetonitrilo, temperatura del capilar y tiempo de inyección, y además, también es robusto para variaciones de 0'1 unidad de pH en el tampón de separación. Con este estudio se conoce mejor el sistema y se pueden controlar aquellos factores que contribuyen más al error experimental.

Tabla I-4. Estudio de la robustez del método propuesto.

| Variables | Valores nominales | Efecto (valor P (%)) |
|--------------------------|-------------------|----------------------|
| pH | 8 | Negativo (50'7) |
| [Tris](mM) | 100 | Negativo (93'1) |
| % Acetonitrilo | 15 | Negativo (88'5) |
| Temperatura capilar (°C) | 25 | Negativo (44'5) |
| Tiempo inyección | 5 | Negativo (69'0) |
| Fantasma 1 | - | Negativo (73'7) |
| Fantasma 2 | - | Negativo (78'5) |

7.5.- Pureza de pico

Un requisito esencial en una técnica separativa es la capacidad de verificar la pureza de las especies separadas, es decir, asegurar que no hay ninguna impureza que comigre con el analito y contribuya a la respuesta de este dentro del límite de detección de la técnica. La comparación de espectros de pico es probablemente el método más popular para descubrir una impureza. Si un pico es puro, todos los espectros adquiridos durante la migración del pico deberían ser idénticos excluyendo, claro está, las diferencias de intensidad debidas a la variación de la concentración. La pureza de pico fue evaluada

con soluciones de muestras de fármacos mediante cinco espectros por pico comparados desde 210 a 400 nm y estableciendo un límite de absorbancia de 1 mAU para reducir la contribución espectral del ruido. Se aplicó un factor de suavizado de 7 y un factor *spline* de 5 para el procesamiento de espectros. El ruido espectral fue evaluado a los 0 min. con 14 espectros. Para calcular la curva de similitud, cada espectro individual es comparado con el espectro medio. Para mostrar las curvas de similitud y umbral se eligió el modo “relación similitud/umbral”. En este modo, si $\left(\text{relación} = \frac{1000 - \text{similitud}}{1000 - \text{umbral}} \right)$ es menor de 1, el pico se puede considerar puro, en caso contrario, no podríamos asegurar que el pico sea puro [96]. Las relaciones encontradas utilizando el programa ChemStation fueron 0'148 para TMS, 0'362 para PMH y 0'073 para PTH. Por tanto este estudio demuestra que los excipientes no interferían en el análisis de TMS, PMH y PTH.

8.- Aplicación del método propuesto a la determinación de fenotiazinas en preparados farmacéuticos

El método validado fue satisfactoriamente aplicado a la determinación cuantitativa de TMS y PMH en soluciones inyectables y de PTH en pastillas. La exactitud del método fue evaluada por comparación de los resultados obtenidos al aplicar el método propuesto con los valores nominales ofrecidos por el fabricante. Esta comparación se hizo por medio de un test de la *t de Student* en el caso del análisis de TMS y PTH. Para PMH, la exactitud fue determinada mediante estudios de recuperación a tres niveles de concentración. Un placebo analítico fue dopado con PMH a concentraciones correspondientes al 80, 100 y 120 % del valor nominal. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada solución placebo a cada nivel de concentración. Se obtuvieron resultados satisfactorios al no encontrarse diferencias significativas entre los valores obtenidos por el método propuesto y los valores nominales indicados (tabla I-5). Igualmente en el ensayo de recuperaciones para la validación de la determinación de PMH, los valores obtenidos fueron aceptables (tabla I-6), lo que demuestra la posibilidad de aplicar el método al control de calidad de estos fármacos. Es importante destacar que los excipientes no interfirieron en la determinación de estos tres principios activos.

[96] Stahl, M., Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2003.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Tabla I-5. Determinación de TMS y PTH en formulaciones farmacéuticas.

| Muestra | Concentración encontrada (mg/L) | DER (%) | Valor nominal (mg/L) | t-Student estimada | Valor P (%) |
|------------------------------|---------------------------------|---------|----------------------|--------------------|-------------|
| Ampollas de tiazinamio (TMS) | 32504 ± 560 | 3'1 | 32500 | 0'015 | 98'8 |
| FRINOVA® (PTH) | 251 ± 3 | 2'4 | 250 | 0'641 | 53'2 |

t de Student ($\alpha = 5\%$; n = 15) = 2'145

Tabla I-6. Determinación de PMH en ampollas.

| | Nivel 80 % | Nivel 100 % | Nivel 120 % |
|-------------------|------------|-------------|-------------|
| Recuperaciones, % | 98'9 | 101'1 | 97'9 |
| DER, % | 2'2 | 3'2 | 1'0 |

n=3

CAPÍTULO 2

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE
ELECTROFORESIS CAPILAR CON PRECONCENTRACIÓN
ON-COLUMN PARA LA DETERMINACIÓN DE
FENOTIAZINAS EN ORINA

1.- Introducción

La sobredosis de fenotiazinas puede poner en riesgo la vida de los pacientes que las consumen ya que pueden causar coma, miosis, deficiencia respiratoria, etc. La importancia de controlar simultáneamente estos fármacos puede ser explicada por el hecho de que, en algunos casos, se administran simultáneamente y se ha publicado que una dosis de 15 mg de clorpromazina, 50 mg de tioridazina y 75 mg de prometazina podrían causar la muerte de un paciente [97]. Además, existe la necesidad de diferenciar rápidamente una sobredosis de fenotiazinas de otra sobredosis producida por cualquier otro fármaco.

Por otro lado, la monitorización terapéutica de fármacos (*Therapeutic Drug Monitoring*, TDM) es una herramienta práctica que ayuda al médico a proporcionar una terapia farmacéutica efectiva y segura en aquellos pacientes que necesitan dicha medicación. La monitorización puede ser utilizada para confirmar si el nivel de concentración de un fármaco está por encima o por debajo del intervalo terapéutico, o si el efecto terapéutico de dicho fármaco no es el esperado. En este caso, se deberían prescribir dosis mayores a las usuales.

Los fármacos básicos, como es el caso de las fenotiazinas, suelen presentar una concentración en sangre baja, en cambio, la concentración en orina suele ser media-alta. Por ejemplo, alrededor de un 40% de la dosis parenteral de metilsulfato de tiazinamio es excretada en la orina en 8 h tras su administración y sin ninguna modificación. Para otras fenotiazinas, el porcentaje excretado varía entre el 2 y el 10 % [98]. Consecuentemente, por estas dos razones, sobredosis y control terapéutico, es interesante la determinación de estos compuestos en orina.

En este capítulo se propone un nuevo método de CE con preconcentración *on-column* para la determinación simultánea en orina de cinco de las más usualmente utilizadas fenotiazinas de uso humano: metilsulfato de tiazinamio (TMS), hidrocloruro de promazina (PMH), hidrocloruro de clorpromazina (CPH), hidrocloruro de tioridazina (THZ) e hidrocloruro de prometazina (PTH).

En el caso de muestras biológicas, la CE acoplada a la detección UV-Vis presenta límites de detección relativamente altos, lo que es una importante desventaja para su aplicación en TDM. En este sentido, se pueden combinar varias técnicas de preconcentración de muestra en el propio capilar (*on-column* u *on-line*) con la separación en CE para aumentar la cantidad de analito introducida en el capilar y obtener así una mejora en la sensibilidad. Estas técnicas de preconcentración *on-line* o de apilamiento de muestra (*stacking*) han sido ampliamente revisadas en bibliografía de

[97] Zhang, X. (Ed.), *Practical Pharmacology*, Beijing 1997, p. 308.

[98] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Galichet, L. Y. (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.

manera general [99- 104] y específicamente en la determinación de fármacos en fluidos biológicos [105].

La inyección de muestra con campo amplificado (*Field Amplified Sample Injection*, FASI), también denominada “concentración de muestra en cabeza de columna con campo amplificado”, es una técnica de preconcentración que consiste en la introducción de la muestra en un disolvente de menor conductividad que el tampón electroforético. Primeramente se introduce hidrodinámicamente un segmento de baja conductividad (normalmente agua) en la entrada del capilar antes de introducir la muestra electrocinéticamente [106- 112]. Cuando esto ocurre, se establece un campo eléctrico varias centenas de veces superior al habitual en CE. Los analitos cargados se introducen en el capilar a una alta velocidad y son concentrados en la interfase entre la zona de baja conductividad y el tampón electroforético (figura II-1). En esta técnica se deben optimizar varios parámetros como la naturaleza del segmento de pre-inyección, la composición del disolvente de la muestra, los tiempos de inyección del segmento de pre-inyección y de la muestra, así como también el voltaje de inyección para alcanzar la máxima sensibilidad posible. Tradicionalmente se ha empleado la optimización univariante [113- 119] que no tiene en cuenta las posibles interacciones entre estos factores lo que podría hacer variar los valores óptimos.

-
- [99] Shihabi, Z. K., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 107–117.
 - [100] Qurino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 119–135.
 - [101] Hirokawa, T., Ikuta, N., Yoshiyama, T., *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 3–9.
 - [102] Urbánek, M., Křivánková, L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 466–485.
 - [103] Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 486–497.
 - [104] Simonet, B. M., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 605–614.
 - [105] Hempel, G., *Electrophoresis* 2003, 21, 691–698.
 - [106] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 141–152.
 - [107] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2042–2047.
 - [108] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal. Chem.* 1992, 64, 489A–496A.
 - [109] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal. Chem.* 1992, 64, 1046–1050.
 - [110] Wey, A. B., Thormann, W., *Chromatographia* 1999, 49, S12–S20.
 - [111] Kulvhee, R., Kubáň, P., Vunder, K., Kaljurand, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 2879–2885.
 - [112] Zhang, C. X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1998, 70, 540–548.
 - [113] Grard, S., Morin, P., Ribet, J. P., *Electrophoresis* 2002, 23, 2399–2407.
 - [114] Ho, Y. H., Ko, W. K., Kou, H. S., Wu, H. L., Wu, S. M., *J. Chromatogr. B* 2004, 809, 111–116.
 - [115] Song, J. Z., Chen, J., Tian, S. J., Sun, Z. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 21, 569–576.
 - [116] Unger, M., Stöckigt, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 791, 323–331.
 - [117] Chen, C. C., Wu, S. M., Huang, Y. H., Ko, W. K., Kou, H. S., Wu, H. L., *Anal. Chim. Acta* 2004, 517, 103–110.
 - [118] Wu, S. M., Ho, Y. H., Wu, H. L., Chen, S. H., Ko, H. S., *Electrophoresis* 2001, 22, 2717–2722.
 - [119] Leung, S. A., de Mello, A. J., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 171–178.

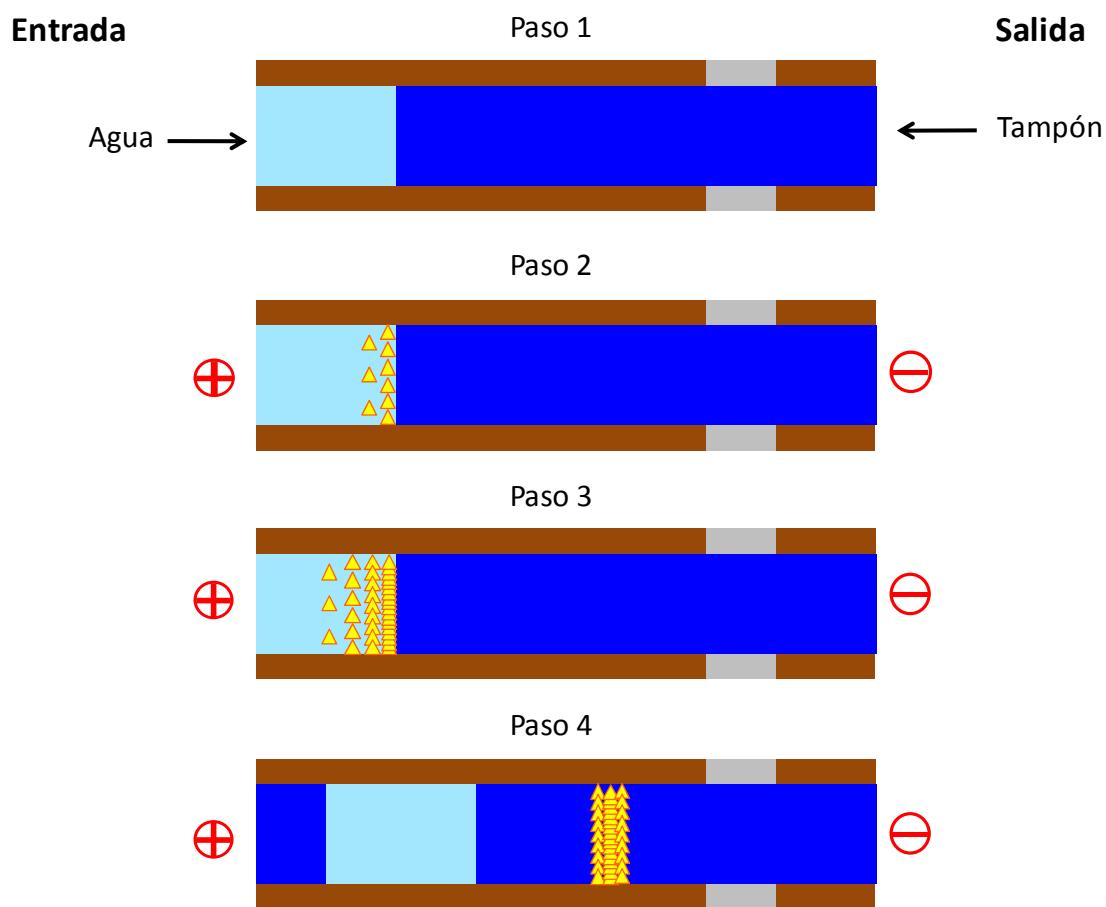


Figura II-1. Etapas en el proceso de preconcentración mediante FASI. Paso 1: Introducción del bolo de baja conductividad. Pasos 2 y 3: Inyección electrocinética de los analitos. Paso 4: separación electroforética.

En el caso de la aplicación a muestras biológicas son necesarios los métodos de extracción antes del análisis mediante CE porque permiten eliminar interferentes que podrían comigrar con los analitos. Además es posible concentrar los compuestos de interés para aumentar la sensibilidad. Los métodos basados en la extracción en fase sólida (SPE) han demostrado ser una alternativa válida a la extracción líquido-líquido (LLE) ya que son menos laboriosos, más rápidos, reducen la cantidad total de disolvente orgánico necesario y la manipulación de los extractos. Hay publicados algunos métodos de SPE para la extracción de fenotiazinas en fluidos biológicos empleando cartuchos C18 para la posterior determinación por GC-MS [120], y más recientemente se ha descrito la utilización de cartuchos Oasis® (Waters), para su aplicación en metodologías de HPLC-UV-Vis [121]. Estos cartuchos aún se emplean menos que los C18 a pesar de

[120] Olmos-Carmona, M. L., Hernández-Carrasquilla, M., *J. Chromatogr. B* 1999, 734, 113–120.

[121] Quintana, M. C., Ramos, L., González, M. J., Blanco, M. H., Hernández, L., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 53–58.

sus prometedores resultados publicados [122]. En nuestro caso, hemos desarrollado un nuevo procedimiento para extraer las fenotiazinas de muestras de orina que a la vez es compatible con la metodología FASI aplicada.

Así, en el presente capítulo se propone un nuevo método para la determinación simultánea de cinco fenotiazinas mediante CE aplicando una técnica de preconcentración *on-column* (FASI). Por primera vez se han optimizado de modo multivariante todas las variables que afectan a dicho proceso de preconcentración de muestra, mediante la metodología del diseño de experimentos, con objeto de considerar las interacciones entre las variables influyentes y seleccionar los óptimos más adecuados. La combinación de los procesos de preconcentración *off-line* (SPE) y *on-column* (FASI) ha permitido la propuesta de un método CZE-UV-Vis muy sensible para la determinación y cuantificación de fenotiazinas en orina al nivel de concentración de nanogramos por mililitro (ng/mL).

2.- Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. Acetonitrilo, metanol e hidróxido sódico se obtuvieron de Panreac-Química (Madrid, España). El ácido clorhídrico fue suministrado por Scharlaub (Barcelona, España). El Tri(hidroximetil)aminometano y el amoniaco se suministraron por Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido fosfórico y el etilenglicol se obtuvieron de Carlo Erba (Milán, Italia). TMS y PTH se obtuvieron de Alfa Pharma (Bélgica) y PMH de Federa (Bélgica). CPH, THZ y el hidrocloruro de nafazolina se compraron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El agua destilada (18'2 MΩ/cm) fue desionizada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Las soluciones patrón de 100 µg/mL de cada sal de fenotiazina fueron preparadas en agua desionizada y almacenadas a 4 °C. Las soluciones de trabajo de 10 µg/mL de cada fenotiazina se preparaban por dilución con agua desionizada.

Se utilizaron los cartuchos de extracción Oasis® HLB (60 mg, 3 cc) y Oasis® MCX (60 mg, 3 cc) (Waters, Milford, MA, USA) y C18 (500 mg) (Supelco).

[122] Stolker, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., Van Ginkel, L. A., Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr. A* 2000, 893, 55–67.

3.- Instrumentación y programas informáticos

Los experimentos de electroforesis capilar se llevaron a cabo con un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector de fila de diodos. Los datos se recogieron utilizando el programa informático HP ChemStation versión A.09.01.

La separación se llevó a cabo en capilares de sílice fundida 64'5 cm × 75 µm ID (longitud efectiva 56 cm) con un camino óptico de 200 µm (capilar con celda de detección tipo burbuja comercializado por Agilent Technologies).

Para las medidas de pH se empleó un pH-metro Crison (modelo pH 2000, Barcelona, España) con una resolución de ±0'01 unidad de pH.

La extracción y el proceso de preconcentración se realizó mediante un sistema de extracción en fase sólida Supelco (Bellefonte, PA, USA) acoplado a una bomba de vacío Büchi (modelo B-169, Suiza).

La centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Hettich (Universal 32, Alemania).

Para generar los diseños experimentales y procesar los datos se empleó el programa StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA).

4.- Procedimiento electroforético

Antes del primer uso, los capilares fueron acondicionados con NaOH 1M durante 10 min. a 60 °C, luego con agua durante 5 min. y finalmente con tampón electroforético durante 20 min. a una presión de 1 bar. Al comienzo de cada día, el capilar se acondicionaba con NaOH 0'1 M durante 1 min., luego con agua durante otro minuto y finalmente con tampón electroforético durante 2 min. En todos los casos se aplicaron 7 bares para el pre-acondicionamiento. Despues de cada análisis el capilar se post-acondicionaba con 0'5 min. de NaOH 0'1 M, 0'5 min. de agua desionizada y 1 min. con tampón electroforético para mantener una adecuada repetibilidad entre inyecciones. El post-acondicionamiento también se hacía con N₂ a 7 bares.

La separación electroforética tenía lugar aplicando un voltaje de separación de 20 kV (modo normal) con una rampa inicial de 0'3 min. El tampón electroforético consistía en una disolución 150 mM de Tris que contenía un 25 % de acetonitrilo y con un pH aparente de 8'2 ajustado con ácido clorhídrico 5 M. Antes de cada uso, el tampón se filtraba a través de una membrana de PTFE (Millex-GN, Millipore) con un tamaño de poro de 0'2 µm. TMS, PMH, CPH y PTH fueron monitorizados a 254 nm con un ancho de banda de 30 nm, THZ fue monitorizada a 264 nm con un ancho de banda de 30 nm, y el hidrocloruro de nafazolina se monitorizó a 220 nm con un ancho de banda de 20 nm. La temperatura del capilar se mantuvo constante a 25 °C. Antes de cada inyección de muestra, se introducía un segmento de agua dentro del capilar aplicando una presión de

50 mbar durante 7 s. La inyección de la muestra tenía lugar empleando un voltaje de 6'2 kV (el ánodo en el lado de la inyección) durante 40 s. La corriente eléctrica era de 16 μ A durante la inyección y alrededor de 70 μ A durante la separación.

5.- Procedimiento de extracción en fase sólida para el análisis de fenotizinas en orina

Antes de aplicar la SPE, las muestras de orina humana se trajeron como sigue: 10 mL de muestra de orina (blanco) se doparon con las fenotiazinas a diferentes niveles de concentración y acidificadas con 100 μ L de HCl 5 M. La mezcla fue centrifugada durante 10 min. a 4000 rpm. Un volumen de 5 mL de la muestra resultante se pasó por un cartucho Oasis® HLB (60 mg, 3 cc) que había sido previamente activado con 2 mL de metanol y 2 mL de agua. Después de la carga de muestra, el cartucho se lavó con 3 mL de una mezcla metanol:agua:amoníaco (50:48:2 v/v/v) y 3 mL de agua. La elución final se llevó a cabo con 3 mL de metanol. El eluente se recogió en un vial de 4 mL que contenía 20 μ L de etilenglicol para evitar la adsorción de las fenotiazinas en las paredes del vial y se concentró hasta casi sequedad con una corriente suave de N₂ a 40 °C. El extracto se reconstituyó en 0'5 mL de una mezcla metanol:agua (1:1 v/v) que contenía H₃PO₄ 32 μ M y 1 μ g/mL de hidrocloruro de nafazolina como patrón interno (IS) y se inyectó en el sistema de CE siguiendo el procedimiento FASI.

6.- Resultados y discusión

6.1.- Optimización de las condiciones de separación electroforéticas

Se llevaron a cabo una serie de estudios preliminares para optimizar los parámetros experimentales que afectan a la separación electroforética de los compuestos estudiados con detección UV-Vis. Los espectros UV-Vis de los analitos se registraron a 254 nm y con un ancho de banda de 30 nm para TMS, PMH, CPH y PTH; 264 nm y 20 nm para THZ; y 220 nm y 20 nm para el hidrocloruro de nafazolina.

Para encontrar un tampón adecuado para la separación de las fenotiazinas seleccionadas, se consideró que los valores de pK_a de las fenotiazinas están alrededor de 9 [123] y por encima de este pH precipitan. Por estas razones, el intervalo de pH adecuado para la separación es desde 7 a 9, como ya se indicó en el capítulo anterior, así que seleccionamos también para este caso el tris(hidroximetil)aminometano (pK_a 8'01) como el tampón más adecuado.

Se observó una mejora significativa en la resolución cuando se añadió MeCN al tampón electroforético, así que, se realizó un estudio con diferentes porcentajes (5, 15 y 25 %). También se probó metanol y se obtuvieron resultados similares en lo referente a la

[123] Lin, C., Liao,W., Chen, K., Lin,W., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154–3159.

resolución aunque los tiempos de migración fueron mayores, así que fue descartado. Se observó una importante interacción entre el pH y el porcentaje de MeCN, lográndose los mejores resultados para un pH de 8'2 y un 25 % de MeCN (el pH se ajustaba después de añadir el MeCN) con una resolución mayor de 1'5 para todos los picos (figura II-2). Si el porcentaje de MeCN era inferior al 25 % no se conseguía una resolución completa entre todos los picos, independientemente del pH.

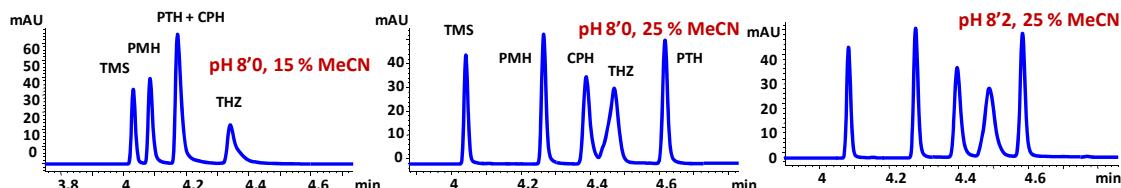


Figura II-2. Optimización del pH y del porcentaje de MeCN en el tampón de separación.

Se seleccionó un voltaje de 20 kV como óptimo ya que suponía un adecuado compromiso entre el tiempo de análisis y la corriente eléctrica. Se probaron diferentes concentraciones de tampón (50, 100, 150 y 200 mM). La concentración seleccionada como óptima fue 150 mM porque con ella se conseguía un adecuado efecto de *stacking* (figura II-3) y la corriente eléctrica era inferior a los 100 μ A.

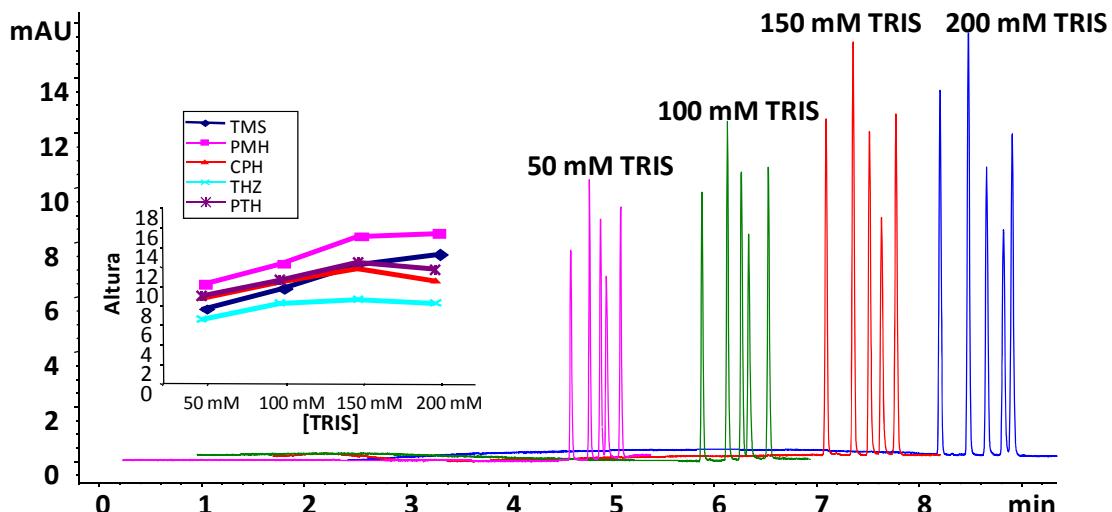


Figura II-3. Optimización de la concentración de tampón.

Se estudió el efecto de la temperatura en la separación en el intervalo de 15 a 35 °C. Un aumento de la temperatura implica menores tiempos de migración pero empeora la separación. Con un capilar a 25 °C se consigue el mejor compromiso entre tiempo de migración y resolución. Las condiciones óptimas de separación se recogen en la tabla II-1.

Tabla II-1. Condiciones óptimas de separación.

| [Tris] (mM) | % MeCN | pH | Voltaje (kV) | Temperatura (°C) |
|----------------|--------|-----|-----------------|---------------------|
| 150 | 25 | 8'2 | 20 | 25 |

Bajo estas condiciones óptimas, se conseguían eficacias de pico de hasta $2'5 \times 10^5$ plato.metro en menos de 7 min. (figura II-4).

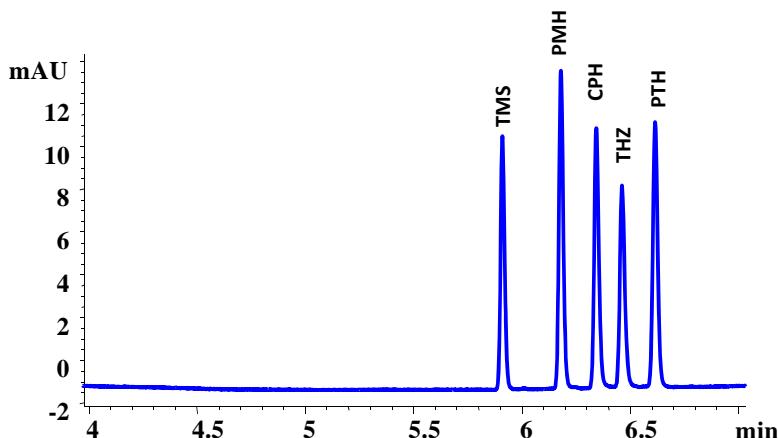


Figura II-4. Separación de las fenotiazinas estudiadas en condiciones óptimas: 150 mM Tris con 25% v/v de MeCN y un pH aparente de 8'2; voltaje de separación, 20 kV; temperatura del capilar, 25 °C; longitud de onda 254 nm. Muestra: 5 mg/L en tampón fosfato 5 mM pH 6. Inyección electrocinética: 7 kV durante 10 s.

Si se emplea una inyección electrocinética normal (7 kV durante 10 s) los límites de detección que se alcanzan están en el intervalo de concentración de los microgramos por mililitro, pero para el análisis de estos compuestos en muestras de orina es necesario obtener límites en el rango de los nanogramos por mililitro, así que fue necesario mejorar la sensibilidad por medio de una técnica de preconcentración *on-line* o *stacking*.

6.2.- Optimización de la inyección de muestra con campo amplificado (FASI)

Hay varias técnicas de preconcentración de muestra *on-column* o *stacking* que pueden ser empleadas para mejorar la sensibilidad en el análisis de preparados farmacéuticos mediante CE [124]. En este estudio, decidimos emplear la técnica conocida como “inyección de muestra con campo amplificado” (FASI). A diferencia de las técnicas *in-column* de preconcentración de muestra, la FASI tiene lugar en la entrada de la columna

[124] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2004, 25, 428–436.

capilar y el volumen de inyección no está limitado. Otras ventajas son la facilidad de aplicación y automatización y la posibilidad de ser empleada con un espectrómetro de masas, ello conlleva que sea considerada como la técnica de *stacking* que proporciona la mayor sensibilidad [125].

Cuando se utiliza la FASI se deben optimizar ciertos parámetros para obtener la máxima sensibilidad: segmento de pre-inyección (composición y volumen), composición del disolvente de muestra (disolvente orgánico: tipo y porcentaje, y concentración del ácido fosfórico), el tiempo y el voltaje de inyección.

Para reducir el trabajo experimental y considerando la posibilidad de que existan interacciones entre las variables estudiadas, decidimos llevar a cabo una optimización univariante para la selección del disolvente orgánico en la muestra, y para el resto de las variables (cinco factores) se empleó la metodología del diseño de experimentos para una optimización multivariante. Según nuestro conocimiento, esta es la primera aplicación de esta metodología en la optimización de una FASI en CE. Para este propósito, seleccionamos un diseño factorial de media fracción en el que el número de experimentos sería $2^{5-1} = 16$. Un diseño de cribado más saturado no hubiera sido adecuado debido al alto número de confusiones posibles entre los factores principales y sus interacciones. La respuesta analítica considerada fue la suma de las alturas de los cinco picos, de esta manera esperábamos maximizar la sensibilidad con una resolución satisfactoria. Cuando se aumenta el volumen de muestra inyectado, la altura de pico crece hasta un valor crítico a partir del cual se observa un efecto de ensanchamiento de bandas y ya no mejora la sensibilidad pero, sin embargo, empeora la resolución. Debido a este hecho, es este valor crítico el que se considera como el volumen de inyección óptimo.

La constante dieléctrica y la viscosidad del disolvente de la muestra afectan a la movilidad de los analitos [125], así que cuanto mayor es la movilidad, mayor es la cantidad de analito inyectada. En este sentido, tratamos de mejorar la sensibilidad modificando el disolvente de la muestra. Se probaron diferentes mezclas binarias de agua:metanol y agua:acetonitrilo con diferentes porcentajes de disolvente orgánico (0, 25, 50, 75 y 100 %) en una muestra que contenía 0'1 µg/mL de cada fenotiazina y que fue inyectada electrocinéticamente (3 kV durante 50 s.). Como se muestra en la figura II-5, los mejores resultados se obtuvieron con 100 % de agua, así que éste fue seleccionado como disolvente de la muestra.

[125] Zhang, C. X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2523–2532.

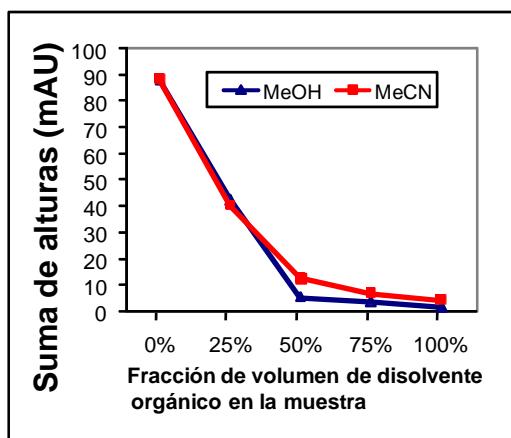


Figura II-5. Optimización de la FASI: Efecto del porcentaje de disolvente orgánico de la muestra en la suma de alturas de los picos de las fenotiazinas estudiadas.

A continuación, para el resto de variables, se realizó un diseño de cribado factorial fraccionado a la media fracción con 2^{5-1} experimentos y tres puntos centrales. Los 16 experimentos se llevaron a cabo de manera aleatoria.

En la tabla II-2 se recogen los niveles estudiados de los diferentes factores que afectan a la FASI. Sus valores fueron impuestos por las siguientes consideraciones: en la FASI, para asegurar una adecuada amplificación de campo, es usual introducir un segmento de pre-inyección con un disolvente de alta resistividad (principalmente agua o mezclas agua:alcohol), así se consigue mejorar la sensibilidad [106]. En nuestro caso, el porcentaje de metanol en el segmento de pre-inyección fue modificado desde 0 hasta el 100 %. Teniendo en cuenta los estudios previos de Zhang y Thorman [125], si el segmento de pre-inyección es muy corto, se alcanzan elevadas temperaturas al comienzo de la inyección electrocinética lo que puede resultar en una ebullición del líquido, precipitación del soluto y daños en la entrada del capilar. Sin embargo, si el segmento de pre-inyección es demasiado largo, esto puede causar un empeoramiento en la eficacia de los picos [126]. El volumen del segmento de pre-inyección fue variado desde el 0'2 hasta el 1'5 % del volumen total del capilar.

Según la bibliografía existente [113,115,125], a menudo resulta beneficiosa la presencia de cierta cantidad de iones H^+ en la muestra. Si la concentración de H_3PO_4 era mayor de 100 μM , se producía una disminución en la eficacia del *stacking*, y si la concentración era menor de 20 μM , la reproducibilidad no era aceptable, así que el intervalo estudiado se estableció desde 20 hasta 100 μM .

Para la optimización del tiempo de inyección, se estudiaron previamente valores mayores de 50 s., pero se observó que ocurría una pérdida de resolución, así que el intervalo estudiado se estableció desde 10 a 50 s.

[126] Manetto, G., Tagliaro, F., Crivellente, F., Pascali, V. L., Marigo, M., *Electrophoresis* 2000, 21, 2891–2898.

En estos estudios iniciales, se observó que voltajes de inyección superiores a 7 kV provocaban la oxidación de las fenotiazinas a sus correspondientes sulfóxidos, hecho que no debe resultar extraño puesto que estos compuestos se oxidan fácilmente [127] y que la inyección tiene lugar en el ánodo. Este problema también ha sido publicado por otros autores para otros analitos [128]. Por esta razón, la optimización se centró en el intervalo de 3 a 7 kV. En cada análisis la muestra era reemplazada por una nueva para evitar la contaminación, el deterioro y cambios en el pH de la solución de la muestra debida a la电解sis [129,130]. Se utilizaron volúmenes de muestra de 500 μL ya que es necesario tener en cuenta la influencia del volumen de muestra en la inyección electrocinética [131].

Tabla II-2. Niveles estudiados de los parámetros involucrados en la optimización de la FASI.

| | [H ₃ PO ₄] (μM) | Tiempo inyección (s) | Voltaje inyección (kV) | Tiempo del segmento (s) | % MeOH en el segmento |
|------|---|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| (+1) | 100 | 50 | 7 | 7 | 100 |
| (-1) | 20 | 10 | 3 | 1 | 0 |

En la figura II-6 se muestra una representación de los efectos normalizados de las variables estudiadas en la respuesta analítica seleccionada a través de la aplicación del diseño de cribado. Se puede observar que los factores más significativos en la altura de pico son la concentración de ácido fosfórico, el tiempo de inyección y el voltaje de inyección, además de algunas interacciones entre los factores estudiados como la interacción entre el tiempo de inyección y la concentración de ácido fosfórico. Como era de esperar, el aumento de la concentración de ácido fosfórico tiene un efecto negativo en la sensibilidad pero el incremento en el tiempo y voltaje de inyección tiene un efecto positivo. Más importante es hacer notar que el tiempo y el porcentaje de metanol en el segmento de pre-inyección no son variables significativas en el intervalo estudiado.

Decidimos introducir agua durante 7 s a 50 mbar para mejorar la reproducibilidad porque humedecer la entrada del capilar en un vial con agua es necesario para evitar la contaminación de la muestra con tampón electroforético de alta conductividad, y para evitar los problemas causados por segmentos de pre-inyección cortos, como se mencionó anteriormente.

[127] Karpinska, J., *Anal. Sci.* 2001, **17**, 249–253.

[128] Rose, D. J., Jorgenson, J. W., *Anal. Chem.* 1988, **60**, 642–648.

[129] Guttman, A., Schwartz, H. E., *Anal. Chem.* 1995, **67**, 2279–2283.

[130] Krivácsy, Z., Gelencsér, A., Hlavay, J., Kiss, G., Sárvári, Z., *J. Chromatogr. A* 1999, **834**, 21–44.

[131] de Boer, T., Ensing, K., *J. Chromatogr. A* 1997, **788**, 212–217.

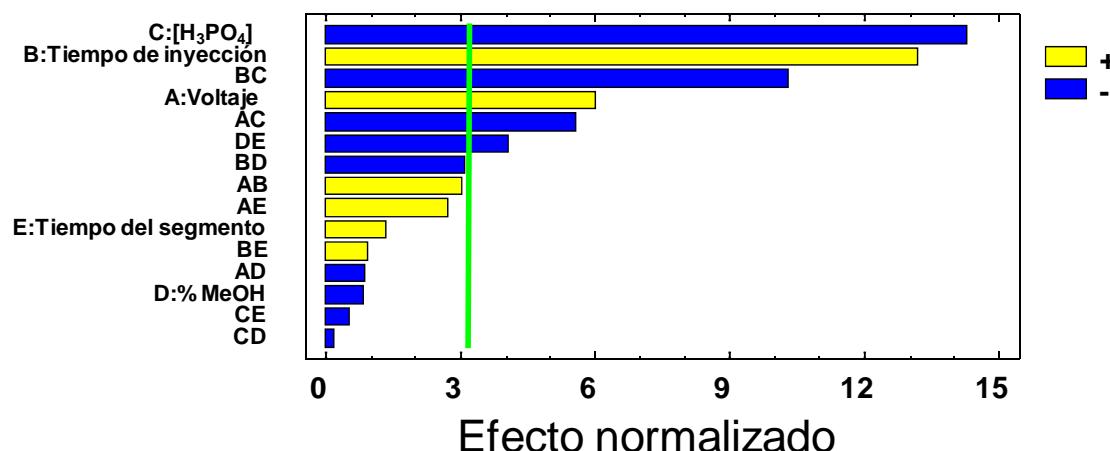


Figura II-6. Gráfica de Pareto que muestra los efectos significativos en la respuesta tras el diseño de cribado para las variables presentes en cualquier procedimiento FASI. (+) Efecto positivo en la respuesta. (-) Efecto negativo en la respuesta. La línea vertical muestra el límite de decisión para considerar un factor significativo (basado en el efecto normalizado = efecto estimado / error estándar, valor $P = 0'05$ a un nivel de confianza del 95 %).

El diseño de cribado previo nos permitió seleccionar las variables significativas que debían ser optimizadas, es decir, la concentración de ácido fosfórico, el tiempo y voltaje de inyección. Para el diseño de superficie de respuesta se empleó un diseño Doehlert [132] que, aunque poco utilizado en química analítica [133-135], ofrece una mayor eficacia si lo comparamos con otros diseños como el Box-Behnken o un central compuesto y además, nos da también la posibilidad de estudiar con un mayor número de niveles las variables más significativas.

En nuestro caso, el voltaje de inyección fue estudiado a tres niveles porque su intervalo (3-7 kV) es el más reducido, la concentración de H₃PO₄ se estudió a cinco niveles, y el tiempo de inyección fue estudiado a siete niveles debido al amplio intervalo de estudio. Los niveles máximo y mínimo, así como la respuesta analítica a optimizar fueron los mismos que en el diseño de cribado previo. La figura II-7 muestra las superficies de respuesta obtenidas. Los valores óptimos obtenidos se recogen en la tabla II-3. El valor de P para el test de fallo de ajuste es del 77% y el coeficiente de determinación (R^2) fue del 96'5%. La figura II-8 muestra un electroferograma en las condiciones óptimas de separación e inyección.

[132] Doehlert, D. H., *Appl Statist.* 1970, 19, 231-239.

[133] Nechar, M., Molina Molina, M. F., Cuadros Rodríguez, L., Bosque Sendra, J. M., *Anal. Chim. Acta* 1995, 316, 185-193.

[134] García-Campaña, A. M., Cuadros Rodríguez, L., Lupiáñez- González, A., Alés-Barrero, F., Román Ceba, M., *Anal. Chim. Acta* 1997, 348, 237-246.

[135] Ferreira, S. L. C., dos Santos,W. N. L., Quintilla, C. M., Neto, B. B., Bosque-Sendra, J. M., *Talanta* 2004, 63, 1061-1067.

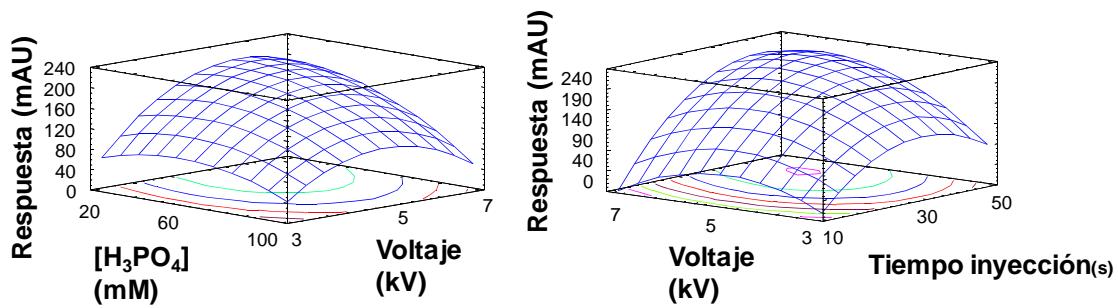


Figura II-7. Superficies de respuesta obtenidas en el procedimiento de optimización multivariante de las variables significativas en la FASI para la determinación de las cinco fenotiazinas seleccionadas, empleando un diseño Doehlert.

Tabla II-3. Intervalos estudiados de las variables significativas y valores óptimos obtenidos en el diseño de superficie de respuesta Doehlert.

| | [H ₃ PO ₄] μM | Voltaje de inyección (kV) | Tiempo de inyección (s) |
|--------|---|------------------------------|----------------------------|
| Máximo | 100 | 7'0 | 50 |
| Mínimo | 20 | 3'0 | 10 |
| Óptimo | 32 | 6'2 | 40 |

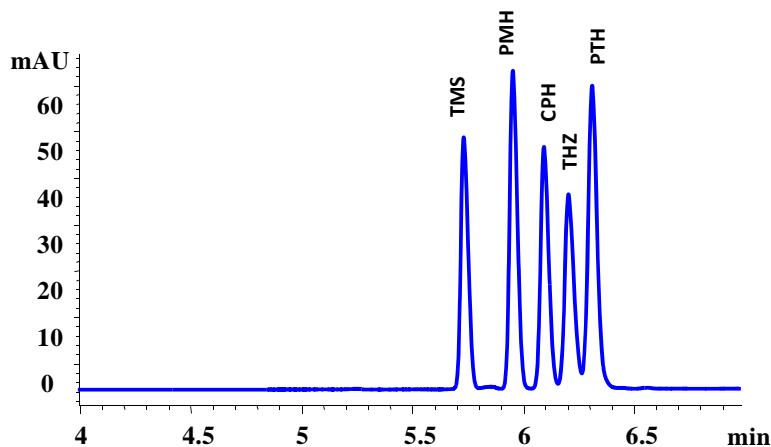


Figura II-8. Separación de las fenotiazinas estudiadas en las condiciones de separación y FASI óptimas: 150 mM Tris con 25% v/v de MeCN y un pH aparente de 8'2; voltaje de separación, 20 kV; temperatura del capilar, 25 °C; longitud de onda 254 nm. Muestra: 0'5 mg/L en H₃PO₄ 32 μM. Inyección: 50 mbar durante 7 s. de H₂O + 6'2 kV durante 40 s. de muestra.

Desafortunadamente, la aplicación directa del procedimiento FASI a muestras de orina dopadas con concentraciones de 10 a 100 ng/mL para cada fenotiazina no proporcionó resultados satisfactorios debido a la alta conductividad de la matriz de la muestra. Por tanto, fue necesario desarrollar un procedimiento de SPE que fuese efectivo para reducir la conductividad de la muestra, eliminar posibles interferentes, y concentrar los analitos.

6.3.- Optimización del procedimiento de extracción en fase sólida para el análisis de fenotiazinas en orina

Para extraer los analitos en estudio (TMS, PTH, PMH, CPH y THZ) de las muestras de orina, se intentó primeramente una extracción líquido-líquido (LLE) con hexano:isopropanol (9:1 v/v), pero aparecieron problemas debidos a la formación de emulsiones y a la manipulación de la muestra; por tanto es procedimiento fue reemplazado por uno basado en SPE.

Se ensayaron tres tipos diferentes de cartuchos: C18 500 mg (Supelco), Oasis® MCX de 60 mg, y Oasis® HLB 60 mg (ambos de Waters) para encontrar el más adecuado para la eliminación de interferentes y concentración de las fenotiazinas en orina. Los C18 y los HLB son cartuchos de fase inversa y los MCX son cartuchos de contienen una fase mixta puesto que combinan la fase inversa con los mecanismos de intercambio catiónico. Los estudios se centraron en encontrar un sistema simple que permitiera la extracción de las fenotiazinas. Estos fármacos son metabolizados después de una administración oral, principalmente mediante sulfoxidación, N-dimetilación, hidroxilación, N-oxidación y, en menor medida, por conjugación con ácido glucurónico o sulfato (aprox. 10%) [136]. Por tanto, no merece la pena desarrollar un procedimiento para incrementar la concentración de fármaco precursor libre en la muestra.

Las muestras de orina se introdujeron directamente en los cartuchos previa acidificación (1% HCl v/v) y centrifugación (4000 rpm durante 10 min.) para evitar la obturación del cartucho con precipitados. Se emplearon los procedimientos estándar para los tres cartuchos como a continuación se indican:

[136] Moffat, A. C. (Ed.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London 1986.

C18 {

- Acondicionado { 2 mL MeOH
- 2 mL H₂O
- Cargar: 3 mL de muestra
- Lavado: 3 mL H₂O (1% Trietilamina)
- Elución: 3 mL MeOH

HLB {

- Acondicionado { 2 mL MeOH
- 2 mL H₂O
- Cargar: 2 mL de muestra
- Lavado: 3 mL H₂O (5% MeOH)
- Elución: 2 mL MeOH

MCX {

- Acondicionado: no es necesario
- Cargar: 2 mL de muestra
- Lavado: 2mL HCl al 2%.
- Elución: 2 mL 5% NH₃ en MeOH

Los mejores resultados se obtuvieron con los HLB porque proporcionaban los extractos más limpios y era el único con el que se conseguía recuperar el TMS. Aunque era posible, con los cartuchos HLB, retener y eluir las fenotiazinas, después de secar con N₂ no se conseguían redisolver adecuadamente, así que se llevó a cabo un nuevo procedimiento de optimización del disolvente de la muestra. Como se puede ver en la figura II-9, los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla de agua:metanol (1:1 v/v) para todas las fenotiazinas. Cuanto menor es el porcentaje de metanol, peor es la redisolución de los analitos y cuanto mayor es, peor es el efecto de *stacking*.

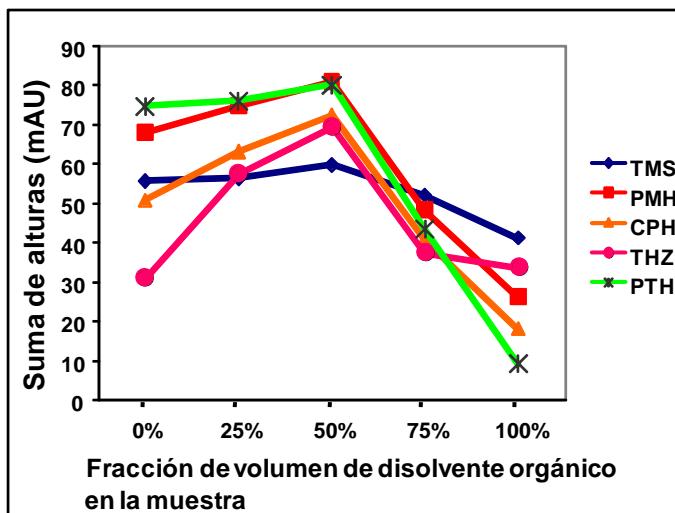


Figura II-9. Efecto del porcentaje de metanol en la re-optimización del disolvente de muestra. El resultado implica un efecto combinado sobre el efecto del *stacking* y de la eficacia en la extracción.

El nuevo disolvente de la muestra podría afectar a las condiciones ya optimizadas para el procedimiento FASI. Para resolver este problema, habría sido necesario optimizar en primer lugar el procedimiento de SPE, pero, de hacerlo así, deberíamos haber empleado altas concentraciones de fenotiazinas y las interferencias causadas por algunos compuestos comigrantes no podrían haber sido observadas.

Se ensayaron diferentes disolventes como MeCN, acetato de etilo, hexano:isopropanol (9:1 v/v), y metanol para la elución de las fenotiazinas. Como se puede ver en la figura II-10, donde se muestran los porcentajes de recuperación para cada una de las fenotiazinas consideradas, los mejores resultados se obtuvieron con metanol.

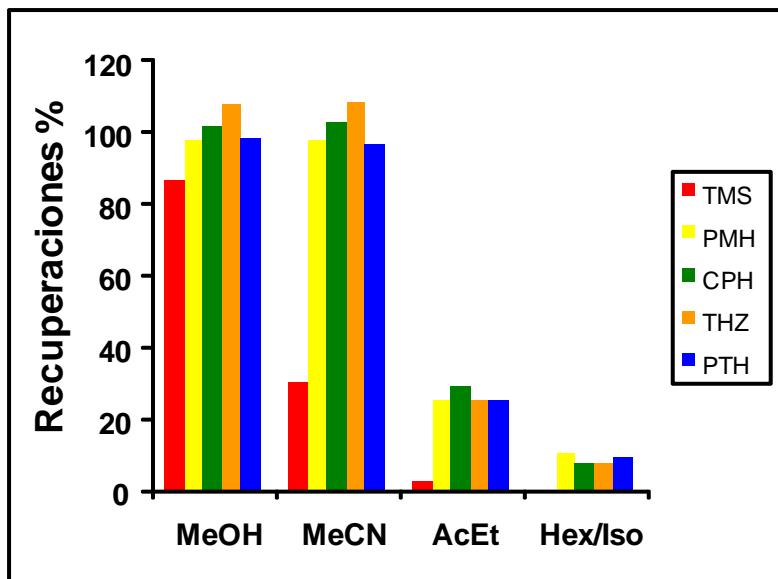


Figura II-10. Comparación de las recuperaciones obtenidas para cada fenotiazina utilizando diferentes disolventes para la elución.

Una vez seleccionado el metanol como disolvente para la elución, el siguiente paso fue optimizar el volumen mínimo de metanol necesario para llevar a cabo una elución completa. Para ello se recogieron fracciones de elución de 1 mL y se analizaron individualmente para comprobar con qué volumen las fenotiazinas ya habían eluido completamente. Aunque la mayoría habían eluido completamente con el primer mililitro, la THZ que es la más apolar de todas ($\log P = 6.1$) necesitaba 3 mL para alcanzar una elución completa (figura II-11).

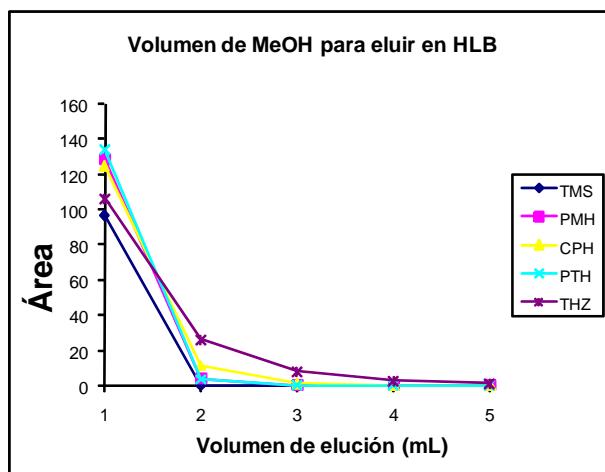


Figura II-11. Optimización del volumen mínimo de MeOH para eluir las fenotiazinas de un cartucho Oasis® HLB de 60 mg/3 cc.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Cuando intentamos aplicar el procedimiento de SPE a muestras de orina dopadas con 0'1 µg/mL de cada fenotiazina, aparecieron algunos interferentes que comigraban con los analitos separados lo que hacía imposible la cuantificación (figura II-12).

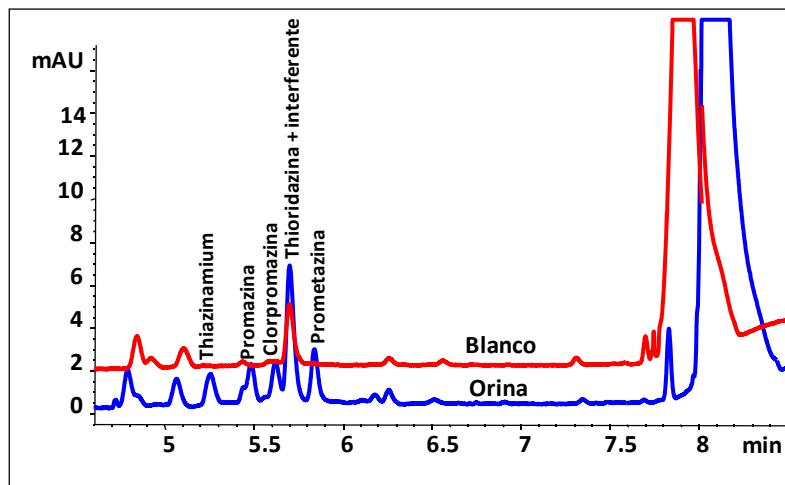


Figura II-12. Electroferograma de un blanco de orina (línea roja) y de una muestra dopada con 100 ng/mL (línea azul).

Esto ocurría cuando empleábamos 2 mL de agua con un 5% v/v de metanol para lavar tal y como recomiendan las instrucciones del fabricante, así que se llevó a cabo una optimización de la etapa de lavado empleando disoluciones patrón de 1 µg/mL de cada fenotiazina. Se ensayaron mezclas binarias de agua y metanol con un 2% de amoníaco y se encontró que con porcentajes de metanol de hasta un 50% no ocurría la elución de las fenotiazinas (figura II-13). Además si se incluía una ulterior etapa de lavado con 3 mL de agua se obtenía una mejora en la sensibilidad, quizás debido a que los extractos eran más limpios y mostraban una menor conductividad. La aplicación de esta etapa de lavado fue adecuada para eliminar los interferentes.

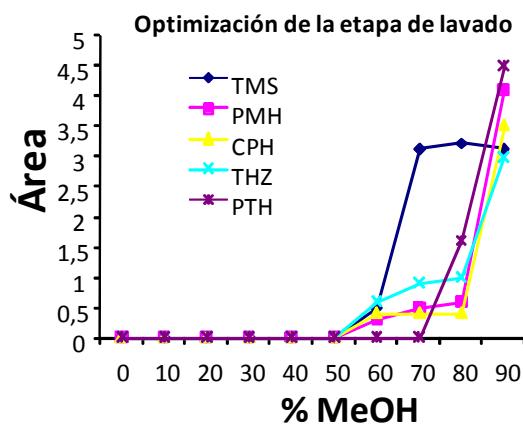


Figura II-13. Optimización de la etapa de lavado en cartuchos Oasis® HLB de 60 mg/3 cc.

Con este procedimiento se obtenían extractos limpios pero tratamos de mejorar la sensibilidad incrementando el volumen de muestra que pasa a través del cartucho. Con 5 mL no se sobrepasaba el volumen de rotura así que este fue el volumen que se seleccionó. Otra opción era reconstituir la muestra en 250 μ L en vez de 500 μ L pero reducir el volumen de muestra tiene un efecto negativo en la inyección electrocinética [131]. Finalmente se conseguía un factor de preconcentración de 10 al aplicar el procedimiento optimizado de SPE. En la figura II-14 se muestran los electroferogramas obtenidos tras someter al procedimiento de SPE y de FASI una muestra de blanco de orina y otra de orina dopada con las fenotiazinas en estudio.

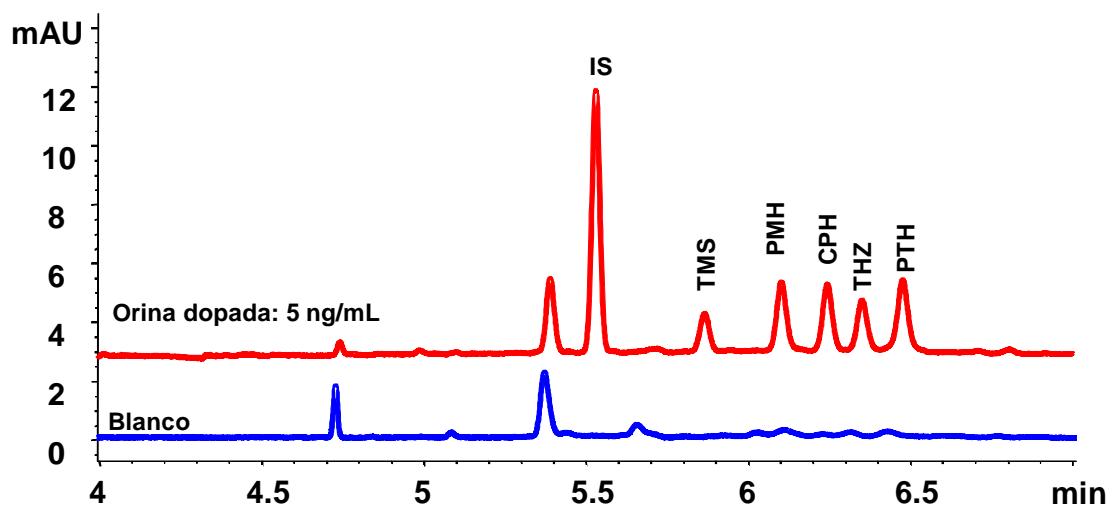


Figura II-14. Separación de las fenotiazinas estudiadas en las condiciones óptimas y aplicando los procedimientos de SPE y FASI: 150 mM Tris con 25% v/v de MeCN y un pH aparente de 8,2; voltaje de separación, 20 kV; temperatura del capilar, 25 °C; longitud de onda 254 nm.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

La combinación de un procedimiento de SPE específico, la separación electroforética y la detección UV-Vis proporcionan un método altamente selectivo. La figura II-15 muestra los espectros de estos compuestos.

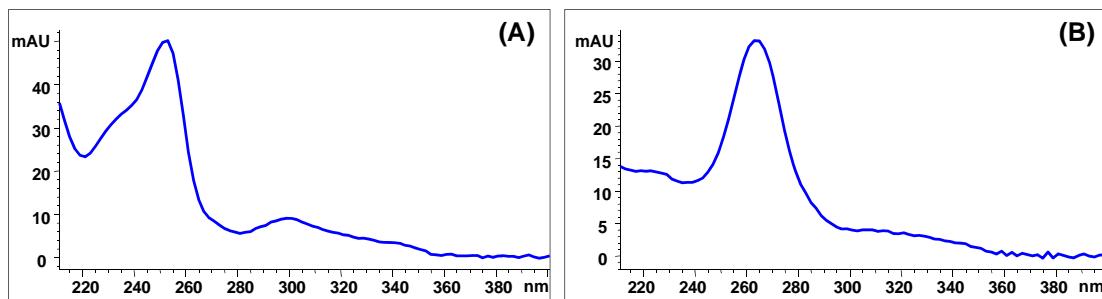


Figura II-15. Espectros de absorción de las fenotiazinas en estudio (100 ng/mL en tampón electroforético) desde 190 a 400 nm. (A) TMS, PMH, CPH y PTH presentan un espectro similar. (B) Espectro de THZ.

6.4.- Rectas de calibrado, linealidad, límites de detección y cuantificación

Se establecieron las correspondientes rectas de calibrado (figura II-16) con cinco niveles de calibración que correspondían a 5, 25, 50, 75 y 100 ng/mL de cada fenotiazina. En todos los casos se añadió 1 µg/mL de hidrocloruro de nafazolina como patrón interno (IS). La calibración se llevó a cabo en presencia de matriz, empleando muestras de orina procedentes de una persona sana y fueron dopadas antes del procedimiento de SPE. Se prepararon dos réplicas para cada nivel de concentración y cada uno fue inyectado por triplicado. Las curvas de calibrado se establecieron considerando áreas relativas de pico corregidas (cociente entre el área de pico de analito/tiempo de migración y el área de pico de patrón interno/tiempo de migración) frente a la concentración de analito.

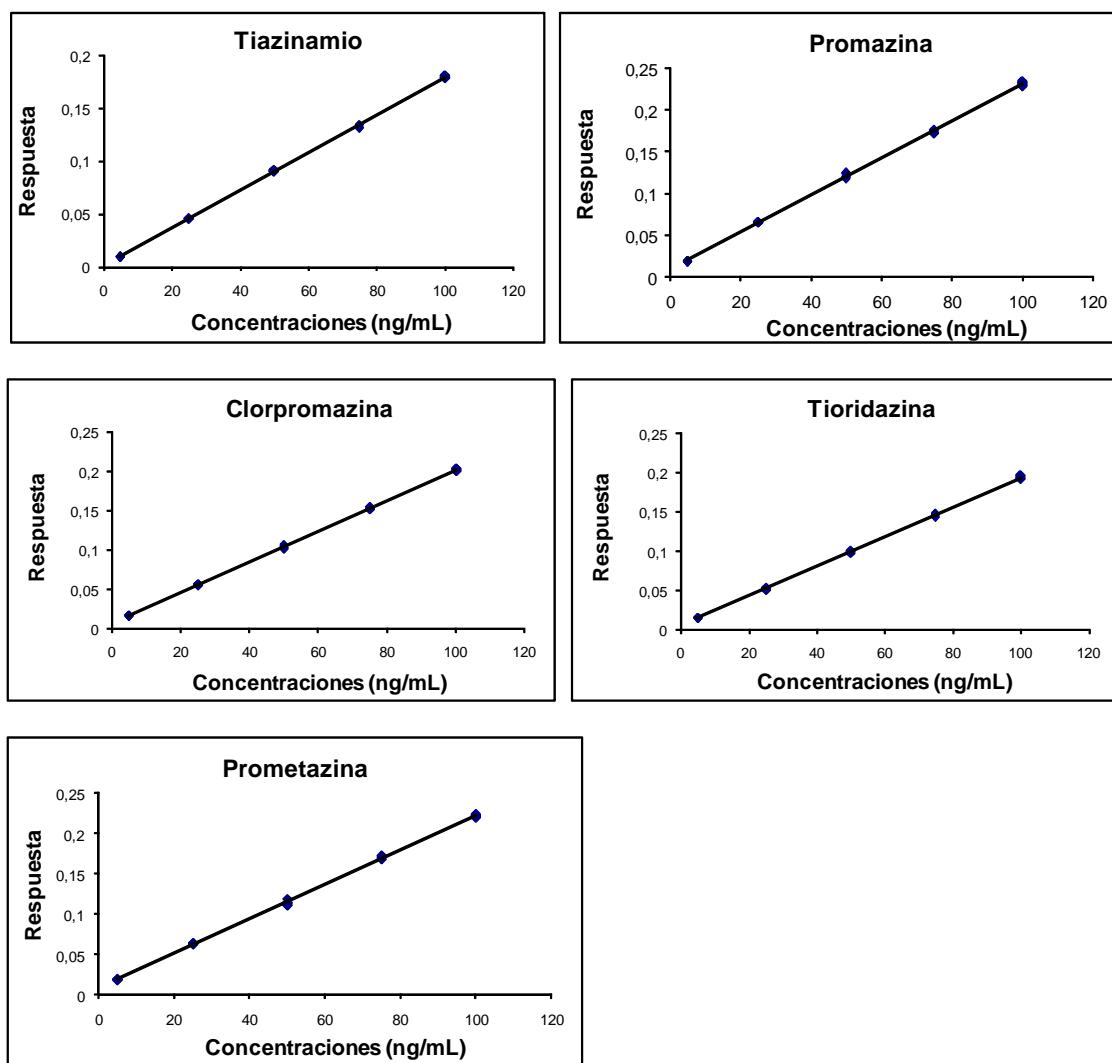


Figura II-16. Rectas de calibrado para tiazinamio, promazina, clorpromazina, tioridazina y prometazina.

Los parámetros estadísticos del calibrado fueron calculados mediante la regresión por mínimos cuadrados y se muestran en la tabla II-4, junto con los parámetros de calidad del método. Los coeficientes de determinación y los valores de P para el test de fallo de ajuste en el análisis de la varianza (ANOVA) fueron satisfactorios lo que confirma que la respuesta de las fenotiazinas es lineal en el intervalo estudiado, indicando la ausencia de curvatura. Los límites de detección y cuantificación fueron evaluados considerando las recomendaciones de la IUPAC y en base a un estudio de residuales a partir de la curva de regresión ajustada para estimar la desviación estándar de una señal de blanco virtual para técnicas cromatográficas y electroforéticas [137].

[137] García-Campaña, A. M., Baeyens, W. R. G., Van der Weken, G., Cuadros-Rodríguez, L., Alés-Barrero, F., *Biomed. Chromatogr.* 1998, 12, 177–178.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Tabla II-4. Parámetros estadísticos y de calidad del método propuesto.

| Analito | Rango lineal (ng/mL) | Ordenada | Pendiente (mL/ng) | Fallo ajuste <i>P</i> (%) | <i>R</i> ² | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---------|-------------------------|----------|----------------------|------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| TMS | 6-100 | 0'0012 | 0'0018 | 50'6 | 0'9999 | 2 | 6 |
| PMH | 11-100 | 0'0084 | 0'0022 | 30'6 | 0'9993 | 4 | 11 |
| CPH | 8-100 | 0'0064 | 0'0020 | 20'2 | 0'9996 | 3 | 8 |
| THZ | 9-100 | 0'0058 | 0'0019 | 43'4 | 0'9995 | 3 | 9 |
| PTH | 10-100 | 0'0087 | 0'0021 | 68'8 | 0'9993 | 3 | 10 |

6.5.- Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación

Para evaluar la veracidad del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación dopando muestras de orina a tres niveles de concentración (20, 50 y 80 ng/mL). Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando las concentraciones obtenidas para muestras de orina dopadas antes del procedimiento de SPE, y calculadas a partir de la curva establecida con muestras de orina blanco dopadas después del procedimiento de SPE, con la concentración añadida. Este procedimiento asegura la corrección de posibles errores sistemáticos en la señal analítica debidos al efecto matriz. Se prepararon tres réplicas a cada nivel de concentración y cada una fue inyectada por triplicado. Como se muestra en la tabla II-5 se obtuvieron resultados satisfactorios para todos los niveles estudiados.

Tabla II-5. Recuperaciones para cada fenotiazina aplicando el método SPE-FASI-CZE propuesto a diferentes niveles de dopado en muestras de orina humana.

| | 20 ng/mL | | 50 ng/mL | | 80 ng/mL | |
|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | Recuperación | DER | Recuperación | DER | Recuperación | DER |
| TMS | 96'8 | 3'0 | 101'3 | 5'8 | 99'2 | 1'8 |
| PMH | 95'8 | 3'3 | 95'8 | 6'5 | 94'7 | 5'5 |
| CPH | 94'5 | 4'3 | 99'7 | 6'4 | 101'7 | 4'7 |
| THZ | 90'7 | 4'6 | 90'9 | 7'4 | 90'0 | 6'3 |
| PTH | 100'3 | 3'1 | 99'0 | 8'4 | 98'0 | 4'3 |

Resultados en %. (n=9)

6.6.- Evaluación de la precisión

La precisión del método completo fue evaluada en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de la aplicación repetitiva del procedimiento de SPE a tres muestras (réplicas experimentales) a cada nivel de concentración (20, 50 y 80 ng/mL), y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales) y sometida al método FASI-CZE propuesto.

La precisión intermedia fue evaluada durante tres días consecutivos con un procedimiento igual al de los estudios de repetibilidad; de hecho, los resultados obtenidos durante el estudio de repetibilidad se consideraron como los resultados del primer día de precisión intermedia o reproducibilidad. En el segundo día se repitió el procedimiento pero se cambió el capilar, y durante el tercer día lo que se cambió fue el tampón electroforético por uno recién preparado. Los resultados, expresados como desviación estándar relativa (DER) de las áreas relativas de pico corregidas, se muestran en la tabla II-6. También se estudiaron las variaciones de los tiempos de migración y los resultados con sus correspondientes valores de DER se incluyen en la tabla II-7. Como se puede observar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla II-6. Estudio de la precisión del método propuesto SPE-FASI-CZE para determinación de cinco fenotiazinas.

| Analito | Intra-día DER (%) (n = 9) | | | Entre-días DER (%) (n = 27) | | |
|---------|---------------------------|----------|----------|-----------------------------|----------|----------|
| | 20 ng/mL | 50 ng/mL | 80 ng/mL | 20 ng/mL | 50 ng/mL | 80 ng/mL |
| TMS | 2'6 | 3'0 | 0'7 | 3'7 | 3'6 | 3'0 |
| PMH | 4'9 | 3'0 | 2'7 | 5'5 | 4'3 | 5'5 |
| CPH | 3'3 | 3'2 | 3'4 | 4'5 | 4'4 | 6'6 |
| THZ | 3'5 | 2'5 | 2'7 | 7'2 | 4'0 | 5'8 |
| PTH | 4'4 | 3'5 | 4'5 | 6'0 | 5'2 | 7'2 |

Tabla II-7. Estudio de la variación de los tiempos de migración.

| | TMS | PMH | CPH | THZ | PTH |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Tiempos de migración (min.) | 5'92 | 6'15 | 6'29 | 6'40 | 6'52 |
| DER % | 1'71 | 1'79 | 1'80 | 1'80 | 1'91 |
| Tiempos de migración relativos (min.) | 1'06 | 1'10 | 1'13 | 1'15 | 1'17 |
| DER % | 0'07 | 0'17 | 0'19 | 0'19 | 0'33 |
| (n=81) | | | | | |

6.7.- Especificidad

Se recomienda el empleo de varias técnicas para determinar posibles impurezas o interferentes en un pico electroforético [138]. En nuestro caso los procedimientos empleados para validar la pureza de pico de los compuestos estudiados fueron los siguientes: (i) una muestra de orina exenta de analitos fue analizada por el método propuesto y no se encontraron interferentes comigrando con los analitos (ver figura II-14), (ii) medimos la absorbancia a dos longitudes de onda (200 y 254 nm), y (iii) calculamos el índice de pureza de pico con el programa informático ChemStation dando los siguientes resultados: 0'373 para TMS, 0'595 para PMH, 0'368 para CPH, 0'509 para THZ, 0'435 para PTH y 0'445 para el patrón interno. Este test se llevó a cabo con cinco espectros por pico (desde 210 a 400 nm) a diferentes tiempos, y cada espectro individual fue comparado con un espectro medio. Un coeficiente de similitud entre cada espectro individual y el espectro medio se calculó y comparó con un coeficiente umbral (o límite) teniendo en cuenta el ruido espectral. Se estableció un corte de 1 mAU para reducir la contribución del ruido espectral. Para procesar los espectros se eligieron unos valores de 7 para el factor de suavizado y de 5 para el factor de *spline*. El ruido espectral se evaluó a los 0 min. con 14 espectros. Si el pico es puro, el coeficiente de similitud es mayor que el coeficiente umbral o límite; por esta razón si el índice de pureza de pico calculado como: (1000-coeficiente de similitud)/(1000-coeficiente umbral) es menor de 1, el pico es puro, pero si es mayor de 1 no lo es. Estas técnicas demostraron el elevado porcentaje con el que se puede afirmar que los picos correspondientes a los compuestos estudiados en muestras de orina son puros. Por tanto no se encontraron interferentes procedentes de la matriz.

[138] Fabre, H., Le Bris, A., Blanchin, M. D., *J. Chromatogr. A* 1995, 697, 81–88.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ELECTROFORESIS
CAPILAR CON DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE PARA
LA DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS EN PRODUCTOS
FARMACÉUTICOS Y MUESTRAS DE ORINA

1.- Introducción

Como es sabido, la principal desventaja de la CE reside en su falta de sensibilidad debido a que sólo unos pocos nanolitros de muestra son introducidos en el capilar. Existen algunas estrategias para mejorar los límites de detección en CE tales como la aplicación de técnicas de concentración *on-line* [139,140], como ya se ha visto en el capítulo anterior, *in-line*, que serán comentadas y aplicadas en los capítulos 5 y 6, o el empleo de sistemas de detección más sensibles tales como los métodos luminiscentes. Entre ellos se encuentran la fluorescencia inducida por láser (LIF) [141 - 144], ampliamente utilizada o la quimioluminiscencia (CL), menos extendida en su aplicación, aunque ha demostrado ser muy sensible como técnica de detección en sistemas de análisis en continuo.

La quimioluminiscencia es un fenómeno basado en la producción de radiación electromagnética a través de una reacción química en la que se produce una especie intermedia en estado excitado, que puede emitir radiación directamente al regresar al estado fundamental (CL directa), o bien transferir su energía a un fluoróforo, el cual retornará al estado fundamental emitiendo radiación (CL sensibilizada). Si la emisión se produce en organismos vivos se denomina bioluminiscencia.

La intensidad de la radiación emitida depende de la concentración de las especies implicadas en la reacción (oxidantes, catalizadores, precursores, fluoróforos, etc.). Este hecho confiere a la técnica una gran versatilidad en sus aplicaciones analíticas ya que pueden ser detectadas y/o cuantificadas cualquiera de las sustancias que participan directa o indirectamente en estas reacciones [145].

Las técnicas analíticas basadas en la CL pueden proporcionar medidas muy sensibles, presentando en ocasiones falta de selectividad. Aunque las primeras observaciones fueron realizadas por Radziszewski en 1877 con la lofina (2,4,5-trifenilimidazol) al emitir una luz verde en su reacción con oxígeno en medio alcalino, las investigaciones sobre el uso analítico de la CL se han desarrollado fundamentalmente desde 1970 en fase gaseosa y desde 1980 para reacciones en fase líquida. Desde entonces, el número de reacciones CL citadas en la bibliografía se ha incrementado cada año, con aplicaciones analíticas en el ámbito de la química, biomedicina, alimentación, medioambiente y toxicología [146- 150]. En la última década destaca su empleo como

-
- [139] Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 486–497.
 - [140] Simonet, B. M., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 605–614.
 - [141] Tao, L., Kennedy, R. T., *Trends Anal. Chem.* 1998, 19, 484–491.
 - [142] Lin, Y. W., Chiu, T. C., Chang, H. T., *J. Chromatogr. B* 2003, 793, 37–48.
 - [143] Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Galera, R., *Electrophoresis* 2005, 26, 2384–2390.
 - [144] García-Campaña, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* 2007, 28, 208–232.
 - [145] García-Campaña, A. M., Baeyens, W. R. G., *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York 2001.
 - [146] Calokerinos, A.C., Deftereos, N.T., Baeyens, W.R.G., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 1063–1071.
 - [147] Navas, M.J., Jiménez, A.M., *Food Chem.* 1996, 55, 7–15.
 - [148] Jiménez, A.M., Navas, M.J., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1997, 27, 291–305.
 - [149] Kricka, L.J., *Anal. Chim. Acta*, 2003, 500, 279–286.

sistema de detección en el análisis por inyección en flujo (FIA), en sistemas de cromatografía líquida (HPLC) e inmunoanálisis [151- 158].

Una ventaja de la detección CL es que requiere una instrumentación muy sencilla, ya que no se necesita fuente de excitación, al ser la propia reacción CL la que proporciona la energía requerida. Esto supone la ventaja adicional de una mayor estabilidad en la línea de base, con lo que se mejoran los límites de detección, proporcionando excelentes sensibilidades debido al bajo ruido de fondo. Por este motivo a esta técnica se la ha clasificado como de “campo oscuro”, ya que produce una señal frente a un fondo nulo, haciéndola fácilmente detectable y siendo posible adquirir la señal mediante un tubo fotomultiplicador (TFM) que sea lo suficientemente sensible para la regiónpectral de interés.

En la última década se ha comenzado a explorar la CL como técnica de detección para CE, ofreciendo excelentes sensibilidades y elevada selectividad y permitiendo la resolución y cuantificación de diversos analitos en mezclas complejas. Algunos artículos de revisión recogen los avances y aplicaciones de los sistemas CE-CL [159- 167].

Debido a las ventajas de esta detección y a su potencial cuando se combina con la alta eficacia en la separación que presenta la CE, la investigación en esta área se ha incrementado significativamente, aunque existen ciertos inconvenientes que pueden limitar su aplicación. En primer lugar, cualquier sustancia fluorescente podría ser medida tras una excitación química adecuada, lo que implica que los reactivos CL no

-
- [150] Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., Soto-Chinchilla, J.J., Huertas-Pérez, J.F., González-Casado, A., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 927-942.
- [151] Nieman, T.A., Baeyens, W.R.G., De Keukeleire, D., Korkidis, K. (Eds.), *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis; Practical Spectroscopy Series, Vol. 12*. Marcel Dekker, New York, 1995. Pp 523-561.
- [152] Bowie, A.R., Sander, M.G., Worsfold, P.J., *J. Biolum. Chemilum.*, 1996, 11, 61-90.
- [153] Palilis, L.P., Calokerinos, A.C., Baeyens, W.R.G., Zhao, Y., Imai, K., *Biomed. Chromat.*, 1997, 11, 85-86.
- [154] Baeyens, W.R.G., Schulman, S.G., Calokerinos, A.C., Zhao, Y., García-Campaña, A.M., Nakashima, K., De Keukeleire, D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 941-953.
- [155] García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., Zhang, X., Smet, E., Van der Weken, G., Nakashima, K., Calokerinos, A.C., *Biomed. Chromatog.*, 2000, 14, 166-172.
- [156] García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., *Analusis* 2000, 28, 686-698.
- [157] García-Campaña, A.M., Lara, F.J., *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 165-169.
- [158] Ramos-Fernández, J.M., García-Campaña, A.M., Ales-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M., *Talanta* 2006, 69, 763-768.
- [159] Baeyens, W.R.G., Lin Ling, B., Imai, K., Calokerinos, A.C., Schulman, S.G., *J. Microcol. Sep.* 1994, 6, 195-206.
- [160] García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., y Zhao, Y., *Anal. Chem.*, 1997, 69, 83A-88 A.
- [161] Staller, T.D., Sepaniak, M.J., *Electrophoresis* 1997, 18, 2291-2296.
- [162] García-Campaña, A.M., Baeyens, W.R.G., Guzman, N.A., *Biomed. Chromatog.*, 1998, 12, 172-176.
- [163] Zhu, R., Kok, W.Th., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 17, 985-999.
- [164] Li, F., Zhang, C., Guo, X., Feng, W., *Biomed. Chromatog.*, 2003, 17, 96-105.
- [165] Huang, X. J., Fang, Z. L., *Anal. Chim. Acta* 2000, 414, 1-14.
- [166] García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., Baeyens, W. R. G., Alés-Barrero, F., *J. Chromatogr. B* 2003, 793, 49-74.
- [167] Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., Lara, F.J., cap. “Quimioluminiscencia: una alternativa a la detección en electroforesis capilar”, en “Electroforesis Capilar: Aproximación según la técnica de detección”. Fernández Gutiérrez, A., Segura Carretero, A. (Eds), Editorial Universidad de Granada, 2005.

son exclusivos para un único analito. Esta falta de selectividad es importante en las aplicaciones en FIA, donde deben incorporarse reactores selectivos antes de que se produzca la reacción CL, sin embargo en combinación con técnicas separativas como HPLC o CE no es una limitación importante. Una desventaja de la CL en el acoplamiento con CE es la gran dependencia que presenta la emisión de factores influyentes en las condiciones de la reacción, lo que implica establecer una solución de compromiso entre las condiciones requeridas en la separación electroforética, y las necesarias para la reacción CL. Por último, ya que la emisión CL no es constante, sino que varía con el tiempo y este perfil de emisión frente a tiempo difiere de unos sistemas CL a otros, se debe tener la precaución de detectar la señal CL en un sistema en flujo a un tiempo fijo, coincidiendo con el momento en el que se produzca el máximo de emisión en la ventana de detección.

Hoy en día, la necesidad de mejorar las técnicas de detección está claramente relacionada con la tendencia general de la química analítica de disminuir el consumo de disolventes orgánicos mediante el empleo de sistemas en fase acuosa, además de reducir el tamaño de muestra, analizando concentraciones cada vez menores. Ya que la CL puede mejorar estos aspectos, proporcionando bajos límites de detección, amplios rangos lineales y alta sensibilidad, en los últimos años el acoplamiento de diferentes sistemas CL con equipos de CE presenta un considerable potencial, fundamentalmente en la detección de analitos a niveles traza en muestras de cantidad limitada.

Se han empleado varios reactivos quimioluminiscentes en CE-CL [165,166], principalmente peroxioxalatos, complejos de rutenio en el caso de la CL electrogenerada (ECL), y luminol y algunos derivados como el isotiocianato de isoluminol o el *N*-(4-aminobutil)-*N*-etilisoluminol (ABEI). Aunque en una menor extensión, las oxidaciones directas también se han empleado.

En este capítulo proponemos el diseño y construcción de un equipo de electroforesis capilar con detección quimioluminiscente con objeto de establecer un nuevo método de CE-CL para la determinación de PTH y PMH basado en la exaltación de la emisión CL que estos compuestos producen en la reacción del luminol con ferricianuro potásico. Teniendo en cuenta que no hay equipos comerciales de CE-CL, se ha desarrollado un instrumento casero de CE que incorpora un sistema de conteo de fotones como detector justo en frente de la zona de reacción en la que los analitos son eficazmente mezclados con el correspondiente reactivo para generar la emisión quimioluminiscente, una vez separados en el capilar mediante CE. Se han empleado por primera vez en CE-CL estrategias habituales en química analítica como el empleo de un patrón interno (IS) o la optimización multivariante de las variables significativas mediante el diseño de experimentos para considerar las posibles interacciones entre los factores en estudio. Se han empleado dos modos de inyección dependiendo del nivel de sensibilidad requerido: inyección por gravedad, utilizada para la determinación de PTH como impureza en una ampolla de metilsulfato de tiazinamio (TMS) o para su cuantificación como principio activo en jarabes y pastillas; y la inyección electrocinética, empleada para la determinación de PMH en muestras de orina.

La utilización de ferricianuro potásico como oxidante en CE-CL aún no ha sido explorada exhaustivamente a pesar de las ventajas que ofrece: (i) es el oxidante y el catalizador al mismo tiempo, por tanto la configuración CE-CL es más simple; (ii) no se producen problemas con la corriente eléctrica debido a la formación de burbujas como ocurre en el caso del H_2O_2 , (iii) es soluble en medios básicos y por tanto (iv) es adecuado para la reacción del luminol (pH 10-11). Fueron Tsukagoshi y *col.* [168] quienes lo emplearon por primera vez en CE-CL, y desde entonces se ha utilizado para la determinación directa de aldehído protocatechuico y ácido protocatechuico [169] y de carbohidratos marcados con 3-aminoftalhidracida [170]. El modo indirecto se ha empleado para la determinación de 2,3,5,4'-tetrahidroxiestileno-2-*O*- β -D-glucósido y baicalina [171], ácido clorogénico y rutin [172].

2.- Reactivos y productos

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. El luminol (3-aminoftalhidracida) y el tetraborato sódico ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, USA). El ferricianuro potásico ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) se obtuvo de Probus (Badalona, España). El metanol y el hidróxido sódico fueron suministrados por Panreac-Química (Barcelona, España). El ácido clorhídrico y el amoniaco fueron proporcionados por Merck (Darmstadt, Alemania). El ácido fosfórico y el etilenglicol se obtuvieron de Carlo Erba (Milán, Italia). El metilsulfato de tiazinamio (TMS) y el hidrocloruro de prometazina (PTH) fueron obtenidos de Alfa Pharma (Bélgica), y el hidrocloruro de promazina (PMH) fue obtenido de Federa (Bélgica).

Las ampollas de TMS (65 mg de TMS, 1 mg de EDTA·2Na, 2 mg de ácido ascórbico, 14 mg de NaCl en 1 mL de agua) fueron suministradas por la farmacia de un hospital (Universidad de Gante, Bélgica), la pastillas de prometazina (FRINOVA®: 25 mg de PTH y excipientes: almidón, lactosa, cera, sacarosa, levilite y estearato magnésico) y el jarabe de prometazina (Actithiol Antihistamínico®: carbocisteína 0'2 g/L, prometazina clorhidrato 500 mg/L, etanol 3%, propilenglicol, sacarosa, etc.) de una farmacia local y son producidos por Rhône-Poulen y Almirall Prodesfarma respectivamente.

El agua destilada (18'2 MΩ/cm) fue desionizada empleando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Los cartuchos de extracción en fase sólida empleados fueron los Oasis® HLB (60 mg, 3 cc) (Waters, Mildford, MA, USA).

[168] Tsukagoshi, K., Ouji, Y., Nakajima, R., *Anal. Sci.* 2001, 17, 1003–1005.

[169] Han, S., Liu, E., Li, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 733–738.

[170] Wang, X., Wang, Q., Chen, Y., Han, H., *J. Chromatogr. A* 2003, 992, 181–191.

[171] Han, S., Li, H., Liu, E., *Microchim. Acta* 2005, 150, 167–171.

[172] Jiang, H. L., He, Y. Z., Zhao, H. Z., Hu, Y. Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 512, 111–119.

3.- Instrumentación y programas informáticos

El primer paso en el desarrollo de un método analítico basado en CE-CL es el diseño y construcción del instrumento. Básicamente, el dispositivo que hemos construido (figura III-1) consiste en una fuente de alto voltaje capaz de suministrar hasta 30 kV (Glassman series EL, Hampshire, Inglaterra), dos electrodos de platino (el ánodo o electrodo de alto voltaje en la entrada y el cátodo o electrodo de tierra en la salida), un sistema de conteo de fotones (Hamamatsu M7824, Iwata-Gun, Japón) que recoge la emisión quimioluminiscente y un conector de tres vías de PEEK con diámetro interno (di) de 508 µm (Upchurch Scientific, WA, USA) para ensamblar los capilares de reacción, de separación y de reactivos. Una sección de 3'7 cm del capilar de separación (longitud total 50 cm × 50 µm diámetro interno × 192 µm diámetro externo) fue introducida en el capilar de reacción (11 cm de longitud × 320 µm diámetro interno × 450 µm diámetro externo) constituyendo lo que se denomina interfase de flujo coaxial *on-column* (figura III-2). Ambos capilares fueron suministrados por Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

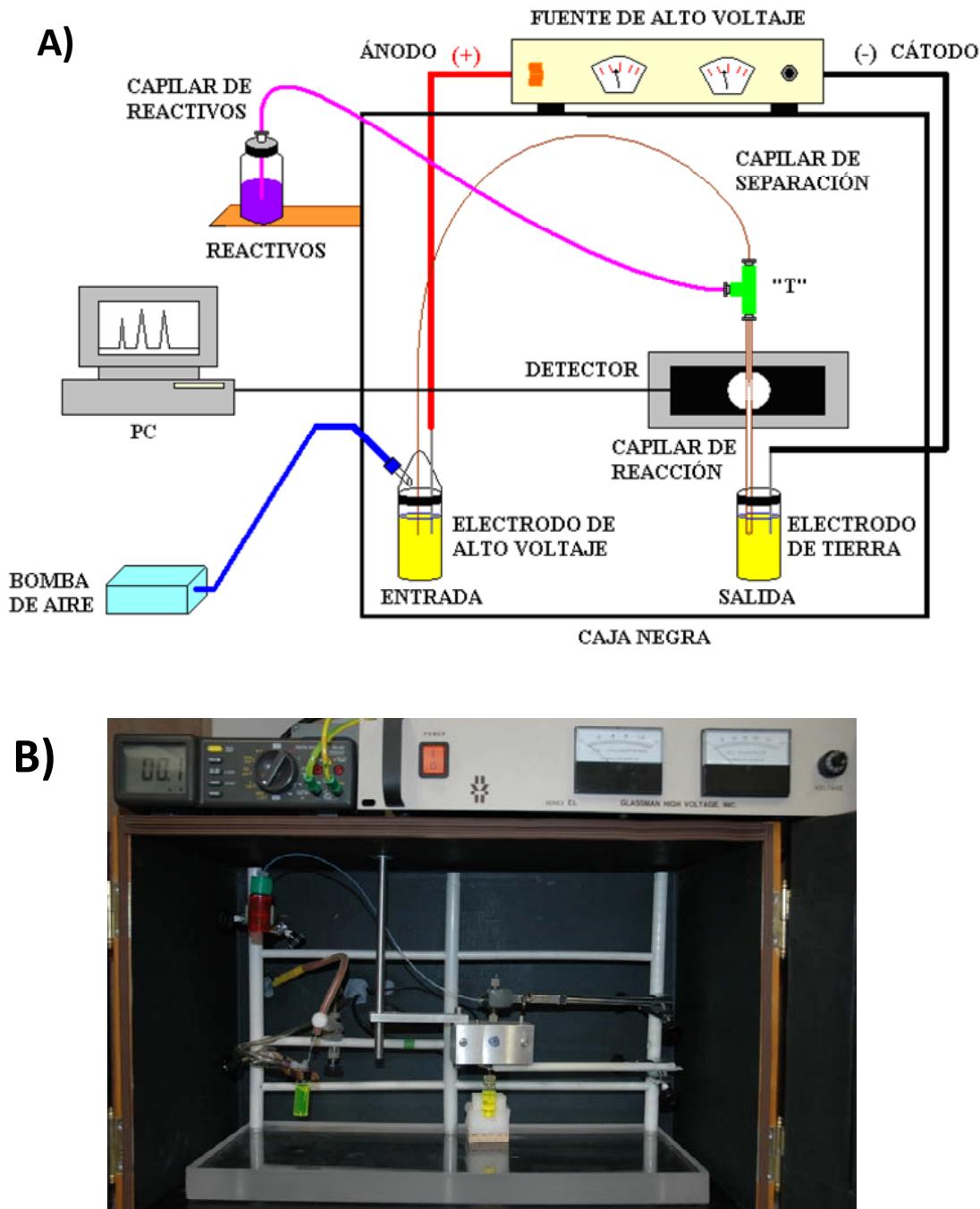


Figura III-1. A) Diagrama esquemático del sistema CE-CL propuesto con interfase de flujo coaxial *on-column* y B) fotografía del mismo.

El reactivo quimioluminiscente fue introducido en el conector de tres vías mediante el capilar de reactivos que consistía en un tubo PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) de 90 cm de longitud y 0'3 mm de diámetro interno. El reactivo para generar la reacción quimioluminiscente se introdujo mediante efecto sifón colocando el vial de reactivos 30 cm por encima del capilar de reacción. El flujo de reactivos era aproximadamente de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$. El acondicionamiento del capilar de separación se llevó a cabo mediante presurización del vial de entrada por medio de una bomba de aire (Otto SA-3500, Derby, CT, USA).

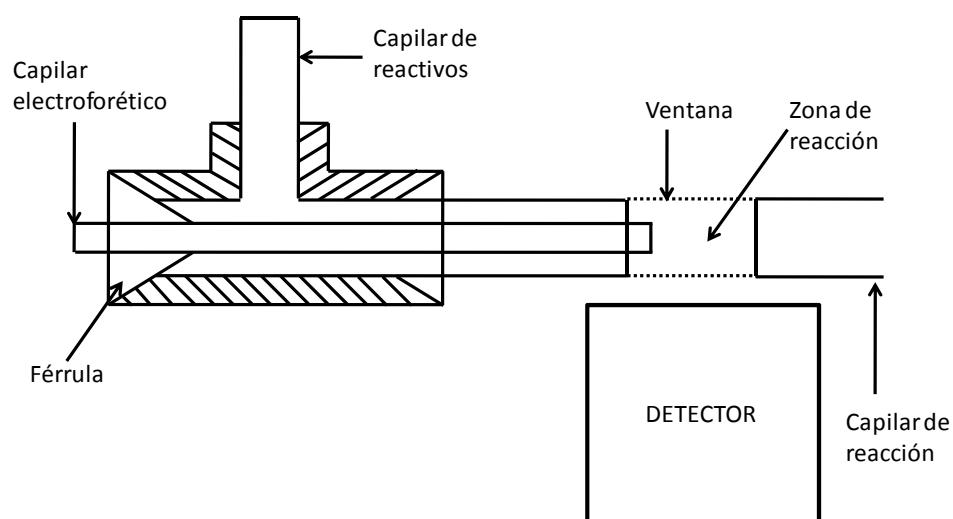


Figura III-2. Detalle de la interfase de flujo coaxial *on-column*.

Cuando los analitos salen del capilar de separación se mezclan con el reactivo CL en el capilar de reacción iniciando, de este modo, la emisión de luz. Se realizó una ventana de detección de 1 cm en el capilar de reacción quemando el recubrimiento de poliimida. Esta ventana de detección fue colocada justo en frente del detector teniendo en cuenta que 2 mm del capilar de separación sobresalían dentro de la ventana de detección. Todo el sistema se introdujo de una caja negra para evitar la radiación externa.

La corriente eléctrica se monitorizó con un multímetro digital (Promax MD-200, Barcelona, España).

La adquisición de datos se llevó a cabo mediante una tarjeta electrónica y el programa Hamamatsu M7824 (Iwata-Gun, Japón). El programa StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Rockville, MD, USA) se empleó para generar el diseño experimental y procesar los datos.

Para las medidas de pH se empleó un pH-metro (Crison modelo pH 2000, Barcelona, España) con una resolución de $\pm 0'01$ unidad de pH.

Los procesos de extracción y preconcentración fueron realizados en un sistema de vacío de Supelco (Bellefonte, PA, USA) acoplado a una bomba de vacío (Büchi modelo B-

169, Suiza). La centrifugación se llevó a cabo en una Hettich Zentrifugen (Universal 32, Tuttlingen, Alemania).

4.- Disoluciones y preparación de las muestras

Las soluciones patrón de 100 µg/mL de PMH y PTH se prepararon en agua desionizada y se almacenaron en botes color topacio en la nevera. Las disoluciones de trabajo se prepararon diluyendo alícuotas de las disoluciones anteriores con agua desionizada (si no se especifica lo contrario).

El procedimiento seguido para la preparación de las muestras de los preparados farmacéuticos fue como sigue. Para la determinación de impurezas de PMH en ampollas de TMS, 615 µL del fármaco fueron diluidos hasta 10 mL con agua. De esta manera la concentración de analito debería quedar en el intervalo de trabajo.

Para la determinación de PTH como principio activo en pastillas, se trituraron finamente varias pastillas en un mortero hasta completa homogeneización. La cantidad correspondiente al peso medio de una pastilla se disolvió en 100 mL de agua y se sonicó durante 15 min. Una alícuota de 120 µL de esta disolución se diluyó hasta 10 mL con agua desionizada y se filtró a través de una membrana de PTFE con un diámetro de poro de 0'2 µm (Millipore).

Para el análisis de PTH en jarabe, 60 µL del jarabe fueron diluidos hasta 10 mL sin ningún otro tratamiento.

En el caso del análisis de muestras de orina, se empleó el método previamente desarrollado en el capítulo anterior. En este método, 10 mL de orina dopada con PMH a diferentes concentraciones fueron acidificados con 100 µL de HCl 5M para posteriormente ser centrifugados a 4000 rpm durante 10 min. Una alícuota de 5 mL de la muestra resultante se hacían pasar por un cartucho Oasis® HLB (60 mg, 3 mL) que fue previamente acondicionado con 2 mL de MeOH y 2 mL de agua. Después de pasar la muestra, el cartucho era lavado con 3 mL de MeOH:H₂O:NH₃ (50:48:2 v/v/v) y 3 mL de agua. La elución final se hizo con 3 mL de MeOH. El eluyente se recogió en viales de 4 mL que contenían 20 µL de etilenglicol para evitar la adsorción de PMH a las paredes del vial. El disolvente se evaporó casi completamente con una corriente de N₂ a 40 °C. El extracto se reconstituyó en una mezcla de 0'5 mL de MeOH:H₂O (1:1 v/v) que contenía H₃PO₄ 32 µM y 1 µg/mL de PTH como patrón interno para ser finalmente inyectado en el sistema construido de CE-CL.

5.- Procedimiento electroforético propuesto

El acondicionamiento del capilar de separación se llevó a cabo mediante presurización del vial de entrada por medio de una bomba de aire que proporciona una presión de 3 psi. Antes del primer uso, el capilar fue acondicionado durante 30 min. con NaOH 1M, luego durante 20 min. con agua y finalmente con tampón electroforético durante otros 30 min. Al principio de cada día el capilar se pre-acondicionaba durante 20 min. con NaOH 0'1 M, luego durante 10 min. con agua, y finalmente con tampón electroforético durante 20 min. Después de cada análisis el capilar se post-acondicionaba durante 5 min. con NaOH 0'1 M y con tampón electroforético durante 5 min. para mantener una adecuada repetibilidad entre análisis. Antes de inyectar era necesario aplicar 15 kV durante 5 min. para que se estabilizara la línea base.

La separación electroforética se realizó con un voltaje de 15 kV (modo normal, es decir, el ánodo en la entrada del capilar y el cátodo a la salida). El tampón electroforético era una solución acuosa de tetraborato sódico 20 mM y luminol 1'25 mM ajustado a pH 8'5 con ácido clorhídrico 5 M. Fue necesario reemplazar el vial de entrada en cada análisis debido a la descomposición del luminol, y también el vial de salida debido a la contaminación con el reactivo necesario para iniciar la emisión quimioluminiscente. Este reactivo consistía en una solución 0'27 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ y NaOH 0'01 N.

La corriente eléctrica era aproximadamente de 30 μ A durante la separación. Se estudiaron dos modos de introducir la muestra: por gravedad e inyección electrocinética. En el primer modo la muestra es elevada 20 cm por encima de la salida del capilar de reacción durante 15 s. En el segundo modo se aplican 5 kV durante 30 s.

6.- Resultados y discusión

6.1. Validación del dispositivo CE-CL construido

Con objeto de demostrar que el instrumento diseñado presenta un óptimo funcionamiento se comenzó inyectando luminol en el sistema electroforético, empleando la detección quimioluminiscente [168]. Para ello se introdujo una disolución de 100 ng/mL de luminol preparada en una disolución tampón 10 mM Na_3PO_4/Na_2HPO_4 a pH 10'8. Este mismo tampón, con una concentración 10 mM de H_2O_2 se utilizó como tampón de separación, e igualmente sirvió para preparar la disolución de reactivo disolviendo ferricianuro potásico en una concentración de 25 mM. El voltaje aplicado durante la separación fue de 15 kV. El electroferograma que se obtuvo aparece en la figura III-3, pudiendo observarse que con el dispositivo propuesto CE-CL es posible detectar luminol mediante la correspondiente reacción CL *on-column*.

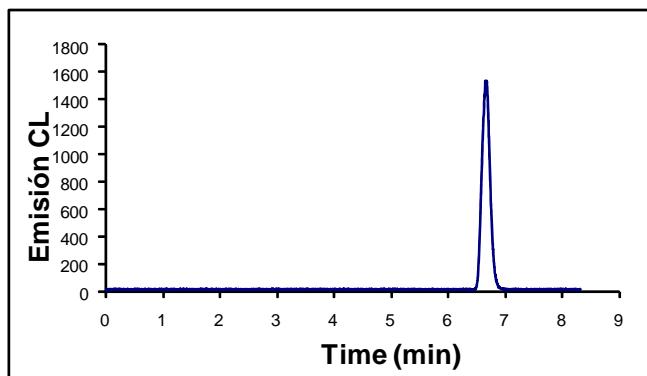


Figura III-3. Electroferograma de una muestra de 100 ng/mL de luminol.

Si cambiamos el tampón de separación anterior por uno compuesto de: 20 mM de tetraborato / NaOH a pH 9,5 con 20 mM de SDS y 10 mM de H₂O₂ era posible separar en una mezcla el luminol de su isómero isoluminol como lo demuestra la figura III-4. La identificación de los picos se hizo aumentando la concentración de luminol en la muestra para ver qué pico aumentaba su altura.

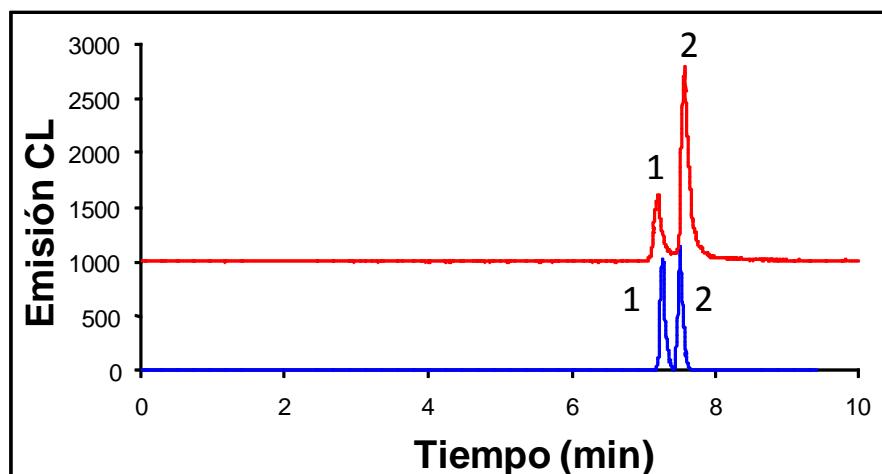


Figura III-4. Electroferogramas de una mezcla de isoluminol (1) y luminol (2) a distintas concentraciones.

Por tanto, el primero en migrar era el isoluminol y el segundo el luminol. Con esta experiencia se pretendió demostrar que el montaje no sólo fue eficaz en la detección de la emisión CL de la reacción sino que además era posible la separación electroforética previa.

6.2.- Selección de la reacción quimioluminiscente para la determinación de fenotiazinas mediante CE-CL

Se han publicado varios métodos de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección quimioluminiscente para la determinación de fenotiazinas basados en oxidaciones directas [173,174], quimioluminiscencia sensibilizada [175,176], quimioluminiscencia indirecta [177] y exaltación de la quimioluminiscencia [178]. Todas estas reacciones se probaron en el instrumento CE-CL desarrollado en nuestro laboratorio para seleccionar la que proporcionara una mayor sensibilidad. En todos los casos, el reactivo responsable de la emisión quimioluminiscente se colocó a una altura de 15 cm sobre el capilar de reacción, el voltaje que se aplicó fue de 15 kV, y la disolución acuosa de 100 µg/mL de fenotiazinas se inyectaba elevando el vial 20 cm durante 5 s.

La oxidación directa se basa en el empleo de un oxidante en medio ácido o básico que produce una emisión quimioluminiscente al actuar frente al analito de interés. En nuestro caso, para la determinación de PTH se usó esta metodología empleando un tampón electroforético $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 3 y una disolución oxidante de KMnO_4 1mM en H_2SO_4 1M. Aunque esta reacción proporciona la configuración más simple no se obtuvo una buena sensibilidad así que fue descartada (figura III-5).

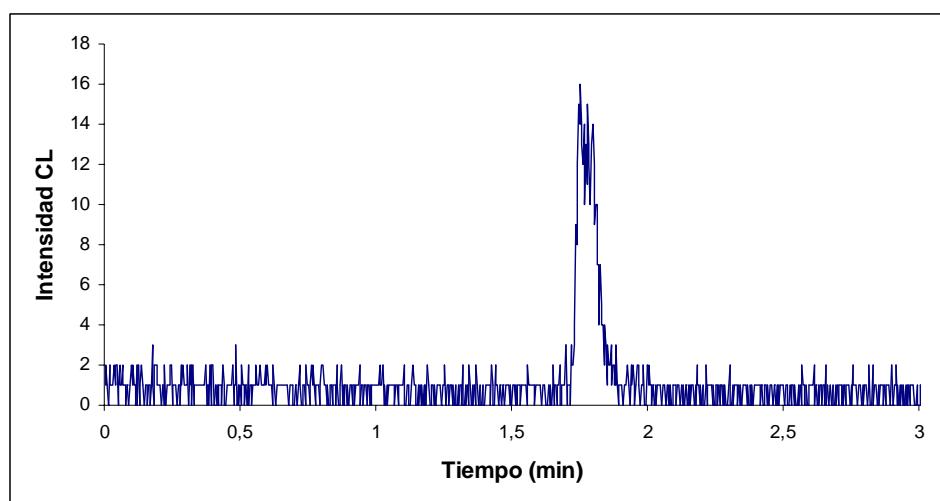


Figura III-5. Electroferograma obtenido tras la oxidación directa de una muestra de 200 µg/mL de prometazina con KMnO_4 . Tampón: 50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 3. Reactivos: 1 mM de KMnO_4 en H_2SO_4 1M.

[173] Kojlo, A., Michalowski, J., Wolyniec, E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22, 85–91.

[174] Sultan, S. M., Hassan, Y. A. M., Abulkibash, A. M., *Talanta* 2003, 59, 1073–1080.

[175] Huang, Y., Chen, Z., *Talanta* 2002, 57, 953–959.

[176] Aly, F. A., Alarjaf, N. A., Alwarthan, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1998, 358, 255–262.

[177] Alwarthan, A. A., Al-Tamrah, S. A., Akel, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1993, 282, 169–174.

[178] Yang, J., Huang, Y., *Yaowu Fenxi Zazhi* 2002, 22, 453–456.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

La segunda reacción de oxidación directa que se probó fue la oxidación de las fenotiazinas con Ce(IV) en medio de ácido nítrico y empleando un sensibilizador como es la Rodamina 6-G [175]. En este caso el tampón de separación fue el mismo que para la primera reacción pero se le adicionó Rodamina 6-G hasta obtener una concentración de 30 μ M. El reactivo consistió en una disolución de 0.6 mM de sulfato de Ce(IV) en ácido nítrico 1 M, introducido por gravedad a una altura de 15 cm. Se aplicaron 15 kV para la separación. En este caso la fenotiazina ensayada fue la clorpromazina a una concentración de 100 μ g/mL (figura III-6).

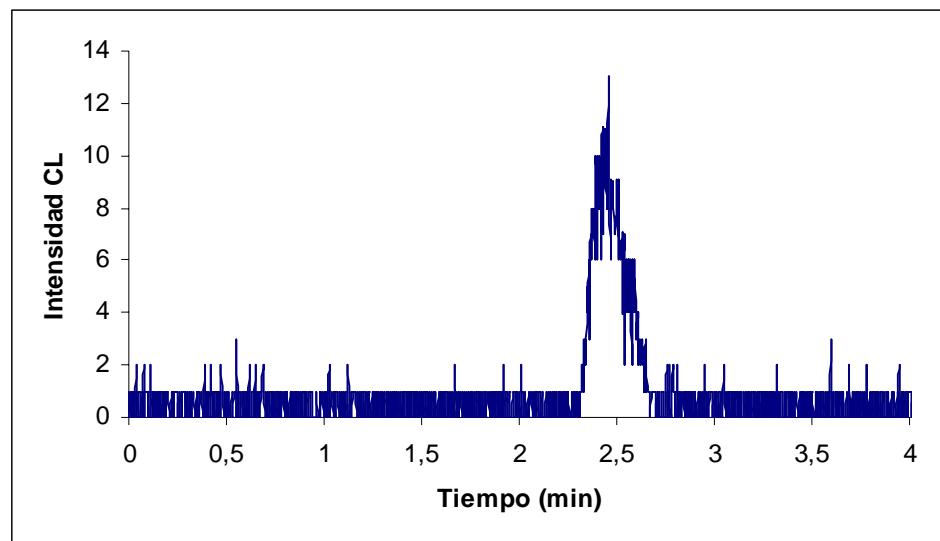


Figura III-6. Electroferograma de una muestra de 100 μ g/mL clorpromazina mediante oxidación con Ce(IV) y sensibilización con Rodamina 6-G . Tampón: 50 mM de NaH_2PO_4 / H_3PO_4 y 30 μ M de Rodamina 6G a pH 3. Reactivos: 0'6 mM de sulfato de Ce(IV) en ácido nítrico 1M.

Se comprobó que aumentando la concentración de Rodamina 6-G se podía mejorar la sensibilidad del sistema, pero los resultados tampoco eran los deseados en cuanto a sensibilidad, así que se siguieron buscando reacciones que fuesen más eficaces.

Una de las reacciones de mayor eficacia quimioluminiscente es la del luminol cuando se oxida con H_2O_2 en presencia de un catalizador. Teniendo en cuenta que las fenotiazinas se oxidan fácilmente transformándose en los correspondientes sulfóxidos, se pensó estudiar la participación de estos fármacos en dicha reacción con objeto de comprobar si alteraban la emisión CL [177]. Los problemas que nos encontramos ante esta estrategia fueron: en primer lugar era necesario que el luminol fuese disuelto en tampón y el H_2O_2 entrara por el capilar de reactivo (ver figura III-2). Obviamente debían ir por canales separados y encontrarse justo delante del detector para que allí, debido a su rápida cinética, generasen la emisión CL debida a la reacción. Esto originaría una línea base

elevada que podría disminuir en presencia de alguna fenotiazina, puesto que esta se oxidaría con el peróxido, lo que provocaría que hubiese menos reactivo disponible para oxidar al luminol. Así, si se oxida menos luminol deberíamos observar una caída en la línea base y podría ser posible la detección de las fenotiazinas de manera indirecta. Otro inconveniente es que no era posible introducir el peróxido con el tampón de separación porque eso provocaría que las fenotiazinas se oxidasen mucho antes de llegar al detector y antes de haber sido separadas. También plantea problemas la introducción del catalizador, puesto que de no hacerlo la línea base no sería lo suficientemente alta como para conseguir una buena sensibilidad. Los catalizadores que se suelen emplear son iones metálicos como Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} o Fe^{2+} . Las sales de estos iones son solubles a pHs neutros o ácidos y la reacción del luminol es eficaz si formamos el dianión para lo que es necesario un pH de 10-11. A estos pHs básicos se forman los hidróxidos de los iones metálicos con lo que precipitan y dejan de catalizar la reacción. En estas condiciones sólo se observó un pico negativo pero que correspondía al flujo electroosmótico (figura III-7).

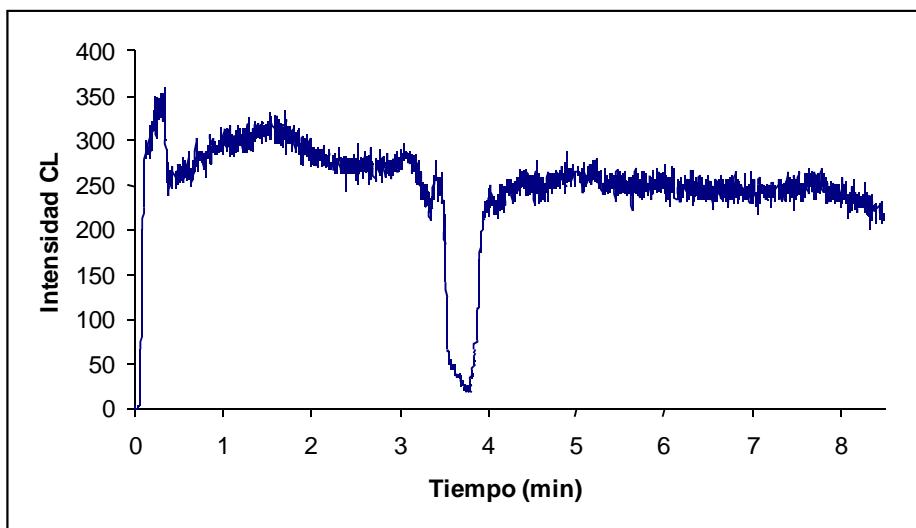
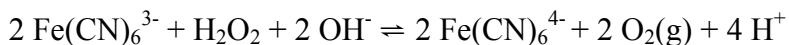


Figura III-7. Electroferograma obtenido de una muestra de 100 mg/L de clorpromazina mediante quimioluminiscencia indirecta. Tampón: 10 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH 10'8 con 5 mM de luminol. Reactivos: 10 mM de H_2O_2 en tampón fosfato 10 mM a pH 10'8.

Una estrategia muy empleada en bibliografía [179] ha sido la formación de complejos con los iones metálicos de manera que sean solubles en medios alcalinos y no pierdan su actividad catalítica. Así, decidimos utilizar el mismo catalizador que habíamos empleado para comprobar el funcionamiento del montaje, es decir, el ferricianuro potásico, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Aunque este complejo podía ir disuelto tanto en el tampón como en el reactivo, existían problemas en ambos casos. Si lo disolvíamos en el tampón no conseguíamos que avanzase por el capilar porque el anión $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, al tener tres

[179] Tsukagoshi, K., Nakahama, K., Nakajima, R., *Chem. Letters* 2003, 32, 634-635.

cargas negativas, posee una movilidad electroforética mayor y de sentido contrario a la electroosmótica, con lo que esta especie nunca migraba hacia el cátodo, que es donde se encontraba el detector, sino que tenía tendencia a ir hacia el ánodo, que se encuentra en el vial de entrada. La otra opción era introducirlo por el capilar de reactivos pero esto hacía que se descompusiese el peróxido, con lo que no conseguíamos una estabilidad en la línea base porque además la descomposición del peróxido formaba burbujas de oxígeno conforme a la siguiente reacción redox:



Como se encuentra descrito que el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ es capaz de oxidar por si solo al luminol produciendo quimioluminiscencia [180] decidimos eliminar el peróxido de la disolución de reactivo e introducir sólo el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Las condiciones de partida fueron:

- Muestra: disoluciones individuales de 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada fenotiazina. Se inyectó aplicando presión durante 5 s.
- Tampón: Se probaron diferentes tampones: 20 mM de tetraborato, 100 mM Tris(hidroximetil)aminometano, 20 mM Na_2CO_3 y 50 mM acetato amónico. Todos ellos a pH 8'5 y utilizando una disolución de luminol 2 mM. De todos los tampones empleados el único que proporcionó resultados satisfactorios fue el tetraborato. El Tris(hidroximetil)aminometano no permitía que se diese la emisión de luz por parte del luminol al reaccionar con el $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. La línea base que se obtenía era inferior a las 5 unidades arbitrarias de señal quimioluminiscente. La inhibición de la señal puede estar causada por los grupos alcohólicos del Tris. De hecho hay métodos en bibliografía que determinan analitos con grupos alcohol basándose en la inhibición que producen sobre la señal de esta reacción. Con el acetato amónico ocurrió algo semejante aunque en este caso no se puede aplicar la misma explicación que para el Tris. En el caso del Na_2CO_3 el problema fue que no se estabilizaba la intensidad de corriente eléctrica en el capilar. Además se observó la formación de burbujas en el vial de salida, quizás debido a la producción de CO_2 puesto que 8'5 no es el pH más adecuado para trabajar con carbonato. Así que finalmente el tampón seleccionado fue: 20 mM tetraborato / HCl a pH 8'5, con 2 mM de luminol. Se aplicaron 15 kV para la separación.
- Reactivo: disolución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0'2 mM en NaOH 0'1N, introducido por gravedad a una altura de 30 cm.

Con objeto de evaluar la sensibilidad del sistema ante diferentes fenotiazinas se realizó un test, en las condiciones anteriormente citadas, con cinco de ellas: tiazinamio, promazina, clorpromazina, tioridazina y prometazina. Únicamente promazina y prometazina produjeron señales significativas (figura III-8).

[180] Shevlin, P. B., Neufeld, H. A., *J. Org. Chem.* 1970, 35, 2178-2182.

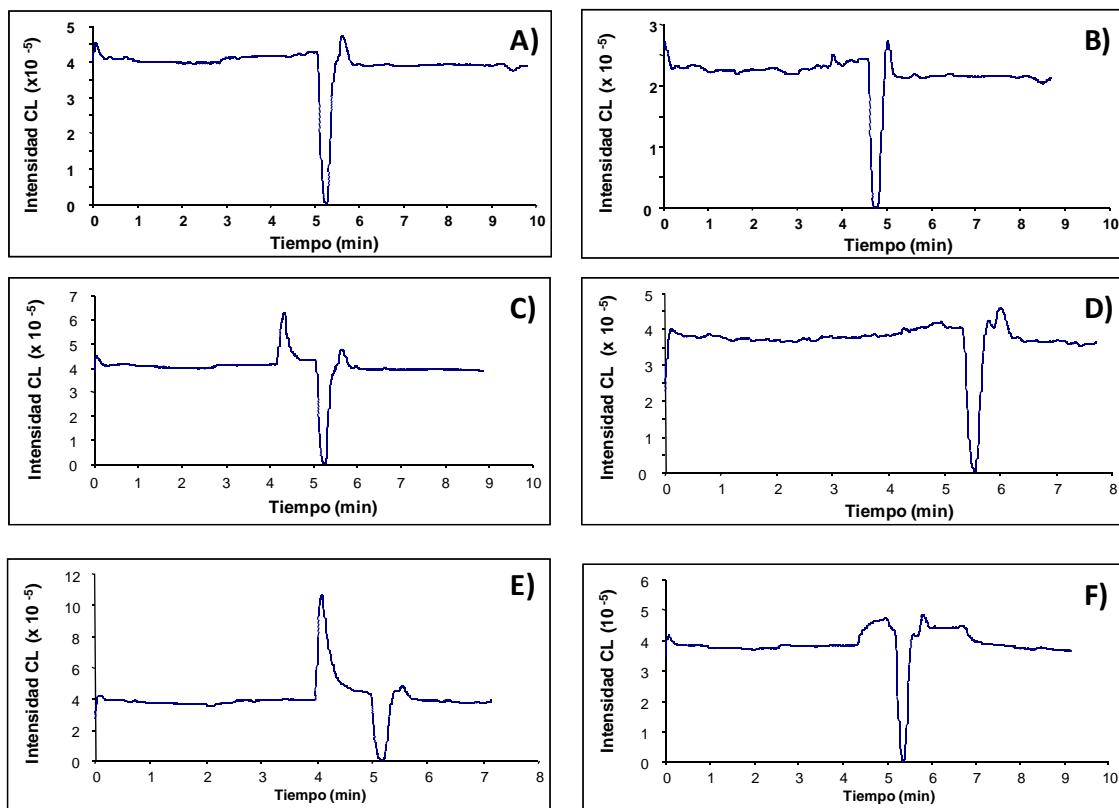


Figura III-8. Electroferogramas correspondientes a: A) línea base; B) tiazinamio (100 mg/L); C) prometazina (100 mg/L); D) clorpromazina (100 mg/L); E) promazina (100 mg/L) y F) tioridazina (100 mg/L). El pico negativo que se observa corresponde al flujo electroosmótico. Tampón: 20 mM de tetraborato a pH 8'5 con 2 mM de luminol. Reactivos: disolución 0'2 mM de $K_3[Fe(CN)_6]$ en NaOH 0'1 N.

6.3.- Posible mecanismo de la reacción quimioluminiscente seleccionada

El hecho de que tanto PMH como PTH actuaran como exaltadores de la emisión quimioluminiscente del luminol en lugar de inhibirla mediante la reducción del ferricianuro podría ser explicado por el mecanismo de la reacción quimioluminiscente del luminol con el ferricianuro (figura III-9A) [180].

El dianión del luminol se oxida por el ferricianuro a una estructura de semidiona que se vuelve a oxidar para dar el subsiguiente radical peroxi. En el siguiente paso el radical peroxi se reduce a anión peroxi. Es ahora cuando los autores [180] proponen que el ferrocianuro formado previamente es el agente reductor más lógico, ya que en principio no hay otro en el medio de reacción. En nuestro caso particular, PMH y PTH podrían proporcionar el electrón necesario para convertir el radical peroxi a anión peroxi. De hecho, se ha publicado que PTH puede ser oxidada mediante un mecanismo radicalario [181,182] para dar el correspondiente sulfóxido (figura III-9B). Este hecho podría

[181] Baxter, R. I., Svehla, G., Kerr, B., Woolfson, A. D., *Anal. Chim. Acta* 1984, 164, 171–180.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

acelerar la cinética de la reacción y podría explicar el efecto exaltador de las fenotiazinas sobre la emisión quimioluminiscente. Finalmente, el anión peroxy se descompone a 3-aminoftalato que es considerado como el emisor quimioluminiscente. Ulteriores estudios, teniendo en cuenta el mecanismo de oxidación de las fenotiazinas, serían necesarios para explicar los diferentes comportamientos quimioluminiscentes de las distintas fenotiazinas.

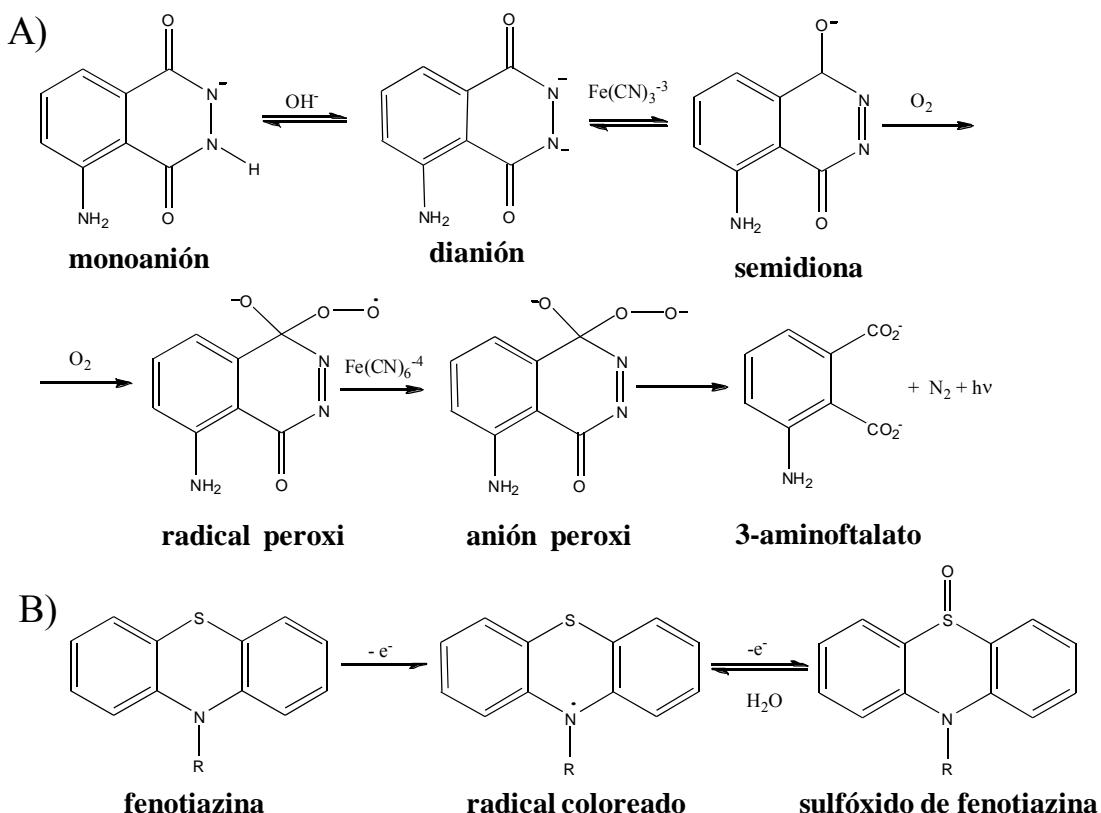


Figura III-9. (A) Mecanismo de la reacción quimioluminiscente del luminol catalizada por ferricianuro. (B) Mecanismo de la oxidación de fenotiazinas.

6.4.- Optimización de la separación electroforética

Se llevó a cabo un estudio univariante de las variables experimentales para lograr la separación electroforética de PMH y PTH. Las condiciones de detección, aún no optimizadas eran las siguientes: 2 mM de luminol en el tampón de separación y un reactivo consistente en una disolución 0'2 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en NaOH 0'1N introducido a una altura de 30 cm. Los reactivos se introducían con un tubo de teflón de 0'3 mm y una longitud de 90 cm. El flujo era de 18 $\mu\text{l}/\text{min}$ aproximadamente.

El primer parámetro estudiado fue la composición del tampón. Como ya se ha señalado anteriormente, y teniendo en cuenta que los valores de $\text{p}K_a$ de estas fenotiazinas están

[182] Bishop, E., Hussein, W., *Analyst* 1984, 109, 229–234.

alrededor de 9 [183] los tampones estudiados fueron: 20 mM de tetraborato sódico, 100 mM de Tris, 20 mM de carbonato sódico y 50 mM de acetato amónico, todos ellos a pH 8'5, y sólo se obtuvieron señales quimioluminiscentes cuando se empleó tetraborato sódico. Para valores de pH entre 8 y 10 la resolución fue mayor de 1'5. Por encima de pH 9 las formas de pico empeoraron posiblemente porque por encima de este pH tiene lugar una cierta precipitación de las fenotiazinas en el interior del capilar. El pH óptimo fue 8'5 ya que con él se obtenía la mejor relación señal/ruido (figura III-10A).

La concentración de tampón se estudió a cuatro niveles: 10, 20, 40 y 60 mM. Aunque la mejor relación señal/ruido se obtuvo con 10 mM (figura III-10B), la resolución era inferior a 1'5, por ello se seleccionó 20 mM como concentración óptima.

La adición de modificadores orgánicos como metanol o acetonitrilo se descartó porque producían un incremento en los tiempos de migración y decrecía la relación señal/ruido sin que mejorara apreciablemente la resolución.

El voltaje aplicado durante la separación fue optimizado teniendo en cuenta la relación señal/ruido y el efecto Joule. Se observó que existía una relación lineal entre el voltaje aplicado y la corriente eléctrica hasta los 15 kV. Por encima de este voltaje, los datos no eran consistentes con la ley de Ohm debido, probablemente, al efecto de calentamiento Joule (figura III-10C). De hecho, la mejor relación señal/ruido se obtuvo cuando el voltaje era de 15 kV. En estas condiciones, se conseguía una resolución completa entre PMH y PTH en menos de 3'5 min.

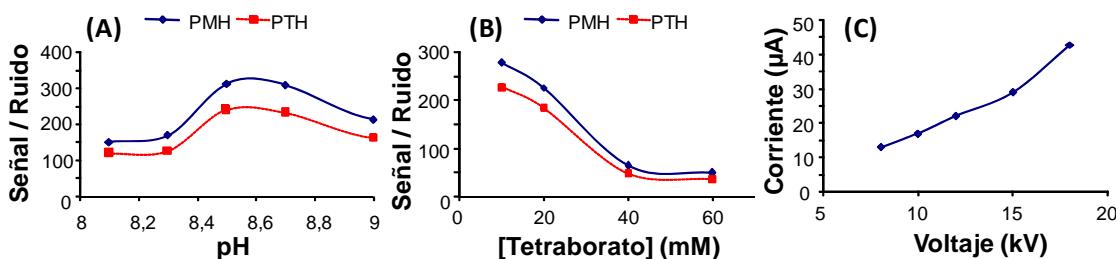


Figura III-10. Optimización de las condiciones electroforéticas: (A) pH, (B) concentración de tampón, y (C) voltaje de separación. La inyección fue por gravedad: 20 cm durante 5 s.; 10 µg/mL PMH y 40 µg/mL de PTH.

En este trabajo se emplearon dos modos de inyección: inyección por gravedad e inyección electrocinética. El primer modo se optimizó elevando el vial de muestra 20 cm por encima del capilar de reacción y variando el tiempo de inyección. El ensanchamiento de bandas se observó cuando el tiempo de inyección fue mayor de 15 s; así que este fue el tiempo seleccionado como óptimo. El segundo modo se optimizó

[183] Lin, C., Liao, W., Chen, K., Lin, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154–3159.

aplicando un voltaje constante de 5 kV y modificando el tiempo de aplicación. Tiempos de inyección demasiado largos producían inestabilidad de la línea base y, por tanto, una disminución de la relación señal/ruido. El tiempo de inyección óptimo en el modo electrocinético fue de 30 s (figura III-11).

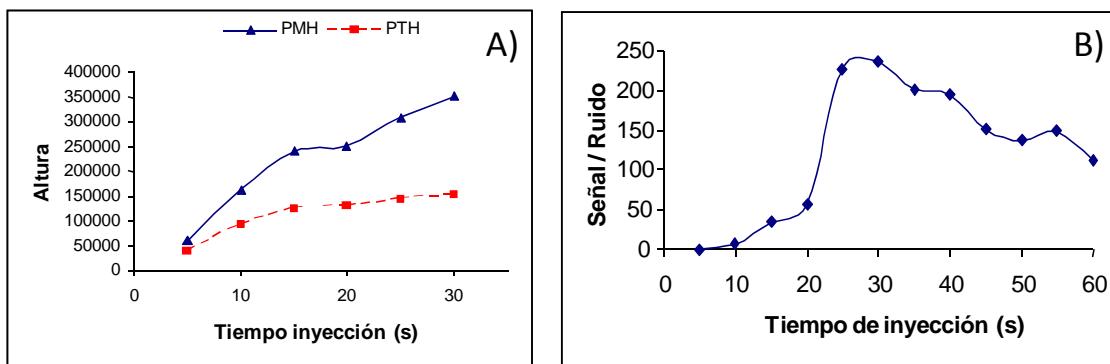


Figura III-11. Optimización de la inyección: A) por gravedad y B) electrocinética.

6.5.- Optimización de la detección quimioluminiscente

En el sistema empleado de luminol-ferricianuro es necesario optimizar la concentración de luminol en el tampón electroforético, la concentración de ferricianuro, y el pH del reactivo para la emisión quimioluminiscente. Teniendo en cuenta que el flujo del reactivo quimioluminiscente es mucho mayor que el flujo electroforético, el pH de la zona de reacción está determinado por el pH del reactivo quimioluminiscente, es decir, por la concentración de hidróxido sódico en esta disolución. De esta manera, es posible llevar a cabo la separación electroforética a un pH diferente del correspondiente a la zona de detección. El flujo de reactivo quimioluminiscente está controlado por la altura del recipiente de reactivo y esto influye tanto en la altura como en la eficacia de pico. Si el flujo de reactivo es demasiado elevado, el máximo de emisión quimioluminiscente podría no ser alcanzado dentro del área de la ventana de detección.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, con una muestra que consistía en una disolución estándar de 1 µg/mL de PMH y 4 µg/mL de PTH, y se empleó la inyección por gravedad previamente optimizada. La altura del recipiente de reactivo se modificó desde 10 a 30 cm por encima del capilar de reacción. La altura óptima fue de 30 cm porque se obtuvo la mejor relación señal/ruido con eficacias de 7×10^4 platos/m para PMH y 6×10^4 para PTH.

Las concentraciones de luminol, ferricianuro e hidróxido sódico se optimizaron de manera multivariante mediante un diseño de superficie de respuesta, concretamente se empleó un diseño Doehlert [184] con tres puntos centrales. Este diseño ofrece la

[184] Doehlert, D. H., *Appl Stat.* 1970, 19, 231–239.

posibilidad de estudiar con un mayor número de niveles las variables más significativas o, por el contrario, emplear un menor número de niveles en aquellas que sean más difíciles de modificar. Así, la concentración de luminol se estudió a tres niveles desde 0'1 a 5 mM porque concentraciones mayores de luminol producían un elevado ruido de fondo y, por tanto, una baja relación señal/ruido. La concentración de NaOH se estudió a cinco niveles desde 0'005 a 0'2 N ya que concentraciones de NaOH mayores producían bajas señales quimioluminiscentes posiblemente debido a que las fenotiazinas precipitan en un medio tan alcalino. La concentración de ferricianuro se estudió a siete niveles, desde 0'05 a 3 mM. A concentraciones mayores de $K_3[Fe(CN)_6]$ se observaba una disminución de la señal quimioluminiscente. Esto puede ser atribuido a una cierta autoabsorción de la disolución de $K_3[Fe(CN)_6]$. Con objeto de obtener la mejor sensibilidad, se prefirió optimizar la relación señal/ruido en lugar de la altura de pico ya que en la mayoría de los sistemas quimioluminiscente el nivel de ruido no es constante y depende de las concentraciones de reactivos. Únicamente se consideró la relación señal/ruido de la PTH porque su emisión quimioluminiscente era inferior a la correspondiente a la PMH.

En el primer diseño no fue posible obtener las condiciones óptimas para los factores seleccionados porque el dominio experimental era demasiado amplio y la variación de la respuesta no quedaba bien definida. Por tanto, se realizó un segundo diseño con un dominio experimental más reducido y teniendo en cuenta los resultados del diseño anterior. La concentración de ferricianuro se estudió a sólo tres niveles, desde 0'0 a 3'0 mM, la concentración de luminol se estudió a cinco niveles, desde 0'01 a 2 mM, y la concentración de NaOH se estudió a siete niveles, desde 0'0 hasta 0'1 N. La figura III-12 muestra las superficies de respuesta obtenidas. Los valores para los que se alcanzaba la máxima relación señal/ruido se muestran en la tabla III-1.

Tabla III-1. Niveles máximos y mínimos del intervalo seleccionado para las variables estudiadas y valores óptimos obtenidos en la optimización mediante el diseño de superficie de respuesta Doehlert.

| | Luminol (mM) | Ferricianuro (mM) | NaOH (N) |
|--------|--------------|-------------------|----------|
| Máximo | 2 | 3'0 | 0'1 |
| Mínimo | 0'01 | 0'0 | 0'0 |
| Óptimo | 1'25 | 0'27 | 0'01 |

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

La interacción concentración del luminol y concentración de NaOH se encontró significativa en la respuesta seleccionada. El valor de P para el test de fallo de ajuste fue del 33% y el coeficiente de determinación (R^2) fue del 83%.

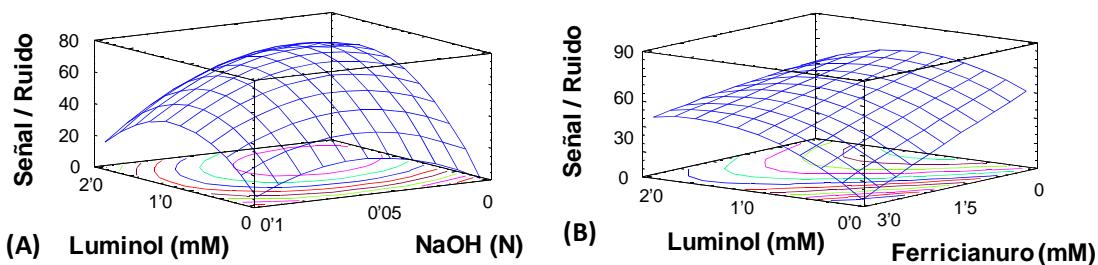


Figura III-12. Superficies de respuesta estimadas en el diseño Doehlert para la optimización multivariante de la detección quimioluminiscente en el sistema CE-CL propuesto para la determinación de fenotiazinas: (A) [Luminol] vs. concentración de NaOH, (B) [Luminol] vs. [Ferricianuro].

6.6.- Rectas de calibrado y parámetros de calidad del método

6.6.1.- Linealidad, límites de detección y cuantificación.

6.6.1.A.- Empleando inyección por gravedad.

Una vez establecidas las condiciones óptimas, se estudió la linealidad de la respuesta para seis niveles de concentración: 0'10, 0'25, 0'50, 1'00, 2'00 y 5'00 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de PMH y 0'4, 1'0, 2'0, 4'0, 8'0 y 20'0 para PTH. Cada nivel se inyectó por duplicado. Las curvas de calibrado se establecieron considerando las alturas de pico como una función de la concentración de analito en la disolución estándar (figura III-13).

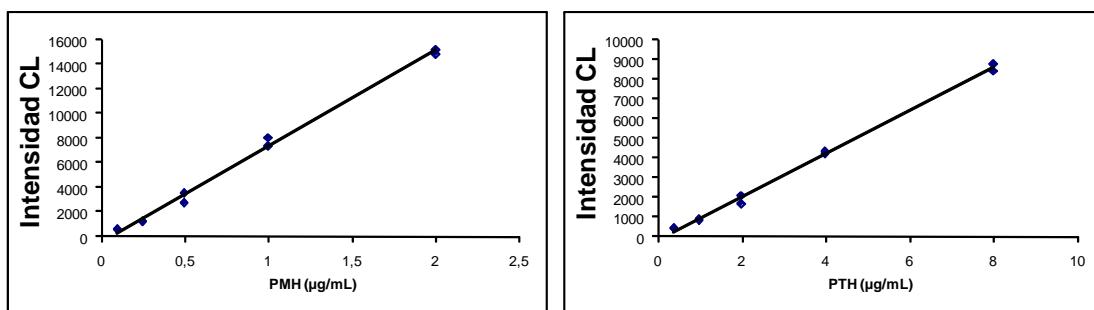


Figura III-13. Rectas de calibrado para promazina y prometazina empleando la inyección por gravedad.

Los límites de detección se calcularon considerando la mínima concentración de analito que proporcionaba una relación señal/ruido igual a tres. Los límites de cuantificación se

calcularon en función de la mínima concentración de analito que producía una señal diez veces mayor que el ruido. En la tabla III-2A se recogen los parámetros de calidad del método.

Tanto los coeficientes de determinación como los valores de P para el test de fallo de ajuste ($\alpha = 0'05$) del análisis de la varianza (ANOVA) confirman que la respuesta de las fenotiazinas es lineal en el intervalo estudiado. Este intervalo es apropiado para la aplicación del método propuesto a la determinación de PMH y PTH en formulaciones farmacéuticas.

6.6.1.B.- Empleando inyección por electrocinética.

Para poder aplicar el método propuesto a muestras biológicas (orina humana) fue necesario reducir los límites de detección, y para ello se aplicó la inyección electrocinética. Con el objetivo de reducir la alta irreproducibilidad asociada a este tipo de inyección propusimos la utilización de una de las fenotiazinas como patrón interno. Así, la determinación de PMH se realizó empleando PTH como patrón interno. La curva de calibrado se estableció en presencia de matriz para cinco niveles de concentración correspondientes a 5, 10, 15, 20 y 25 ng/mL de PMH en muestras de orina procedentes de un individuo sano y dopadas antes del tratamiento de SPE. En todos los casos se añadió 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PTH como patrón interno. Cada nivel del calibrado se inyectó por triplicado. La curva de calibrado se construyó considerando las alturas relativas de pico (es decir, la relación entre la altura del pico de analito y la altura del pico de patrón interno) como función de la concentración de analito (figura III-14).

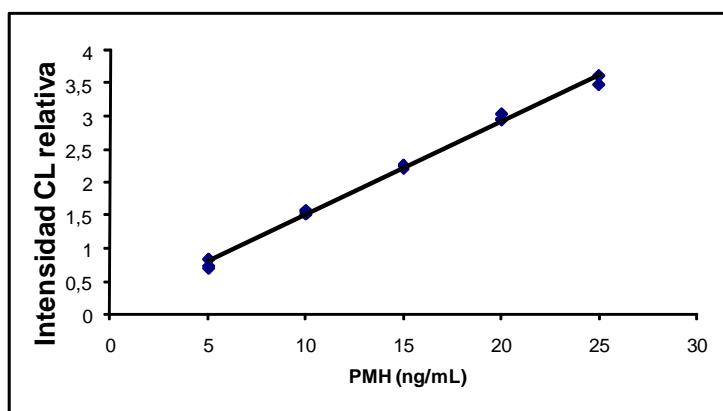


Figura III-14. Recta de calibrado para promazina en muestras de orina empleando inyección electrocinética.

Los parámetros estadísticos se calcularon mediante regresión por mínimos cuadrados y los parámetros de calidad obtenidos se representan en la tabla III-2B. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron adecuados para la determinación de PMH en muestras de orina.

Parte 1: Determinación de fenotiazinas

Tabla III-2. Parámetros de calidad del método propuesto; cu: unidades quimioluminiscentes.

A) Empleando inyección por gravedad.

| Analito | Rango Lineal ($\mu\text{g/mL}$) | Ordenada (cu) | Pendiente (cu·mL/ μg) | Fallo de ajuste (P %) | R^2 | LOD ($\mu\text{g/mL}$) | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------|--------------------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------|-----------------------------|-----------------------------|
| PMH | 0'145-2'000 | -430'5 | 7802'0 | 19 | 0'995 | 0'080 | 0'145 |
| PTH | 0'780-8'000 | -155'9 | 1094'7 | 42 | 0'997 | 0'335 | 0'780 |

B) Empleando inyección electrocinética.

| Analito | Rango Lineal (ng/mL) | Ordenada | Pendiente (mL/ng) | Fallo de ajuste (P %) | R^2 | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---------|-------------------------|----------|----------------------|--------------------------|-------|----------------|----------------|
| PMH | 3'8-25'0 | 0'041 | 0'148 | 33 | 0'997 | 1'0 | 3'8 |

6.6.2.- Estudio de la precisión

6.6.2.A.- Empleando inyección por gravedad

La precisión del método, en lo que se refiere a las alturas de pico, se determinó mediante un estudio de repetibilidad (intra-día) y otro estudio de precisión intermedia (entre-días). La repetibilidad fue evaluada mediante la desviación estándar relativa (DER) de experimentos replicados ($n = 4$) a tres diferentes concentraciones. La precisión intermedia se evaluó durante tres días consecutivos con un procedimiento similar al de los estudios de repetibilidad. Cada día se empleaba un tampón electroforético recién preparado. Los resultados se recogen en la tabla III-3A.

6.6.2.B.- Empleando inyección electrocinética

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad se evaluó en un mismo día por medio de determinaciones repetitivas de dos muestras (réplicas experimentales) a tres niveles de concentración y cada uno se inyectó por duplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante tres días consecutivos con un procedimiento similar al de los estudios de repetibilidad.

Es interesante hacer notar que si sólo se hubiera considerado la altura de pico las DER podían llegar a alcanzar valores del 26 %, pero cuando lo que se consideraba era la altura de pico relativa, las DER eran inferiores al 8'2% tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia. Por tanto, esto demuestra la necesidad de emplear un patrón interno si se pretende llevar a cabo una cuantificación. Los resultados se recogen en la tabla III-3B.

Tabla III-3. Estudio de la precisión del método CE-CL propuesto para la determinación de fenotiazinas.

A) Empleando inyección por gravedad

| | Intra-día, DER (%) (n = 4) | | | Entre-días, DER (%) (n = 12) | | |
|-----|----------------------------|---------------|---------------|------------------------------|---------------|---------------|
| | 0'20 µg/mL | 0'75 µg/mL | 1'50 µg/mL | 0'20 µg/mL | 0'75 µg/mL | 1'50 µg/mL |
| PMH | 6'9 | 4'5 | 7'8 | 10'8 | 9'6 | 11'5 |
| | 0'8 µg/mL | 3'0 µg/mL | 6'0 µg/mL | 0'8 µg/mL | 3'0 µg/mL | 6'0 µg/mL |
| PTH | 11'7 | 5'1 | 6'4 | 7'9 | 7'9 | 9'3 |

B) Empleando inyección electrocinética

| PMH | Intra-día DER (%) (n = 4) | | | Entre-días DER (%) (n = 12) | | |
|--------|---------------------------|----------|----------|-----------------------------|----------|----------|
| | 5 ng/mL | 10 ng/mL | 15 ng/mL | 5 ng/mL | 10 ng/mL | 15 ng/mL |
| Con IS | 7'5 | 4'1 | 5'6 | 6'3 | 4'4 | 6'4 |
| Sin IS | 12'5 | 16'5 | 7'8 | 17'8 | 14'6 | 26'9 |

6.6.3.- Robustez de las variables que afectan a la detección quimioluminiscente

La robustez del método propuesto se estudió empleando un diseño saturado de media fracción 2^{3-1} con tres puntos centrales (siete experimentos). Para realizar este estudio se empleó una disolución que contenía 0'75 µg/mL de PMH y 3'00 µg/mL de PTH. Los factores involucrados en este estudio fueron las concentraciones de luminol, NaOH y ferricianuro que fueron variadas un ±10% alrededor del valor óptimo. El hecho de que estas variaciones tuvieran un efecto significativo en la altura de pico se estimó teniendo en cuenta la varianza de las alturas de pico para las concentraciones estudiadas de ambas fenotiazinas.

Aunque la temperatura es un factor que podría afectar a la respuesta quimioluminiscente, todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Las pequeñas modificaciones que ocurrían durante el trabajo experimental se consideraron como error aleatorio y evaluado dentro de la irreproducibilidad experimental. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla III-4 y demuestran que el procedimiento analítico es robusto frente a modificaciones moderadas de los valores óptimos establecidos. De esta manera se consiguió conocer cuáles son los factores que afectan más al error experimental y, por tanto, que se deberían controlar más exhaustivamente.

Tabla III-4. Estudio de la robustez de las variables que afectan a la detección quimioluminiscente.

| Variables | Valores óptimos | Nivel de significación (Valor P (%)) ^{a)} |
|----------------|-----------------|---|
| [Luminol] | 1'25 mM | No (7'3) |
| [Ferricianuro] | 0'27 mM | No (28'9) |
| NaOH | 0'01 N | No (67'0) |

a) Valor de P para el test de fallo de ajuste en el análisis de la varianza para comprobar el efecto de los valores estudiados en la respuesta seleccionada.

7.- Aplicaciones del método CE-CL propuesto a la determinación de fenotiazinas en preparados farmacéuticos y muestras de orina

7.1.- Análisis de compuestos farmacéuticos

El método propuesto, empleando la inyección por gravedad, fue aplicado a la determinación de PTH como impureza en ampollas de TMS (excipientes: EDTA·2Na, ácido ascórbico y cloruro sódico). Cuando una de estas ampollas era convenientemente diluida y analizada mediante el método propuesto de CE-CL se observaba un pico al tiempo de migración de PTH (figura III-15).

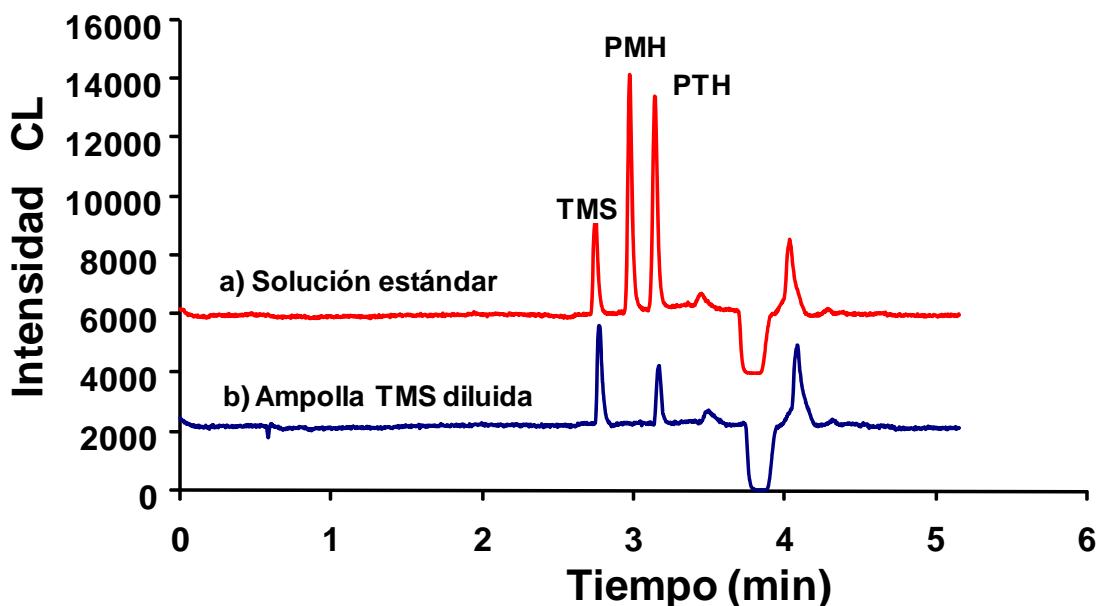


Figura III-15. (a) Separación de una disolución estándar que contenía 1 mg/mL de TMS, 1 µg/mL de PMH y 8 µg/mL de PTH en condiciones óptimas: pH 8'5 con tampón que contenía borato 20 mM y luminol 1'25 mM; voltaje de separación 15 kV; inyección por gravedad elevando el vial de muestra 20 cm durante 15 s, el reactivo quimioluminiscente estaba a 30 cm de altura y contenía 0'27 mM de ferricianuro y 0'01 N de NaOH. (b) Electroferograma de una ampolla de TMS diluida 1:16'26 y que contenía una impureza de PTH.

Es bastante probable que se forme PTH durante la síntesis de TMS teniendo en cuenta que sus estructuras son muy similares. Se analizaron tres ampollas y cada una fue inyectada por triplicado.

Este método también se empleó para la determinación de PTH como principio activo en un jarabe (excipientes: carbocisteína, sacarosa, metilparaben, propilparabén, etanol, hidróxido sódico, esencia de piña y de melocotón) y en unas pastillas (excipientes: almidón, lactosa, cera, sacarosa, levilita y estearato magnésico). Se inyectaron dos alícuotas por triplicado en el caso del jarabe y para las pastillas se hicieron un total de nueve determinaciones. Los excipientes no interferían en la determinación de PTH y los resultados obtenidos muestran una concordancia satisfactoria entre el valor encontrado y el contenido indicado por el fabricante, como lo indica el test de la *t* de Student (tabla III-5).

Tabla III-5. Determinación de PTH en preparados farmacéuticos.

| Muestra | Concentración encontrada ($\mu\text{g/mL}$) | DER (%) | Valor nominal ($\mu\text{g/mL}$) | Valor-t estimado | Valor-t tabulado |
|---|---|---------|------------------------------------|------------------|------------------|
| ACTITHIOL® jarabe (n = 6) | 492 | 10'6 | 500 | 0'390 | 2'571 |
| FRINOVA® pastillas (n = 9) | 255 | 9'4 | 250 | 0'590 | 2'306 |
| Ampollas de Tiazinamio (n = 9) | 43 | 11'0 | ----- | ----- | ----- |
| Valor t Student tabulada ($\alpha = 5\%$) | | | | | |

7.2.- Análisis de muestras de orina

Las fenotiazinas y sus metabolitos son excretados conjugados con ácido glucorónico, principalmente por la orina y en menor medida también por la bilis [185]. Para demostrar la veracidad y la aplicabilidad del método propuesto a la determinación de PMH en orina humana empleando PTH como patrón interno se llevaron a cabo estudios de recuperación a tres niveles de concentración empleando la inyección electrocinética.

La figura III-16 muestra un típico electroferograma de un blanco de orina y otro electroferograma de orina dopada con 10 ng/mL de PMH. No se encontraron interferentes que comigrasen con PMH o PTH lo que demuestra la especificidad del método propuesto.

[185] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Galichet, L. Y. (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.

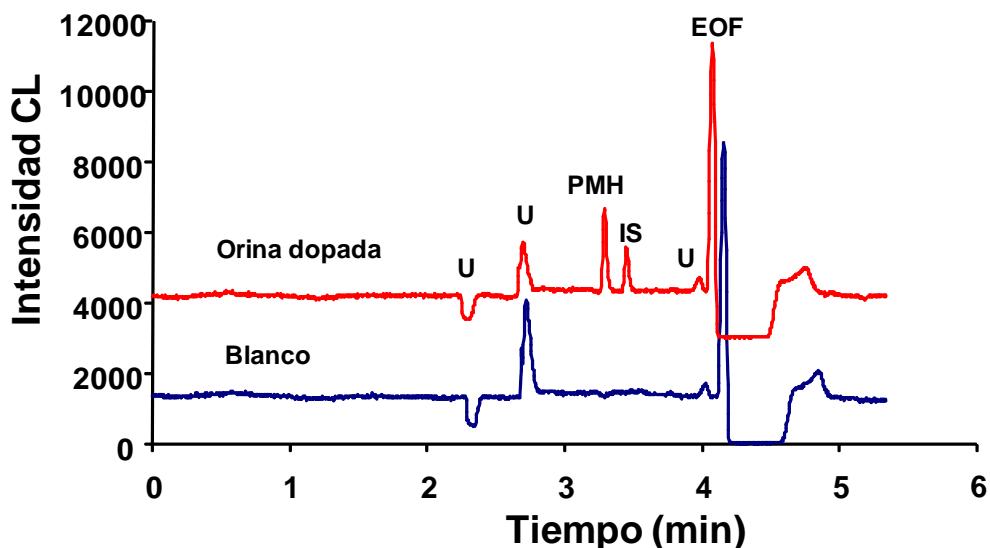


Figura III-16. Electroferogramas de un blanco de orina y de una muestra de orina dopada con 10 ng/mL de PMH. Inyección electrocinética: 5 kV durante 30 s. El resto de condiciones fueron las mismas que las de la figura III-15. Identificación de picos: U, desconocido; PMH, hidrocloruro de promazina; IS, patrón interno (hidrocloruro de prometazina); EOF, flujo electroosmótico.

Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando las concentraciones obtenidas para muestras de orina dopadas antes del procedimiento de SPE y calculadas a partir de una curva de calibrado establecida con muestras de orina dopadas después del procedimiento de SPE, con las concentraciones añadidas. Este procedimiento asegura la corrección de posibles errores sistemáticos sobre la señal analítica debidos al efecto de la matriz. Cada nivel de concentración se inyectó por triplicado. Como se puede observar en la tabla III-6, los resultados fueron satisfactorios a todos los niveles estudiados.

Tabla III-6. Recuperaciones para PMH al aplicar el método CE-CL propuesto a muestras de orina humana dopadas a diferentes niveles de concentración.

| Añadido (ng/mL) | Recuperación % | DER % (n = 3) |
|-----------------|----------------|---------------|
| 5 | 88'8 | 14'6 |
| 10 | 85'1 | 10'9 |
| 15 | 94'4 | 15'3 |

PARTE 2:

DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS

DE USO VETERINARIO

INTRODUCCIÓN

1.- Evolución histórica de las quinolonas

A principios de la década de los años 60, Lescher y colaboradores, en plena síntesis de la cloroquina, descubren, de forma fortuita, la primera 4-quinolona, denominándola ácido nalidíxico [186].

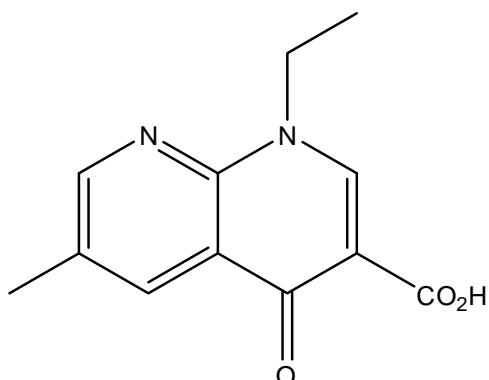


Figura 1.- Estructura del ácido nalidíxico.

Esta familia de quimioterápicos evolucionó lentamente, apareciendo en la década de los 70 otros miembros; ácido oxolínico, cinoxacina, ácido piromídico y ácido pipemídico, todos con efectos similares al ácido nalidíxico.

Años después, en 1984, debido a la introducción de uno o varios átomos de flúor en el núcleo básico, aparecen las primeras 4-fluoroquinolonas, también llamadas quinolonas de segunda generación, encabezadas por la norfloxacina y seguidas por pefloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina, fleroxacina y temafloxacina (esta última fuera del mercado por reacciones adversas graves). Todas tienen una importante actividad contra bacterias Gram negativas y escasa contra Gram positivas (exceptuando estafilococos), buena biodisponibilidad por vía oral y excelente tolerancia [187].

En la década de los 90 fueron sintetizados varios componentes de esta familia, con mejoras importantes en su biodisponibilidad, vida media y espectro, específicamente sobre el *Streptococcus pneumoniae*. Fueron clasificados como quinolonas de tercera generación (tosufloxacina, levofloxacina y esparfloxacina) [188].

En los últimos años han sido aprobadas nuevas quinolonas (moxifloxacina, gatifloxacina, clinafloxacina, trovafloxacina, sitafloxacina) también conocidas como

[186] Andriole, V.T. *Las quinolonas*. Ed. Academia Press Limited, London 1989, 1-287.

[187] Damaso, D. *Quimioterápicos II. Ácido nalidíxico y análogos. Quinolonas. Fluoroquinolonas. Antibacterianos*. Ed. Marketing Pharm SA. Madrid 1990, 135-175.

[188] King, D.E., Malone, R., Lilley, S.H., *Am. Fam. Physician* 2000, 61, 2741-2748.

quinolonas de cuarta generación, las cuales incluyen en su espectro los gérmenes anaerobios [189,190].

El importante desarrollo de esta familia la ha situado a la cabeza en el tratamiento antimicrobiano de las enfermedades infecciosas, siendo consideradas en la actualidad dentro del grupo de antimicrobianos de élite para enfrentar las sepsis por gérmenes con alta virulencia y resistencia.

2.- Clasificación química de las quinolonas

Las quinolonas poseen una estructura común, la 4-oxo-1,4-dihidroquinoleína, de la que derivan las quinolonas fluoradas y no fluoradas. Su núcleo central es la 7-piperazin-4-quinolona, a la que incorporándole uno, dos o tres átomos de flúor en su molécula, da lugar a las llamadas 4-fluoroquinolonas [186,191].

Estos fármacos forman un grupo de agentes antimicrobianos con estructuras y comportamientos químicos diferentes. La estructura general se presenta en la figura 2.

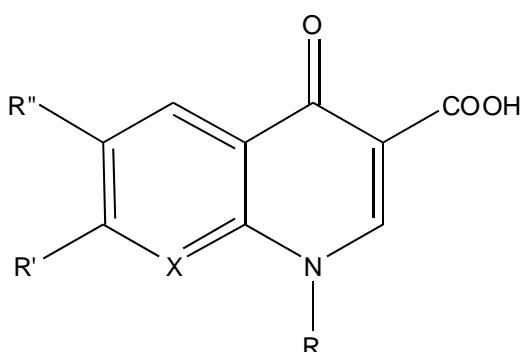


Figura 2. Estructura general de las quinolonas: X = C ó N; R = ciclopropil, etil, fluoroetil, metilamino, fluorofenilo, anillo tiazínico u oxacínico. R' = piperacino-4-ilo, 3-metilpiperacino-1-ilo; R'' = átomo de flúor.

En 1997 se crea una nueva clasificación, que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Las quinolonas se agruparon por generaciones (tabla 1), un tanto coincidiendo con su época de aparición y sobre todo con el espectro bacteriano [188,189].

[189] Oliphant, C.M., Green, G.M., *Am. Farm. Physician* 2002, 65, 455-464

[190] O'Donnell J.A., Gelone S.P., *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2000, 14, 489-513,

[191] Neuman, M., *Vademecum*, Ed. Sigma, Roma 1994.

Tabla 1. Clasificación química de las quinolonas.

| 1^a Generación | 2^a Generación | 3^a Generación | 4^a Generación |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Ácido nalidíxico | Norfloxacina | Difloxacina | Trofloxacina |
| Ácido oxolínico | Enoxacina | Amifloxacina | Gatifloxacina |
| Ácido piromídico | Perfloxacina | Temafloxacina | Moxifloxacina |
| Ácido pipemídico | Ciprofloxacina | Lomefloxacina | Balofloxacina |
| Cinoxacina | Oflloxacina | Esparfloxacina | Gemifloroxina |
| Rosoxacina | Flerofloxacina | Levofloxacina | Pazufloxacina |
| | Lomefloxacina | Tosufloxacina | |
| | | Clinafloxacina | |
| | | Sarafloxacina | |

Así, como se muestra en la tabla 1, es posible distinguir entre:

- **Quinolonas de 1^a generación:** Se utilizan exclusivamente como antisépticos urinarios porque no alcanzan niveles sérico suficientes y se eliminan por orina en forma activa. Todas ellas se administran solamente por vía oral.
- **Quinolonas de 2^a generación:** Son las quinolonas monofluoradas. Comparadas con las anteriores tienen una actividad más potente, un mayor espectro antibacteriano, una semivida más larga y, con la excepción de norfloxacina y enoxacina, alcanzan buenos niveles séricos, con lo que es posible tratar infecciones sistémicas. Ciprofloxacina, oflloxacina y perfloxacina se pueden administrar tanto por vía oral como parenteral.
- **Quinolonas de 3^a generación:** son las fluoroquinolonas bi- o trifluoradas. Comparadas con las anteriores, unas presentan una semivida mayor y otras un mayor espectro antibacteriano, que en algunos casos incluye bacterias Gram positivas (estreptococo sobre todo), intracelulares (Chlamydia, mycoplasma, microbacterias, etc.) y anaerobias.
- **Quinolonas de 4^a generación:** las de cuarta generación aportan una mejora en la actividad frente a Gram positivas y además una buena actividad frente a anaerobios.

3.- Mecanismo y espectro de acción de las quinolonas

El mecanismo de acción de estos compuestos consiste fundamentalmente en la inhibición de la síntesis del ADN bacteriano provocada por el bloqueo de la subunidad A de la ADN girasa (topoisomerasa II), enzima perteneciente al grupo de las topoisomerasas que son esenciales para la duplicación del ADN [186,187,191].

Las bacterias confrontan un gran problema topológico ya que en su gran mayoría miden 2 µm de longitud por 1 µm de ancho, teniendo que contener en su interior una doble cadena de ADN de 1300 µm de longitud. Esto se consigue gracias a la acción de la enzima topoisomerasa II que es la responsable del enrollamiento de dichas bandas

Parte 2: Determinación de quinolonas

manteniendo todos los cromosomas en un estado de superespiral fijándolo a la superficie interna de la célula. Además, esta enzima se encarga de la reparación de pequeñas roturas de filamento de ADN que ocurren durante el proceso de multiplicación del mismo.

Recientemente se ha determinado que además de la topoisomerasa II existe participación de la topoisomerasa IV, encargada de separar la parte replicada del ADN. El bloqueo de esta última tiene su mayor importancia en las bacterias Gram positivas siendo secundario en las Gram negativas.

El bloqueo de dichas enzimas ofrece una explicación para la inhibición de la multiplicación bacteriana, pero no lo suficiente para explicar el efecto bactericida. Crumplin y Smith propusieron en 1975 que el efecto bactericida aparece al ser inhibidas las topoisomerasas y quedar sin reparación porciones dañadas del ADN, desencadenando un proceso de endonucleosis (producción de endonucleasas).

Es interesante destacar que a pesar de existir este mismo tipo de topoisomerasas en las células humanas (eucariotas), estas no se ven afectadas por la acción de estos compuestos, debido a que las mismas están formadas por sólo 2 subunidades en lugar de 4 como poseen las células bacterianas.

En cuanto al espectro de acción de las quinolonas, éstas se comportan de forma similar en todos los miembros de una misma generación y se irá ampliando según avancen éstas.

Así, las quinolonas de primera generación son eficaces contra gérmenes sensibles como bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Proetus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) excepto pseudomonas.

Las quinolonas de segunda generación son eficaces contra gérmenes sensibles con el mismo espectro anterior y ahora expandiéndose a *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* (incluyendo meticillin-resistente), *H. influenzae*, *H. Ducrey*, *M. Catarrhalis* (incluyendo los productores de penicilinas). También son eficaces contra gérmenes multirresistentes a cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos como *V. Cholera*, *Campylobactre*, *Y. Enterocolica*, *Acinetobacter*, *Microbacterias* y algunos patógenos atípicos.

Las quinolonas de tercera generación son eficaces contra gérmenes sensibles con el mismo espectro anterior y su espectro de acción se expande a las bacterias Gram positivas (*estreptococos pyogenes* y *neumococo penicilin-sensible* y *penicilin-resistente*) y atípicas.

Las quinolonas de cuarta generación son eficaces contra gérmenes sensibles con el mismo espectro anterior y su acción se expande hasta las bacterias anaerobias (*clostridium* y *bacteroides*).

4.- Resistencia a las quinolonas

Para ejercer su efecto citotóxico las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular, la topoisomerasa II (ADN girasa) o la topoisomerasa IV, e inducir la muerte de la célula. Por ello, los mecanismos de resistencia a las quinolonas incluyen [192]:

- 1) Mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV, dando lugar a la QRDR (región determinante de resistencia a quinolonas, del inglés “quinolone resistance-determining region”).
- 2) Alteraciones en la permeabilidad de la membrana que disminuyen la penetración intracelular del antibiótico y la actividad de transportadores activos endógenos que provocan la expulsión de los antimicrobianos desde la membrana celular al medio exterior. Estos mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien parece que *in vivo* el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas es producto de varios mecanismos simultáneos.

Las mutaciones en el gen *gyrA*, que codifica la subunidad A de la ADN girasa, es el mecanismo más común de resistencia a las quinolonas para Gram negativos, mientras que mutaciones en el gen *parC*, que codifica la subunidad C de la topoisomerasa IV, es el mecanismo más frecuente en Gram positivos. Sin embargo, en el caso específico de gemifloxacina y esparfloxacina, las mutaciones en el *gyrA* de los Gram positivos parecen ser el principal mecanismo de resistencia. Se producen cambios en los aminoácidos de la QRDR que alteran la estructura del sitio al que se unen las quinolonas en el complejo ADN girasa y disminuye la afinidad de las quinolonas por dicho complejo [193-195].

Otro problema relevante es el posible papel de las fluoroquinolonas como inductores de coselección de resistencia a otros antimicrobianos. Las quinolonas tienen resistencia cruzada entre ellas, al igual que cierto grado de resistencia cruzada con otros antibióticos como tetraciclinas, cloranfenicol y cefoxitina.

5.- Difusión y excreción de las quinolonas en organismos

Las quinolonas de primera generación tienen una baja difusión tisular de ahí que no estén indicadas en sepsis sistemáticas, sólo en urinarias y gastrointestinales.

[192] Ruiz, J., *J Antimicrob Chemother*. 2003, *51*, 1109-1117.

[193] Ball, P., *Semin. Respir. Infect.* 2001, *16*, 215-224.

[194] Talens-Visconti, R., Garrigues, T.M., Canton, E., *Rev. Esp. Quimioter.* 2002, *15*, 25-31.

[195] Schmitz., F.J., Higgins, P.G., Mayer, S., Fluit, A.C., Dalhoff, A., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2002, *21*, 647-659.

A partir de la segunda generación hubo una mejoría importante respecto a la difusión a órganos y tejidos, lográndose concentraciones terapéuticas en mucosa nasal, epitelio bronquial, aparato digestivo, vesícula biliar, próstata, hueso, piel, hígado, corazón, pulmones y de forma significativa en riñón. La difusión en el líquido cefalorraquídeo depende de la lipofilia de las moléculas del compuesto siendo desde 5-25% para ciprofloxacina y hasta el 90% para esparfloxacina.

Una característica muy importante de esta familia de antimicrobianos es su capacidad de penetración intracelular (macrófagos, polimorfonucleares), lo que favorece su acción bactericida sobre los gérmenes intracelulares (*legionellas*, *chlamydias*, *mycoplasmas*, *brucellas*, *microbacterias*, etc).

Presentan una amplia biodisponibilidad por vía oral, abarcando desde el 70 % para la ciprofloxacina hasta casi un 100 % para ofloxacina, lomefloxacina, fleroxacina y perfloxacina. Esto facilita su aplicación ambulatoria, la continuidad de la terapia parenteral-oral, cursos prolongados de tratamiento y el cumplimiento del paciente.

La excreción es fundamentalmente renal, tanto por filtrado glomerular como por secreción tubular, no obstante existen diferencias individuales. La ciprofloxacina presenta una eliminación a través de las células intestinales que llega a ser del 20-30 % de la dosis administrada, al igual que la norfloxacina y fleroxacina, de ahí su gran efectividad sobre las infecciones intestinales [186,187,191].

6.- Características farmacocinéticas de las quinolonas

En general las nuevas quinolonas se unen a proteínas en un bajo porcentaje, inferior al 50 %. Se difunden ampliamente alcanzando concentraciones altas en tejidos periféricos y fluidos orgánicos (esputo, pulmón, piel, huesos, líquido articular, riñón, próstata, bilis, etc.) con un volumen de distribución (Vd) que oscila entre 1'3 y 1'9 L/kg para enoxacina y perfloxacina respectivamente, y que puede llegar hasta los 3 L/kg en el caso de ciprofloxacina. El volumen de distribución (Vd), es de gran importancia en toxicología para aplicar ciertos procedimientos tendientes a incrementar la excreción de tóxicos. Por definición, Vd es el volumen de los diferentes compartimentos en que se distribuye un compuesto en la misma concentración que alcanzó en el compartimiento plasmático. Cuando esta distribución se refiere a compartimentos acuosos, el Vd es por lo general 1 L/kg (100%); cuando la distribución ocurre en otro tipo de compartimentos, particularmente los ricos en tejido graso, el Vd tiende a ser muy elevado, en ocasiones superior a 10-15 L/kg (1000-1500%).

El porcentaje de la dosis administrada que se elimina por la orina inalterada es variable y lo mismo sucede con el porcentaje de fármaco que se metaboliza en el hígado. La semivida de eliminación varía, oscilando para las fluoroquinolonas entre 4 y 14 horas; para ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina y enoxacina es de 5-7 horas, mientras que para la perfloxacina alcanza unas 12 horas aproximadamente. Las fluoroquinolonas

son poco dializables. La insuficiencia renal prolonga la semivida de eliminación, siendo necesario en ocasiones reducir la dosis o ampliar el intervalo de administración. En la tabla 2 se muestran características de la farmacocinética de ciertas quinolonas y en la tabla 3 las concentraciones más habituales que pueden encontrarse en fluidos biológicos.

Tabla 2. Farmacocinética de algunas quinolonas.

| | Enoxacina | Norfloxacina | Oflloxacina | Ciprofloxacina | Enrofloxacina* |
|------------------------|----------------|-----------------|--------------|----------------|----------------|
| Dosificación (mg/12 h) | 200-400 | 200-400 | 200 – 400 | 250 – 750 | |
| Fracción de adsorción | 75-80 % | 35-45 % | 85-95 % | 97-100 % | 97-100 % |
| Semivida (h) | 5 | 4 | 7 | 3'9 | |
| Unión a proteínas (%) | 40-50 | 14 | 8-30 | | |
| Vd (L/kg) | 1'7-2 | 1'7-2 | 1'3-1'8 | | |
| Eliminación | Orina Heces | 65-72 % 18 % | 30 % 30 % | 50 % 4 % | 70-90 % |

* Sólo uso veterinario

Tabla 3. Concentraciones habituales en fluidos biológicos [196].

| | Enoxacina | Norfloxacina | Oflloxacina | Ciprofloxacina |
|-------|-----------|--------------|--------------|----------------|
| Orina | 250 mg/L | 157 mg/L | 200-400 mg/L | 237 mg/L |
| Suero | ≤2'0 mg/L | ≤1'2 mg/L | 1-7 mg/L | ≤2'0 mg/L |

Se han descrito numerosas interacciones entre las quinolonas y otros fármacos existiendo diferencias significativas entre los diferentes derivados:

- a) La enoxacina, ciprofloxacina y perfloxacina reducen el aclaramiento de teofilina entre un 20 y un 50 %, aumentando en consecuencia sus niveles plasmáticos y su toxicidad; sin embargo la norfloxacina, la ofloxacina y el ácido nalidíxico no producen este efecto.
- b) La enoxacina reduce también el aclaramiento de cafeína, warfarina y antipirina.
- c) Aunque no existen datos concluyentes sobre la interacción ciclosporina-fluoroquinolonas, se ha descrito un aumento en los niveles plasmáticos de ciclosporina tras la administración simultánea de ciprofloxacina.

[196] Well, M., Naber, K.G., Kinzig-Schippers, M., Sörgel, F., *Inter. J. Antimicrobial Agents* 1998, 10, 31-38.

7.- Efectos adversos de las quinolonas

Las quinolonas en general son bien toleradas, con un perfil de seguridad similar para todos los componentes del grupo. Existen pequeñas diferencias tanto en la incidencia como en el tipo de reacciones de los fármacos que las contienen. En su mayoría las manifestaciones son leves y retroceden al suspender el fármaco [197,198].

El efecto adverso más conocido y temido de las quinolonas, que incluso las contraindica en los pacientes menores de 18 años, así como en el embarazo y la lactancia, es la erosión del cartílago articular en el crecimiento de articulaciones que soportan peso. Este efecto se ha observado en animales (perros inmaduros) tratados con dosis 6 veces mayores que la utilizada en el hombre [199,200].

Hasta el momento, por su alta efectividad frente a *pseudomonas* y *stafilococo* y por su facilidad de administración por vía oral, teniendo en cuenta la relación riesgo/beneficio, las quinolonas, específicamente la ciprofloxacina, han sido utilizadas en más de 10.000 niños, incluyendo recién nacidos, muchos de ellos portadores de fibrosis quística, no informándose ninguna artropatía relacionada con el tratamiento. Pueden aparecer una serie de efectos similares al resto de los antimicrobianos; náuseas, vómitos, diarreas, erupciones cutáneas, prurito, exantema, fotosensibilidad, etc.

Un efecto observado en las quinolonas más modernas (levofloxacina, moxifloxacina, fleroxacina, trovafloxacina) que provocó la retirada del mercado de la grepafloxacina es la aparición de arritmias peligrosas. Por tal motivo no deber ser aplicadas en pacientes medicamentados con antiarrítmicos o antecedentes de arritmias peligrosas.

En 1999 la *Food and Drug Administration* (FDA) dio a conocer 14 casos de insuficiencia hepática aguda provocados por trovafloxacina. A partir de entonces se recomienda su utilización valorando el riesgo/beneficio. En Europa este medicamento se retiró completamente del mercado, y sólo está disponible en EEUU, México y Canadá.

8.- Campo de aplicación de las quinolonas

Las quinolonas son utilizadas actualmente tanto en medicina humana como en veterinaria y su empleo específico depende del tipo de compuesto e incluso de la generación a la que pertenecen. Así, las quinolonas de primera generación están aprobadas para infecciones urinarias (*cistitis*, *pielonefritis*) e intestinales (*disentería bacilar*, *salmonelosis*, *enterocolitis* por *E. coli*).

[197] Lambert, H.P., O'Grady, F.W., Quinolones. en: Antibiotic and chemotherapy (Churchill Livingstone). 6 ed. Londres 1992, 245-262.

[198] Shah, P.M., *Int. J. Antimicrob. Agents* 1991, 1, 75-96.

[199] Hooper, D.C., Wolfson, J.S., *N. Engl. J. Med.*, 1991, 324-394.

[200] New, C.H., *Clin. Med. Norteam.* 1987, 71, 663-667.

Las quinolonas de segunda generación pueden ser utilizadas con gran efectividad, en las infecciones urinarias complicadas y no complicadas. Por su excelente difusión prostática, algo que logran pocos antimicrobianos, se han convertido en fármacos de primera línea en las prostatitis. Pueden ser administradas mediante monodosis (ciprofloxacina 500 mg vía oral) en el tratamiento de la uretritis y cervicitis gonocóccica.

Debido a su gran absorción intestinal, su importante difusión ósea y su espectro sobre estafilococos y Gram negativos las quinolonas se han convertido en fármacos muy utilizados en el tratamiento de la osteomilitis, facilitando la aplicación de tratamientos prolongados por vía oral.

Tienen un papel muy importante en las infecciones respiratorias por su excelente penetración en las secreciones bronquiales y su acción sobre bacterias Gram negativas. También son muy beneficiosas en el caso de pacientes portadores de fibrosis quística, puesto que éstos suelen contaminarse frecuentemente con *Pseudomonas aeruginosa* y *cepacia*, y también en el caso de pacientes portadores de enfermedad pulmonar obstructiva crónica que se infectan frecuentemente con *H. influenzae* y *M. Catarrhalis*.

Las quinolonas son muy efectivas en el tratamiento de infecciones respiratorias altas (sinusitis, otitis), sobre todo en la otitis externa maligna del diabético, por la participación de *P. aeruginosa*. Su efectividad se extiende también a las infecciones biliares, de piel, tejidos blandos y gastrointestinales (cólera, diarrea del viajero, disenterías y fiebre tifoidea).

9.- Uso de las quinolonas en medicina veterinaria y control en alimentos de origen animal.

En los últimos años ha aumentado el interés público por el uso intensivo de antibióticos en animales de granja, entre los cuales se encuentran las quinolonas [201]. Ya en la década de los 80, se estimó que al menos el 60 % de los animales destinados a la alimentación humana eran tratados con antibióticos en alguna etapa de su vida. Esta utilización masiva supone un creciente problema debido a que los antibióticos se utilizan en animales tanto para tratar infecciones y como promotores del crecimiento y por tanto pueden surgir cepas de bacterias resistentes tanto en animales sanos como enfermos. Este hecho podría causar un problema médico en el hombre, ya que haría inútil el tratamiento de infecciones humanas comunes con antibióticos. Algunos autores [202] incluso han señalado literalmente que: “nos encontramos a las puertas de un futuro incierto en el que las condiciones que existían antes de 1940, en la era pre-antibiotica, podrían regresar”.

[201] Piddock, L. J. V., *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, 38, 1-3.

[202] Pérez-Trallero, E., Zigorraga, C., *Int. J. Antimicrob. Agents* 1995, 6, 59-63.

Parte 2: Determinación de quinolonas

Otros problemas relacionados con la inadecuada utilización de los antibióticos son los siguientes: (a) pueden producir reacciones alérgicas en algunas personas; (b) complicaciones en los procesos de fermentación, por ejemplo, la elaboración del yogur podrían fallar; y (c) la presencia de residuos de antibióticos podría ocultar la existencia de patógenos en alimentos cuando se llevan a cabo análisis bacteriológicos. Por estas razones, es importante controlar el contenido de antibióticos en los alimentos de origen animal.

El caso concreto de la determinación de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal a muy bajas concentraciones se ha convertido en una preocupación social debido a la transferencia de cepas de bacterias resistentes desde los animales al hombre. Es a muy bajas concentraciones cuando los antibióticos no destruyen las bacterias completamente y se vuelven resistentes al fármaco. Este hecho hace inútiles fármacos que hace algunos años podían ser muy efectivos en el tratamiento de ciertas infecciones. Este es el caso de las quinolonas de primera generación tales como el ácido nalidíxico o el ácido pipemídico que se utilizaban satisfactoriamente en el tratamiento de infecciones urinarias pero que hoy en día han perdido su actividad contra estas bacterias y han tenido que ser reemplazados por una nueva generación de quinolonas, las fluoroquinolonas. El amplio rango de utilización y el extenso uso en veterinaria, no siempre correcto, de las quinolonas presenta un peligro potencial porque los residuos de estos antibióticos pueden persistir en alimentos como la leche o los huevos. Algunas quinolonas han sido específicamente desarrolladas para uso veterinario pero, entre los productos de su metabolización, es posible encontrar quinolonas para uso en humanos en animales destinados al consumo humano. Este es el caso de la enrofloxacina y su metabolito principal, la ciprofloxacina.

La preocupación pública se despierta a causa de que las compañías farmacéuticas tiene cada día más dificultades para encontrar nuevos compuestos con actividad farmacológica. Este hecho ha promovido el establecimiento de medidas preventivas por parte de los gobiernos, que están dedicando grandes cantidades de dinero, ya sea en forma de campañas publicitarias o proyectos científicos, para evitar la mala utilización de los antibióticos tanto en humanos como en animales.

Así, la normativa Europea establece los requisitos necesarios para garantizar la seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos veterinarios en todo el proceso de su autorización, elaboración, comercio, almacenamiento, suministro y utilización, en relación con los animales de destino, así como de su seguridad, habida cuenta las repercusiones sobre la salud pública y el medio ambiente [203]. En el R.D. 109/1995 se exponen los requisitos de calidad, eficacia, seguridad y pureza que ha de cumplir un medicamento veterinario para poder ser registrado y autorizado. En este sentido, no podrá autorizarse la puesta en el mercado de un medicamento veterinario, con excepción de los inmunológicos, para ser administrado a animales cuya carne o

[203] Real Decreto 109/1995, de 27 de enero sobre medicamentos veterinarios. BOE. 53, de 3 de marzo de 1995.

productos sean destinados al consumo humano si no tiene establecido el correspondiente Límite Máximo de Residuos (LMR) tal y como está previsto en la Decisión de la UE 2377/90/CEE [204]. Esta normativa entró en vigor a partir del 1 de Enero de 1997, quedando desde entonces prohibido el uso de medicamentos veterinarios que contengan sustancias farmacológicamente activas que no estén mencionadas en los anexos I, II o III, en especies productoras de alimentos. La Directiva comunitaria 96/23/CE [205] establece las medidas de control y los planes de vigilancia que deben aplicarse para la detección de determinadas sustancias y sus residuos, potencialmente tóxicos para el consumidor, en animales vivos o productos de origen animal destinados al consumo humano. Según los estudios realizados sobre el efecto de ciertas sustancias en la salud humana, los residuos se han clasificado en dos grupos: el grupo A, que engloba sustancias con efecto anabolizante y otras sustancias no autorizadas, y el grupo B, que son medicamentos veterinarios y otros contaminantes para los que se fija un LMR.

Asimismo, el Reglamento (CE) nº 1181/2002 [206] modifica el anexo I del Reglamento nº 2377/90/CEE del Consejo, sobre los LMR de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, incorporando nuevas sustancias. Los grupos incluidos cuyos LMRs están legislados en diferentes tejidos animales comestibles y productos (grasa, hígado, riñón, leche, músculo, etc.) para diversas especies productoras de alimentos (bovinos, porcinos, caprinos, equinos, aves, conejos, salmonídos, etc.) son los agentes antiinfecciosos, dentro de los cuales se encuentran los quimioterapéuticos (sulfonamidas y derivados de la diaminopirimidina), antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, macrólidos, flurofenicol y compuestos asociados, tetraciclinas, ansamicina, pleuromutilinas, lincosamidas, aminoglucósidos, etc.) y agentes antiparasitarios (salicilanidas, benzimidazoles, derivados fenólicos, etc.).

[204] Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DOCE L 224 de 18 de agosto de 1990. Modificado por el Reglamento 1338/2000/CE de la Comisión, de 20 de octubre de 2000. DOCE L 269 de 21 de octubre de 2000.

[205] Directiva 96/23/EC de Abril 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancia y sus residuos en animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/EEC y 86/469/EEC y las Decisiones 89/18/EEC y 91/664/EEC, *Off. J. Eur. Commun.* 1996, *L125*, 10–18.

[206] Reglamento 1181/2002 de la Comisión, de 1 de julio de 2002, por el que se modifica el anexo I del Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. DOCE L 172 de 2 de Julio de 2002.

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de disponer de métodos analíticos y técnicas de tratamiento de muestra para la detección de residuos de antibacterianos en alimentos, con la problemática que esto conlleva y que está relacionada con:

- i) El gran número de compuestos que deben ser controlados, así como sus posibles metabolitos debido a que ciertos productos pueden oxidarse, reducirse o hidrolizarse en la primera etapa del metabolismo o incluso biotransformarse a conjugados solubles en etapas posteriores, como es el caso de los nitrofuranos, presentando los metabolitos cierta toxicidad.
- ii) Los niveles extremadamente bajos a los cuales pueden presentarse estos residuos en los alimentos de interés (por debajo de las ppb).
- iii) La complejidad de la matriz objeto de análisis (carne, leche, huevos, etc., con alto contenido proteico, siendo posible la unión de estos antibacterianos con las proteínas, e incluso con ciertos cationes divalentes y trivalentes que forman complejos con éstos y que pueden aumentar su retención en diferentes tejidos).

La Decisión 2002/657/EC [207] relativa a la validación de los métodos analíticos de control de estos residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los resultados, en el marco de la Directiva 96/23/EC [205] no establecen obligación de usar métodos normalizados en el control de tales residuos en los alimentos. Sin embargo, se establecen distintos criterios de funcionamiento y requisitos que deben cumplir los métodos analíticos a aplicar en función del tipo de método. En el caso de requerir confirmación inequívoca de los residuos encontrados se indica que la detección por espectrometría de masas (MS) es la adecuada tras separación cromatográfica, empleándose un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos, basado en el uso de la MS mediante análisis de los fragmentos (modo SIM: control de iones específicos). La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A (anabolizantes y sustancias no autorizadas) de la Directiva 96/23/EC requiere un mínimo de 4 puntos de identificación y las clasificadas en el grupo B (medicamentos de uso veterinario con LMR establecido, como es el caso de las quinolonas) un mínimo de 3 puntos, considerando que se asignará 1 punto por cada ión precursor y 1'5 puntos por cada ión fragmento obtenido.

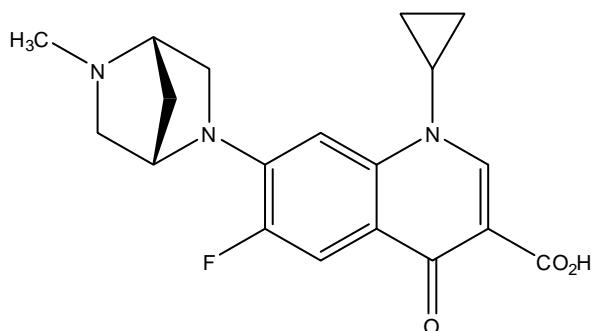
10. Propiedades físico-químicas de las quinolonas

A continuación se muestran las estructuras y propiedades físico-químicas de las quinolonas de uso veterinario permitidas por la legislación europea y que serán objeto de estudio en la presente memoria: danofloxacina, sarafloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina, enrofloxacina, difloxacina, ácido oxolínico y flumequina. Igualmente se detalla la dosis suministrada y los LMRs para las matrices en las que se han aplicado los métodos analíticos propuestos en esta tesis.

[207] Commission Decision 2002/657/EEC, *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L 221, 23.

La danofloxacina es un sólido cristalino blanco ligeramente amarillento.

Su estructura química es la siguiente:



Sus características más destacables se recogen en la tabla 4.

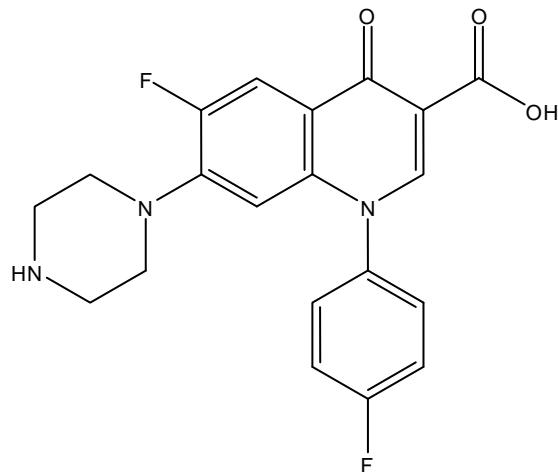
Tabla 4. Propiedades físicas de la danofloxacina.

| | |
|---------------------------------|--|
| Número CAS: | 112398-08-0 |
| Nombre químico: | Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-7-[(1S,4S)-5-metil-2,5-diazabiciclo[2.2.1]hept-2-il]-4-oxo- 3-quinolincarboxílico . |
| Solubilidad (*): | 0'29 mol/L a pH 1. |
| Punto de ebullición (*): | 570 °C |
| Punto de fusión (*): | 263 °C |
| Log P (*): | 1'9 |
| pK_a (*): | 6'0 y 9'0 |
| Peso molecular | 357 |
| Dosis | En el caso de pollos, el fármaco se administra disuelto en el agua de bebida. Las cantidades pueden variar desde 5 hasta 50 mg/kg durante 3 días. En el caso de vacas o cerdos la administración es a través de una inyección intramuscular o subcutánea. La dosis es 1'25 mg/kg durante 3-5 días. |
| LMR | 30 µg/kg en leche de vaca y 200 µg/kg en músculo de pollo. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

Parte 2: Determinación de quinolonas

La sarafloxacina es un sólido cristalino blanco o ligeramente amarillo. Su estructura química es la siguiente:



Sus características más destacables se recogen en la tabla 5.

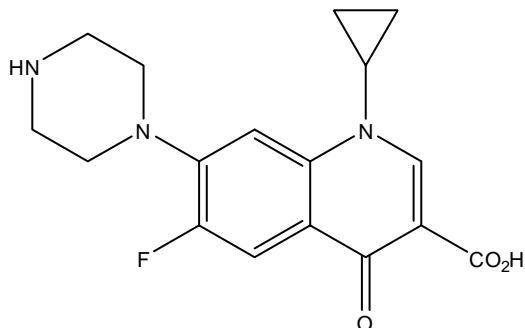
Tabla 5. Propiedades físicas de la sarafloxacina.

| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 98105-99-8 |
| Nombre químico: | Ácido 6-fluoro-1-(4-fluorofenil)-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolincarboxílico. |
| Solubilidad (*): | 0'034 mol/L a pH 1. |
| Punto de ebullición (*): | 621 °C |
| Punto de fusión (*): | 285 °C |
| Log P (*): | 3'0 |
| pK_a (*): | 5'6 y 8'4 |
| Peso molecular | 385 |
| Dosis | La dosis habitual suele ser de 10 mg/kg y se administra en el agua de bebida. |
| LMR | No tiene establecido un LMR ni en leche de vaca ni en músculo de pollo. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

La ciprofloxacina es un fármaco de uso en humanos pero se ha encontrado como metabolito de la enrofloxacina en aves a las que se había administrado la quinolona de uso veterinario [208].

Su estructura química es la siguiente:



Sus propiedades más importantes se recogen en la tabla 6.

Tabla 6. Propiedades físicas de la ciprofloxacina.

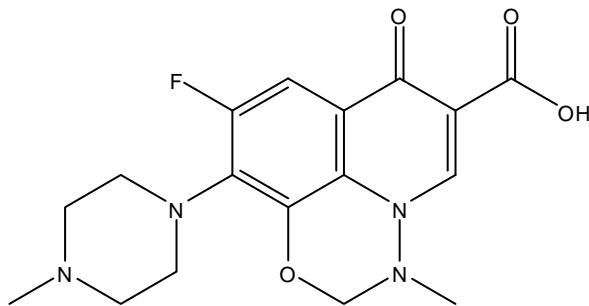
| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 85721-33-1 |
| Nombre químico: | Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)- 3-quinolínacarboxílico. |
| Solubilidad (*): | 0'65 mol/L a pH 1. |
| Punto de ebullición (*): | 581 °C |
| Punto de fusión (*): | 265 °C |
| Log P (*): | 1'3 |
| pK_a (*): | 6'0 y 8'4 |
| Peso molecular | 331 |
| Dosis | No es de uso veterinario |
| LMR | La suma de enrofloxacina y ciprofloxacina no debe superar los 100 µg/kg. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

[208] Flammer, K., Aucoin, D.P., Whitt, D.A., Prus, S.A., *Avian diseases* 1990, 34, 1017-1022.

Parte 2: Determinación de quinolonas

La marbofloxacina es un sólido cristalino blanco ligeramente amarillento. Su estructura química es la siguiente:



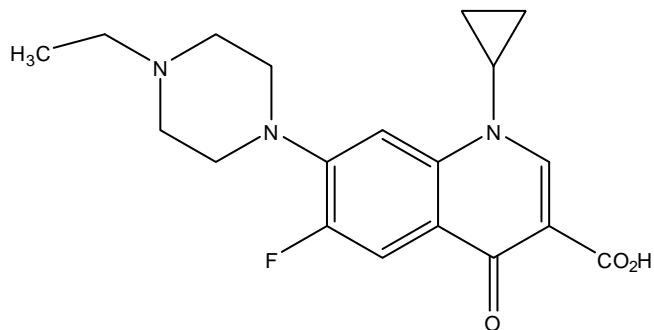
Sus propiedades más importantes se recogen en la tabla 7.

Tabla 7. Propiedades físicas de la marbofloxacina.

| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 115550-35-1 |
| Nombre químico: | Ácido 9-fluoro-2,3-dihidro-3-metil-10-(4-metil-1-piperazinil)-7-oxo- 7H-pirido[3,2,1-ij][4,1,2]benzoxadiazin-6-carboxílico. |
| Solubilidad (*): | 1'88 mol/L a pH 1. |
| Punto de ebullición (*): | 570 °C |
| Punto de fusión (*): | 268 °C |
| Log P (*): | 0'2 |
| pK_a (*): | 6'1 y 7'4 |
| Peso molecular | 362 |
| Dosis | Se administra oralmente a una dosis de 2 mg/kg. |
| LMR | 75 µg/kg para la leche de vaca y no está establecido para músculo de pollo. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

La enrofloxacina es un sólido blanco ligeramente amarillento. Su estructura química es la siguiente:



Sus propiedades más importantes se recogen en la tabla 8.

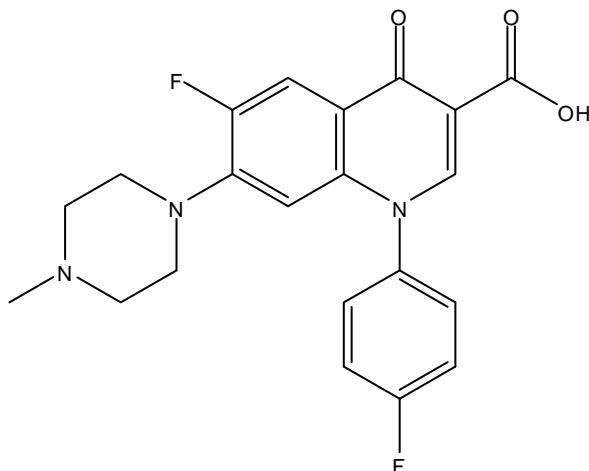
Tabla 8. Propiedades físicas de la enrofloxacina.

| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 93106-60-6 |
| Nombre químico: | Ácido 1-ciclopropil-7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo- 3-quinolincarboxílico. |
| Solubilidad (*): | 0'15 mol/L a pH 1. |
| Punto de ebullición (*): | 560 °C |
| Punto de fusión (*): | 220 °C |
| Log P (*): | 2'5 |
| pK_a (*): | 6'0 y 6'9 |
| Peso molecular | 359 |
| Dosis | De 5 a 10 mg/kg por vía oral o inyección intramuscular. |
| LMR | La suma de enrofloxacina y ciprofloxacina no debe superar los 100 µg/kg. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

Parte 2: Determinación de quinolonas

La difloxacina es un sólido blanco. Su estructura química es la siguiente:



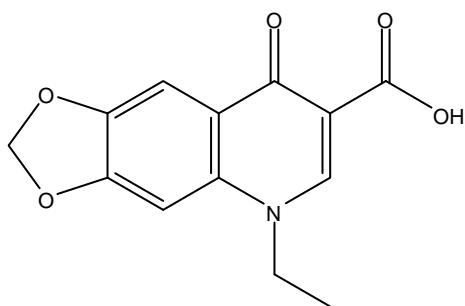
Sus propiedades más importantes se recogen en la tabla 9.

Tabla 9. Propiedades físicas de la difloxacina.

| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 98106-17-3 |
| Nombre químico: | Ácido 6-fluoro-1-(4-fluorofenil)-1,4-dihidro-7-(4-metil-1-piperazinil)-4-oxo- 3-quinolincarboxílico |
| Solubilidad (*): | 0'016 mol/L a pH 1 |
| Punto de ebullición (*): | 595 °C |
| Punto de fusión (*): | 279 °C |
| Log P (*): | 3'7 |
| pK_a (*): | 5'9 y 7'4 |
| Peso molecular | 399 |
| Dosis | De 5 a 10 mg/kg por vía oral |
| LMR | 300 µg/kg en músculo de pollo. No está establecido en muestras de leche de vaca. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

El ácido oxolínico es un sólido blanco. Su estructura química es la siguiente:



Sus características más importantes se recogen en la tabla 10.

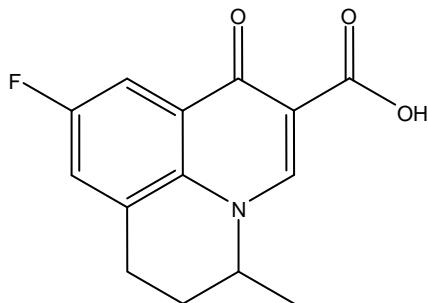
Tabla 10. Propiedades físicas del ácido oxolínico.

| | |
|---------------------------------|--|
| Número CAS: | 14698-29-4 |
| Nombre químico: | Ácido 5-etil-5,8-dihidro-8-oxo- 1,3-dioxolo[4,5-g]quinolin-7-carboxílico. |
| Solubilidad (*): | 3'83 mol/L a pH 10. |
| Punto de ebullición (*): | 473 °C |
| Punto de fusión (*): | 314 °C |
| Log P (*): | 0'9 |
| pK_a (*) | -2'0 y 5'9 |
| Peso molecular | 261 |
| Dosis | 25 mg/kg por vía oral. |
| LMR | 100 µg/kg en músculo de pollo. No está establecido en muestras de leche de vaca. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

Parte 2: Determinación de quinolonas

La flumequina es un sólido blanco microcristalino. Su estructura química es la siguiente:



Sus características más destacables se recogen en la tabla 11.

Tabla 11. Propiedades físicas de la flumequina.

| | |
|---------------------------------|---|
| Número CAS: | 42835-25-6 |
| Nombre químico: | Ácido 9-fluoro-6,7-dihidro-5-metil-1-oxo- 1H,5H-Benzo[ij]quinolizin-2-carboxílico |
| Solubilidad (*): | 2'51 mol/L a pH 10. |
| Punto de ebullición (*): | 439 °C |
| Punto de fusión (*): | 253-255 °C |
| Log P (*): | 2'4 |
| pK_a (*): | -1'9 y 5'7 |
| Peso molecular | 261 |
| Dosis | En el caso de pollos, el fármaco se administra disuelto en el agua de bebida. La dosis suele ser de 12 mg/kg durante 5 días. En el caso de vacas el fármaco se administra mediante inyecciones intramusculares dos veces al día. La dosis inicial es de 12 mg/kg y luego se reduce hasta 6 mg/kg. |
| LMR | 50 µg/kg en leche de vaca y 400 µg/kg para músculo de pollo. |

(*) Datos obtenidos del SciFinder Scholar 2006

11.- Métodos analíticos para la determinación de quinolonas en alimentos

Para poder implementar estas directivas en calidad y seguridad alimentaria son necesarios métodos multirresiduo suficientemente sensibles que proporcionen una determinación fiable de residuos antibacterianos en alimentos de origen animal [209]. En un reciente artículo de revisión se recogen las estrategias analíticas aplicadas específicamente para la detección de residuos de quinolonas en alimentos y muestras ambientales [210]. Tradicionalmente, las quinolonas han sido determinadas por cromatografía líquida [211, 212] empleando detección ultravioleta [213, 214] o fluorescente [215 - 218] aunque para fines reguladores y debido a su inherente capacidad de caracterización se prefiere la espectrometría de masas [219- 222].

A pesar de las posibilidades que presenta la electroforesis capilar (CE) en el análisis de antibióticos [223,224], ha sido poco utilizada, hasta ahora, para la determinación de quinolonas en alimentos. Sus principales aplicaciones se han establecido acoplada con detección ultravioleta para la determinación de flumequina y ácido oxolínico [225], difloxacina y sarafloxacina [226], o danofloxacina, ciprofloxacina, marbofloxacina, enrofloxacina, difloxacina, ácido oxolínico y flumequina [227] en tejido de pollo empleando electroforesis capilar zonal.

La electroforesis en medios no acuosos (NACE) se ha empleado para la determinación de enrofloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, difloxacina, marbofloxacina, flumequina y ácido oxolínico en riñones de cerdo [228]. Como resultado de la baja sensibilidad inherente a la detección UV-Vis se han adoptado diversas estrategias para

-
- [209] Blasco, C., Torres, C.M., Picó, Y., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 895-913.
 - [210] Andreu, V., Blasco, C., Picó, Y., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 534-556.
 - [211] Carlucci, C., *J. Chromatogr. A* 1998, 812, 343-367.
 - [212] Hermo, M. P., Barrón, D., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2006, 1104, 132-139.
 - [213] Bailac, S., Ballesteros, O., Jiménez-Lozano, E., Barrón, D., Sanz-Nebot, V., Navalón, A., Vilchez, J. L., Barbosa, J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1029, 145-151.
 - [214] Turiel, E., Bordin, G., Rodríguez, A. R., *J. Chromatogr. A* 2003, 1008, 145-155.
 - [215] Yang, G., Lin, B., Zeng, Z., Chen, Z., Huang, X., *J. AOAC Int.* 2005, 88, 1688-1694.
 - [216] Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W., *Anal. Chem.* 2001, 73, 3632-3638.
 - [217] Zeng, Z., Dong, A., Yang, G., Chen, Z., Huang, X., *J. Chromatogr. B* 2005, 821, 202-209.
 - [218] Ramos, M., Aranda, A., García, E., Reuvers, T., Hooghuis, H., *J. Chromatogr. B* 2003, 789, 373-381.
 - [219] Volmer, D. A., Mansoori, B., Locke, S.J., *Anal. Chem.* 1997, 69, 4143-4155.
 - [220] Turnipseed, S. B., Roybal, J. E., Pfenning, A. P., Kijak, P. J., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 373-386.
 - [221] Ballesteros, O., Sanz-Nebot, V., Navalón, A., Vilchez, J.L., Barbosa, J., *Chromatographia* 2004, 59, 543-550.
 - [222] Van Hoof, N., De Wasch, K., Okerman, L., Reybroeck, W., Poelmans, S., Noppe, H., De Brabander, H., *Anal. Chim. Acta* 2005, 529, 265-272.
 - [223] Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 793-812.
 - [224] García-Ruiz, C., Marina, M. L., *Electrophoresis* 2006, 27, 266-282.
 - [225] Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Bailac, S., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2003, 477, 21-27.
 - [226] Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Bailac, S., Barbosa, J., *J. Chromatogr. B* 2002, 767, 313-319.
 - [227] Jiménez-Lozano, E., Roy, D., Barrón, D., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 65-73.
 - [228] Hernández, M., Borrull, F., Calull, M., *Electrophoresis* 2002, 23, 506-511.

mejorar los límites de detección. Una de estas estrategias ha sido la detección por fluorescencia inducida por láser que se ha utilizado para determinar enrofloxacina y su metabolito ciprofloxacina en músculo de pollo [229]. Otras estrategias empleadas han sido las técnicas de preconcentración *on-line* como el empleo del denominado *sweeping*, que se utilizó para determinar ciprofloxacina, ofloxacina, y enrofloxacina en tejido de cerdo [230].

Hasta la fecha, según nuestros datos, son escasos los artículos donde se investiga la aplicabilidad de la CE-MS/MS para la separación de quinolonas. En este sentido, McCourt y col. [231] han investigado las condiciones más adecuadas para la separación y detección de danofloxacina, ofloxacina, marbofloxacina, enrofloxacina, enoxacina, ciprofloxacina, cinoxacina, flumequina y norfloxacina. Dicho estudio incluía la optimización de las etapas de lavado y acondicionamiento del capilar, la elección del tampón de separación y del líquido adicional, del voltaje de separación, del voltaje ESI y del voltaje del capilar del espectrómetro de masas, así como del flujo del líquido adicional. Otros factores estudiados fueron la temperatura del capilar electroforético y del capilar MS, el grado en el que el capilar electroforético sobresale de la aguja nebulización y la importancia de llevar a cabo la inyección en ausencia de nebulización. También llevaron a cabo un estudio de fragmentación para averiguar los iones producto más abundantes. El método no fue aplicado a muestras reales. Juan-García y col. [232] han propuesto un método para la determinación de danofloxacina, enrofloxacina, flumequina, ofloxacina, y ácido pipemídico en pollo y pescado empleando como analizadores un cuadrupolo simple y un cuadrupolo-trampa de iones. Estos mismos autores [233] han desarrollado recientemente un método multirresiduo para la determinación de danofloxacina, enrofloxacina, ofloxacina y flumequina junto con cuatro sulfonamidas y cuatro β-lactamas en muestras de pescado y carne de vaca. En este caso el analizador empleado fue una trampa de iones.

[229] Horstkötter C., Jiménez-Lozano E., Barrón D., Barbosa J., Blaschke G., *Electrophoresis* 2002, 23, 3078-3083.

[230] Zhao, Y.-Y., Wang, L.-J., Li, Y.-Q., Han, Y.-Y., Du, G.-L., *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao* 2007, 28, 62-64.

[231] McCourt, J., Bordin, G., Rodríguez, A.R., *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 259-269.

[232] Juan-García, A., Font, G., Pico, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2240-2249.

[233] Juan-García, A., Font, G., Pico, Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 4180-4191.

CAPÍTULO 4

DETERMINACIÓN MULTIRRESIDUO DE QUINOLONAS DE USO
VETERINARIO EN LECHE CRUDA DE VACA MEDIANTE
ELECTROFORESIS CAPILAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS
EN TÁNDEM (CE-MS/MS)

1.- Introducción

La espectrometría de masas (MS) acoplada como sistema de detección a la CE constituye una poderosa herramienta en la que se combina la rapidez del análisis, la elevada resolución y el bajo consumo de muestra que presenta la CE, con la selectividad del análisis y la información estructural proporcionada por la MS [234- 239]. Esta combinación proporciona una segunda dimensión a la separación, ya que los analitos no sólo quedan separados por su relación carga/tamaño (como es el caso de la CZE) sino además en función de su relación masa/carga (m/z). A pesar de los avances y del incremento de aplicaciones que se han producido en la última década, aún son escasas las aplicaciones de CE-MS en análisis cuantitativo. La naturaleza de los compuestos analizados es cada vez más variada, incluyendo aplicaciones en proteómica [240], análisis clínico y forense [241] o análisis de alimentos [242,243]. En este ámbito esta metodología se ha aplicado con éxito al control de residuos de antibióticos [244- 248].

El objetivo de este capítulo es demostrar por primera vez las posibilidades de la electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas en tandem (CE-MS/MS) para cuantificar e identificar simultáneamente las quinolonas legisladas por la Unión Europea (UE) para uso veterinario (danofloxacina, sarafloxacina, difloxacina, flumequina, ciprofloxacina, enrofloxacina, ácido oxolínico y marbofloxacina) en una matriz compleja como la leche cruda de vaca.

Para lograr este propósito, después de seleccionar las condiciones de separación mediante CE, se llevará a cabo una optimización multivariante de la ionización por electrospray (ESI) mediante la aplicación del diseño de experimentos. Aunque esta metodología no es todavía muy común en la optimización de métodos de CE-MS [249,250] representa una interesante alternativa a la tradicional metodología univariante

-
- [234] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837-3867.
 - [235] Ohnesorge, J., Sänger-van de Griend, C., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 2360-2375.
 - [236] Ohnesorge, J., Neusüß, C., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 3973-3987.
 - [237] Schmitt-Kopplin, P., Engmann, M., *Electrophoresis* 2005, 26, 1209-1220.
 - [238] Simó, C., Cifuentes, A., en “Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis”, Marina, M.L., Rios, A., Valcárcel, M. (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 2005, Capítulo 9.
 - [239] Simó, C., Cifuentes, A., en “Electroforesis Capilar: Aproximación según la Técnica de Detección”, Fernández Gutiérrez, A., Segura Carretero, A., (Eds.), Editorial Universidad de Granada, 2006, Capítulo 12.
 - [240] Simpson, D.C., Smith, R.D., *Electrophoresis* 2005, 26, 1291-1305.
 - [241] Franklin, F.W., Brooks, P., *Electrophoresis* 2004, 25, 1413-1446.
 - [242] Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 793-812.
 - [243] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 1306-1318.
 - [244] McCourt, J., Bordin, G., Rosa Rodríguez, A., *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 259-269.
 - [245] Santos, B., Lista, A., Simonet, B.M., Rios, A., M. Valcárcel, *Electrophoresis* 2005, 26, 1567-1575.
 - [246] Juan-García, A., Font, G., Picó, Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 2240-2249.
 - [247] Soto Chinchilla, J.J., García Campaña, A.M., Gámiz Gracia, L.. *Electrophoresis* 2007, 28, 4164-4172.
 - [248] Font, G., Juan-García, A., Picó, Y., *J. Chromatogr., A* 2007, 1159, 233-241.
 - [249] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A. *Electrophoresis* 2004, 25, 2065-2076.
 - [250] Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 948-956.

cuando se deben optimizar diferentes parámetros, al considerar las posibles interacciones o los efectos cuadráticos que pueden encontrarse entre ellos. Además, la metodología del diseño de experimentos puede facilitar la optimización del acoplamiento CE–MS, consiguiendo además un ahorro de tiempo y esfuerzo. Así, ante un número alto de posibles factores influyentes en el sistema, el uso previo de un diseño de cribado permitirá establecer aquellos factores que influyen de forma significativa sobre la respuesta seleccionada, con lo que se podrá reducir el número de parámetros que es necesario optimizar. Por su parte, la utilización de los diseños de superficie de respuesta permitirá obtener la función de respuesta del sistema y el valor óptimo de los factores significativos en la región experimental seleccionada teniendo en cuenta las posibles interacciones entre factores. Todo ello redundará en un mejor conocimiento del proceso de ionización por electrospray y por consiguiente en lograr un espray más eficaz y mejores límites de detección.

Una de las principales dificultades en el desarrollo de un método analítico para matrices complejas es el tratamiento de muestra. Este procedimiento puede llegar a ser bastante complicado cuando están implicados varios analitos con propiedades químicas diferentes. Es el caso de este estudio, se trata establecer un método multirresiduo para todas las quinolonas de uso veterinario reguladas por la UE. Entre ellas aparecen dos tipos claramente diferenciados: las ácidas y las zwitteriónicas. En el caso particular de la determinación de estos antibióticos en muestras de leche, los métodos propuestos normalmente incluyen extracciones en fase sólida (SPE) después de precipitar proteínas mediante la acción de disolventes orgánicos junto con ácidos fuertes orgánicos o inorgánicos [251,252]. Sin embargo, estas condiciones pueden afectar de diferentes maneras la retención de las distintas quinolonas en los cartuchos de SPE seleccionados; por tanto, se deberían desarrollar procedimientos para hacer compatibles las condiciones de retención para todas las quinolonas presentes y obtener así recuperaciones satisfactorias en un método multirresiduo.

En este capítulo se propone lo siguiente: (a) un método de CE–MS/MS sensible y selectivo para la identificación y cuantificación de ocho quinolonas por debajo de los LMRs establecidos por la legislación europea; (b) un exhaustivo conocimiento del proceso de ionización por electrospray realizado mediante un estudio riguroso de las variables instrumentales y químicas involucradas utilizando la metodología del diseño de experimentos; (c) una nueva estrategia para solventar el problema del tratamiento de muestra cuando se tienen que determinar simultáneamente quinolonas ácidas y zwitteriónicas en muestras de leche cruda de vaca. Estos resultados demuestran las posibilidades de la CE–MS/MS dentro del marco europeo de métodos confirmatorios para el análisis de antibióticos en alimentos.

[251] Marazuela, M.D., Moreno-Bondi, M.C. *J. Chromatogr. A* 2004, 1034, 25-32.

[252] Cinquina, A. L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo, F., Draisici, R., Fagiolo, A., Brizioli, N. R. *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 221-226.

2.- Reactivos, disoluciones y material

Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico. Acetonitrilo, metanol, amoníaco e hidróxido sódico se suministraron por Panreac (Madrid, España). Isopropanol, ácido fórmico y acetato amónico fueron proporcionados por Merck (Darmstad, Alemania). Danofloxacina (DAN), sarafloxacina (SAR) y difloxacina (DIF) se obtuvieron de Riedel-de Häen (Séles, Alemania). Flumequina (FLU) y lomefloxacina (LOM), ésta última usada como patrón interno, fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO). Ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENR) y ácido oxolínico (OXO) se adquirieron en Fluka (Buchs, Suiza). Marbofloxacina (MAR) fue amablemente proporcionada por Vetoquinol S.A. (Madrid, España). El agua destilada ($18.2\text{ M}\Omega/\text{cm}$) fue desionizada mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

Una disolución madre, mezcla de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de cada quinolona fue preparada en MeCN/H₂O (1:1) (v/v) y almacenada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botes de color topacio. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua desionizada.

Se utilizaron dos tipos diferentes de cartuchos de SPE para el tratamiento de las muestras: Oasis MAX y HLB (60 mg, 3 mL) (Waters, Mildford, MA).

3.- Instrumentación y programas informáticos

Las separaciones electroforéticas se realizaron en un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector UV-visible que operó a 275 nm con un ancho de banda de 20 nm. La separación se llevó a cabo en capilares de sílice fundida con 96 cm de longitud y 50 μm de diámetro interno (360 μm de diámetro externo) obtenidos de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ).

Se utilizó el nebulizador coaxial Agilent de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS (Agilent Technologies). El líquido adicional fue introducido con una bomba de alta presión Jasco PU-2085 (Jasco Analítica, Madrid, España) equipada con un divisor de flujo 1:100. La detección por espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 1100 Series LC/MSD SL (Agilent Technologies) equipado con un analizador de trampa de iones.

Los electroferogramas UV-visible se realizaron con el programa proporcionado con la HP ChemStation versión A.09.01. El espectrómetro de masas estaba controlado por un PC mediante el programa Esquire 4.1 de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

Se utilizó el programa StatGraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) para generar los diseños de experimentos y procesar los datos.

4.- Procedimiento electroforético propuesto

Para la separación de las ocho quinolonas mediante CE, las inyecciones se realizaron en el lado anódico utilizando una presión de 50 mbar durante 75 s (aprox. el 3% del volumen del capilar, 60 nL). La separación electroforética se realizó con un voltaje de 25 kV (modo normal) con una rampa inicial de 0'3 min. Como tampón de separación se utilizó una disolución acuosa 70 mM de acetato amónico ajustada a pH 9'1 con amoníaco 5 M. La temperatura del capilar se mantuvo constante a 25 °C. En estas condiciones los valores de corriente del capilar estaban entre 35 y 40 µA, con lo que se evitaba la descarga corona y fallos en las separaciones electroforéticas.

Antes de su primer uso, el capilar se acondicionó con NaOH 1 M durante 10 min. a 60 °C, lavándose posteriormente con agua durante 5 min. y finalmente con electrolito fondo durante 20 min. Se aplicó una presión de 1 bar. Diariamente y antes de empezar a utilizar el equipo, el capilar se acondicionaba durante 4 min. con NaOH 0'1 M, lavando a continuación con agua durante 3 min. y finalmente con tampón electroforético durante 5 min., manteniéndose una presión de N₂ de 7 bares. Después de cada análisis, el capilar se acondicionó durante 1 min. con tampón electroforético a 7 bares para mantener una adecuada repetibilidad entre inyecciones.

5.- Interfase ESI

Se utilizó el nebulizador coaxial Agilent de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS (Agilent Technologies). Desde su primera aplicación [253], la interfase coaxial con flujo adicional es la más utilizada. Esta interfase está formada por tres tubos concéntricos: el capilar de separación, que se encuentra rodeado de un tubo de acero inoxidable por el que se hace fluir el líquido adicional (“sheath liquid”) y un tercer tubo por el cual se introduce el gas nebulizador, normalmente nitrógeno, que posibilita la formación del electrospray. Estos tres tubos concéntricos están situados en la cámara de nebulización, la cual se encuentra a una temperatura generalmente comprendida entre 100 y 350 °C. El flujo adicional que se hace pasar por el tubo metálico que rodea el capilar cierra el circuito eléctrico necesario durante la separación por CE, al establecer el contacto eléctrico entre el electrodo situado en el vial de entrada, el capilar y el tubo de acero inoxidable que hace de electrodo de salida. Este tubo metálico sirve además para definir la diferencia de potencial entre la salida del capilar y el electrodo que se encuentra a la entrada del espectrómetro de masas. Con el flujo adicional además se consigue aumentar el flujo necesario para que la interfase ESI funcione de modo adecuado originando un electrospray estable, ya que aumenta el flujo con el que típicamente se trabaja en la separación por CE, obteniéndose flujos del orden de los mL/min.

[253] Smith, R.D., Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Udseth, H.R., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1948-1952.

El capilar se instaló de manera que la punta del mismo sobresalía de la aguja de acero que lo envuelve, aproximadamente, un cuarto del diámetro externo del capilar. El líquido adicional consistía en una mezcla de isopropanol, agua y ácido fórmico (50:49:1 v/v/v). El voltaje ESI se estableció en -4 kV. Otros parámetros del electrospray en condiciones óptimas fueron los siguientes: presión de nebulización de 10 psi, flujo de gas de secado de 6 L/min y temperatura del gas de secado 150 °C. Para evitar la entrada de burbujas de aire durante el paso de inyección, debido al efecto Venturi causado por el gas nebulizador, fue necesario acondicionar e introducir la muestra con la presión de nebulización y un valor del voltaje del ESI de cero, y antes de establecer los valores óptimos del gas de espray y del voltaje ESI, se introdujo un retraso de 2 min. después de comenzar a aplicarse el voltaje de separación.

6.- Condiciones MS y MS/MS

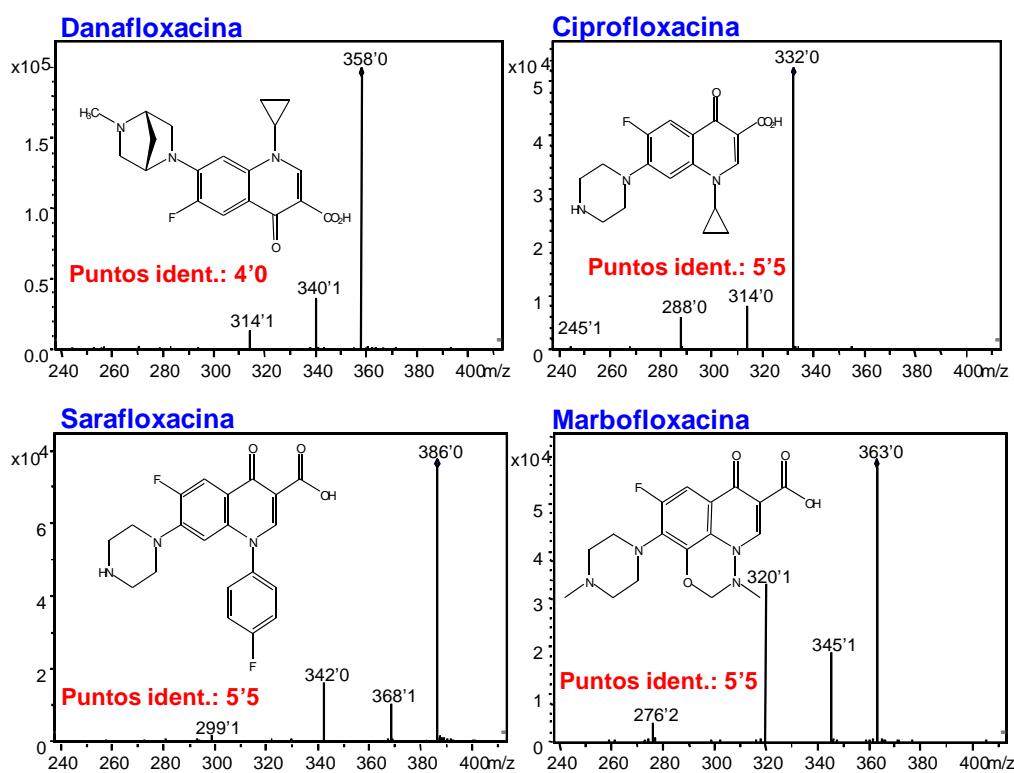
El espectrómetro de masas operó en modo positivo y escaneó entre 190-410 m/z (masa objetivo 360 m/z , estabilidad del compuesto 100%) a 13.000 $m/z/s$. En los experimentos MS, los parámetros de la trampa se seleccionaron con el modo de control de carga activado utilizando un objetivo de 50.000 y un tiempo de acumulación máximo de 300 ms., se hicieron 5 medias por experimento. En los experimentos de MS/MS, el tiempo de acumulación máximo se estableció en 50 ms., utilizando 2 medias por experimento para poder obtener 10 espectros por pico.

La fragmentación se realizó por medio de disociaciones inducidas por colisión (CID) con el helio presente en la trampa durante 40 ms. en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). Los parámetros obtenidos en MS/MS se recogen en la tabla IV-1 y los espectros MS/MS y sus correspondientes estructuras se muestran en la figura IV-1.

Parte 2: Determinación de quinolonas

Tabla IV-1. Principales parámetros del método de MS/MS y puntos de identificación obtenidos.

| | Segmentos de tiempo (min.) | | | | | | | | | |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-------|-----------|---|
| | 0-13'0 | | 13'0-13'9 | | | 13'9-15'2 | | | 15'1-18'0 | |
| | LOM | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU | |
| Anchura (<i>m/z</i>) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Límite (<i>m/z</i>) | 96 | 98 | 106 | 91 | 99 | 98 | 110 | 71 | 71 | |
| Amplitud (V) | 0'7 | 0'7 | 0'7 | 0'6 | 0'6 | 0'7 | 0'7 | 0'5 | 0'5 | |
| Ion precursor | 352'1 | 358'1 | 386'0 | 332'1 | 363'1 | 360'1 | 400'0 | 262'0 | 262'0 | |
| Iones fragmento | 334'1 308'1 288'2 265'1 | 340'1 314'2 342'2 299'1 | 368'1 314'1 288'2 245'1 | 314'1 320'0 316'1 276'1 | 345'1 342'1 356'2 245'1 | 342'1 382'1 356'2 299'3 | 382'1 244'0 244'1 | | | |
| Puntos ident. | 7 | 4 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 2'5 | 2'5 | |



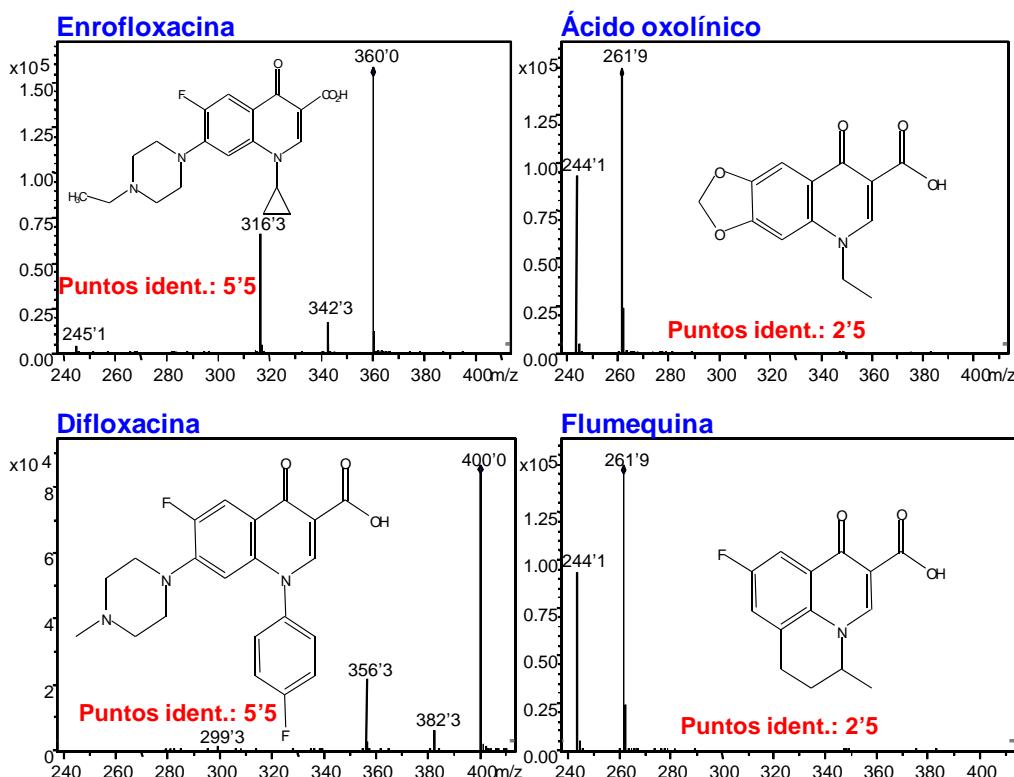


Figura IV-1. Espectros MS/MS de las quinolonas estudiadas y sus correspondientes estructuras.

7.- Preparación de la muestra de leche

La leche cruda de vaca se obtuvo de una granja local. Previamente a la aplicación del procedimiento de SPE, las muestras de leche se trataron como se indica a continuación: Se pesó con exactitud en un tubo de ensayo una alícuota de 5 g de leche cruda de vaca y se añadieron alícuotas de disoluciones de las ocho quinolonas a diferentes niveles de concentración. Sobre esta alícuota se añadieron 400 µL de NH₃ concentrado y la mezcla se agitó durante unos 10 s. A continuación, se tomó una alícuota de 2'5 mL de esta mezcla y adicionó a dos viales Eppendorf. Los viales se centrifugaron durante 10 min a 18.000 rpm, y después se eliminó la grasa sólida con una espátula. Se hizo pasar una alícuota de 2 mL de la muestra resultante a través de un cartucho Oasis MAX (60 mg, 3 mL) que había sido previamente activado con 2 mL de metanol y 2 mL de una solución acuosa al 2% en NH₃. Tras pasar la muestra, el cartucho fue lavado con 2 mL de una solución acuosa al 2% en NH₃ y 1 mL de una solución al 2% de NH₃ en acetonitrilo para eliminar las sales y proteínas. Finalmente, el cartucho se secó a vacío y se llevó a cabo la elución con 3 mL de una disolución al 2% de ácido fórmico en MeOH. El eluato se recogió en un vial de 4 mL y se concentró hasta sequedad a 40 °C bajo una ligera corriente de nitrógeno. El extracto se reconstituyó en 3 × 1 mL de tampón fosfato 50 mM de pH 7 y se hizo pasar por un cartucho Oasis HLB (60 mg, 3 mL) que había sido previamente acondicionado con 2 mL de MeOH y 2 mL de agua. Después, el cartucho se lavó con 2 mL de agua y se secó a vacío. Las quinolonas se eluyeron del cartucho

con 3 mL de MeOH. El eluato se evaporó hasta sequedad mediante una corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituyó en 250 μ L de una solución de NH₃ 1 M en agua que contenía 1 μ g/mL de LOM como patrón interno (IS). Finalmente el extracto se filtró a través de una membrana de nylon de 0'22 μ m y se inyectó en el sistema CE.

8.- Resultados y discusión

8.1.- Optimización de la separación electroforética

Para acoplar un método electroforético con la detección por espectrometría de masas se han de tener en cuenta algunas consideraciones iniciales. Por ejemplo, se requiere el empleo de un tampón volátil de baja conductividad (corriente eléctrica inferior a 50 μ A) tanto para evitar problemas eléctricos entre la cámara de espray y el espectrómetro de masas, como para obtener un espray estable. Por ello, como un paso previo que nos permita establecer unas condiciones adecuadas para el establecimiento del método CE-MS, antes del acoplamiento con el espectrómetro de masas se realizó una optimización de la separación electroforética utilizando un detector UV-visible.

Para elegir un tampón adecuado, se tuvieron en cuenta datos bibliográficos y los valores de pK de las quinolonas [254], llegándose a la conclusión de que se pueden conseguir adecuadas separaciones entre las quinolonas con tampones básicos; por ello, sólo se estudiaron tampones de acetato amónico y carbonato amónico. Finalmente se seleccionó el primero de ellos porque se obtuvieron mejores formas de pico (figura IV-2).

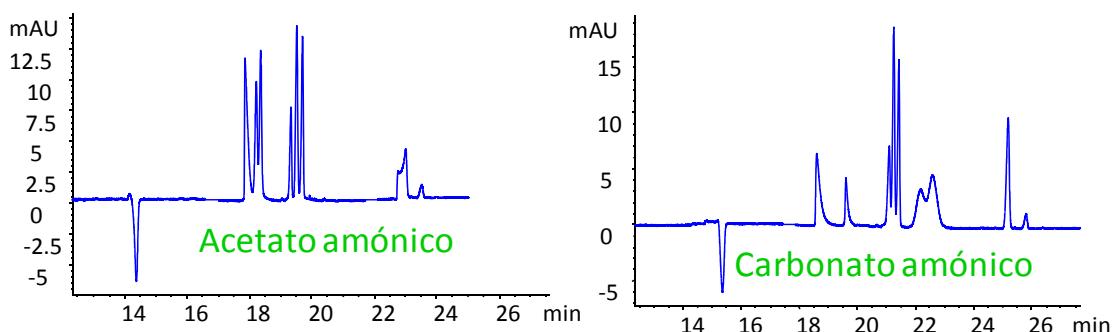


Figura IV-2. Selección de la naturaleza del tampón. Condiciones: concentración, 50 mM; pH, 9; capilar, 96'5 cm (longitud total) x 50 μ m (diámetro interno); voltaje, 20 kV; temperatura, 25 °C; concentración de cada quinolona en la disolución, 100 μ g/mL; inyección, 50 mbar x 5 s; longitud de onda, 275 nm.

Con este tampón se realizó un estudio sistemático del efecto del pH entre 8 y 10; seleccionándose un pH de 9'1 porque con él se consiguió la mejor resolución entre las

[254] McCourt, J., Bordin, G., Rodríguez, A.R. *J. Chromatogr. A* 2003, 990, 259-269.

ocho quinolonas (figura IV-3). Aunque las quinolonas que comigran pueden ser separadas por espectrometría de masas, se prefirió iniciar el estudio con una mínima resolución para evitar problemas de supresión de la ionización y porque es más fácil insertar segmentos de tiempo con diferentes condiciones MS/MS en el modo MRM.

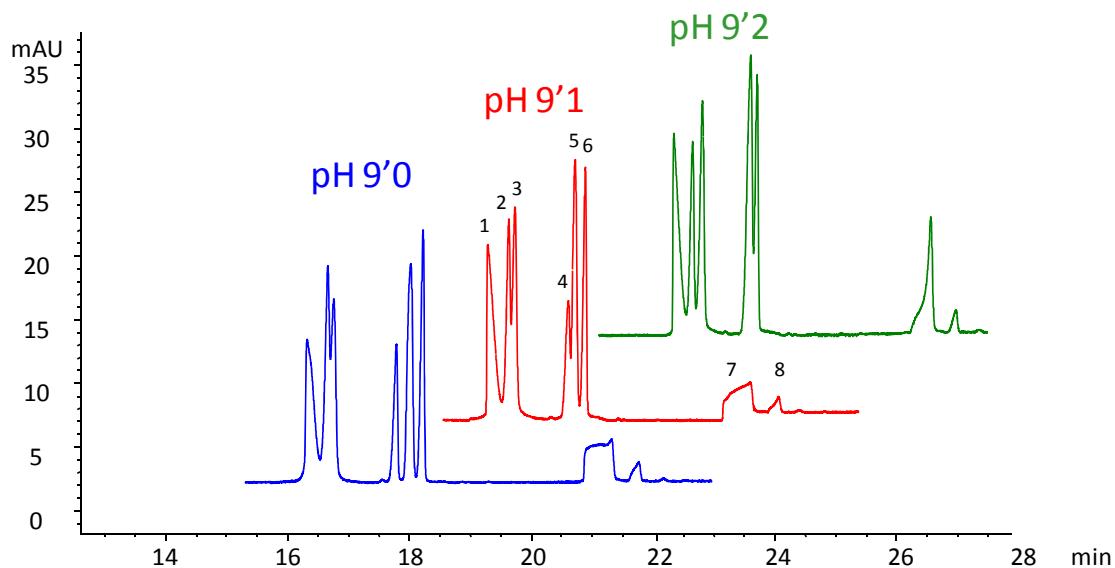


Figura IV-3. Optimización del pH de separación. El resto de condiciones son iguales que en la figura IV-2. Identificación de picos: 1, danofloxacina; 2, sarafloxacina; 3, ciprofloxacina; 4, marbofloxacina; 5, enrofloxacina; 6, difloxacina; 7, ácido oxolínico; 8, flumequina.

La concentración óptima de tampón fue 70 mM porque se consigue una buena solución de compromiso entre la forma de pico, la intensidad de la corriente eléctrica y el tiempo de análisis (figura IV-4).

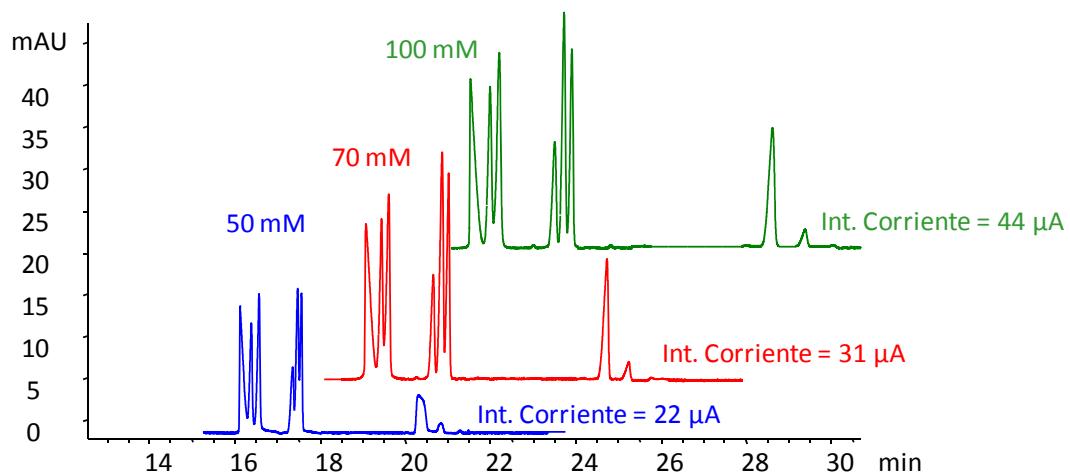


Figura IV-4. Optimización de la concentración de tampón. El resto de condiciones fueron iguales que en la figura IV-2.

Parte 2: Determinación de quinolonas

También se optimizó el voltaje de separación y se seleccionó un valor de 25 kV porque mayores voltajes aumentaban la corriente eléctrica a valores por encima de 50 μ A y no se observó una mejora significativa en el tiempo de análisis o en la resolución (figura IV-5).

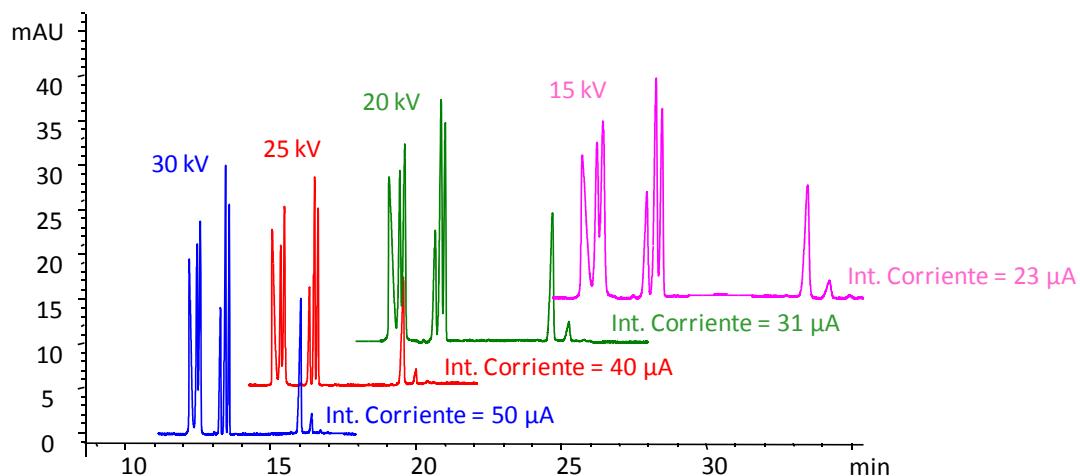


Figura IV-5. Optimización del voltaje de separación. El resto de condiciones fueron iguales que en la figura IV-2.

Finalmente, la temperatura se fijó a 25 °C porque a menores temperaturas empeoraba la resolución entre MAR, ENR y DIF mientras que a temperaturas más altas empeoraba la resolución entre DAN, SAR y CIP (figura IV-6).

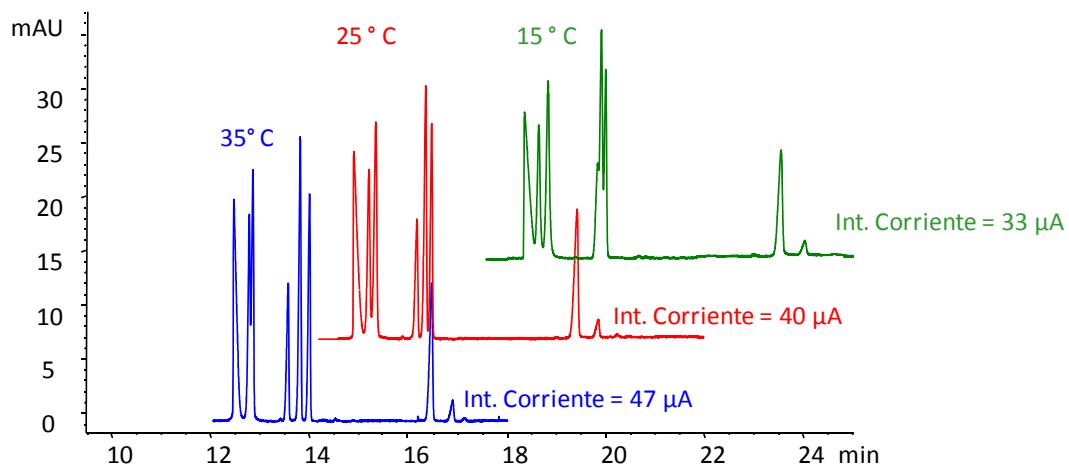


Figura IV-6. Optimización de la temperatura de separación. El resto de condiciones fueron iguales que en la figura IV-2.

La adición de modificadores orgánicos, tales como acetonitrilo o metanol, no mejoró la resolución entre las quinolonas; por tanto, no se emplearon.

La figura IV-7 muestra un electroferograma utilizando la detección UV-visible en las condiciones óptimas de separación.

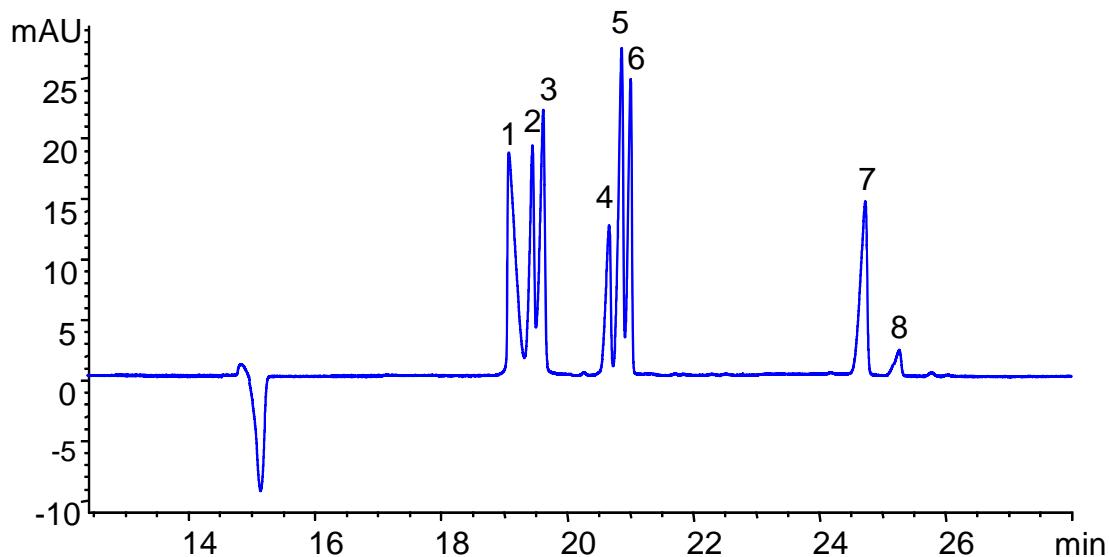


Figura IV-7. Separación de las quinolonas. Las condiciones experimentales se optimizaron con detección UV-visible: 70 mM acetato amónico a pH 9'1; voltaje de separación, 25 kV; temperatura del capilar, 25 °C; longitud de onda, 275 nm; inyección, 50 mbar × 10 s; longitud del capilar, 96'5 cm. Identificación de picos: (1) DAN, (2) SAR, (3) CIP, (4) MAR, (5) ENR, (6) DIF, (7) OXO y (8) FLU (100 µg/mL de cada quinolona).

8.2.- Optimización CE-ESI-MS/(MS)

En primer lugar, fue necesario seleccionar la naturaleza del disolvente orgánico presente en el líquido adicional. Se probaron mezclas binarias de acetonitrilo, metanol, etanol e isopropanol con agua, todos ellos en proporción 1:1 v/v y con 1% de ácido fórmico. Los mejores resultados en términos de intensidad de las señales MS para las quinolonas estudiadas se consiguieron utilizando una mezcla isopropanolagua (figura IV-8).

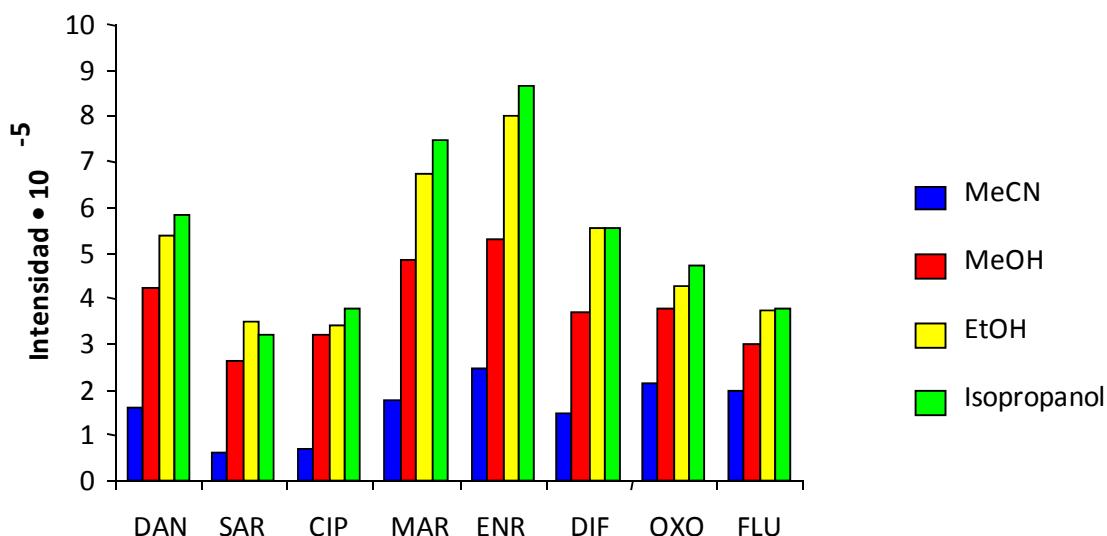


Figura IV-8. Optimización de la naturaleza del disolvente orgánico en el líquido adicional.

Con estas condiciones, y con el objetivo de detectar las variables del electrospray que influyen en la respuesta analítica, se llevó a cabo la media fracción de un diseño factorial para seis factores, 2^{6-1} , en dos bloques más tres puntos centrales por bloque (38 experiencias).

La respuesta seleccionada fue la relación señal/ruido de DAN ya que esta quinolona presenta el LMR más bajo en la legislación europea para muestras de leche. El rango de valores seleccionado para las diferentes variables estudiadas en el diseño fue: presión de nebulización (2–10 psi), flujo de gas de secado (2–10 L/min), temperatura de gas de secado (50–300 °C), flujo de líquido adicional (2–8 µL/min), porcentaje de isopropanol en el líquido adicional (20–80%) y porcentaje de ácido fórmico en el líquido adicional (0'2–1'5 %). Los intervalos estudiados de estos parámetros se escogieron por diferentes restricciones tales como la estabilidad del espray o limitaciones instrumentales.

Aunque previamente en bibliografía ya se había utilizado un diseño de cribado [249] para el estudio de las variables que afectan al electrospray utilizando la inyección directa, en el presente trabajo, se ha utilizado por primera vez una aproximación más realista que implica el estudio de los efectos bajo condiciones de separación electroforéticas. El estudio y las conclusiones del diseño se obtuvieron bajo las mismas condiciones instrumentales que se aplicarán en posteriores experimentos utilizando CE-MS para establecer el método analítico. Además, para obtener resultados válidos, es necesario utilizar la misma respuesta tanto en el diseño de cribado, para seleccionar los factores significativos, como en el diseño de superficie de respuesta para optimizar estos valores.

A partir del diseño de cribado se obtuvo una gráfica de Pareto (figura IV-9), en la que puede verse que, en el intervalo estudiado, ni el porcentaje de ácido fórmico ni la

temperatura de gas de secado producen efectos significativos sobre la relación señal/ruido de DAN. Una explicación posible para comprender el efecto no significativo del primero de los factores podría ser que, incluso cuando se utilizó el 0'2% de ácido fórmico, esta quinolona se encontraba totalmente en su forma catiónica, por lo que un aumento en este valor no mejoraba la relación señal/ruido. Una explicación similar podría sugerirse para comprender el efecto no significativo de la temperatura del gas de secado; ya que incluso a 50 °C se consiguió una desolvatación completa. Para experimentos posteriores, las condiciones asociadas a estos dos factores se fijaron a valores cercanos al punto central del diseño de experimentos, correspondiendo al 1% de ácido fórmico y 150 °C de temperatura de gas de secado, al considerar que valores extremos dentro de la región experimental deberían evitarse porque ligeras desviaciones de las condiciones operacionales podrían afectar a la robustez del método.

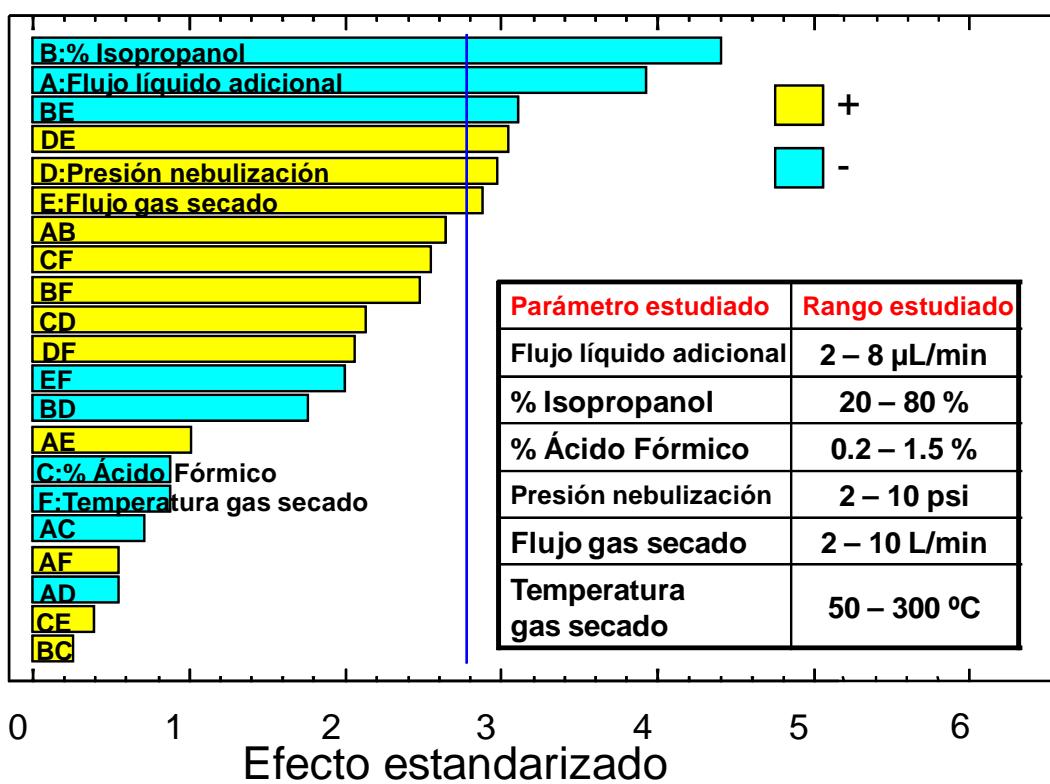


Figura IV-9. Gráfica de Pareto obtenida del diseño de cribado en el estudio de las variables significativas sobre la relación señal/ruido de DAN para las condiciones del ESI. (+) Efectos positivos sobre la respuesta; (-) efectos negativos sobre la respuesta. La línea vertical muestra el límite de decisión para considerar los efectos significativos (se basa en el efecto estandarizado = efecto estimado/error estándar, valor de $P = 0'05$ a un nivel de confianza del 95%).

Otras conclusiones interesantes que pueden extraerse del estudio fueron los signos (positivos o negativos) de los principales efectos en la respuesta. Como se puede ver en la figura IV-9, un aumento en el porcentaje de isopropanol producía un efecto negativo en la respuesta; esto es sorprendente, pues se esperaba encontrar el efecto contrario, ya que un aumento en el porcentaje de isopropanol debería causar un mejor proceso de desolvatación. El resto de los factores principales tuvieron el signo esperado, por ejemplo, el aumento en el flujo de líquido adicional producía una menor respuesta, quizás debido a un aumento en la dilución del DAN en el espray. Por su parte, la presión de nebulización y el flujo de gas de secado tuvieron un efecto positivo en la respuesta. Estos hechos se pueden explicar si consideramos que una presión de nebulización alta produce gotas más pequeñas en el espray, y por tanto, el proceso de desolvatación tendría lugar más fácilmente; un resultado similar puede observarse si el gas de secado aumenta. Es importante resaltar que tanto la interacción entre el porcentaje de isopropanol y el flujo de gas de secado como la producida entre la presión de nebulización y el flujo de gas de secado fueron significativas, mostrando la conveniencia de utilizar la metodología del diseño de experimentos en este proceso de optimización multivariante.

La figura IV-10 muestra las interacciones antes señaladas. En la figura IV-10(A) se puede ver que cuando el porcentaje de isopropanol en el líquido adicional es bajo, se necesita un mayor flujo de gas de secado para obtener mejores relaciones señal/ruido. Este comportamiento podría explicarse considerando que es más difícil evaporar agua que isopropanol; por tanto, se necesita un mayor flujo de gas de secado para conseguir una completa desolvatación de las moléculas de DAN.

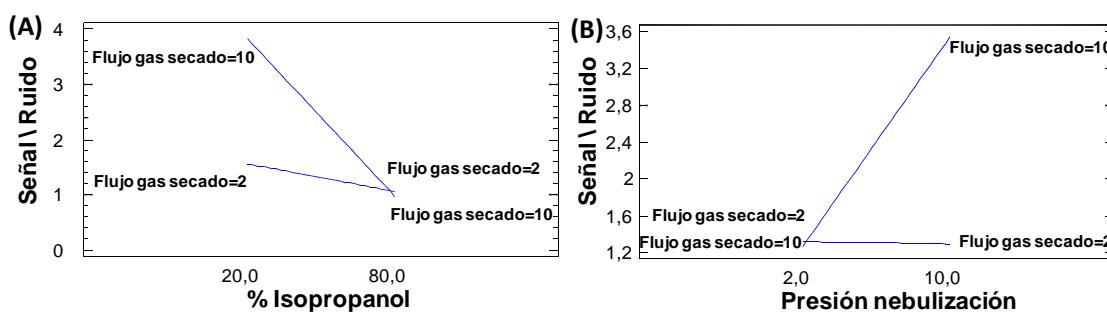


Figura IV-10. Gráfica de interacciones para (A) % isopropanol-flujo de gas de secado y (B) presión de nebulización-flujo de gas de secado.

La figura IV-10(B) muestra que los mejores resultados en términos de relación señal/ruido se obtienen cuando se aplican presiones de nebulización y flujos de gas secado altos. La limitación está impuesta por la estabilidad del espray porque si la presión de nebulización y el flujo de gas de secado son demasiado altos se puede secar la punta del capilar, especialmente cuando se utilizan elevados porcentajes de isopropanol, y no sería posible cerrar el circuito eléctrico.

El paso siguiente fue la optimización de los factores significativos identificados. Esta tarea se realizó por medio de un diseño Doehlert [255] para cuatro factores con tres puntos centrales (23 experiencias) (tabla IV-2).

Tabla IV-2. Matriz del diseño Doehlert para la optimización de los factores influentes en la detección por MS.

| Experiencia | Presión nebulización(psi) | % Isopropanol | Flujo líquido adicional ($\mu\text{L}/\text{min}$) | Flujo gas secado (L/min) |
|-------------|---------------------------|---------------|--|--------------------------|
| 1 | 6 | 23 | 30 | 6 |
| 2 | 10 | 23 | 30 | 6 |
| 3 | 8 | 46 | 30 | 6 |
| 4 | 8 | 31 | 45 | 6 |
| 5 | 8 | 31 | 34 | 9'2 |
| 6 | 2 | 23 | 30 | 6 |
| 7 | 4 | 0 | 30 | 6 |
| 8 | 4 | 15 | 15 | 6 |
| 9 | 4 | 15 | 26 | 2'8 |
| 10 | 8 | 0 | 30 | 6 |
| 11 | 8 | 15 | 15 | 6 |
| 12 | 6 | 23 | 30 | 6 |
| 13 | 8 | 15 | 26 | 2'8 |
| 14 | 4 | 46 | 30 | 6 |
| 15 | 6 | 39 | 15 | 6 |
| 16 | 6 | 39 | 26 | 2'8 |
| 17 | 4 | 31 | 45 | 6 |
| 18 | 6 | 8 | 45 | 6 |
| 19 | 6 | 23 | 41 | 2'8 |
| 20 | 4 | 31 | 34 | 9'2 |
| 21 | 6 | 8 | 34 | 9'2 |
| 22 | 6 | 23 | 19 | 9,2 |
| 23 | 6 | 23 | 30 | 6 |

En este caso, el porcentaje de isopropanol en el líquido adicional (0–50%) y el flujo de líquido adicional (2–8 $\mu\text{L}/\text{min}$) se estudiaron a siete niveles, la presión de nebulización (2–10 psi) a cinco niveles, y el flujo de gas de secado (3–9 L/min) a tres. La respuesta analítica a optimizar era la misma que se utilizó en el diseño de cribado anterior. Las superficies de respuesta correspondientes a las interacciones significativas se muestran en la figura IV-11. Los valores óptimos se recogen en la tabla IV-3.

[255] Doehlert, D.H. *Appl Statist.*, 1970, 19, 231-239.

Tabla IV-3. Valores óptimos obtenidos en el proceso de optimización multivariante.

| | Presión nebulización | % Isopropanol | Flujo líquido adicional | Flujo gas secado |
|--------------|----------------------|---------------|-------------------------|------------------|
| Valor óptimo | 10 psi | 50 % | 3 μ L/min | 6 L/min |

La prueba del fallo de ajuste para el modelo dio un valor de P del 50% y el coeficiente de determinación (R^2) fue del 88%, lo que indicaba que el modelo predicho se ajustaba satisfactoriamente a los datos experimentales.

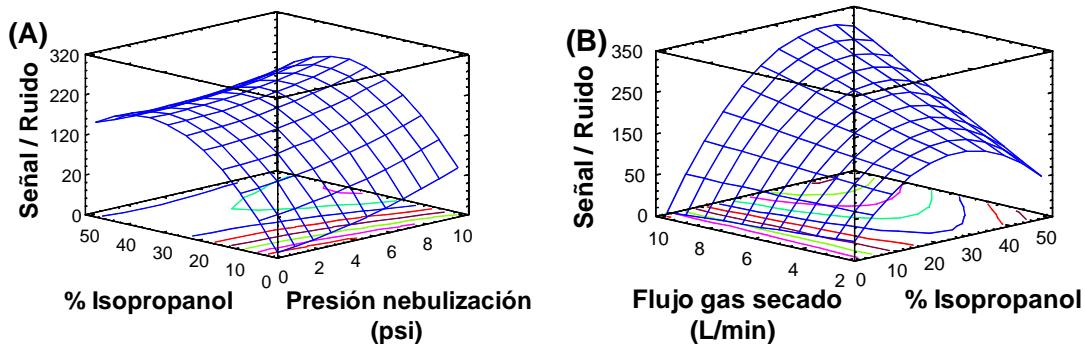


Figura IV-11. Superficies de respuesta estimadas con el procedimiento de optimización utilizando un diseño Doehlert. (A) % isopropanol–presión de nebulización y (B) flujo de gas de secado–% de isopropanol.

Una vez que las condiciones para el espray se habían establecido utilizando el modo MS, se llevó a cabo la optimización del modo MS/MS. Teniendo en cuenta que algunos picos no estaban suficientemente resueltos, el modo *multiple reaction monitoring* (MRM) era la opción preferida. Para los experimentos de fragmentación, se seleccionó un límite del 27 % de la masa precursora, es decir, la mínima m/z del ión fragmento capaz de ser captada por el analizador. Las quinolonas fueron fragmentadas utilizando la opción *SmartFrag* que eleva automáticamente la energía de fragmentación desde 30 hasta el 200 % de la amplitud de excitación. La amplitud de fragmentación se varió manualmente y se optimizó monitorizando las intensidades de los iones fragmento para alcanzar un máximo que permitiera seguir viendo el ión precursor en la trampa. En estas condiciones se observaron pérdidas de CO₂ y H₂O para DAN, SAR, CIP, ENR y DIF. MAR exhibió pérdidas de CH₃CO y H₂O, y OXO y FLU sólo perdieron H₂O. Desafortunadamente, no fue posible alcanzar el número mínimo de puntos de identificación requeridos por la UE [256] en el caso de OXO y FLU. Ni siquiera con experimentos de MS³ se consiguieron ver fragmentos adicionales. Los resultados de este estudio ya se han mostrado en la figura IV-1.

[256] Commision Decision 2002/657/EEC, *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L 221, 23-33.

Previamente a la optimización del procedimiento de tratamiento de muestra, se llevó a cabo la selección del patrón interno. La utilización de un compuesto con propiedades similares a las de los analitos estudiados puede ser muy útil cuando se intenta cuantificar con CE-MS [257]. LOM fue seleccionada como patrón interno porque es una quinolona de uso en humanos, por tanto, se supone que no se encontrará en muestras de leche cruda de vaca; además, su tiempo de migración es adecuado porque no incrementa el tiempo de análisis y no interfiere con las quinolonas u otros picos de la matriz.

8.3.- Optimización del tratamiento de muestra

Para aplicar el método optimizado en muestras de leche cruda de vaca, es necesario desarrollar un procedimiento de tratamiento de muestra. Se han adoptado diferentes estrategias para extraer las quinolonas de fluidos biológicos lo que incluye la extracción directa con disolventes después de ajustar el pH de la muestra, y extracción después de precipitar las proteínas. La extracción directa con disolventes no se aplicó porque se formaba una fuerte emulsificación de las muestras de leche como ya indicaron Idowu y Peggins [258]. Estos autores propusieron un método basado en la precipitación de proteínas mediante la adición de acetonitrilo y ácido fosfórico, obteniendo buenas recuperaciones para ENR y CIP; desafortunadamente este método no es adecuado para las quinolonas ácidas debido a la utilización de diclorometano en condiciones ácidas y además no se conseguía una preconcentración extra.

La utilización de cartuchos de SPE permite un incremento en la sensibilidad preconcentrando la muestra y eliminando las interferencias de la matriz. Esta alternativa ha demostrado ser válida para la determinación de quinolonas en carne [251,259,260], leche [251,252,261], huevos [262], aguas residuales [263-265] y fluidos biológicos [266].

En este capítulo se ha llevado a cabo un riguroso estudio probando diferente cartuchos de SPE: un cartucho de intercambio catiónico (MCX), una fase polimérica (HLB) y un cartucho de intercambio aniónico (MAX), todos ellos de la marca Oasis®. Los procedimientos de SPE para los cartuchos MAX y HLB se han descrito en la sección de

-
- [257] Ohnesorge, J., Sänger-van de Griend, C., Wätzig, H. *Electrophoresis* 2005, 26, 2360-2375.
 - [258] Idowu, O. R., Peggins, J. O. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35, 143-153.
 - [259] Cinquina, A. L., Roberti, P., Giannetti, L., Longo, F., Draisici, R., Fagiolo, A., Brizioli, N. R. *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 221-226.
 - [260] Jiménez-Lozano, E., Roy, D., Barrón, D., Barbosa, J. *Electrophoresis* 2004, 25, 65-73.
 - [261] Ho, C., Sin, D. W. M., Tang, H. P. O., Chung, L. P. K., Siu, S. M. P. *J. Chromatogr. A* 2004, 1061, 123-131.
 - [262] Samanidou, V. F., Christodoulou, E. A., Papadoyannis, I. N. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 555-565.
 - [263] Turiel, E., Bordin, G., Rodríguez, A. R. *J. Chromatogr. A* 2003, 1008, 145-155.
 - [264] Golet, E. M., Alder, A. C., Hartmann, A., Ternes, T. A., Giger, W. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3632-3638.
 - [265] Ferdig, M., Kaleta, A., Vo, T. D. T., Buchberger, W. *J. Chromatogr. A* 2004, 1047, 305-311.
 - [266] Hernández, M., Borrull, F., Calull, M. *J. Chromatogr. B* 2000, 742, 255-265.

preparación de muestra. Cuando se utilizaron cartuchos MCX, el procedimiento fue el siguiente: acondicionamiento de los cartuchos con 2 mL de MeOH y 2 mL de H₂O, carga de muestra, lavado con 2 mL de una solución acuosa al 2% de ácido fórmico, y elución final con 3 mL de una solución metanólica al 2% de NH₃. Los otros pasos fueron similares a los descritos para los otros cartuchos.

Era necesario controlar el pH de la muestra para conseguir una retención óptima de las quinolonas (figura IV-12). Con los cartuchos MCX, fue posible retener las quinolonas desde pH ácidos hasta pH 7; con los cartuchos HLB, el valor óptimo de retención se conseguía a pH 7, observándose elución de las quinolonas a valores de pH ácidos y básicos. En el caso de los MAX, era posible la retención de todas las quinolonas por encima de pH 9; a pH 7, sería posible retener todas las quinolonas excepto el CIP. Estos resultados podrían explicar las bajas recuperaciones obtenidas para este analito con este tipo de cartuchos [260]. Considerando que el pH de la leche está entre 6 y 7, sería posible aplicar muestras de leche directamente en el cartucho sin necesidad de ajustar el pH en el caso de los cartuchos MCX y HLB. Si se utilizaban cartuchos MAX, sin embargo, sería necesario añadir a las muestras de leche NH₃ hasta que su concentración fuese del 2%.

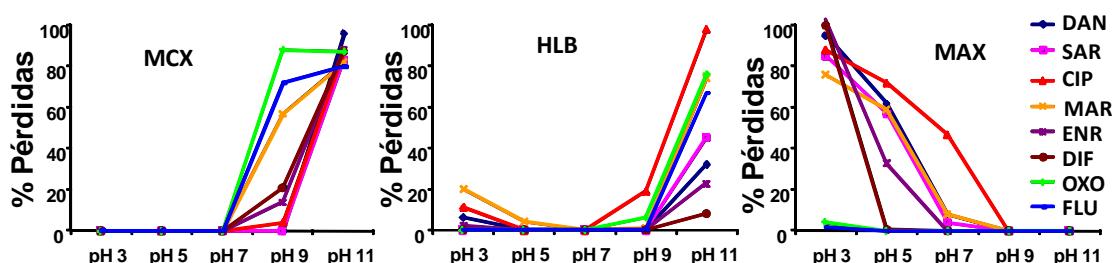


Figura IV-12. Estudio de la influencia del pH de la muestra en la retención de las quinolonas sobre tres cartuchos diferentes: MCX, HLB y MAX.

Después de centrifugar las muestras de leche a 18.000 rpm durante 10 min. y eliminar la grasa, la porción acuosa se vertió en los diferentes cartuchos utilizando los procedimientos descritos para cada uno. No se observaron picos en el caso de los cartuchos MCX (figura IV-13), quizás debido a la unión de las quinolonas con las proteínas de la leche. Los intentos de eliminar las proteínas con ácidos fuertes en disolventes orgánicos no proporcionaron buenos resultados; así que estos cartuchos fueron descartados.

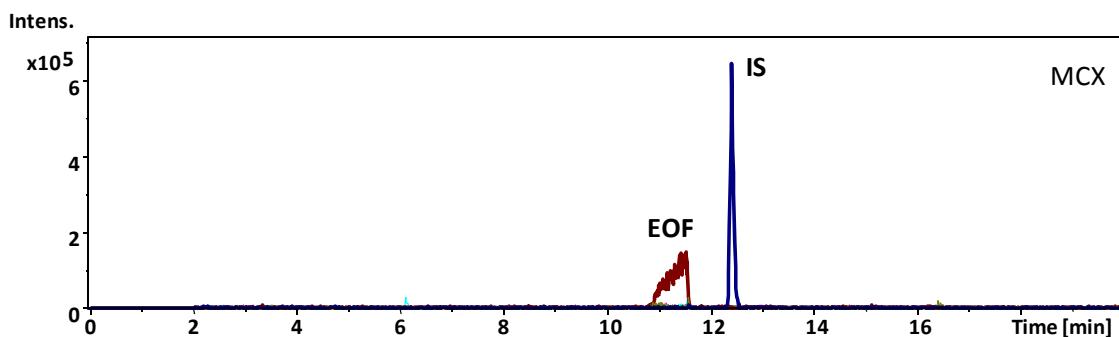


Figura IV-13. Electroferograma de una muestra de leche dopada con 25 ng/mL de cada quinolona tras ser sometida a un procedimiento de SPE empleando cartuchos MCX. Como IS se usó LOM (1 µg/mL) añadido en el momento de la recomposición.

En el caso de los cartuchos HLB, se obtuvieron buenas formas de pico pero las recuperaciones fueron aproximadamente del 50% para todas las quinolonas, quizás porque era necesaria una etapa previa de limpieza para eliminar las proteínas y las grasas remanentes (figura IV-14).

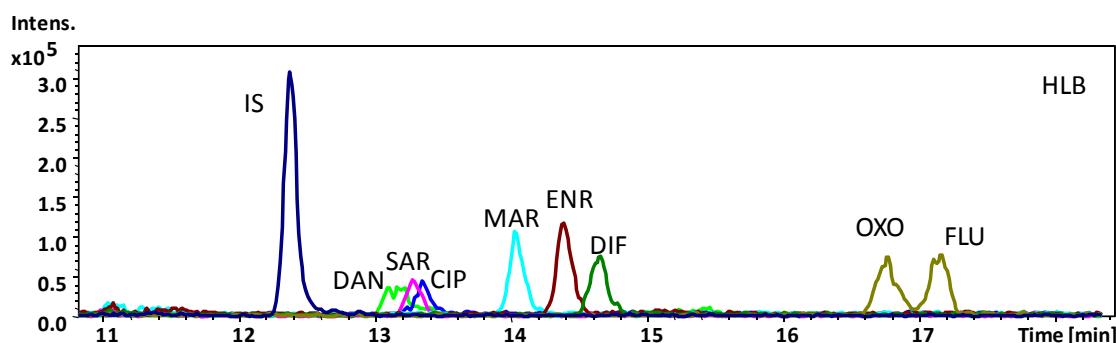


Figura IV-14. Electroferograma de una muestra de leche dopada con 25 ng/mL de cada quinolona tras ser sometida a un procedimiento de SPE empleando cartuchos HLB. Como IS se usó LOM (1 µg/mL) añadido en el momento de la recomposición.

Cuando se utilizaron los cartuchos MAX (figura IV-15), se obtuvieron recuperaciones superiores al 90% para todas las quinolonas, pero las formas de pico eran bastante malas (picos anchos y bajos) porque los extractos tenían una alta conductividad y no se producía un efecto de apilamiento (*stacking*).

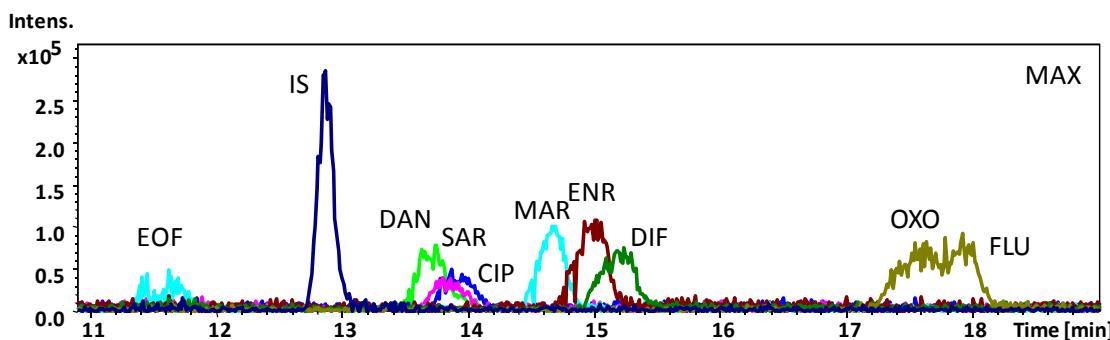


Figura IV-15. Electroferograma de una muestra de leche dopada con 25 ng/mL de cada quinolona tras ser sometida a un procedimiento de SPE empleando cartuchos MAX. Como IS se usó LOM (1 μ g/mL) añadido en el momento de la recomposición.

A partir de estos resultados, se planteó que un paso previo en el que sólo se retuvieran las sustancias neutras o zwitteriónicas podría resolver este problema. Por estas razones se propuso un procedimiento de SPE en dos pasos: en el primero, los cartuchos MAX eran utilizados para eliminar las proteínas y la grasa remanente mediante una etapa de lavado utilizando una solución de NH₃ al 2% en acetonitrilo, los extractos así obtenidos, más limpios, eran utilizados después en un segundo paso que empleaba los cartuchos HLB para eliminar las sales. Este procedimiento operatorio proporcionó buenos resultados en términos de recuperación y formas de pico, y se obtuvo un factor de preconcentración de 8; por tanto, fue adoptado para la validación del método optimizado en muestras de leche cruda de vaca.

En la figura IV-16 se muestran electroferogramas de ión total de muestras de leche cruda de vaca dopada a diferentes niveles de concentración.

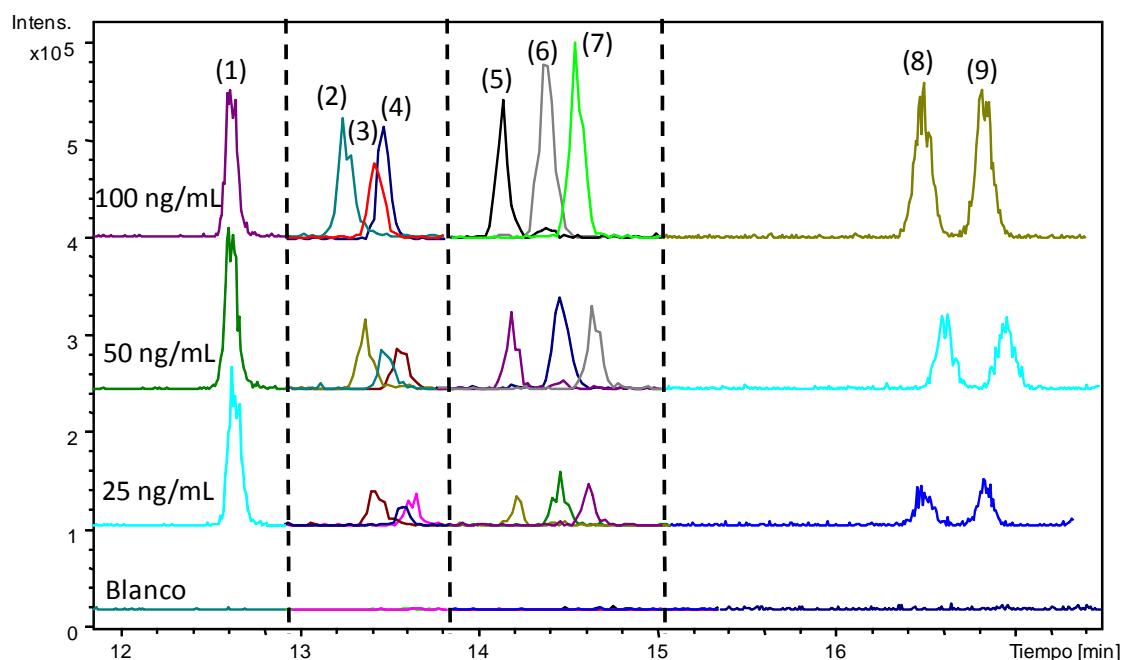


Figura IV-16. Electroferogramas de CE-MS/MS en condiciones óptimas obtenidos después de la SPE de muestras de leche dopadas a diferentes niveles de concentración. Identificación de picos: (1) LOM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, IS), (2) DAN, (3) SAR, (4) CIP, (5) MAR, (6) ENR, (7) DIF, (8) OXO, (9) FLU.

8.4.- Validación del método CE-MS/MS propuesto

8.4.1.- Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación

El método analítico completo fue validado en términos de linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), repetibilidad, precisión intermedia y veracidad por medio de estudios de recuperación.

Las curvas de calibración para las quinolonas con CE-MS/MS se obtuvieron utilizando muestras de leche cruda de vaca dopada antes del procedimiento de SPE. La linealidad de la respuesta fue establecida con cinco niveles de calibración correspondientes a 25, 50, 100, 200 y 400 ng/mL, pretendiendo que el LMR quedase en el centro del rango de calibración. En todos los casos, se añadía 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de LOM como patrón interno. Se prepararon dos réplicas por cada nivel de concentración y cada una fue inyectada por triplicado. Las curvas de calibración se establecieron utilizando las áreas de pico relativas (relación pico de analito vs. pico de patrón interno) (figura IV-17). Aunque una calibración previa utilizando soluciones patrón mostró que la respuesta MS era lineal al menos dos órdenes de magnitud (desde 100 ng/mL hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el rango de trabajo estudiado se consideró adecuado ya que muestras de leche reales con contenidos mayores de quinolonas sólo aparecen raramente.

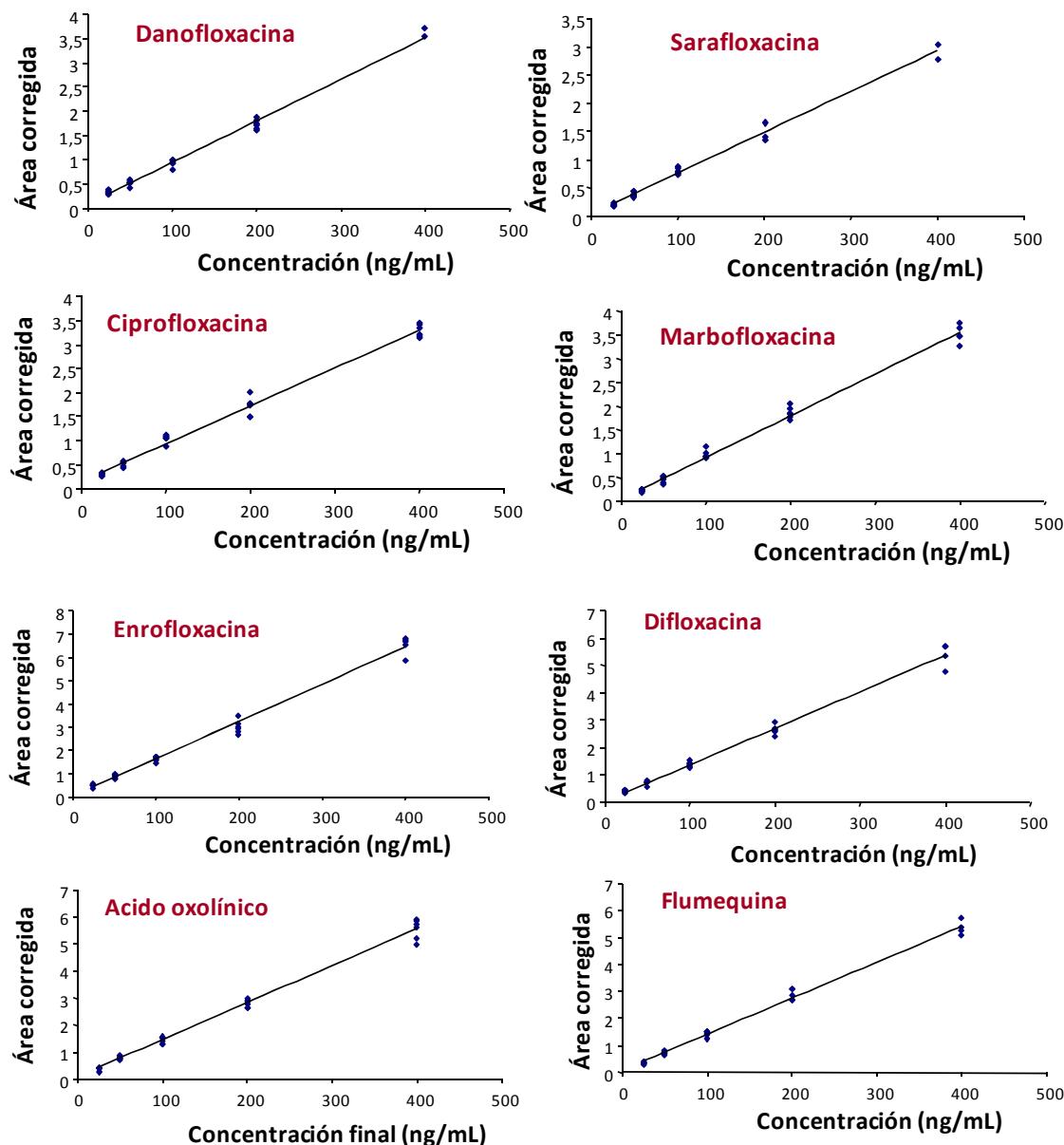


Figura IV-17. Curvas de calibrado para las diferentes quinolonas.

Se realizó una comparación entre las pendientes del calibrado con disoluciones patrón en una solución de NH₃ 1 M y la de la curva de calibrado en matriz con muestras dopadas mediante una prueba de la *t*-Student con una nivel de confianza al 95% y se demostró que no existían diferencias significativas para algunos analitos, lo que implica que la matriz no producía errores sistemáticos para éstos, siendo posible utilizar directamente la curva de calibrado con patrones para la cuantificación del DAN, SAR, MAR y DIF en muestras de leche de vaca sin cometer errores significativos. Para las otras quinolonas se encontraron diferencias significativas, así que es necesaria una curva de calibrado en matriz con muestras dopadas y tratadas para tener en cuenta el efecto matriz o las pérdidas debidas al tratamiento de muestra.

El límite de detección (LOD) fue considerado como la mínima concentración de analito que producía una relación S/N igual a tres. El límite de cuantificación (LOQ) fue adoptado como la concentración más baja de analito que producía una señal 10 veces mayor que el ruido. Para evaluar el ruido, se trató una muestra limpia con el procedimiento de SPE y no se encontraron picos que comigrasen con los analitos. Es importante resaltar que los LODs obtenidos estaban por debajo de los LMRs para todas las quinolonas. En la tabla IV-4 se presentan los parámetros estadísticos de las rectas, calculados mediante la regresión de mínimos cuadrados.

Tabla IV-4. Características del método propuesto ^{a)}

| Analito | Rango lineal (ng/mL) | Ordenada | Pendiente (mL/ng) | R ² | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) | LMR (ng/mL) |
|---------|-------------------------|----------|----------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|
| DAN | 18-400 | 0'078 | 0'0086 | 0'992 | 4 | 18 | 30 |
| SAR | 24-400 | 0'043 | 0'0072 | 0'991 | 6 | 24 | N.E. |
| CIP | 17-400 | 0'158 | 0'0079 | 0'989 | 5 | 17 | 100 ^{b)} |
| MAR | 17-400 | 0'052 | 0'0088 | 0'991 | 4 | 17 | 75 |
| ENR | 18-400 | 0'035 | 0'0160 | 0'990 | 5 | 18 | 100 ^{b)} |
| DIF | 17-400 | 0'018 | 0'0135 | 0'990 | 5 | 17 | N.E. |
| OXO | 19-400 | 0'068 | 0'0137 | 0'992 | 5 | 19 | N.E. |
| FLU | 18-400 | 0'070 | 0'0134 | 0'992 | 5 | 18 | 50 |

En todos los casos el valor P del fallo de ajuste fue mayor del 5%.

a) Concentración (ng/mL) vs. área de pico relativa; b) LMR (ENR + CIP) = 100 ng/mL; N.E. No establecido en muestras de leche

8.4.2.-Estudio de la precisión

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad fue evaluada en el mismo día por medio de aplicaciones repetidas del procedimiento de SPE a dos muestras (réplicas experimentales) para cada nivel de concentración (50, 100 y 200 ng/mL), y cada una fue inyectada por triplicado (réplicas instrumentales). La precisión intermedia se evaluó durante tres días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetibilidad. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico

Parte 2: Determinación de quinolonas

relativas y de los tiempos de migración se dan en la tabla IV-5. Como se puede comprobar, la precisión fue aceptable en todos los casos.

Tabla IV-5. Estudio de la precisión del método propuesto.

| | | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|----|-------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| n | | Intra-día DER (%) | | | | | | | |
| 6 | 50 ng/mL | 5 | 12 | 11 | 14 | 8 | 11 | 9 | 10 |
| | 100 ng/mL | 8 | 8 | 9 | 9 | 6 | 7 | 9 | 8 |
| | 200 ng/mL | 6 | 14 | 11 | 6 | 10 | 6 | 5 | 7 |
| 18 | Tiempo mig. (min) | 13'1 | 13'3 | 13'3 | 13'9 | 14'2 | 14'3 | 16'2 | 16'5 |
| | DER (%) | 0'5 | 0'7 | 0'6 | 0'5 | 0'6 | 0'6 | 0'6 | 0'7 |
| | | Entre-días DER (%) | | | | | | | |
| 18 | 50 ng/mL | 12 | 14 | 16 | 15 | 12 | 15 | 15 | 12 |
| | 100 ng/mL | 18 | 16 | 18 | 12 | 10 | 9 | 14 | 12 |
| | 200 ng/mL | 17 | 15 | 10 | 17 | 12 | 16 | 13 | 12 |
| 54 | Tiempo mig. (min) | 13'4 | 13'6 | 13'7 | 14'3 | 14'6 | 14'8 | 16'9 | 17'2 |
| | DER (%) | 2'2 | 2'3 | 2'4 | 2'5 | 2'6 | 2'7 | 3'4 | 3'5 |

8.4.3.-Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación

Para comprobar la eficacia del tratamiento de muestra se llevaron a cabo estudios de recuperación dopando muestras de leche a tres niveles de concentración (50, 100 y 200 ng/mL). Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración y cada una fue inyectada por triplicado. Las recuperaciones absolutas fueron calculadas comparando las áreas de pico relativas de muestras de leche dopadas antes del procedimiento de SPE con las áreas de pico relativas de muestras de leche dopadas después del procedimiento de SPE. Las recuperaciones fueron mayores del 80% en todos los casos con DER aceptables. Los resultados se muestran en la tabla IV-6.

Tabla IV-6. Recuperación para cada quinolona a diferentes niveles de concentración en muestra de leche cruda de vaca ^{a)}

| n = 6 | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|-----------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|
| 50 ng/mL | 91 (9) | 85 (9) | 81 (4) | 92 (9) | 88 (5) | 99 (11) | 101 (9) | 99 (6) |
| 100 ng/mL | 87 (11) | 87 (9) | 81 (10) | 93 (13) | 88 (11) | 94 (8) | 99 (10) | 99 (8) |
| 200 ng/mL | 102 (5) | 99 (7) | 91 (5) | 105 (17) | 101 (9) | 107 (16) | 110 (12) | 106 (8) |

a) Recuperación media (DER, %)

CAPÍTULO 5

APLICACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN EN FASE SÓLIDA
IN-LINE EN ELECTROFORESIS CAPILAR CON
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM PARA LA
DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS EN CARNE MEDIANTE
EXTRACCIÓN LÍQUIDA PRESURIZADA

1.- Introducción

Paradójicamente una de las ventajas de la CE como es el pequeño volumen de muestra requerido, puede ser a la vez una de sus desventajas puesto que conduce a una disminución significativa en la sensibilidad de la técnica. El volumen total del capilar es normalmente de entre 1 y 2 μL , y ello resulta en muy poca capacidad de carga de muestra. Una resolución y eficacias óptimas de separación se consiguen con volúmenes de inyección inferiores al 2 % del volumen del capilar [267,268]. Desafortunadamente, ello conlleva la obtención de límites de detección no demasiado bajos, lo que supone un problema importante cuando se intentan analizar muestras relativamente diluidas, especialmente aquellas que provienen de matrices biológicas o medioambientales.

En un intento de mejorar los límites de detección, numerosos investigadores han desarrollado diversas técnicas de inyección en CE, como por ejemplo: el apilamiento (*stacking*), aplicado en el capítulo 2 de esta memoria, o la isotacoforesis transitoria, que permiten el análisis de grandes volúmenes de muestra [269-271]. Todas estas técnicas operan bajo la aplicación de un voltaje a través del capilar electroforético. Esto provoca que las zonas de analito se focalicen debido a la variación de las movilidades de los iones en los diferentes campos eléctricos que se generan. Sin embargo, ya que estas técnicas se llevan a cabo en capilares de electroforesis convencionales, el máximo volumen de muestra que se puede analizar está predeterminado por el volumen total del capilar. En los casos más favorables se puede llegar a introducir, como mucho, volúmenes de 1 μL . Por tanto, aunque estas técnicas de introducción electroforética de muestra, también consideradas como de preconcentración *on-column*, son una solución para mejorar los límites de detección, puede que no lleguen a ser suficientes para un propósito concreto.

Otra metodología que se ha empleado para tratar de solventar el problema de los relativamente altos límites de detección en CE es la aplicación de un pretratamiento *off-line* de la muestra para así aumentar los niveles de analito. Sin embargo, este paso es preferible evitarlo para muestras diluidas porque puede haber pérdidas sustanciales en las distintas etapas del tratamiento. Por tanto, se aconseja un tratamiento de muestra lo más reducido posible.

Una interesante alternativa a las anteriores se basa en el empleo del acoplamiento en línea con la CE de un concentrador de analitos (AC) que se inserta cerca de la entrada del capilar de separación [272]. Estos dispositivos consisten normalmente en la incorporación de una fase sorbente, como por ejemplo las empleadas comúnmente en extracción en fase sólida (SPE), a la entrada del capilar electroforético que sirve para

[267] Cai,J., El Rassi, Z., *J. Liq. Chromatogr.* 1992, 15, 1179-1192.

[268] Cai,J., El Rassi, Z., *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 2007-2004.

[269] Wanders, B.J., Everaerts, F.M., en Landers, J.P. (Editor), *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1994, p. 111.

[270] Chien, R.L., Burgi, D.S., *Anal. Chem.*, 1992, 64, 489A-496A.

[271] Gebauer, P., Thormann, W., Bocek, P., *J. Chromatogr.* 1992, 608, 47-57.

[272] Tempels, F.W.A., Underberg, W.J.M., Somsen, G.W., de Jong, G.J., *Electrophoresis* 2007, 28, 1319-1326.

Parte 2: Determinación de quinolonas

concentrar niveles traza de analito, así como también permite hacer una limpieza de la muestra *in-line* previa a la separación electroforética. En algunos trabajos se demuestra que es posible inyectar volúmenes de muestra de más de 100 µL en capilares con volumen total inferior a los 300 nL [273]. Estos métodos de preconcentración con fundamento cromatográfico, que acoplan la SPE en línea a la electroforesis capilar (*in-line* SPE-CE) pueden mejorar la sensibilidad en una mayor extensión que los mecanismos de preconcentración electroforéticos comentados anteriormente [274].

El concepto de preconcentración *in-line* en CE fue concebido originalmente por Guzman y col. [275] en 1991 pero su difusión ha sido limitada debido a varios problemas comunes tales como inestabilidad de la corriente eléctrica y efecto de ensanchamiento de bandas. Además aún no hay un diseño establecido como el más adecuado para la construcción de un AC. Se han desarrollado varios modelos que podrían ser clasificados en cuatro grupos: capilares tubulares abiertos (*open tubular*) [267], microcartuchos monolíticos [276], membranas impregnadas [277 - 281] y rellenos empaquetados [275,282- 297].

En la primera modalidad la porción de entrada de capilar electroforético se recubre con el sorbente de SPE. Aunque se evitan problemas de sobrepresión, ya que no son

-
- [273] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Jameson, S., Naylor, S., *Electrophoresis*, 1996, 17, 1801-1807.
 - [274] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C., *Anal. Chim. Acta* 2007, 587, 208-215.
 - [275] Guzman, N.A., Trebilcock, M.A., Advis, J.P., *J. Liq. Chromatogr.*, 1991, 14, 997-1015.
 - [276] Vegvari, A., Guttman, A., *Electrophoresis* 2006, 27, 716-725.
 - [277] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Oda, R.P., Braddock, W.D., Riggs, B.L., Katzmann, J.A., Naylor, S., *J. Cap. Elec.*, 1995, 2, 97-104.
 - [278] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Braddock, W.D., Oda, R.P., Naylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 381-383.
 - [279] Tomlinson, A.J., Naylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1995, 18, 384-386.
 - [280] Tomlinson, A.J., Naylor, S., *J. Cap. Elec.* 1995, 2, 225-233.
 - [281] Tomlinson, A.J., Naylor, S., *J. Liq. Chromatogr.* 1995, 18, 3591-3615.
 - [282] Debets, A.J.J., Mazereeuw, M., Voogt, W.H., van Iperen, D.J., Lingeman, H., Hupe, K.-P., Brinkman, U.A.T., *J. Chromatogr.*, 1992, 608, 151-158.
 - [283] Swartz, M.E., Merion, M., *J. Chromatogr.*, 1993, 632, 209-213.
 - [284] Morita, I., Sawada, J., *J. Chromatogr.*, 1993, 641, 375-381.
 - [285] Hoyt, A.M. Jr., Beale, S. C., Larmann, J. P. Jr., Jorgenson, J.W., *J. Microcol. Sep.*, 1993, 5, 325-330.
 - [286] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Oda, R.P., Braddock, W.D., Strausbauch, M.A., Wettstein, P.J., Taylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1994, 17, 669-671.
 - [287] Benson, L.M., Tomlinson, A.J., Naylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 1994, 17, 671-673.
 - [288] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Braddock, W.D., Oda, R.P., Naylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1994, 17, 729-731.
 - [289] Naylor, S., Benson, L.M., Tomlinson, A.J., *J. Cap. Elec.*, 1994, 1, 181-189.
 - [290] Tomlinson, A.J., Braddock, W.D., Benson, L.M., Oda, R.P., Naylor, S., *J. Chromatogr. B*. 1995, 669, 67-73.
 - [291] Pálmarsdóttir, S., Edholm, L.-E., *J. Chromatogr. A*, 1995, 693, 131-143.
 - [292] Strausbauch, M.A., Madden, B.J., Wettstein, P.J., Landers, J.P., *Electrophoresis* 1995, 16, 541-548.
 - [293] Cole, L.J., Kennedy, R.T., *Electrophoresis* 1995, 16, 549-556.
 - [294] Beattie, J.H., Self, R., Richards, M.P., *Electrophoresis*, 1995, 16, 322-328.
 - [295] Guzman, N.A., en Righetti, P.G. (Editor), *Capillary electrophoresis: an analytical tool in biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.
 - [296] Guzman, N.A., *J. Liq. Chromatogr.*, 1995, 18, 3751-3768.
 - [297] Saavedra, L., Barbas, C., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007, 70, 289-297.

necesarias fritas para retener el sorbente, el volumen de rotura es muy bajo si lo comparamos con otros diseños debido a que la superficie de retención está limitada por la superficie interna del capilar derivatizado. En la modalidad monolítica el sorbente se prepara como un relleno continuo dentro del capilar. No necesita fritas y su volumen de rotura es muy elevado pero su preparación es la más complicada.

Sin embargo, los concentradores de membrana impregnada o los de relleno empaquetado se pueden preparar de manera sencilla y tienen un elevado volumen de rotura. El primero consiste en una membrana que puede ser cortada con la punta roma de una aguja y posicionada en el medio de una manga de teflón entremedias de dos capilares de sílice fundida. Esta aproximación fue desarrollada por A.J. Tomlinson y col. [277] para reducir o eliminar los problemas de los rellenos empaquetados. En la modalidad de relleno empaquetado el material sorbente es generalmente retenido por dos fritas para prevenir que las partículas sólidas puedan entrar y bloquear el capilar, pero la utilización de estas fritas es desaconsejable porque puede distorsionar el flujo electroosmótico y en algunos casos se pueden formar burbujas lo que provocaría problemas de corriente, ensanchamiento de bandas e irreproducibilidad de los tiempos de migración. Los fenómenos de ensanchamiento de bandas se han atribuido, al menos en parte, al incremento de las interacciones analito-analito y analito-paredes del capilar que ocurre cuando se analizan disoluciones de analito concentradas. Por otro lado el tiempo de análisis es normalmente mayor cuando se emplean preconcentradores [298]. Además, los diversos estudios realizados sobre *in-line* SPE-CE concluyen que los volúmenes relativamente grandes de disolvente orgánico que se requieren para eluir los analitos del material adsorbente también tienden a reducir el flujo electroosmótico y comprometen el rendimiento de la CE [299,300]. Este problema podría ser solucionado reduciendo el volumen de disolvente orgánico [277,280] pero hay que tener en cuenta que es necesario un volumen mínimo para conseguir la elución completa de los analitos.

Se han hecho diversos intentos para solucionar este problema mediante el empleo de un volumen de relleno menor pero esto presenta el inconveniente de la dificultad de construir de manera reproducible estos dispositivos de preconcentración además de disminuir la capacidad de retención.

En la bibliografía existente se pueden encontrar dos tipos de aplicaciones del AC: caracterización de metabolitos y mezclas de biopolímeros [301- 305] y determinación

[298] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Landers, J.P., Scanlan, G.F., Fang, J., Gorrod, J.W., Naylor, S., *J. Chromatogr. A*, 1993, 652, 417-426.

[299] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., S. Naylor, *LC-GC*, 1994, 12, 122-130.

[300] Tomlinson, A.J., Benson, L.M., S. Naylor, *Am. Lab.*, 1994, 26, 29-36.

[301] Strausbauch, M.A., Landers, J.P., Wettstein, P.J., *Anal. Chem.* 1996, 68, 306-314.

[302] Phillips, T.M., *Luminescence* 2001, 16, 145-152.

[303] Sandra, K., Lynen, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Sandra, P., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 385, 671-677.

[304] Naylor, S., Tomlinson, A.J., *Biomed. Chromatogr.* 1996, 10, 325-330.

[305] Figeys, D., Ducret, A., Aebersold, R., *J. Chromatogr. A* 1997, 763, 295-306.

de moléculas pequeñas tales como fármacos hipoglucémicos [292], oxprenolol [306], verapamil [307], doxepin [283], terbutalina [308], ceftofur [274], clorofenoles [309] y 3-nitrotirosina [312]. La cuantificación se ha intentado sólo en el caso de moléculas pequeñas y normalmente no se cuantificaba más de dos compuestos simultáneamente empleando, en todos los casos, la detección UV-Vis. En la mayoría de los casos no se ha llevado a cabo una rigurosa validación del método propuesto en muestras reales.

Todas las estrategias basadas en el acoplamiento de la SPE con CE que permitan la concentración de la muestra y la eliminación de interferentes dentro del capilar pueden resultar muy interesantes en el campo de la seguridad alimentaria y el control de calidad y específicamente en el caso de la determinación de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal a muy bajas concentraciones, ya que como es sabido, a muy bajas concentraciones los antibióticos no destruyen las bacterias completamente y se pueden volver resistentes al fármaco.

En este capítulo se ha propuesto la construcción y evaluación de un AC mediante una estrategia poco empleada a pesar de su simplicidad y utilidad [310-312]. Esta estrategia evita el empleo de fritas al emplear partículas con diámetros mayores que el diámetro interno del capilar. Además el sorbente empleado fue Oasis® MCX que debido a su gran capacidad de retención permite el empleo de un volumen de relleno menor paliando los problemas anteriormente mencionados. Igualmente se presenta una alternativa útil para identificar y cuantificar simultáneamente muy bajas cantidades (del nivel de los ng/kg) de residuos de antibióticos (quinolonas) en carne de pollo, mediante este acoplamiento *in-line* de la SPE con la CE y la espectrometría de masas en tandem, empleando una técnica de tratamiento de muestra relativamente reciente, la extracción líquida presurizada (PLE) [313 - 317]. Esta metodología, también denominada extracción acelerada con disolventes (ASE), permite la utilización de disolventes por encima de sus puntos de ebullición debido al empleo de alta presión. Esta característica puede mejorar las recuperaciones y reducir el consumo de disolventes orgánicos si la comparamos con la extracción Soxhlet más tradicional. Esta técnica ha demostrado ser

-
- [306] De Rossi, A., Desiderio, C., *J. Chromatogr. B* 2006, 839, 6-11.
 - [307] He, J., Shibukawa, A., Zeng, M., Amane, S., Sawada, T., Nakagawa, T., *Anal. Sci.* 1996, 12, 177-181.
 - [308] Petersson, M., Wahlund, K.G., Nilsson, S., *J. Chromatogr. A* 1999, 841, 249-261.
 - [309] Zhang, L.H., Wu, X.Z., *Anal. Chem.* 2007, 79, 2562-2569.
 - [310] Bateman, K.P., White, R.L., Thibault, P., *J. Mass Spectrom.* 1998, 33, 1109-1123.
 - [311] Tomlinson, A.J., Braddock, W.D., Benson, L.M., Oda, R.P., Naylor, S., *J. Chromatogr. B* 1995, 669, 67-73.
 - [312] Saavedra, L., Maeso, N., Cifuentes, A., Barbas, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, 44, 471-476.
 - [313] Schantz, M.M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1043-1047.
 - [314] Björklund, E., Sporring, S., Wiberg, K., Haglund, P., von Holst, C., *Trends. Anal. Chem.* 2006, 25, 318-325.
 - [315] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernández-Méndez, J., *J. Chromatogr. A* 2005, 1089, 1-17.
 - [316] Ramos , L., Kristenson, E.M., Brinkman, U.A.Th., *J. Chromatogr. A* 2002, 975, 3-29.
 - [317] Giergiewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł., Namieśnik, J., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2001, 31, 149-165.

satisfactoria para la extracción de quinolonas en varias matrices tales como suelo [318], huevos [319] y semillas [320]. En todos los casos la técnica analítica empleada fue la cromatografía líquida y el disolvente utilizado para la extracción una mezcla de acetonitrilo y un ácido acuoso.

El método propuesto PLE- *in-line* SPE-CE-MS/MS para la determinación de quinolonas en carne permite la cuantificación e identificación simultánea de un elevado número de analitos a niveles de concentración extremadamente bajos en una matriz compleja. Igualmente se ha llevado a cabo una exhaustiva caracterización de la eficacia del AC y una validación rigurosa en muestras reales.

2.- Reactivos, disoluciones y material

Todos los reactivos y disolventes fueron de grado analítico. Diclorometano, n-hexano, metanol, amoniaco, ácido fosfórico e hidróxido sódico fueron suministrados por Panreac (Madrid, España). Isopropanol, ácido fórmico, ácido acético y acetato amónico fueron suministrados por Merck (Darmstad, Alemania). Danafloxacina (DAN), sarafloxacina (SAR) y difloxacina (DIF) se obtuvieron de Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania). Flumequina (FLU), lomefloxacina (LOM) y la arena de cuarzo (maya -50 +70) se compraron a Sigma (St. Louis, MO, USA). Ciprofloxacina (CIP), enrofloxacina (ENR) y ácido oxolínico (OXO) se adquirieron en Fluka (buchs, Suiza). La marbofloxacina (MAR) fue amablemente suministrada por Vetoquinol S.A. (Madrid, España). La tierra de diatomeas se obtuvo de Dionex (California, USA).

El agua destilada ($18'2\text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) fue desionizada empleando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Como disolución madre se preparó una mezcla de $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ de cada quinolona en acetonitrilo: H_2O (1:1) (v/v) y se guardó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un bote color topacio. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua o tampones de acetato amónico.

Los cartuchos de extracción Oasis HLB (60 mg, 3cc) (Waters, Milford, MA, USA) se emplearon para el tratamiento de muestra y para la fabricación del AC se empleó un sorbente de modo mixto, Oasis MCX (Waters, Milford, MA, USA), con un tamaño de partícula de $60\text{ }\mu\text{m}$ y un tamaño de poro de 80 \AA .

[318] Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5455- 5462.

[319] Herranz, S., Moreno-Bondi, M.C., Marazuela, M.D., *J. Chromatogr. A* 2007, 1140, 63-70.

[320] Pecorelli, I., Galarini, R., Bibi, R., Floridi, Al., Casciarri, E., Floridi, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 81-89.

3.- Instrumentación y programas informáticos

Las separaciones electroforéticas se realizaron en un instrumento HP^{3D} CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector UV-visible que operó a 275 nm con un ancho de banda de 20 nm. La separación se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida con una longitud total de 130 cm y un diámetro interno de 50 µm (360 µm de diámetro externo) que se compró a Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

Se utilizó el nebulizador coaxial Agilent de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS (Agilent Technologies). El líquido adicional fue introducido con una bomba de alta presión Jasco PU-2085 (Jasco Analítica, Madrid, España) equipada con un divisor de flujo 1:100. La detección por espectrometría de masas se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 1100 Series LC/MSD SL (Agilent Technologies) equipado con un analizador de trampa de iones.

Los electroferogramas UV-visible se realizaron con el programa proporcionado con la HP ChemStation versión A.09.01. El espectrómetro de masas estaba controlado por un PC mediante el programa Esquire 4.1 de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

En el tratamiento de muestra se empleó una picadora de cocina (Taurus, Barcelona, España) para triturar las muestras de músculo de pollo. El equipo ASE 100 de Dionex (Sunnyvale, CA, USA) fue empleado para la extracción líquida presurizada. Se usaron celdas de 10 mL.

4.- Procedimiento electroforético propuesto

Antes de cada inyección el capilar se acondicionaba como sigue: con NH₃ 1 N a 7 bares durante 2 min., H₂O a 7 bares durante 1 min. y acetato amónico 50 mM (sin ajustar el pH para disoluciones patrón y a pH 5 para muestras de pollo) a 7 bares y durante 1 min. Las inyecciones se hicieron en el ánodo utilizando una presión de 7 bares durante 15 min (aprox. 135 µL utilizando la ecuación de Hagen-Poiseuille).

El disolvente de la muestra era 50 mM de acetato amónico para disoluciones patrón y 50 mM de acetato amónico a pH 5 para muestras de pollo. Después de la inyección, el disolvente de la muestra era desplazado del capilar con tampón electroforético al aplicar 7 bares durante 0'5 min. Los analitos eran eluidos al inyectar un bolo de MeOH:H₂O:NH₃ (60:38:2 v/v/v) utilizando una presión de 50 mbar durante 100 s (aproximadamente un 2'3 % del volumen total del capilar = 60 nL). Antes de aplicar el voltaje de separación, el bolo de elución se hizo pasar a través del AC empujándolo con tampón electroforético al aplicar 1 bar durante 0'5 min. De esta manera se trataba de evitar interacciones indeseables entre los analitos y el sorbente de retención durante la separación electroforética. El voltaje de separación fue de 25 kV (polaridad positiva) con una rampa inicial de 1 min.

El tampón electroforético consistía en una disolución acuosa de acetato amónico 50 mM ajustado a pH 9'1 con amoniaco 5 M. La temperatura del capilar se mantuvo constante a 20 °C. En estas condiciones, la corriente eléctrica era de 20 µA, con lo que se evitaban las descargas corona e inestabilidad en las separaciones electroforéticas. Antes de la primera utilización, el capilar se acondicionaba con NaOH 1 M durante 10 min. y a 60 °C, posteriormente con agua durante 5 min. y finalmente con el tampón electroforético durante 20 min. En todos los casos se aplicaban 7 bares. Al comienzo de cada día, el capilar se acondicionaba con NH₃ 1M durante 4 min., posteriormente con agua durante 3 min. y finalmente con tampón electroforético durante 5 min. Siempre se aplicaban 7 bares de N₂. Después de cada análisis, el capilar se post-acondicionaba a 7 bares con MeOH:NH₃ (98:2 v/v) durante 5 min. y con MeOH durante otros 3 min. De esta manera se pretendía evitar la contaminación entre inyecciones consecutivas.

5.- Interfase ESI

Se utilizó el nebulizador coaxial Agilent de líquido adicional para el acoplamiento CZE-MS (Agilent Technologies). El capilar estaba montado de manera que la punta del mismo sobresalía, aproximadamente, un cuarto del diámetro externo del capilar de la aguja de acero que lo envuelve.

El líquido adicional consistía en una mezcla de 2-propanol, agua y ácido fórmico (50:49:1 v/v/v) y fue introducido con un flujo de 3 µL/min con una bomba de alta presión Jasco PU-2085 (Jasco Analítica, Madrid, España) equipada con un divisor de flujo 1:100. El voltaje ESI se estableció en -4 kV. Otros parámetros del electrospray en condiciones óptimas fueron los siguientes: presión de nebulización de 3 psi, flujo de gas de secado de 6 L/min y temperatura del gas de secado de 150 °C. Cuando se inyectaban muestras de músculo de pollo previamente tratadas y para evitar la entrada de compuestos con baja volatilidad al espectrómetro de masas, fue necesario llevar a cabo la inyección de muestra con la presión de nebulización y el voltaje ESI a cero, y además se introdujo un retraso de 0'5 min después de inyectar la muestra antes de establecer la condiciones óptimas para el espray y el voltaje ESI. Si se inyectaban disoluciones patrón este paso no era necesario.

6.- Condiciones MS y MS/MS

El espectrómetro de masas operó en modo positivo y escaneó entre 150-410 *m/z* (masa objetivo 360 *m/z*, estabilidad del compuesto 100 %) a 13.000 *m/z*/s. En los experimentos MS/MS, los parámetros de la trampa se seleccionaron con el modo de control de carga activado utilizando un objetivo de 50.000 y un tiempo de acumulación máximo de 100 ms, se hicieron 2 medias por experimento. La fragmentación se realizó por medio de disociaciones inducidas por colisión (CID) con el helio presente en la trampa durante 10

Parte 2: Determinación de quinolonas

ms en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). Los parámetros en MS/MS se recogen en la tabla V-1.

Tabla V-1. Principales parámetros del método de MS/MS y puntos de identificación obtenidos.

| | LOM | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Anchura (<i>m/z</i>) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Límite (<i>m/z</i>) | 96 | 98 | 106 | 91 | 99 | 98 | 110 | 71 | 71 |
| Amplitud (V) | 0'7 | 0'7 | 0'7 | 0'6 | 0'6 | 0'7 | 0'7 | 0'5 | 0'5 |
| Ion precursor | 352'1 | 358'1 | 386'0 | 332'1 | 363'1 | 360'1 | 400'0 | 262'0 | 262'0 |
| Iones fragmento | 334'1 | 340'1 | 368'1 | 314'1 | 345'1 | 342'1 | 382'1 | 244'0 | 244'1 |
| | 308'1 | 314'2 | 342'2 | 288'2 | 320'0 | 316'1 | 356'2 | 233'9 | 237'9 |
| | 288'2 | | 299'1 | 245'1 | 276'1 | 245'1 | 299'3 | 216'0 | 220'0 |
| | 265'1 | | | | | | | 172'0 | 202'0 |
| | 237'0 | | | | | | | 159'9 | 174'0 |
| Puntos ident. | 8'5 | 4 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 5'5 | 8'5 | 8'5 |

Se empleó LOM como patrón interno (IS). No se aplicó ninguna rampa en la energía de fragmentación.

En el capítulo anterior se observó que no fue posible conseguir los puntos de identificación mínimos requeridos para FLU y OXO debido a la baja fragmentación [321]. Se puede lograr una mejora significativa en el número de puntos de identificación si la optimización MS/MS se realiza sin rampa en la energía de fragmentación. La figura V-1 muestra los espectros MS/MS de FLU y OXO, en los que puede apreciarse como ahora si se consiguen más de tres puntos de identificación.

[321] Lara, F.J., García-Campaña, A.M.; Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M., García-Ayuso, L.E., *Anal. Chem.* 2006, 78, 7665-7673.

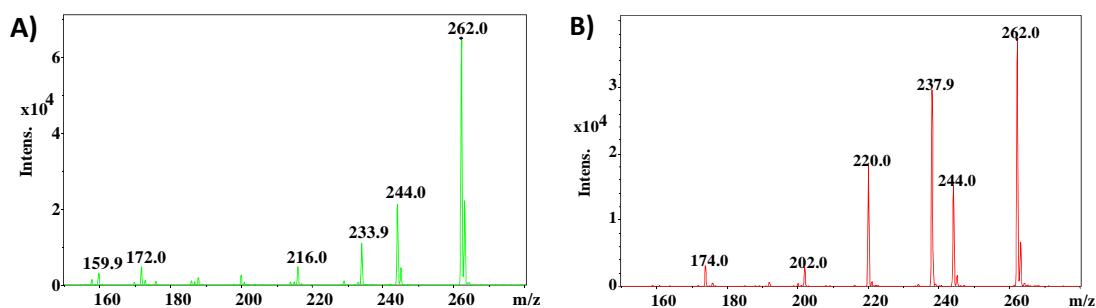


Figura V-1. Espectros MS/MS de: A) ácido oxolínico y B) flumequina.

7.- Construcción del concentrador *in-line*

El primer paso en la construcción del concentrador fue cortar aproximadamente 2'5 mm de capilar de sílice de 150 μm de diámetro interno y 360 μm de diámetro externo. Un corte lo más plano posible en ambos lados del capilar es esencial para obtener un rendimiento óptimo. El proceso de fabricación fue enteramente monitorizado con microscopio (Euromex CSL, Holanda). Esta pequeña porción de capilar de 2'5 mm fue conectado a una bomba de vacío y se introdujo cuidadosamente la fase estacionaria (partículas MCX de 60 μm). Una vez que el capilar se llenó completamente, fue introducido en un tubo de PTFE (Omnifit, Cambridge, Inglaterra) de 1'5 cm de longitud y 0'3 mm de diámetro interno hasta quedar aproximadamente en el centro. A continuación, un capilar de 9'5 cm de longitud (50 μm d.i. \times 360 μm d.e.) se introdujo en uno de los lados del tubo de PTFE y luego otro capilar más largo se añadió (50 μm d.i. \times 360 μm d.e.) por el otro extremo del tubo de PTFE hasta completar la longitud total de la columna. Finalmente, se montaba el capilar con el concentrador en un casete de CE y se comprobaba que no había ninguna obturación cuando se aplicaban 7 bares a un vial que contenía agua. El concentrador así construido se muestra en la figura V-2.



Figura V-2. Fotografía del concentrador con microscopio 4x.

8.- Preparación de las muestras de músculo de pollo

Las muestras de pollo se compraron en un supermercado local. En primer lugar se trituraron con la picadora y se almacenaron a -18 °C hasta el momento del análisis. Posteriormente, una porción de 1 g de muestra dopada con disoluciones de las quinolonas de interés, a diferentes niveles de concentración, se mezcló en un mortero con 1'5 g de tierra de diatomeas hasta obtener una muestra homogénea. Con ello se pretendía deshidratar y dispersar la muestra para facilitar la penetración del disolvente dentro de la matriz de la muestra [322]. La mezcla fue cargada en una celda de 10 mL con un filtro de celulosa en el fondo. El volumen muerto se ocupaba con arena de cuarzo para reducir el consumo de disolvente orgánico. La extracción líquida presurizada (PLE) se realizó utilizando las siguientes condiciones óptimas: disolvente de extracción, 20 mL de diclorometano; presión de extracción ≤ 1700 psi; tiempo de pre-calentamiento, 5 min; tiempo de extracción en estático, 0 min; temperatura de extracción, 50 °C; número de ciclos estáticos, 1; tiempo de purga, 60 s; volumen de purga, 60%.

Una vez que la PLE había tenido lugar, los extractos de diclorometano se trajeron siguiendo un procedimiento similar al descrito por Jiménez-Lozano y col. [323]. El disolvente orgánico se extrajo dos veces con 5 mL de NaOH 1 M. La fase acuosa fue separada del diclorometano por centrifugación (5 min × 2500 rpm) y cuidadosamente transferida a un tubo de centrifuga limpio empleando para ello una pipeta Pasteur. Entonces el pH se ajustó a 3 con H₃PO₄ 3 M. La grasa de los extractos se eliminó

[322] Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., Cruz-Sicilia, A.D., González-Rodríguez, M.J., Plaza-Bolaños, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, 558, 42-52.

[323] Jiménez-Lozano, E., Roy, D.; Barrón, D., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2004, 25, 65-73.

añadiendo 10 mL de n-hexano. Después de centrifugar (5 min. × 2000 rpm), la fase acuosa se pasó a través de un cartucho Oasis® HLB que había sido previamente activado con 2 mL de MeOH y 2 mL de tampón fosfato 50 mM a pH 3. Después de pasar la muestra, el cartucho fue lavado con 2 mL de H₂O y secado a vacío. La elución se llevó a cabo con 3 mL de MeOH. El eluente se recogió en vial de 4 mL y se evaporó el disolvente con una corriente de nitrógeno a 40 °C hasta casi sequedad. Los extractos se reconstituyeron en 1 mL de tampón 50 mM de acetato amónico a pH 5 que contenía 5 µg/L de LOM como IS. Finalmente los extractos se filtraron a través de una membrana Acrodisc GHP de 0'22 µm (Pall Corporation, MI, USA) y se inyectaron en el sistema de CE. Entre procedimientos de SPE consecutivos se llevó a cabo un enjuague completo del sistema para evitar contaminación entre muestras.

9.- Resultados y discusión

9.1.- Acoplamiento in-line de la extracción en fase sólida y la electroforesis capilar

El material preferido para construir concentradores ha sido hasta ahora las partículas de sílice derivatizadas con C18 debido a su amplio rango de aplicación [274, 303, 306, 324]. Sin embargo presentan algunas desventajas relacionadas con su limitada utilización a pH básicos, algo que es frecuentemente necesario para el acondicionamiento del capilar electroforético. Además requieren un alto contenido de disolvente orgánico para la elución lo que podría comprometer el rendimiento electroforético. Por otro lado, las aplicaciones basadas en el acoplamiento de la electroforesis capilar con extracción en fase sólida de intercambio de iones son poco frecuentes [325]. Aunque con esta estrategia la utilización de disolventes orgánicos para la elución se podría evitar hay otras limitaciones impuestas por el hecho de que esta alternativa implica llenar el capilar de separación con un tampón electroforético que tenga una menor capacidad de intercambio de iones para evitar la elución de los analitos adsorbidos en el concentrador.

La utilización de una fase estacionaria de modo mixto, como es el caso de la Oasis® MCX, que combina mecanismos de fase inversa e intercambio iónico podría evitar las limitaciones previamente mencionadas [312]. Otra característica interesante de este sorbente es su elevada capacidad de retención ya que hace posible reducir las dimensiones del relleno con una capacidad de retención similar. Una longitud típica en el caso de concentradores C18 es alrededor de 10 mm. En nuestro caso, con el empleo de los MCX, tan sólo 2'5 mm fueron suficientes. Esto tiene la ventaja de que el impedimento al EOF va a ser menor y la separación electroforética se verá menos afectada. Además, cuando el proceso de elución tiene lugar, los analitos se focalizarán

[324] Benavente, F., Vescina, M.C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N., *J. Chromatogr. A* 2007, 1149, 205-212.

[325] Hutchinson, J.P., Macka, M., Avdalovic, N., Haddad, P.R., *J. Chromatogr. A* 2006, 1106, 43-51.

en una banda más estrecha lo que reduce la pérdida de eficacia que normalmente se observa con estos dispositivos.

Otra propiedad importante es que el relleno MCX se puede utilizar en un amplio rango de pH, desde 0 a 14, lo que hace más fácil acondicionar el capilar con soluciones alcalinas sin tener que quitar el concentrador. Pero, quizás, la principal ventaja del sorbente MCX es que es totalmente compatible con las condiciones de separación de nuestros analitos en estudio, las quinolonas, ya que el proceso de elución requiere un medio alcalino y el tampón electroforético presenta también un pH alcalino. Sin embargo con este tampón no es posible eluir los analitos ya que permanecen retenidos por medio de las interacciones apolares. Por tanto, para una eficaz elución de los compuestos, se requiere una combinación de pH alcalino y MeOH. En nuestro caso se empleó un bolo de MeOH:H₂O:NH₃ (60:38:2 v/v/v) (ver optimización más adelante). Este bolo tiene una conductividad inferior a la del tampón electroforético, así que cuando se aplica un campo eléctrico positivo, los analitos, en su forma aniónica debido al pH alcalino, son focalizados en límite posterior del bolo de elución con el tampón electroforético entrante. Es entonces cuando al mezclarse con el tampón electroforético pueden ser separados sin pérdida de eficacia. En condiciones óptimas se obtenían eficacias de entre 81000 y 165000 platos, valores similares a los que se obtienen sin el concentrador. Finalmente, es importante mencionar que el sorbente MCX está disponible con un tamaño de partícula de 60 µm, así que si se emplean capilares con un diámetro interno de 50 µm es posible evitar la utilización de fritas para retener el sorbente.

9.2.- Modificación de la separación electroforética en presencia del concentrador

Aunque las condiciones electroforéticas para la separación de estas ocho quinolonas ya fueron explicadas en el capítulo anterior, fue necesario modificarlas para que se adaptasen a las condiciones particulares del concentrador.

Un problema serio que se plantea cuando se usa el concentrador *in-line* es la formación de burbujas debido, posiblemente, al efecto Joule. Para evitarlo, la concentración de tampón fue reducida desde 70 mM a 50 mM, la temperatura se disminuyó desde 25 a 20 °C, la longitud del capilar se aumentó desde 96 cm hasta 130 cm y también fue necesario reducir la presión del nebulizador desde 10 hasta 3 psi para mantener una adecuada resolución entre los diferentes compuestos.

Aunque algunos autores han señalado que la adición de acetonitrilo al tampón electroforético tiene un efecto positivo en la separación de algunas quinolonas y que además reduce la corriente eléctrica [326], su utilización cuando se emplea un concentrador debe ser evitada porque los analitos podrían ser eluidos con el tampón electroforético antes de injectar el bolo de elución.

[326] Ferdig, M., Kaleta, A., Thanh Vo, T.D., Buchberger, W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1047, 305–311.

9.3.- Optimización del método *in-line* SPE-CE-MS/MS para la determinación de quinolonas

Varios son los parámetros que hay que optimizar en un método *in-line* SPE-CE para lograr un rendimiento óptimo: pH del disolvente, tiempo de inyección, y composición y volumen del bolo de elución.

El pH del disolvente es un parámetro muy importante ya que puede afectar en gran medida a la retención de los analitos en el concentrador, especialmente en este caso en el que se establecen interacciones iónicas. En nuestro caso, se estudió el pH del disolvente, tanto en el caso de disoluciones patrón como en el de muestras de pollo dopadas con las distintas quinolonas en estudio, utilizando diferentes electrolitos: 50 mM ácido fórmico/amoníaco a pH 3, 50 mM ácido acético/amoníaco a pH 5, 50 mM acetato amónico (\approx pH 7) y 50 mM de ácido acético/amoníaco a pH 9. Cuando se inyectaban disoluciones patrón que contenían 10 $\mu\text{g/L}$ de cada analito a 1 bar durante 2 min., los valores de área mayores se obtenían con acetato amónico 50 mM (figura V-3A). Si eliminábamos el acetato amónico y sólo empleábamos agua Milli-Q, el área de pico decrecía.

En el caso de muestras de músculo de pollo, los mejores resultados se obtenían con un tampón 50 mM ácido acético/acetato amónico a pH 5 (figura V-3B). Esta diferencia puede ser atribuida al efecto matriz.

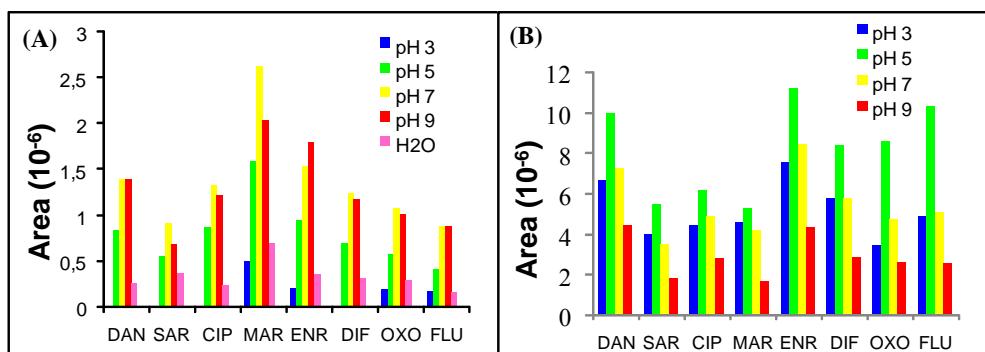


Figura V-3. (A) Efecto del pH del disolvente en el caso de disoluciones patrón que contenían 10 $\mu\text{g/L}$ de cada quinolona e inyectada a 1 bar durante 2 min. (B) Efecto del pH del disolvente en el caso de muestras de músculo de pollo dopadas con 2 $\mu\text{g/kg}$ de cada quinolona e inyectadas a 7 bares durante 15 min.

En el siguiente paso, el tiempo de inyección se optimizó empleando disoluciones patrón que contenían 10 $\mu\text{g/L}$ de cada quinolona y que se inyectaban a 7 bares durante tiempos que iban desde 1 a 30 min. La saturación del sorbente no se observó incluso para tiempos de inyección de 30 min., lo que indica la elevada capacidad de retención del sorbente MCX incluso cuando se utiliza una pequeña cantidad para la construcción del

Parte 2: Determinación de quinolonas

concentrador. Para los experimentos posteriores se empleó un tiempo de inyección de 15 min. ya que se consideró un compromiso entre sensibilidad y tiempo de análisis.

Las variables anteriormente citadas se optimizaron empleando un bolo inicial de elución de MeOH:H₂O:NH₃ (50:48:2 v/v/v) inyectado a 50 mbar durante 75 s. Sin embargo, análisis consecutivos, sin los pasos de inyección de muestra y post-acondicionamiento, mostraron una incompleta elución de los analitos retenidos. Para mejorar esta elución mantuvimos constante el porcentaje de NH₃ y el porcentaje de MeOH se modificó desde 0 hasta el 80 %. Los mejores resultados en términos de área de pico se obtuvieron con un porcentaje de MeOH del 60 % (figura V-4A).

Finalmente, la optimización de la longitud del bolo de elución se llevó a cabo modificando el tiempo de inyección desde 12 hasta 125 s (figura V-4B). El área de pico se incrementó para todos los analitos con el bolo de elución hasta los 100s; por encima de este valor permaneció constante. Los valores óptimos del procedimiento *in-line* SPE se recogen en la tabla V-2.

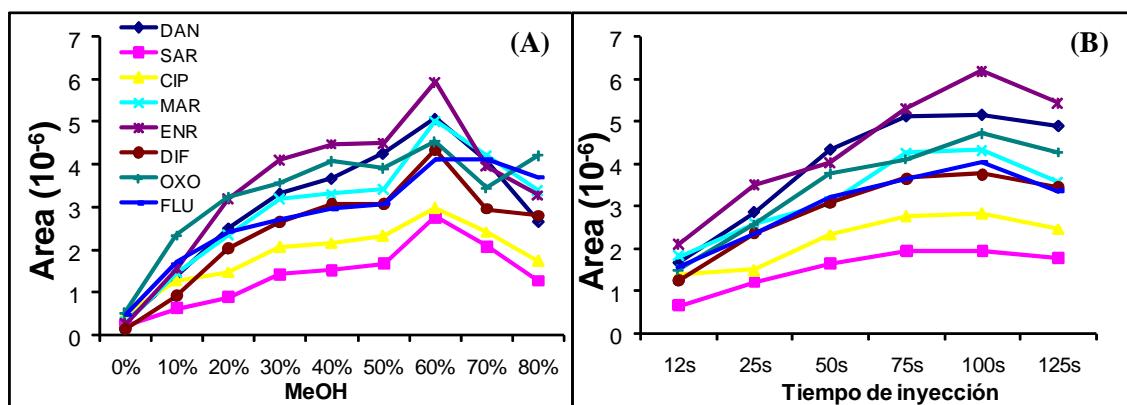


Figura V-4. Efecto de: (A) la composición del bolo de elución y (B) del tiempo de inyección del bolo en el área de pico de las quinolonas estudiadas. Se inyectaron disoluciones patrón de 10 µg/L de cada quinolona a 7 bares durante 15 min.

Tabla V-2. Resumen de los parámetros óptimos del procedimiento *in-line* SPE.

| Parámetro | Valor óptimo |
|-------------------------------------|---|
| Disolvente | 50 mM acetato amónico |
| Inyección | 7 bar × 15 min |
| Disolvente para elución | MeOH:H ₂ O:NH ₃ (60:38:2 v/v/v) |
| Inyección del disolvente de elución | 50 mbar × 100 s |

En la figura V-5 se muestra un electroferograma en condiciones óptimas de una disolución patrón que contenía 50 ng/L de cada quinolona.

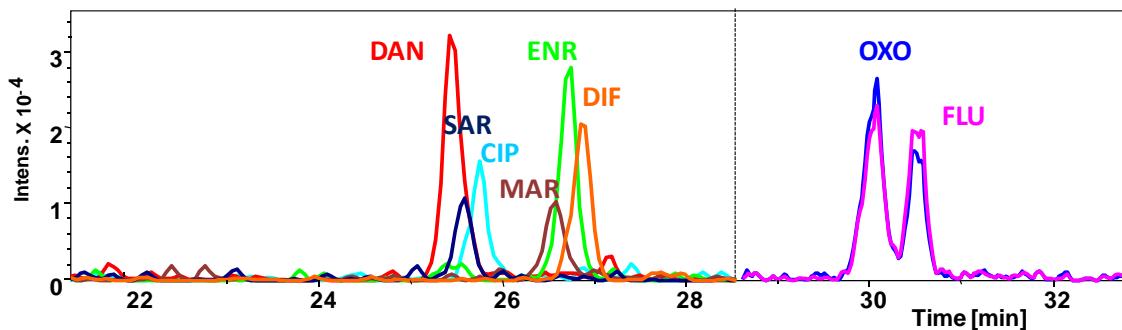


Figura V-5. Electroferograma en condiciones óptimas de una disolución patrón (50 ng/L de cada quinolona).

9.4.- Optimización del tratamiento de muestra mediante extracción líquida presurizada

El método decidió aplicarse a la determinación de residuos de quinolonas en músculo de pollo. Para extraer las quinolonas de esta matriz se ha decidido emplear como disolvente el diclorometano ya que ha demostrado ser capaz de producir extractos muy limpios empleando otras metodologías de extracción [327].

En nuestro caso, esto es un requerimiento muy importante para obtener resultados satisfactorios al aplicar el concentrador a muestras reales porque, de otro modo, los componentes de la matriz podrían afectar a la retención de los analitos en el relleno MCX y por tanto la sensibilidad empeoraría. Además, con este disolvente se pueden extraer tanto las quinolonas zwiteriónicas como las ácidas. Por todos estos motivos se seleccionó el diclorometano como disolvente de extracción.

Otros parámetros que deben optimizarse al utilizar la extracción líquida presurizada son: el volumen de celda, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción.

Para seleccionar el volumen de celda se probaron dos tamaños diferentes: 34 y 10 mL con las siguientes condiciones: temperatura de extracción de 75 °C, tiempo de extracción de 5 min, un solo ciclo de extracción, un volumen de purga del 60 % del volumen de la celda, y un tiempo de purga de 60 s. Para la celda de 34 mL se emplearon 5 g de músculo de pollo mezclados con 7'5 g de tierra de diatomeas y para la celda de 10 mL se empleó sólo 1 g de músculo de pollo mezclado con 1'5 g de tierra de diatomeas. Se observó que si empleaba un capilar sin concentrador y las muestras se dopaban con concentraciones relativamente altas de quinolonas (100 µg/kg), las recuperaciones eran similares con ambas celdas, pero si se empleaba un capilar con

[327] Bailac, S., Barrón, D., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2006, 580, 163-169.

concentrador y las muestras se dopaban a 5 µg/kg, las recuperaciones obtenidas con la celda de mayor tamaño empeoraban (figura V-6). Esta diferencia podría ser atribuida a los diferentes volúmenes de diclorometano empleados: si se empleaba la celda de 34 mL el consumo de disolvente orgánico era de 60 mL, pero si se empleaba la celda de 10 mL el consumo de disolvente orgánico era de sólo 20 mL. Esto podría afectar notablemente a la eficacia de la posterior extracción con 2×5 mL de NaOH 1 M, que sería menor en el caso de disponer de 60 mL que en el caso de tener sólo 20 mL. Obviamente sería posible incrementar el volumen de NaOH empleado pero esta opción conduciría a mayores volúmenes, más difíciles de manejar, así que finalmente se seleccionó la celda de extracción de 10 mL.

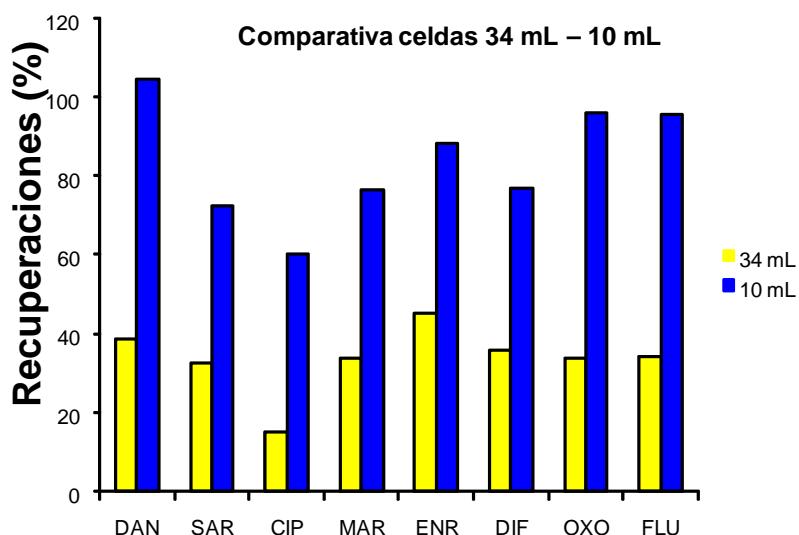


Figura V-6. Comparativa entre celdas de extracción de 10 y 34 mL usando PLE.

Se estudiaron tres temperaturas de extracción: 50, 75 y 100 °C, y tres tiempos de extracción en estático: 0, 2 y 5 min. El estudio mostró que si se empleaban altas temperaturas o tiempos de extracción más largos ello conducía a una disminución en el área de pico (figura V-7), quizás debido a que en estas condiciones los extractos no eran tan limpios y se coextraían componentes de la matriz que competirían con los analitos en el proceso de retención sobre el concentrador. Así, finalmente se seleccionaron como condiciones óptimas: 50 °C como temperatura de extracción y 0 min. como tiempo de extracción estático. En la tabla V-3 se recogen los valores óptimos del procedimiento de PLE.

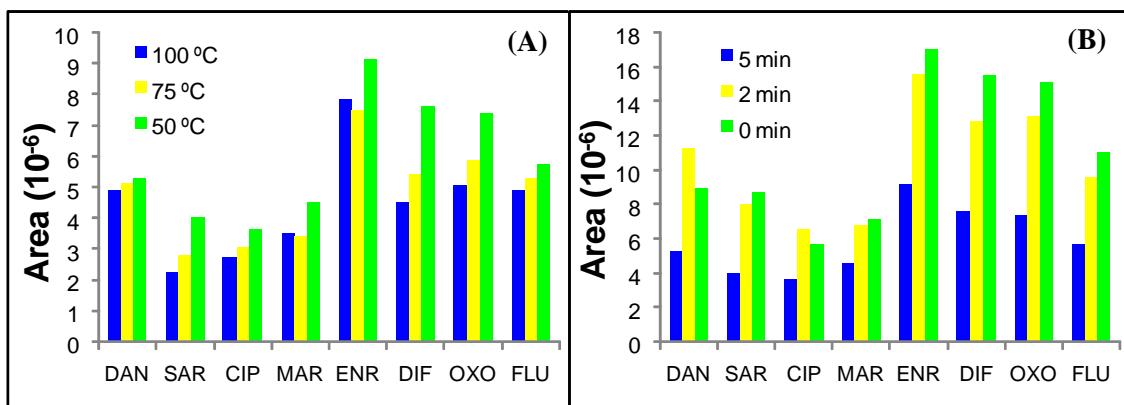


Figura V-7. Efecto del área de pico en la temperatura de extracción (A) y en el tiempo de extracción en estático (B) utilizados durante la PLE. Las muestras de pollo fueron dopadas con 5 µg/kg de cada quinolona e inyectadas a 7 bar durante 15 min.

Los extractos obtenidos tras la extracción líquida presurizada con diclorometano se sometieron al procedimiento descrito en el apartado 8 con ligeras modificaciones. En nuestro caso el disolvente de elución fue metanol porque es el recomendado por el fabricante y no vimos la necesidad de cambiarlo. Se cambió también el disolvente de recomposición para utilizar un tampón acuoso que sería más adecuado para la *in-line* SPE. El pH de dicho tampón se estudió a cuatro valores diferentes: 3, 5, 7 y 9, empleando los tampones previamente mencionados. El área mayor se consiguió a pH 5 (figura V-3B) a diferencia del caso de las soluciones patrón, con las que el área mayor se conseguía a pH 7. Este hecho se podría atribuir a interacciones pH-dependientes de los analitos con los compuestos de la matriz. Por tanto, los extractos se reconstituyeron en un tampón 50 mM ácido acético/acetato amónico a pH 5.

Tabla V-3. Resumen de los parámetros óptimos del procedimiento PLE.

| Parámetro | Valor óptimo |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| Celda | 10 mL |
| Disolvente de extracción | Diclorometano |
| Tiempo de precalentamiento | 5 min. |
| Tiempo de calentamiento en estático | 0 min. |
| Temperatura de extracción | 50 °C |
| Presión de extracción | ≤ 1700 psi |
| Número de ciclos | 1 |
| Volumen de purga | 60% del volumen de la celda |
| Tiempo de purga | 60 s |

9.5.- Validación del método *in-line* SPE-CE-MS/MS propuesto

9.5.1.- Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación

Se llevó a cabo una validación detallada del método propuesto para la determinación de quinolonas usando el concentrador *in-line* previo a la separación por CE y detección por espectrometría de masas en tandem.

Las curvas de calibrado para cada quinolona estudiada se establecieron utilizando disoluciones patrón de seis niveles de concentración correspondientes a 0'05, 0'1, 0'5, 1'0, 5'0 y 10'0 µg/L, inyectando cada nivel por triplicado. La figura V-8 muestra las correspondientes rectas así como una ampliación de la zona baja del rango lineal. Los parámetros estadísticos de las curvas, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados se presentan en la tabla V-4. Los coeficientes de correlación mostraron una linealidad satisfactoria entre áreas de pico y concentración de quinolonas durante al menos dos órdenes de magnitud.

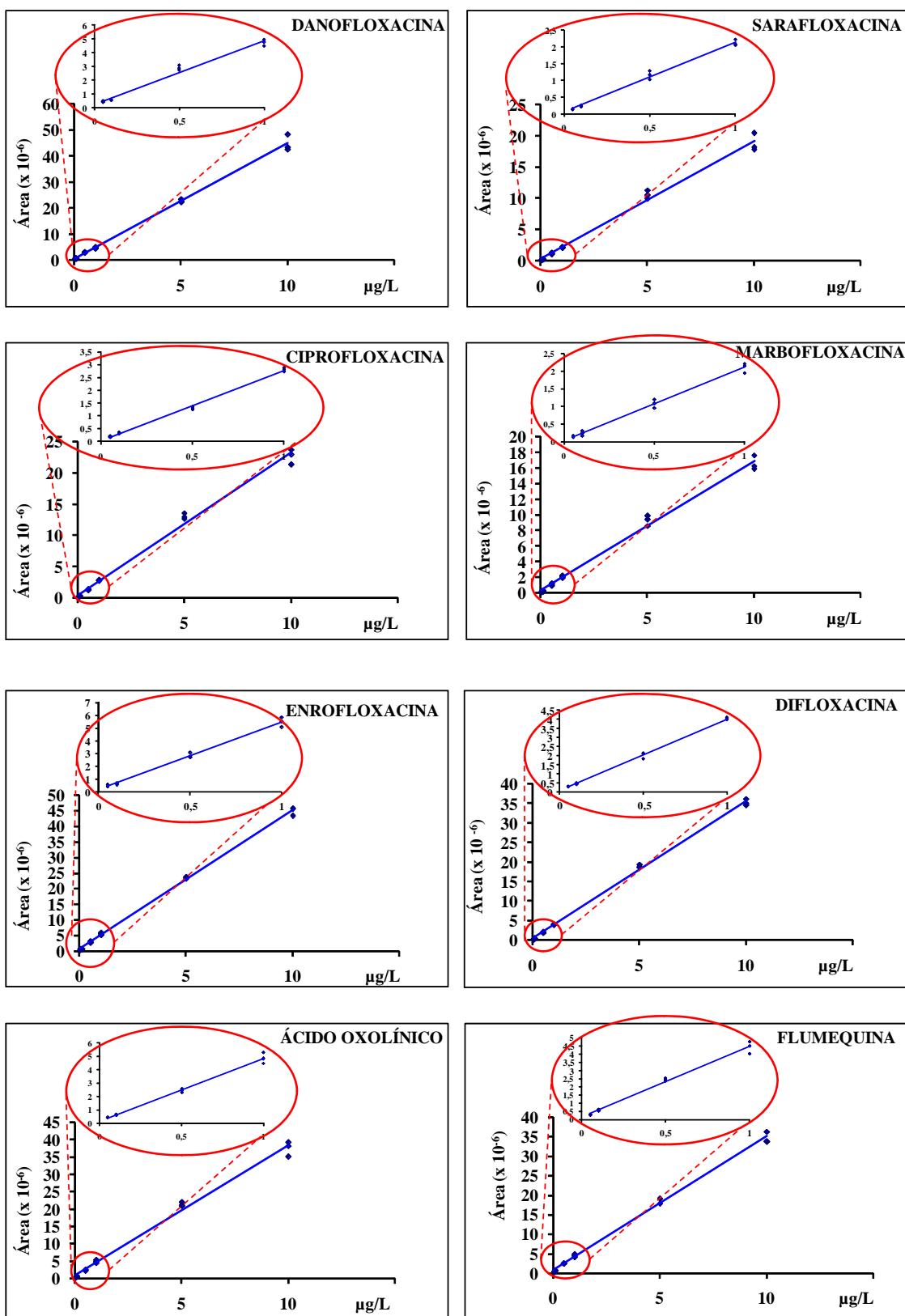


Figura V-8. Rectas de calibrado para las ocho quinolonas estudiadas empleando el método *in-line* SPE-CE-MS/MS propuesto.

Parte 2: Determinación de quinolonas

Los límites de detección (LOD) se calcularon como la mínima concentración de analito que produce una relación señal/ruido igual a tres. Los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon como la concentración de analito más baja que permite obtener una señal 10 veces superior al ruido. Se pudieron determinar niveles de concentración tan bajos como las partes por trillón, lo que demuestra la mejora en sensibilidad obtenida con este concentrador.

Tabla V-4. Parámetros estadísticos del método *in-line* SPE-CE-MS/MS propuesto.

| Analito | Rango lineal ($\mu\text{g/L}$) | Ordenada (a.u.) | Pendiente (u.a. \cdot L/ μg) | R^2 | LOD ($\mu\text{g/L}$) | LOQ ($\mu\text{g/L}$) |
|---------|-------------------------------------|--------------------|---|-------|----------------------------|----------------------------|
| DAN | 0'10-10 | $3'2 \cdot 10^5$ | $4'5 \cdot 10^6$ | 0'996 | 0'021 | 0'10 |
| SAR | 0'25-10 | $2'4 \cdot 10^5$ | $1'9 \cdot 10^6$ | 0'991 | 0'055 | 0'25 |
| CIP | 0'18-10 | $3'6 \cdot 10^5$ | $2'3 \cdot 10^6$ | 0'992 | 0'040 | 0'18 |
| MAR | 0'27-10 | $3'0 \cdot 10^5$ | $1'7 \cdot 10^6$ | 0'993 | 0'059 | 0'27 |
| ENR | 0'10-10 | $5'8 \cdot 10^5$ | $4'5 \cdot 10^6$ | 0'999 | 0'022 | 0'10 |
| DIF | 0'10-10 | $3'5 \cdot 10^5$ | $3'5 \cdot 10^6$ | 0'998 | 0'022 | 0'10 |
| OXO | 0'08-10 | $7'4 \cdot 10^5$ | $3'8 \cdot 10^6$ | 0'993 | 0'017 | 0'08 |
| FLU | 0'08-10 | $6'1 \cdot 10^5$ | $3'4 \cdot 10^6$ | 0'997 | 0'017 | 0'08 |

u.a.: unidades de área

9.5.2.- Estudio de la precisión

La repetibilidad del método se estudió como la media de inyecciones repetidas ($n=3$) de disoluciones patrón de cada quinolona a tres niveles de concentración: 0'1, 1'0 y 10'0 $\mu\text{g/L}$. Cada nivel fue inyectado por triplicado y las desviaciones estándar relativas (DER) obtenidas de las áreas de pico estuvieron comprendidas entre 1'9 y 12'9 % (tabla V-5). Estos valores son similares a los obtenidos en un método CE-MS/MS convencional sin concentrador, lo que demuestra que la utilización de un concentrador no introduce una contribución importante al error aleatorio.

La precisión intermedia o reproducibilidad entre-días también se evaluó a los mismos niveles de concentración anteriormente citados. Cada nivel se inyectó por triplicado durante tres días consecutivos ($n=9$) y empleando el mismo concentrador. Los valores obtenidos de DER estuvieron comprendidos entre el 6'9 y el 15'5 %.

Además de estos estudios, también se llevó a cabo una estimación de la reproducibilidad entre diferentes concentradores (Entre-ACs). Este es un parámetro que no aparece muy a menudo [328] en artículos que tratan sobre estos dispositivos de concentración, y lo cierto es que puede ser muy útil para caracterizar un método porque la vida media de un concentrador no suele ser muy larga, en nuestro caso no se pudieron hacer más de 20-30 inyecciones con el mismo concentrador. El estudio se llevó a cabo utilizando tres concentradores diferentes durante tres días consecutivos ($n=9$) usando las disoluciones patrón de quinolonas de las mismas concentraciones anteriormente citadas. Aunque los valores de DER para el área de pico fueron ligeramente mayores, desde 4'2 a 17'7 %, se podían considerar aceptables.

Tabla V-5. Estudio de la precisión del método *in line* SPE -CE-MS/MS propuesto para la determinación de quinolonas.

| | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Inter-día (DER %, n=3) | | | | | | | | |
| 0'1 µg/L | 1'9 | 9'2 | 8'6 | 6'2 | 12'2 | 3'0 | 10'4 | 1'9 |
| 1'0 µg/L | 5'2 | 5'6 | 6'4 | 8'1 | 2'9 | 8'6 | 7'0 | 8'1 |
| 10'0 µg/L | 8'1 | 6'5 | 8'0 | 12'7 | 4'4 | 12'9 | 11'6 | 11'6 |
| Entre-días (DER %, n= 9) | | | | | | | | |
| 0'1 µg/L | 10'4 | 12'5 | 14'7 | 14'5 | 15'5 | 12'8 | 12'8 | 14'3 |
| 1'0 µg/L | 10'2 | 9'0 | 14'6 | 11'1 | 7'1 | 8'7 | 10'7 | 11'2 |
| 10'0 µg/L | 10'5 | 8'6 | 9'8 | 7'5 | 6'9 | 7'7 | 13'3 | 10'5 |
| Entre-ACs (DER %, n=9) | | | | | | | | |
| 0'1 µg/L | 7'0 | 17'7 | 12'0 | 17'3 | 10'5 | 6'7 | 9'9 | 16'9 |
| 1'0 µg/L | 6'0 | 9'0 | 10'8 | 7'8 | 4'2 | 5'4 | 8'9 | 13'2 |
| 10'0 µg/L | 10'1 | 7'7 | 11'5 | 8'5 | 7'5 | 9'0 | 16'2 | 13'9 |

[328] Swartz, M.E., Merion, M., *J. Chromatogr.*, 1993, 632, 209-213.

9.5.3.-Evaluación de la eficacia del concentrador: recuperaciones *in-line*

Finalmente, con el objetivo de realizar una evaluación exhaustiva del concentrador construido, se propone en este capítulo, por primera vez según nuestra información, un método fiable para evaluar la capacidad de retención de los analitos en el concentrador y también la eficacia en la elución. Para ello se calcularon las denominadas “recuperaciones *in-line*”.

Un concentrador ideal debería ser capaz de retener todas las moléculas de analitos inyectadas y debería ser capaz también de eluir las completamente. En esta situación ideal, las “recuperaciones *in-line*” serían del 100 %. Desafortunadamente, los concentradores reales no logran este nivel de eficacia, así que para comparar diferentes concentradores sería interesante evaluar estas recuperaciones mediante la comparación de las áreas de pico obtenidas utilizando un capilar con concentrador y las áreas de pico obtenidas utilizando un capilar sin concentrador. En el primer caso, algunas de las moléculas inyectadas se van a perder debido a que algunas no serán retenidas y otras no serán eluidas. En cambio, en el capilar sin concentrador no se pierden moléculas en el proceso de inyección, así que para calcular las “recuperaciones *in-line*” es necesario inyectar la misma cantidad de moles en ambos capilares y comparar las áreas utilizando la expresión:

$$\text{"recuperaciones in-line"} = 100 \times \left(\frac{\text{moles detectados}}{\text{moles inyectados}} \right),$$

o lo que es lo mismo:

$$\text{"recuperaciones in-line"} = 100 \times \left(\frac{\text{area capilar con AC}}{\text{area capilar sin AC}} \right)$$

Para obtener resultados válidos es necesario inyectar la misma cantidad de moles en ambos capilares. Por tanto el primer paso consiste en evaluar los moles de analito que se inyectan cuando se aplican 7 bar durante 15 min., y para ello necesitamos saber qué volumen de muestra hemos introducido en el capilar en estas condiciones. Este volumen lo calcularemos con la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$V(m^3) = \frac{\Delta P(Pa) \cdot d^4(m) \cdot \pi \cdot t(s)}{128 \cdot \eta(Pa \cdot s) \cdot L_{TOT}(m)}$$

Donde:

- V : es el volumen de muestra introducido.
- ΔP : es la presión aplicada para introducir la muestra.
- d : es el diámetro interno del capilar.
- t : es el tiempo durante el cual se aplica la presión
- η : es la viscosidad de la muestra.
- L_{TOT} : es la longitud total de capilar.

Para un capilar determinado y con unas condiciones de presión y temperatura constantes, esta ecuación se puede expresar de la siguiente manera:

$$V(\mu L) = k \cdot t(s) \text{ donde } k \text{ es una constante que debemos evaluar, } k = \frac{V(\mu L)}{t(s)}.$$

Se observó que un capilar de 130 cm de L_{TOT} y 50 μm de diámetro interno ($V = 2'55 \mu\text{L}$) tardaba en llenarse 17 s cuando se le aplicaban 7 bar a una disolución 50 mM de acetato amónico.

$$\text{Por tanto } k = \frac{2'55 \mu\text{L}}{17 \text{ s}} = 0'15 \frac{\mu\text{L}}{\text{s}},$$

de manera que si hemos aplicado los 7 bares durante 15 min. (900s) tendremos que el volumen de muestra introducido es el siguiente:

$$V(\mu\text{L}) = 0'15 \frac{\mu\text{L}}{\text{s}} \cdot 900 \text{ s} = 135 \mu\text{L}.$$

Este valor es casi el doble de lo que nos da la aplicación directa de la ecuación de Hagen-Poiseuille ($74 \mu\text{L}$) considerando que la viscosidad de la muestra es igual a la del agua a 20°C . Esta variación puede ser atribuida tanto a la diferencia de viscosidades como a que, a 7 bares la muestra no fluye como un fluido newtoniano ideal. Por tanto para un capilar determinado y en unas condiciones de presión y temperatura constantes es más exacto calcular el volumen introducido evaluando empíricamente el valor de k que aplicar directamente la fórmula.

Una vez que sabemos el volumen de muestra que hemos introducido podemos saber los moles inyectados utilizando el dato de concentración. Pondremos como ejemplo el caso de la DAN:

$$100 \text{ ppt} = \frac{100 \cdot 10^{-9} \text{ g}}{1 \text{ L}} \cdot \frac{1 \text{ mol}}{3581 \text{ g}} \cdot 135 \cdot 10^{-6} \text{ L} = 3'77 \cdot 10^{-14} \text{ moles} = 377 \text{ femtomoles}$$

$$1 \text{ ppb} = 3'77 \cdot 10^{-13} \text{ moles} \quad \text{y} \quad 10 \text{ ppb} = 3'77 \cdot 10^{-12} \text{ moles}$$

Para un capilar normal, es decir, sin concentrador no conviene introducir un volumen de muestra superior al 2 % del volumen total del capilar para que el rendimiento de la separación electroforética sea óptimo. En nuestro capilar de 130 cm de longitud y 50 μm de diámetro interno, un 2 % supone un volumen de 51 nL. Así que para comparar

Parte 2: Determinación de quinolonas

con el valor de señal obtenido a 100 ppt para 7 bares durante 15 min deberemos inyectar 51 nL de una disolución de la siguiente concentración:

$$3'77 \cdot 10^{-14} \text{ moles} \cdot \frac{358'1 \text{ g}}{1 \text{ mol}} \cdot \frac{1}{51 \cdot 10^{-9} \text{ L}} = 0'265 \text{ ppm}$$
$$3'77 \cdot 10^{-13} \text{ moles} = 2'65 \text{ ppm}$$
$$3'77 \cdot 10^{-12} \text{ moles} = 26'5 \text{ ppm}$$

Estas concentraciones serán las mismas para todos los analitos, así que finalmente sólo nos queda evaluar el tiempo que necesitamos para introducir 51 nL en el capilar si lo hacemos aplicando 50 mbar. Nuevamente nos volvemos a encontrar que si aplicáramos directamente la ecuación de Hagen-Poiseuille, los valores predichos podrían diferir significativamente de los valores reales, por este motivo nos volvemos a plantear el cálculo de k con las nuevas condiciones de presión aplicada. En esta ocasión se vio que cuando se aplicaban 50 mbar el capilar tardaba en llenarse 54 min. (3240 s). La ecuación predice 73 minutos, en esta ocasión la diferencia no es tan grande como cuando se aplican 7 bares porque a una presión menor es probable que el fluido se comporte de una manera más ideal.

Para el cálculo de la nueva constante, k' :

$$k' = \frac{2'55 \mu\text{L}}{3240 \text{ s}} = 7'87 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{L}}{\text{s}}$$

De tal manera que el tiempo necesario para inyectar 51 nL será:

$$t(\text{s}) = \frac{51 \cdot 10^{-3} \mu\text{L}}{7'87 \cdot 10^{-4} \mu\text{L/s}} = 65 \text{ s}$$

Por tanto si aplicamos 7 bares durante 15 min. a una disolución de 100 ppt introducimos los mismos moles de analito usando un capilar con concentrador que si aplicamos 50 mbar durante 65 s a una disolución de 0'265 ppm inyectada en un capilar sin concentrador. Como se ha comentado anteriormente, la “recuperación in-line” se calcula por comparación de las áreas obtenidas en ambos casos. Los resultados, para diferentes niveles de concentración ensayados, se muestran en la tabla V-6, donde se observan recuperaciones comprendidas entre un 20 y 37%.

Sin embargo, es interesante mencionar que estos valores de recuperación podrían ser incrementados entre un 20 y 40 % si la presión se reduce desde 7 a 1 bar, aunque obviamente el tiempo necesario para inyectar el mismo volumen de muestra sería mayor y el tiempo de análisis sería extremadamente largo.

Tabla V-6. Recuperaciones *in-line* a diferentes niveles de concentración: Nivel 1=0'1 µg/L; Nivel 2=1'0 µg/L; Nivel 3=10'0 µg/L.

| Recuperaciones <i>in-line</i> , % (n=3) | Nivel 1 | Nivel 2 | Nivel 3 |
|--|---------|---------|---------|
| DAN | 25 | 20 | 26 |
| SAR | 33 | 33 | 33 |
| CIP | 30 | 31 | 33 |
| MAR | 28 | 23 | 28 |
| ENR | 28 | 25 | 37 |
| DIF | 30 | 28 | 32 |
| OXO | 30 | 25 | 25 |
| FLU | 35 | 26 | 27 |

9.6.- Validación del método PLE-SPE- *in-line* SPE -CE-MS/MS en matriz

9.6.1.- Rectas de calibrado, linealidad y límites de detección y cuantificación

El método analítico completo, incluyendo el tratamiento de muestra, se validó en presencia de matriz. Las curvas de calibrado para las quinolonas seleccionadas aplicando el método de PLE-SPE- *in-line* SPE-CE-MS/MS se obtuvieron empleando muestras limpias de músculo de pollo y dopándolas antes del tratamiento de muestra con cuatro niveles de concentración para cada quinolona, correspondientes a 0'5, 2, 8 y 20 µg/kg. En todos los casos, 5 µg/L de LOM se añadieron como IS durante el paso de reconstitución. Se prepararon dos réplicas a cada nivel de concentración. Las curvas de calibrado se establecieron considerando áreas de pico relativas (relación entre el área del pico de analito y el área del pico de IS). Los parámetros estadísticos, calculados mediante regresión por mínimos cuadrados, así como los parámetros de calidad, se muestran en la tabla V-7. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos fueron del orden de los ng/kg y en todos los casos puede observarse como son considerablemente inferiores a los límites máximos de residuo (LMR) establecidos por la UE para estos compuesto en músculo de pollo.

Parte 2: Determinación de quinolonas

Tabla V-7. Parámetros estadísticos y de calidad del método PLE-SPE-*in line* SPE-CE-MS/MS propuesto para la determinación de quinolonas en muestras de músculo de pollo.

| Analito | Rango lineal ($\mu\text{g/kg}$) | Ordenada | Pendiente ($\text{kg}/\mu\text{g}$) | R^2 | LOD (ng/kg) | LOQ (ng/kg) | LMR ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|---------|--------------------------------------|----------|--|-------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| DAN | 0'22-20 | 0'074 | 0'157 | 0'995 | 65 | 220 | 200 |
| SAR | 0'36-20 | 0'085 | 0'070 | 0'993 | 110 | 360 | N.E. |
| CIP | 0'47-20 | 0'008 | 0'057 | 0'994 | 140 | 470 | 100 ^{b)} |
| MAR | 0'29-20 | -0'032 | 0'138 | 0'993 | 90 | 290 | N.E. |
| ENR | 0'13-20 | -0'039 | 0'308 | 0'992 | 40 | 130 | 100 ^{b)} |
| DIF | 0'30-20 | -0'028 | 0'320 | 0'993 | 90 | 300 | 300 |
| OXO | 0'32-20 | 0'032 | 0'209 | 0'994 | 95 | 320 | 100 |
| FLU | 0'22-20 | 0'112 | 0'208 | 0'998 | 65 | 220 | 400 |

b) LMR (ENR + CIP) = 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

N.E. No establecido en muestras de músculo de pollo.

La figura V-9 muestra el electroferograma correspondiente a distintas muestras de carne dopadas con tres concentraciones diferentes de los analitos en estudio, sometidas al procedimiento completo y en la figura V-10 se representa el electroferograma correspondiente a (A) un blanco de muestra (no se observan picos interreferentes), (B) el nivel más bajo de la curva de calibrado y (C) un blanco después de haber inyectado una muestra dopada con 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, pudiéndose comprobar que la contaminación entre muestras es despreciable.

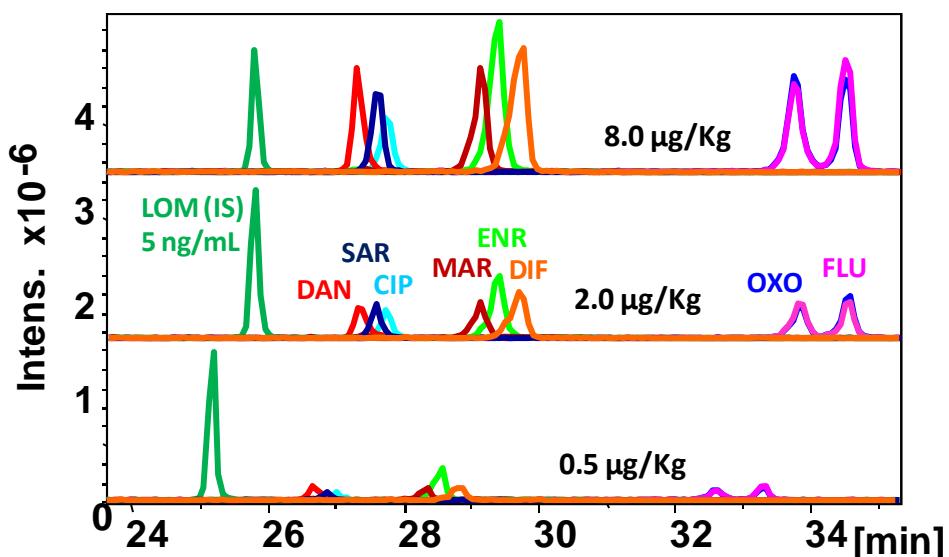


Figura V-9. Electroferogramas para diferentes muestras de músculo de pollo dopadas a diferentes niveles de concentración, obtenidos usando el método propuesto PLE- *in-line* SPE-CE-MS/MS en condiciones óptimas.

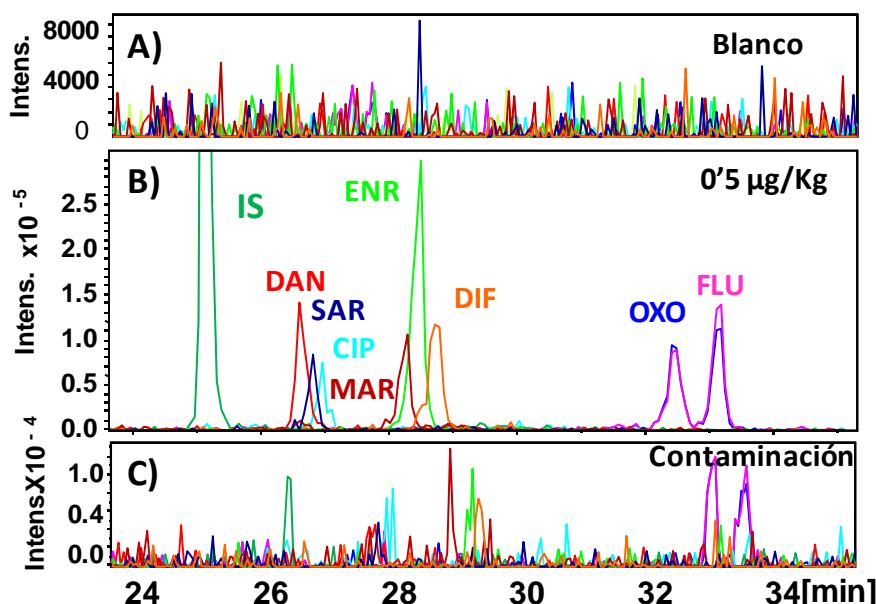


Figura V-10. Electroferogramas de: (A) una muestra blanca, (B) una muestra de músculo de pollo dopada a 0'5 µg/kg para cada quinolona y (C) contaminación cruzada después de una inyección (7 bar × 15 min.) de una muestra de músculo de pollo dopada con 8 µg/kg.

9.6.2.- Estudio de la precisión

La precisión del método completo se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad se estudió en un solo día por medio de aplicaciones repetitivas del procedimiento de tratamiento de muestra a tres muestras diferentes (réplicas experimentales) de tres niveles de concentración para cada quinolona (0'5, 2 y 8 µg/kg). La precisión intermedia se evaluó durante tres días consecutivos con un procedimiento similar al de los estudios de repetibilidad. El resultado, expresado como DER de las áreas de pico, fue ≤ 19 % en todos los casos (tabla V-8), lo que se puede considerar aceptable, considerando la metodología aplicada.

Tabla V-8. Estudio de la precisión del método PLE-SPE- *in-line* SPE-CE-MS/MS propuesto para muestras de carne de pollo.

| | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Intra-día (DER) (%) (n=3) | | | | | | | | |
| 0'5 µg/kg | 15 | 9 | 13 | 14 | 14 | 9 | 17 | 5 |
| 2 µg/kg | 17 | 13 | 13 | 18 | 7 | 5 | 4 | 10 |
| 8 µg/kg | 12 | 15 | 19 | 12 | 11 | 6 | 8 | 4 |
| Tiempo mig. (min.) | 27'1 | 27'3 | 27'5 | 28'8 | 29'1 | 29'4 | 33'3 | 34'1 |
| DER (%) (n=3) | 1'5 | 1'7 | 1'5 | 1'6 | 1'8 | 2'1 | 2'3 | 2'3 |
| Entre-días (DER) (%) (n=3) | | | | | | | | |
| 0'5 µg/kg | 15 | 16 | 7 | 16 | 19 | 5 | 4 | 12 |
| 2 µg/kg | 18 | 10 | 17 | 11 | 15 | 17 | 13 | 8 |
| 8 µg/kg | 16 | 15 | 6 | 15 | 16 | 13 | 10 | 19 |
| Tiempo mig. (min.) | 28'1 | 28'4 | 28'6 | 30'1 | 30'3 | 30'7 | 34'9 | 35'8 |
| DER (%) (n=9) | 9 | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 12 | 12 |

9.6.3.-Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación

Para estudiar la eficacia del tratamiento de muestra se llevaron a cabo estudios de recuperación a tres niveles diferentes preparando muestras de músculo de pollo dopadas con distintos niveles de concentración de las quinolonas en estudio (0'5, 2 y 8 µg/kg) antes de comenzar el proceso de extracción. Se prepararon tres réplicas a cada nivel de concentración y se sometieron las muestras al procedimiento analítico completo propuesto.

Las recuperaciones absolutas se calcularon comparando áreas de pico de muestras de músculo de pollo dopadas antes del tratamiento de muestra con las áreas de pico de muestras de músculo de pollo dopadas después del tratamiento de muestra. Las recuperaciones obtenidas estuvieron comprendidas entre el 63 y el 112 %, con valores de DER aceptables en todos los casos. Los resultados se muestran en la tabla V-9.

Tabla V-9. Recuperaciones medias (%) para cada quinolona en muestras de músculo de pollo dopadas a diferentes niveles de concentración. Entre paréntesis, valores de la DER (%).

| n = 3 | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|-----------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|----------|
| 0'5 µg/kg | 105 (15) | 81 (16) | 63 (7) | 71 (16) | 82 (14) | 87 (5) | 91 (4) | 93 (12) |
| 2 µg/kg | 86 (12) | 66 (13) | 67 (13) | 67 (14) | 90 (7) | 94 (5) | 112 (4) | 110 (10) |
| 8 µg/kg | 103 (16) | 66(15) | 66 (16) | 85 (12) | 84 (11) | 92 (6) | 99 (8) | 105 (4) |

PART 3:

DETERMINATION OF TRIAZINES

CHAPTER 6

EVALUATION OF A MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER AS
IN-LINE CONCENTRATOR FOR THE DETERMINATION OF
ATRAZINE AND ITS DEGRADATION PRODUCTS BY
CAPILLARY ELECTROPHORESIS

1.- Introduction

Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic materials with artificially generated recognition sites able to specifically bind to a target molecule. Although MIPs have been employed in fields such as sensors [329], chromatography [330] and catalysis [331], their use in solid-phase extraction (SPE), so called molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE), is by far the most advanced technical application of MIPs [332]. The use of MIPs as selective sorbent materials allows performing a customized sample treatment step prior to the final determination. This is of special interest when the sample is complex and the presence of interferences leads to signal overlap in chromatography complicating reliable quantification.

The use of MIPs in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography (CE and CEC) has been limited to off-line sample treatment by MISPE and they have also been applied in packed, monolithic and open tubular capillaries or buffer additives for separation purposes [330,333]. So far, to the best of our knowledge, the use of MIPs as in-line concentrators in CE has not been reported. In principle, it should be possible to achieve a high level of preconcentration in this way since it allows increasing the sample volume injected from nanoliters to microliters. On the one hand, the selectivity of MIPs is comparable to antibody-antigen and enzyme-substrate recognition but at the same time, MIPs possess advantages in terms of physical robustness, rigidity, resistance to elevated temperature and pressure, and inertness towards acids, bases, metal ions and organic solvents. Therefore, it should be possible to carry out direct injection of complex matrixes in CE with minimum sample treatment, as such speeding up the analyses.

Triazine herbicides are cause of concern as they are toxic and persistent in water, soil and organisms. These compounds are suspected to be endocrine disrupting chemicals (EDCs) and are listed as priority pollutants by the Environmental Protection Agency (EPA) and European regulatory agencies. Atrazine has also been classified as a possible human carcinogen [334]. The inclusion of triazine degradation products as target compounds in analytical procedures is crucial since some of these degradation products are as toxic as, or even more so than their parent compounds.

Although gas chromatography is the preferred technique for the analysis of triazines [335] it can be problematic for the most polar compounds. HPLC methods have been developed [336], but it has been shown that similar results can be obtained when CE is

[329] Ye, L., Haupt, K., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1887-1897.

[330] Turiel, E., Martín-Esteban, A., *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1876-1886.

[331] Alexander, C., Davidson, L., Hayes, W., *Tetrahedron* 2003, 59, 2025-2057.

[332] Tamayo, F.G., Turiel, E., Martín-Esteban, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1152, 32-40.

[333] Liu, Z.-S., Zheng, C., Yan, C., Gao, R.-Y., *Electrophoresis* 2007, 28, 127-136.

[334] Shen, G., Lee, H.K., *Anal. Chem.* 2002, 74, 648-654.

[335] Nagaraju, D., Huang, S.-D., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 89-97.

[336] Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B., *Mass Spectrometry Reviews* 2006, 25, 838-865.

Part 3: Determination of triazines

used [337], offering advantages over HPLC in terms of efficiency, lower analysis time and cost. CE has been applied for the separation of triazines [338- 342] and their hydroxy metabolites [343,344], but to the best of our knowledge, no CE method has been reported for the determination of ATZ and its three *N*-dealkylated metabolites, i.e., desethylatrazine (DEA), desisopropylatrazine (DIA), desethylatrazine (DEA) (figure VI-1). This is surprising considering their toxicity and taking into account that all of them can be potentially found in a sample containing atrazine [345].

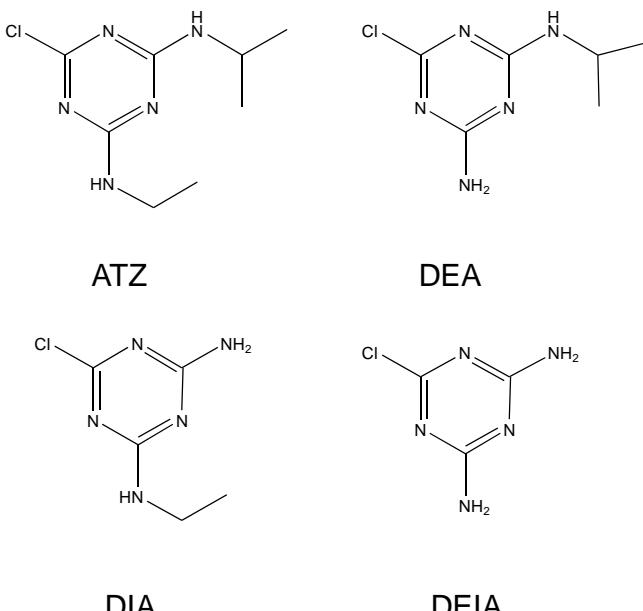


Figure VI-1. Chemical structures of the studied triazines: atrazine (ATZ), desethylatrazine (DEA), desisopropylatrazine (DIA) and desethyldesisopropylatrazine (DEIA).

The in-line coupling of SPE and CE for the determination of triazines (prometron and prometryne) was first reported by Cai and El Rassi [346] using fused-silica capillaries having surface-bound octadecyl functions.

In this chapter, the possibilities and limitations of MIPs when they are used as sorbent for the construction of an in-line concentrator in CE are studied. The usefulness of the

- [337] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Miranda-Cruz, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., *J. Chromatogr. A* 2006, **1122**, 194-201.
[338] Frías-García, S., Sánchez, M.J., Rodríguez-Delgado, M.A., *Electrophoresis* 2004, **25**, 1042-1050.
[339] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Hernández-Méndez, J., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 4437-4444.
[340] Tsai, C.-Y., Chen, Y.-R., Her, G.-R., *J. Chromatogr. A* 1998, **813**, 379-386.
[341] Schmitt, P., Garrison, A.W., Freitag, D., Kettrup, A., *J. Chromatogr. A* 1996, **723**, 169-177.
[342] Lin, C.-E., Wang, T.-Z., Huang, H.-C., Hsueh, C.-C., Liu, Y.-C., *J. Chromatogr. A* 2000, **878**, 137-145.
[343] Schmitt, P., Poiger, T., Simon, R., Freitag, D., Kettrup, A., Garrison, A.W., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 2559-2566.
[344] Loos, R., Niessner, R., *J. Chromatogr. A* 1999, **835**, 217-229.
[345] Qiao, X., Ma, L., Hummel, H. E., *J. Agric. Food Chem.* 1996, **44**, 2846-2848.
[346] Cai, J., El Rassi, Z., *J. Liq. Chromatogr.* 1992, **15**, 1179-1192.

proposed assembly will be evaluated in the monitoring of ATZ and its three metabolites (DEIA, DIA, DEA) in urine samples.

2.- Chemicals and solutions

All chemicals and solvents were of analytical grade. Phosphoric acid was purchased from UCB (Leuven, Belgium). Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), sodium dodecyl sulphate (SDS), methanol, acetonitrile, sodium hydroxide, sodium hydrochloric acid was acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). Desethyldeisopropylatrazine, desisopropylatrazine, desethylatrazine and atrazine were provided by Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The other triazine herbicides: metribuzin, metamitron, cyanazine, propazine, sebutylazine, terbutylazine, promethryn, terbuthryl were from Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany.

A mixture of 100 µg/mL of each triazine was prepared in MeOH and stored at 4 °C. The solutions to be analyzed were prepared by dilution with water or drying with N₂ and reconstituting in an aqueous solution of 75 mM H₃PO₄ adjusted to pH 7 with 1 M NaOH.

Molecularly imprinted polymers were obtained from SupelIMIPTM, SPE-Triazine 10 cartridges by Supelco (Bellefonte, PA, USA) and Oasis® HBL particles (60 µm) were obtained from SPE cartridges from Waters (Milford, MA, USA).

3.- Instrumentation

CE experiments were performed on two systems: a P/ACE 2100 and a P/ACE 5510 (Beckman, Fullerton, CA, USA) equipped with an optical filter set at 214 nm. GoldTM Software (Beckman, Fullerton, CA, USA) was used for the instrument control. Bare-fused silica capillaries with 50, 75 and 150 µm i.d. were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). A pH meter (Thermo Electron Corporation model Orion420A+, San Jose, CA, USA) was employed with a resolution of ± 0.01 pH unit.

4.- Electrophoretic procedure for normal CE

Capillaries of 57 cm total length (50.5 cm effective length) and 50 µm i.d. were used for normal injection. Before the first use, the capillaries were conditioned by flushing 0.1 M NaOH for 30 min., then with water for 10 min., and finally with the background electrolyte solution for 20 min. At the beginning of each day, the capillaries were conditioned for 5 min. with 0.1 M NaOH, for 3 min with water and finally with running buffer for 5 min. After each injection the capillary was conditioned with 0.1 M NaOH for 1 min., with water for 1 min. and finally with running buffer for 3 min. A pressure

of 20 psi was applied in all cases. Hydrodynamic injections were carried out by applying a pressure of 0.5 psi for 5 s followed by a small plug of running buffer (0.5 psi x 3 s).

5.- Electrophoretic procedure for CE with the concentrators

Capillaries of 87 cm (74 cm effective length) and 75 µm i.d. were used for analyses with concentrators, which proposed in this chapter, using MIPs, and another one using HLB sorbent and applied for comparison purposed. The UV-Vis detection was carried out at 214 nm.

The running buffer consisted of an aqueous solution of 75 mM H₃PO₄ and 0.7 mM of CTAB and the pH was adjusted to 2.1 with 1M NaOH. The electrophoretic separation was achieved with a voltage of -20 kV (negative polarity) with a ramp time of 0.17 min. The temperature of the capillary was kept constant at 20 °C. In these conditions, the capillary current was about 57 µA. Before the first use, capillaries were conditioned by flushing 1M NaOH for 10 min. at 50 °C, then with water for 5 min. at 20 °C and finally with running buffer for 20 min. at 20 °C. This initial conditioning was carried out without concentrator. At the beginning of each day the capillary was conditioned with running buffer for 10 min. After each injection the capillary was conditioned with MeOH for 2 min. and another 2 min. of an aqueous solution of 75 mM H₃PO₄ adjusted to pH 7 with 1 M NaOH. The sample was loaded using a pressure of 0.5 psi for 15 min. (ca. 2.7 µL using the Hagen-Poiseuille equation). The sample solvent was displaced from the capillary with running buffer by applying 20 psi for 1 min. The analytes were eluted by injecting a plug of ACN:H₂O (1:1 v/v), using a pressure of 0.5 psi for 20 s (ca. 1.6 % of the total capillary volume = 60 nL) and followed by running buffer (0.5 psi x 2.5 min) to put the elution plug through the MIPs before applying the separation voltage.

6.- Construction of the in-line concentrator for CE using MIPs

This procedure was similar to that described in chapter 5 for the proposed in line SPE-CE assembly. The first step in the construction of the concentrator was to cut ca. 2 mm of bare-fused silica capillary of 150 µm of inner diameter and 360 µm of outer diameter. A proper cut in both sides of this capillary is essential to obtain an optimum performance of the concentrator. The entire process of fabricating the concentrator was monitored under a microscope. This small piece of capillary was connected to a vacuum pump and the sorbent (MIP particles) were carefully loaded. When the concentrator was successfully loaded, it was introduced half way into a 1.5 cm piece of PTFE tube (Omnifit, Cambridge, England) with an inner diameter of 0.3 mm. Then, a 6.5 cm piece of bare-fused silica capillary (75 µm i.d. × 360 µm o.d.) was coupled to one side of the PTFE tube and finally, the column was extended to full length connecting another piece

of bare-fused silica capillary ($75 \mu\text{m}$ i.d. \times $360 \mu\text{m}$ o.d.) in the other side of the PTFE tube. The concentrator was fit in the CE cartridge and checked for abnormal flow. The constructed concentrator is shown in figure VI-2.

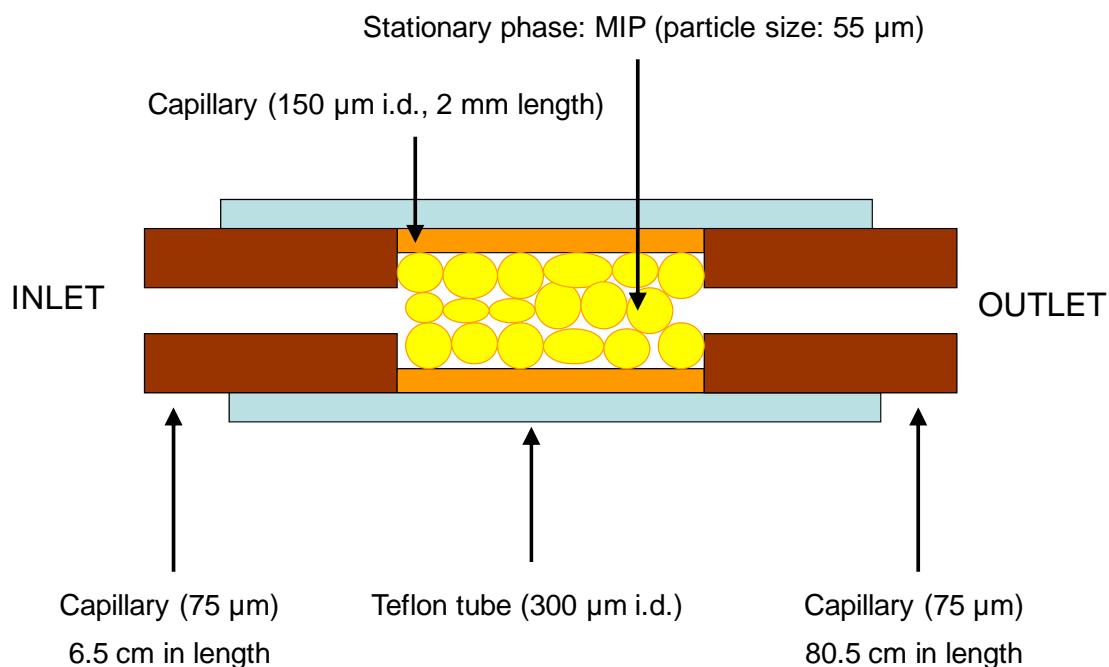


Figure VI-2. Schematic diagram of the developed in-line concentrator using MIPs.

7.- Off-line solid-phase extraction using MIPs

The manufacturer procedure was thereby followed excluding the washing steps i.e. A volume of 1 mL of Milli-Q water containing $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ of each target triazine was percolated through the SupelMIP™ cartridges which were previously activated with 1 mL of MeOH, 1 mL of water and 1 mL of $25 \text{ mM } \text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ at pH 3. Vacuum was applied for 2 min. to dry the cartridge and the analytes were eluted with $3 \times 1 \text{ mL}$ of MeOH.

8.- Sample treatment of human urine

A volume of $100 \mu\text{L}$ of a standard solution containing $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ of each triazine in MeOH was dried under a stream of nitrogen and was reconstituted with 1 mL of human urine previously filtered through a syringe membrane filter (13 mm $0.22 \mu\text{m}$ PVDF, Rotilabo®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). A volume of $8.3 \mu\text{L}$ of concentrated hydrochloric acid was added in order to achieve a final concentration of 0.1 M HCl in the sample solution.

9.- Results and discussion

9.1.- Optimization of the electrophoretic separation

Before using a concentrator, a method was developed to separate the analytes by CE-UV. In order to achieve this, different electrophoretic modes were tested to find the most suitable one for the separation of ATZ, DEA, DIA and DEIA using normal capillaries. In principle, capillary zone electrophoresis (CZE) is the simplest mode and is fully compatible with the retention and elution on the MIPs but unfortunately chlorotriazines are weakly basic compounds with pKa values below 2 [344], so a very low pH is required [341] and under these conditions there is no EOF, leading to excessively long analysis times. Moreover, it was not possible to achieve a complete separation of DEA and DIA in spite of the different conditions which were tested in terms of type of buffers (phosphate, ammonium acetate, citric acid, tris/H₃PO₄, formic acid), pH (from 1.4 to 5) and concentrations (figure VI-3).

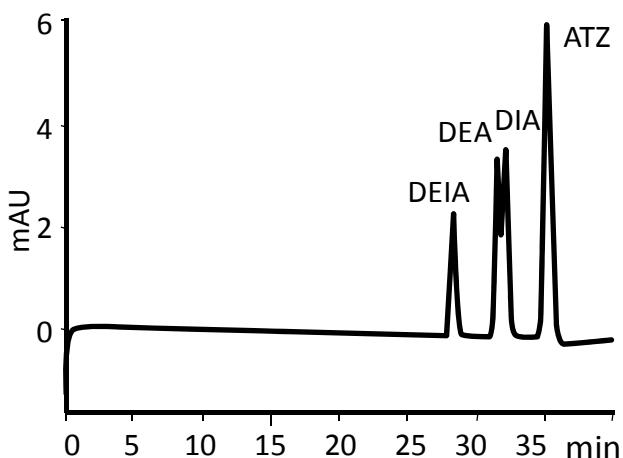


Figure VI-3. Separation of atrazine and their degradation products using CZE in a standard solution containing 25 µg/mL of each compound in water. CE conditions: 50 mM phosphate buffer at pH 2.4, 25 kV and 25 °C.

Taking into account the differences in *n*-octanol-water partitions coefficients ($\log K_{ow}$) [344] it could be possible to separate these four compounds by means of micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) but unfortunately DEIA is a very polar compound and it is not partitioning into the micelle. Therefore it migrates with the EOF when a buffer of 30 mM borate and 60 mM SDS at pH 9.2 is used (Figure VI-4).

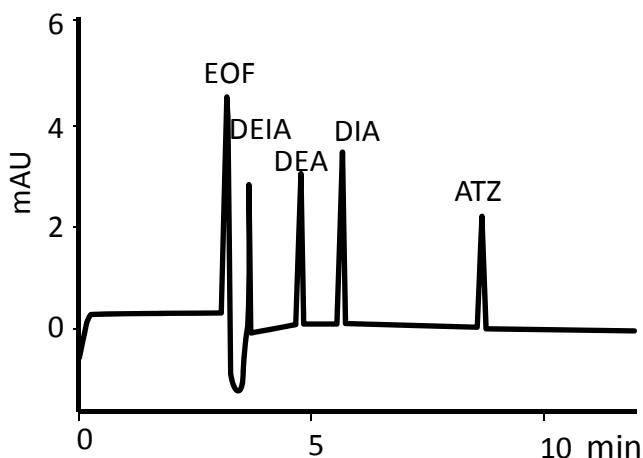


Figure VI-4. Separation of atrazine and degradation products using MECK in a standard solution containing 25 µg/mL of each compound in water. Conditions: 30 mM borate + 60 mM SDS at pH 9.2, 25 kV and 25 °C.

Another mode frequently used for the separation of chlorotriazines is nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) [339] but this mode is not compatible at all with MIPs concentrators as the analytes would be eluted with the buffer prohibiting preconcentration.

An interesting option approach which has been described before [340], is the use of a buffer containing CTAB which reverses the EOF, requiring change in polarity to determine cations. The addition of a small amount of CTAB to the buffer allows for an EOF even at very low pH reducing the analysis times even for the cations which migrate after the EOF in this mode. Phosphoric acid was selected for buffer as pH values of around two are necessary to protonate chlorotriazines and because this buffer is transparent at the wavelength of detection. When SPE is used in-line with CE low electrical currents are preferred as high values can quite easily lead to bubble formation inside the capillary. This is mainly because of the Joule heating effect. For this reason the values for separation voltage, capillary temperature and buffer composition were selected as a compromise to obtain low current and sufficient resolution. The pH was studied between 1.8 and 2.8 and the highest resolution was achieved at pH 2.1. Because the addition of organic solvents to the buffer could elute the compounds from the MIPs, this approach was not investigated. Optimized conditions are summarized in table VI-1.

Part 3: Determination of triazines

Table VI-1. Optimum conditions for the electrophoretic separation of ATZ, DEA, DIA and DEIA.

| Parameter | Optimum value |
|-------------|--|
| Buffer | 75 mM H ₃ PO ₄ and 0.7 mM CTAB |
| pH | 2.1 |
| Voltage | -20 kV |
| Temperature | 20 °C |

Under optimized conditions it was possible to separate the four chlorotriazines in less than 9 min. (figure VI-5A). A more complex mixture containing 12 triazines was also injected and separated in less than 12 min. (figure VI-5B). Peak efficiencies of around 150000 plates were achieved.

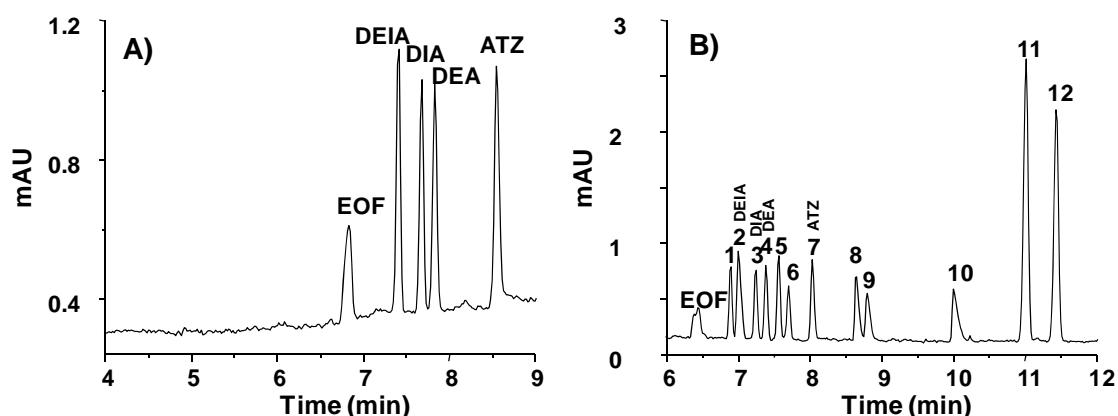


Figure VI-5. A) Electropherogram of DEIA, DIA, DEA and ATZ at optimum conditions: 75 mM H₃PO₄ and 0.7 mM CTAB at pH 2.1, -20 kV, 57 cm and 0.5 psi x 5 s injection. Concentration: 25 µg/mL of each triazine in water. B) Electropherogram of a larger triazine mixture under the same conditions as above. Peak identification: 1, Metribuzin; 2, DEIA; 3, DIA; 4, DEA; 5, Metamitron; 6, Cyanazine; 7, ATZ; 8, Propazine; 9, Sebutylazine; 10, Terbutylazine; 11, Promethryne; 12, Terbuthryne. 20 µg/mL of each triazine in 0.1 M HCl.

9.2.- Optimization of the in-line concentrator device using MIPs

Considering that MIPs are commercially available as irregularly shaped particles with an average size of 55 µm, the most suitable mode for the construction this in line concentrator for CE was the use of packed beds, which were explained in the introduction of chapter 5. The manufacturing of the concentrator has been described in section 6. The large MIP particles are thereby sucked into a large bore capillary (150 µm i.d.), and retained at the connection with the CE capillary with an i.d. of 75 µm. This avoids the use of frits, which are prone to lead to bubble formation during the runs. Also notice that MIPs are stable polymers allowing the conditioning of the capillary with NaOH solutions which is not advisable in case of silica based concentrators.

Another parameter which required optimization is the length of the concentrator. Longer concentrators have higher breakthrough volumes, and therefore, larger sample volumes can be injected. As a consequence larger elution plugs are also required for the elution leading to band broadening. The high retention capacity of the MIPs, which is well-known when it is used in SPE cartridges considering the low quantity needed in comparison with other common sorbents, allows using very short concentrators avoiding the necessity of using stacking procedures to sharpen peaks. Eventually with a concentrator of 2 mm length (150 i.d.) efficiencies among 39000 and 55000 plates could be achieved.

Separation capillaries with an i.d. of 75 µm were selected because they have a higher loading capacity compared to the 50 µm capillaries. Therefore, for the use of the same sample and elution volume on both capillaries shorter sample zones will be obtained on the 75 µm capillary and hence sharper signals.

9.3.- Optimization of the variables involved in the in-line concentration with MIPs

Before attempting the use of MIPs as *in-line* concentrators in CE, the performance of MIPs was studied off-line in SPE. The manufacturer procedure was thereby followed excluding the washing steps: 1 mL of Milli-Q water containing 25 µg/mL of each triazine was percolated through the SupelMIPTM cartridges which were previously activated with 1 mL of MeOH, 1 mL of water and 1 mL of 25 mM NH₄H₂PO₄ at pH 3. Vacuum was applied for 2 min. to dry the cartridge and the analytes were eluted with 3 x 1 mL of MeOH.

The recoveries obtained were 101% for ATZ, 108 % for DEA, 103% for DIA and 75% for DEIA. Thus quantitative results can be obtained for ATZ, DEA and DIA. The lower recovery obtained for DEIA is probably related to the fact that it is the most structurally different from the template, which was used for the making of the MIPs. This explanation is corroborated by the fact that DEIA was found in the load fraction after SPE while DEA, DIA and ATZ were not found or in negligible quantities.

Part 3: Determination of triazines

Several parameters were investigated to achieve the highest performance of the concentrator including sample pH, injection pressure, injection time, composition and volume of the elution plug.

The sample pH can affects the retention of the analytes in the MIPs. According to the manufacturer it should be possible to retain triazines in water without controlling the pH. However, in this study the sample was prepared in 75 mM H₃PO₄ adjusted to pH 7 with 1M NaOH. In this way, we observed maximum retention on the MIPs as the interaction is the strongest when the triazines are in the neutral form. Lower signals were obtained when the sample was prepared in HCl 0.1 M (figure VI-6).

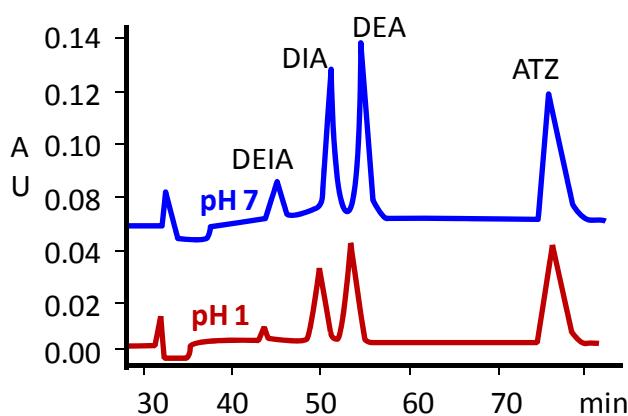


Figure VI-6. Optimization of the sample pH in the in-line SPE procedure using MIPs.

One of the great advantages of the concentrators is that they allow the introduction of high volumes of sample. This is around 100 µL in about 15 min. when 20 psi is applied on a capillary of 87 cm length and 75 µm i.d. To increase the injected sample volume it would preferable to increase the applied pressure instead of the injection time because, as the latter leads to longer total analysis time. However, with the MIPs an increase in the applied pressure did not improve the sensitivity as expected. For example, in the case of ATZ when the injection pressure was increased by a factor of 40 (from 0.5 psi to 20 psi) the improvement of the peak area was just 3 times. A suitable explanation could be probably related to the fact that MIP extraction is very specific compared to the partitioning process in other extractors. Therefore the interactions seem to be only optimal at low flow rates. When MIPs are used as normal SPE cartridges, flows lower than 0.5 mL/min are recommended by the manufacturer which is at least four times lower than the flow recommended for other SPE cartridges using sorbents based on non-specific interactions. This result also demonstrates that the retention of the triazines at high flows is not complete and, therefore, that the use of high pressure for injection could lead to erroneous or irreproducible results. Therefore, 0.5 psi was selected for the injection of the sample.

Finally, the composition and volume of the elution plug were optimized. Mixtures of buffer or water and different organic solvents were tested in the same proportion 1:1

(v/v). The use of higher content of the organic solvent led to electrical current problems. MeOH, 2-Propanol and ACN were tested and the highest recoveries were achieved with ACN (Figure VI-7).

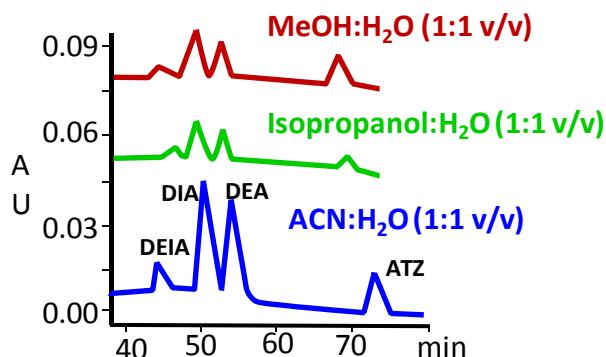


Figure VI-7. Optimization of the elution plug composition in the in-line SPE using MIPs.

The volume of the elution plug is controlled by the injection time of the latter which was studied at 5, 10, 15, 20 s. An increase of the injection time of the eluting solvent led to a linear increase of the peak height up to 15 or 20 s depending on the compound (figure VI-8). So a complete elution of the retained compounds can be achieved with injection times of the eluting solvent of 20 s. Moreover, a blank injection did not show peaks indicating that the carry-over is negligible. An injection time of 20 s for the elution plug, which corresponds roughly to 60 nL using the Hagen-Poiseuille equation, were selected.

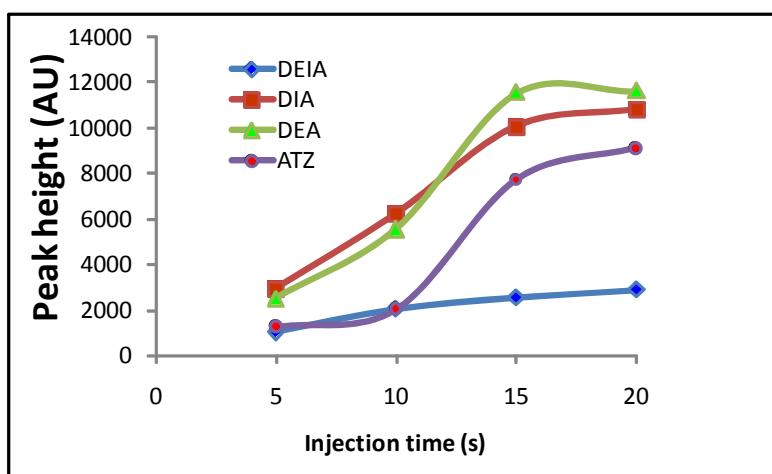


Figure VI-8. Graph representing the influence of the injection time of the elution plug on the obtained peak height using the in-line MIP concentrator.

The optimized conditions from this study are summarized in table VI-2.

Part 3: Determination of triazines

Table VI-2. Optimized conditions for the in-line-SPE in CE using MIPs.

| Parameter | Optimum value |
|---------------------------------|--------------------------------|
| Sample pH | 7 |
| Injection pressure | 0.5 psi |
| Injection time | 15 min. |
| Composition of the elution plug | ACN:H ₂ O (1:1 v/v) |
| Volume of the elution plug | 60 nL |

9.4.- Validation of the in-line MISPE-CE method

9.4.1.- Calibration curves, linearity and detection and quantification limits

The method was evaluated in terms of linearity, repeatability, reproducibility and limit of detection and quantification. Five standard solutions corresponding to 1, 5, 10, 15 and 20 µg/mL were prepared for each triazine. Calibration curves were constructed by plotting peak areas as a function of the concentration. The limit of detection (LOD) was considered as the minimum analyte concentration yielding an S/N ratio equal to three. The limit of quantification (LOQ) was adopted as the lowest analyte concentration yielding a signal 10 times greater than the noise. All the results are presented in table VI-3.

Table VI-3. Figures of merit of the proposed method.

| Analyte | Linear | | R² | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) |
|---------|--------------------------|-------------------|----------------------|----------------|----------------|
| | dynamic range (µg/mL) | Intercept (au) | | | |
| DEIA | 1.9-20 | -9070 | 67567 | 0.998 | 0.6 |
| DIA | 0.7-20 | 20380 | 16742 | 0.999 | 0.2 |
| DEA | 0.8-20 | -40582 | 17553 | 0.998 | 0.2 |
| ATZ | 1.5-20 | -11717 | 13037 | 0.994 | 0.4 |

au: absorbance units

9.4.2.- Precision study

The repeatability was assessed as the relative standard deviation (RSD) of the peak area of replicate experiments ($n=3$) at three different concentrations: 1, 10 and 20 $\mu\text{g/mL}$. The reproducibility was evaluated in three consecutive days with a similar procedure. For all the compounds at the studied concentrations the proposed method provided acceptable precision as can be seen in table VI-4.

Table VI-4. Study of the intra-day and inter-day precision of the proposed method.

| | Intra-day RSD (%) ($n = 3$) | | | Inter-day RSD (%) ($n = 3$) | | |
|------|-------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| | 1 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{g/mL}$ | 20 $\mu\text{g/mL}$ | 1 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{g/mL}$ | 20 $\mu\text{g/mL}$ |
| DEIA | 17.9 | 7.7 | 2.4 | 18.1 | 2.2 | 7.4 |
| DIA | 13.2 | 9.3 | 0.7 | 20.4 | 9.0 | 9.6 |
| DEA | 13.9 | 9.9 | 3.9 | 15.0 | 6.2 | 3.7 |
| ATZ | 17.4 | 7.8 | 3.5 | 21.8 | 14.9 | 12.1 |

9.5.- Application of the proposed in-line MISPE-CE method to human urine samples

In order to demonstrate the usefulness of the proposed method for the analysis of real samples and considering the high selectivity of MIPs, we decided to select as sample a complex matrix, human urine free of analytes. In this sense, a human urine sample spiked with 10 $\mu\text{g/mL}$ of each triazine was injected directly in the in-line MISPE concentrator. In the initial experiments it was not possible to determine triazines, probably due to the interactions with matrix components. However, the addition of concentrated HCl to the urine samples yielding a final concentration of 0.1 M (pH 1) allowed the determination of the triazines in human urine without any other sample treatment (figure VI-9). This positive effect of the addition of concentrated HCl could be explained considering that at very low pH analytes and matrix components present positive charge and in this situation the interactions do not take place.

The sensitivity for standard solutions at pH 1 was between 1.5 and 2.8 times worse compared with pH 7. This is probably because at this low pH the retention of triazines on the MIPs is lower. However, satisfactory recoveries were obtained (table VI-5).

Part 3: Determination of triazines

Table VI-5. Recoveries for the studied compounds using the proposed in-line MISPE-CE method in urine samples spiked with 10 µg/mL of each compound.

| | Recoveries (%) | RSD (%) (n=3) |
|------|----------------|---------------|
| DEIA | 95 | 9 |
| DIA | 102 | 11 |
| DEA | 97 | 9 |
| ATZ | 92 | 11 |

The recoveries were calculated by comparing the peak areas of the standard solutions with the peak areas of urine samples following the same procedure. These results demonstrate that the method can be applied to real samples due to the great selectivity of the MIPs even with very complex matrixes.

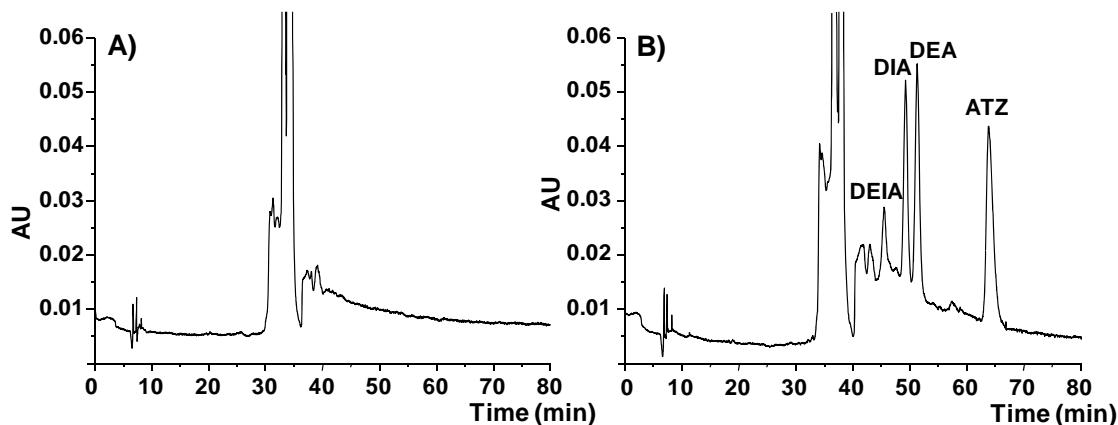


Figure VI-9. In-line MISPE-CE electropherograms of: A) a blank urine sample and B) an urine sample spiked with 10 µg/mL of each triazine. CE conditions: 75 mM H₃PO₄ buffer with 0.7 mM CTAB at pH 2.1, -20 kV, 87 cm of capillary length and 0.5 psi x 15 min. injection.

9.6.- Comparison between MIPs and Oasis® HLB sorbents as in-line concentrators

In order to obtain a more comprehensive evaluation of the MIPs as in-line concentrators in CE, they were compared in qualitative terms with a concentrator prepared in the same way but based on the Oasis® HLB particles (60µm) which can retain the triazines by non specific interactions.

The comparison was carried out using aqueous solutions and urine samples both containing different concentrations of the target triazines. The electropherograms

corresponding to an aqueous solution using both concentrators are shown in figure VI-10.

For aqueous solution, the ATZ signal obtained with the HLB concentrator was 42% of the signal obtained with the MIP concentrator and for DEA and DIA dropped to 15% and 13%, respectively of those on the MIP. DEIA was not retained at all using the Oasis® HLB concentrator. This is clearly related to the polarity of the atrazine metabolites DEIA being the most polar with no hydrophobic interacting groups. The losses of DEA, DIA and DEIA occur during the filling step with buffer after the sample loading. No satisfactory results could be obtained with spiked urine samples on the Oasis® HLB concentrator. This is probably due to the retention and competition of the many endogenous compounds from the matrix.

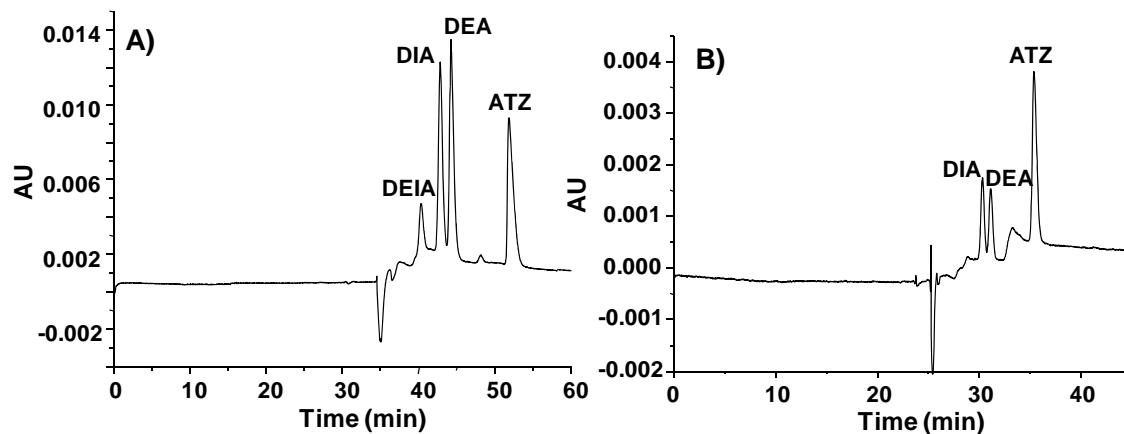


Figure VI-10. In-line SPE electropherogram of an aqueous solution containing 25 µg/mL of each triazine, using: A) MIPs and B) Oasis® HLB as sorbents in the in-line concentrator. Same CE conditions as in figure VI-7.

This paper is in revision R1 in Electrophoresis.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Capítulo 1

Se ha propuesto un nuevo método para la determinación cuantitativa de tres fenotiazinas en preparados farmacéuticos basado en la aplicación de la electroforesis capilar zonal (CZE) con detección UV-vis. Dichos compuestos pueden ser separados y detectados en menos de 3'5 min. utilizando tampón Tris a pH 8'0. Este método constituye una fácil, rápida y económica alternativa a los métodos existentes basados en el uso de la cromatografía líquida y puede ser empleado en el control de calidad farmacéutico debido al bajo coste de los reactivos, simplicidad y rapidez de análisis, exactitud (veracidad y precisión) aceptable y alta eficacia.

Capítulo 2

Se ha desarrollado y validado un método electroforético sensible y rápido para la determinación de cinco fenotiazinas en orina. Con objeto de mejorar la sensibilidad en este caso se ha utilizado una metodología de preconcentración on-line denominada inyección de muestra de campo amplificado (*field amplified sample injection*, FASI). Según nuestro conocimiento en este trabajo se ha usado por primera vez el diseño de experimentos para la optimización de las variables implicadas en la FASI, lo que proporciona una alternativa válida para obtener las mejores condiciones experimentales en esta técnica de preconcentración. También se ha demostrado que la FASI puede ser utilizada como técnica de inyección rutinaria con reproducibilidad satisfactoria. Antes del análisis por CZE, las muestras de orina fueron purificadas y concentradas por extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Oasis® lo que permite la cuantificación de estas fenotiazinas a concentraciones clínicamente relevantes. El método se ha validado para el análisis de los cinco compuestos en orina humana, y la combinación de ambas estrategias (SPE y FASI-CE-UV-Vis) ha demostrado ser útil para la monitorización terapéutica de estos fármacos en el intervalo de concentraciones de los ng/mL.

Capítulo 3

Se ha diseñado y construido un instrumento de CE que incorpora la detección quimioluminiscente (CL), al no existir ningún dispositivo comercial, y que ha sido previamente comprobado y validado con un sistema CL conocido. El sistema CE-CL se ha aplicado a la determinación de PMH y PTH. En primer lugar se llevó a cabo un estudio sistemático de la reacción CL más adecuada en la que interviniesen los analitos en estudio, mediante la exaltación de la emisión, para lograr la máxima sensibilidad posible. Finalmente la reacción seleccionada fue la de la oxidación del luminol con

Conclusiones

ferricianuro potásico debido a la exaltación de la emisión quimioluminiscente del sistema que se produce en presencia de las fenotiazinas. Los parámetros electroforéticos que afectan a la separación se optimizaron de manera univariante, lográndose tanto una buena resolución como una excelente eficacia de pico y cortos tiempos de análisis. Los parámetros que afectan a la detección CL se optimizaron por medio de un diseño experimental, según nuestro conocimiento, aplicado por primera vez en un acoplamiento CE-CL, lo que permitió obtener una alternativa adecuada para conseguir las mejores condiciones de detección con esta técnica.

El método se estableció usando dos modos de inyección diferentes (inyección por gravedad e inyección electrocinética) lo que proporcionó resultados aceptables en términos límites de detección y precisión. Finalmente el método se aplicó a la determinación de PTH en preparados farmacéuticos y de PMH en orina humana. La limitación más importante en la aplicación de la detección CL en CE reside en la falta de instrumentos comerciales que incluyan este tipo de detección, principalmente debido a las diferencias en las configuraciones requeridas dependiendo de la reacción CL utilizada y de los diferentes modos de incorporar los reactivos quimioluminiscentes y hacer más compatible los requerimientos quimioluminiscentes con las condiciones de separación electroforéticas. Sin embargo, ulteriores mejoras en los diseños propuestos, tales como un mayor grado de automatización, podrían conducir a instrumentos más reproducibles, más fáciles de utilizar y con una mayor velocidad de generación de datos.

Capítulo 4

Se ha descrito un método sensible y específico de CE con detección por espectrometría de masas en tandem (CE-MS/MS) para la determinación de ocho quinolonas de uso veterinario en muestras de leche cruda de vaca por debajo de los límites máximos de residuos (LMRs) legislados por la UE. El método propuesto elimina la necesidad de separar los procedimientos de cuantificación y confirmación como hacen la mayoría de los métodos publicados para quinolonas; además, presenta las ventajas propias de la aplicación de la CE como técnica de separación, tales como la simplicidad, bajo coste y tiempo de análisis (pueden analizarse hasta tres muestras por hora) combinada con las características inherentes a la detección por MS. El detallado estudio llevado a cabo para seleccionar y optimizar las variables significativas que afectan al proceso de ionización por electrospray por medio del diseño de experimentos parece ser una alternativa adecuada a la tradicional optimización univariante. Utilizando esta estrategia es posible conseguir una ionización muy eficaz para obtener unos límites de detección por debajo de los LMRs establecidos. La utilización de la SPE en el tratamiento de muestra es sin duda una alternativa útil a los procedimientos de extracción líquido-líquido incluso sin la necesidad de precipitar proteínas. Este tratamiento de muestra evita la utilización de disolventes orgánicos o ácidos clorados perjudiciales para el medio ambiente. El método utilizado podría ser aplicado satisfactoriamente como método de rutina para identificar y cuantificar quinolonas de uso veterinario en

laboratorios de control de calidad y seguridad alimentaria debido a su robustez y fiabilidad, lo que demuestra las posibilidades de la CE-MS/MS, poco utilizada hasta ahora con propósitos de cuantificación.

Capítulo 5

En este capítulo se han establecido unas guías para desarrollar, caracterizar y aplicar un concentrador incorporado en el propio capilar en CE con objeto de mejorar considerablemente la sensibilidad. Al mismo tiempo se muestra que el acoplamiento *in-line* de la SPE y la CE con espectrometría de masas en tandem puede ser una metodología muy útil en la determinación e identificación inequívoca de antibióticos como las quinolonas de uso veterinario, en carne.

En este caso, la detección MS/MS nos permitió alcanzar para todos los compuestos estudiados el número mínimo de puntos de identificación establecidos por la legislación y la utilización del concentrador *in-line* proporcionó unos límites de detección excelentes, en el rango de concentraciones de los ng/kg, muy por debajo de los LMRs establecidos para estos compuestos en alimentos de origen animal.

Igualmente la extracción líquida presurizada (PLE) se muestra como una interesante alternativa para la extracción de residuos de quinolonas en una matriz compleja como la carne, reduciendo el consumo de disolvente y acortando el tiempo del proceso. La combinación con un proceso de SPE permite obtener extractos bastante limpios para ser utilizados en el sistema propuesto con el concentrador in-line.

Así mismo, el método PLE-SPE-*in line* SPE-CE-MS/MS propuesto podría ser fácilmente adaptado para su utilización en otras matrices alimentarias o medioambientales como leche, huevos, agua, etc. Además, el concentrador tiene un futuro prometedor en muchos campos como el control anti-doping, el descubrimiento de biomarcadores, el análisis medioambiental o la caracterización de alimentos ya que es posible determinar simultáneamente niveles muy bajos de compuestos interesantes que de otra manera no podrían ser detectados.

Capítulo 6

Se ha propuesto, a la misma vez que se ha evaluado, la utilización de un polímero impreso molecularmente (MIP) como concentrador *in-line* en CE para la determinación de atrazina y sus productos de degradación en una matriz compleja con un mínimo tratamiento de muestra. La sensibilidad que se obtuvo no fue tan elevada como era de esperar principalmente porque se requiere un flujo muy bajo para que interacciones tan específicas puedan tener lugar. Sin embargo, este aspecto no evita que se pueda lograr una buena sensibilidad puesto que bastaría con aumentar el tiempo de carga de muestra. Se obtuvieron altas recuperaciones y bajas desviaciones estándar relativas cuando el

Conclusiones

concentrador *in-line* de MIP se utilizó, en condiciones de separación óptimas, en el análisis de muestras de orina que contenían los analitos. Este estudio hace pensar que puede haber interesantes perspectivas cuando este tipo de concentradores *in-line*, basados en el empleo de MIPs, se apliquen a la monitorización de éstos u otros compuestos en una gran variedad de muestras (matrices biológicas, alimentos, suelos, etc.).

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Chapter 1

We have described a complete method for quantitative analysis of three phenothiazines in pharmaceutical formulations based on the use of capillary zone electrophoresis (CZE). They can be separated and detected in less than 3.5 min using Tris as buffer at pH 8.0. This procedure is an useful alternative to conventional liquid chromatography methods and can be used in pharmaceutical quality control due to the low cost of reagents, simplicity and speed in the analysis, satisfactory precision and accuracy and high efficiency.

Chapter 2

A sensitive and rapid electrophoretic method has been developed and validated for the analysis of five phenothiazines in urine. With the aim to improve sensitivity in this case we have used a stacking methodology named field amplified sample injection (FASI). For the first time, to our knowledge, FASI has been optimized by means of experimental design proving a suitable alternative to obtain the best experimental conditions for this pre-concentration technique. It has also been demonstrated that FASI can be used as a routine injection method with good reproducibility. Prior to CZE analysis, urine samples were purified and concentrated by SPE using Oasis® cartridges that allows quantification of these phenothiazines at clinically relevant concentrations. The method has been validated for the analysis of the five compounds in human urine and the combination of both strategies (SPE and FASI-CE-UV) has demonstrated its suitability for the therapeutically drug monitoring (TDM) of residues of these drugs at low ng/mL concentrations.

Chapter 3

A CE instrument coupling chemiluminescence detection (CL) was built for the determination of PMH and PTH. A systematic study of the most suitable CL reaction has been carried out in order to achieve a sensitive determination of the analytes. Finally the CL reaction based on the oxidation of luminol with potassium ferricianide was selected because of the high enhancement of this CL emission in presence of the phenothiazines. Electrophoretic parameters were optimized in a univariate way, and it was achieved good resolution, as well as excellent efficiencies and short analysis time. Parameters affecting CL detection were optimized by means of experimental design, to our knowledge for the first time, providing a suitable alternative to obtain the best experimental conditions for this detection technique. The method was characterized using two different injection modes (gravity and electrokinetic injection) providing

Conclusions

acceptable results in terms of detection limits and precision. Finally, the method was satisfactorily applied to the determination of PTH in pharmaceutical formulations and of PMH in human urine. Obviously, the more important limitation in the application of CL detection in CE resides on the lack of commercial instruments including this kind of detection, mainly due to the differences in configurations required depending on the specific CL reaction to be used and the different modes to incorporate the CL reagents and to make compatible the CL requirement with the conditions for the CE separation. However, further improvements of the proposed designs, such as a higher automation grade, could lead to instruments more reproducible, easier to use and with higher throughput.

Chapter 4

A sensitive and specific CE method using tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) is described for the determination of eight quinolones for veterinary use in bovine raw milk samples below the maximum residue levels (MLRs) legislated by the EU. The proposed method eliminates the need to separate quantification and confirmation procedures as required by most published methods for quinolones; moreover, it presents the advantages of the application of CE as separation technique such as simplicity, low cost and analysis time (up to three samples per hour can be analyzed) combined with the characteristics inherent to MS detection. The detailed study carried out to select and optimize the significant variables that affect the electrospray ionization by means of experimental designs appears to be a suitable alternative to the traditional univariate optimization. Using this strategy, it is possible to achieve a most efficient ionization in order to obtain limits of detection below the established MLRs. The utilization of SPE in the sample treatment without any doubt proves to be a valuable alternative for liquid-liquid extraction procedures even without the necessity to precipitate proteins. This sample treatment avoids the use of organic solvents or chlorinated acids, harmful for the environmental. The developed method could be satisfactorily applied as a routine procedure to identify and quantify quinolones for veterinary use in laboratories of food quality and safety control, due to its robustness and feasibility, demonstrating the possibilities of CE-MS/MS, scarcely used so far for quantification purposes.

Chapter 5

This article attempts to establish some guidelines in the development and characterization of an analyte concentrator (AC) and at the same time shows that the in-line coupling of SPE with CE-MS/MS can be a very useful methodology for solving current real problems such as the selective and sensitive multiresidue determination and identification of quinolones antibiotics of veterinary use in meat. In this case, MS/MS detection allowed us to reach for all the studied compounds the minimum number of identification points established by legislation and the use of the AC provided excellent LODs in the low ng/Kg concentration range. It is also demonstrated that pressurized

liquid extraction (PLE) can be an interesting approach to extract quinolone residues in complex matrix such as meat, lowering the solvent consumption and the analysis time. The combination with a SPE process allows obtaining very clean extracts to be used in the in-line concentration system.

Also, this proposed PLE-SPE-in line SPE-CE-MS/MS could be easily adapted for its application to other food or environmental matrixes such as milk, eggs, waters, etc. Moreover, AC could have a promising future in many fields such as doping control, biomarker discovery, environmental analysis or food characterization since it is possible to determine simultaneously very low levels of interesting compounds that otherwise they would not being detected.

Chapter 6

The use of molecularly imprinted polymers (MIPs) as in-line concentrators in CE is proposed and evaluated for the analysis of atrazine and its metabolites in a complex matrix with a minimum of sample treatment. The obtainable sensitivity in this study was not as high as expected mainly because of the low flow required to allow the very specific interactions to take place. This aspect is, however, no prohibitive and can be circumvented by using larger sample loading time and more sensitive detectors. High recoveries and low RSD values were obtained when the constructed MIP in-line concentrator was applied in CE at optimum conditions for the analysis of urine samples containing these compounds. This study shows interesting perspectives about the application of this in-line concentrator for the monitoring of these compounds in other samples, such as different biological matrixes, foods, soils, etc., as well as, about the construction of different in-line concentrators using specific MIPs for a variety of compounds and samples.

ANEXO:

PUBLICACIONES

Determination of thiazinamium, promazine and promethazine in pharmaceutical formulations using a CZE method

Francisco J. Lara, Ana M. García-Campaña*, Fermín Alés-Barrero,
Juan M. Bosque-Sendra

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuente Nueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Received 26 July 2004; received in revised form 30 November 2004; accepted 30 November 2004
Available online 15 January 2005

Abstract

We present the validation of a developed method using capillary zone electrophoresis (CZE) for quantitative analysis of three phenothiazines: thiazinamium methylsulphate (TMS), promazine hydrochloride (PMH) and promethazine hydrochloride (PTH) in pharmaceutical formulations. The influence of various parameters affecting the CZE separation (buffer pH and concentration, acetonitrile percentage, capillary temperature and applied voltage) was investigated by means of multivariate optimization using experimental designs so as to obtain the highest efficiency. The method allows the separation of the phenothiazines in 5.0 min at optimized conditions: 100 mM tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) buffer at a pH 8.0, 15% acetonitrile, capillary with 58.5 cm in length at 25 °C and a voltage of 30 kV. Detection occurred at 254 nm. Acceptable precision (relative standard deviation (R.S.D.) 5.3%) and linearity were achieved using the internal standard (IS) method. The limits of detection (LODs) were 2.8 µg ml⁻¹ for TMS and 3.3 µg ml⁻¹ for PMH and PTH. The method has been successfully applied in the analysis of pharmaceutical formulations.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Capillary zone electrophoresis; Thiazinamium methylsulphate; Promazine; Promethazine; Pharmaceutical analysis

1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a complementary analytical technique to high performance liquid chromatography (HPLC). It presents, as main advantages, low reagent and sample consumption, high separation efficiency and reduced analysis time. Despite these advantages, CE remains less used in industrial routine analysis; it might be due to the relative limited number of validated quantitative analytical methods in CE [1–3].

Phenothiazines are a group of basic drugs including a phenothiazine ring with different substituents attached at the 2- and 10-position, which are used as antipsychotics, neuroleptics and antihistamines [4]. The 10-substituent is an

alkyl piperazine group, a piperidine moiety, or an aliphatic side chain containing an amino group.

Thiazinamium methylsulphate (TMS) (10-[2-trimethylammonium-propyl]-phenothiazine-methylsulphate), has antihistaminic and anticholinergic properties. It is administered by intramuscular injection to patients suffering from chronic respiratory diseases. Few methods were developed for the determination of TMS, based on amperometric detection [5], spectrophotometric detection [6], fluorescence quenching [7], gas chromatography [8] or thin layer chromatography [9]. More recently, a validated method was established using reverse phase HPLC with UV detection for pharmaceutical quality control [10]. Promazine hydrochloride (PMH) (10-[3-dimethylamino-propyl]-phenothiazine), is a neuroleptic agent with strong anticholinergic, hypotensive and sedative effects. It is used mainly as an antipsychotic and antiemetic agent and additionally as an adjunct agent in the management of severe pain. It is administered in solutions for intramus-

* Corresponding author. Tel.: +34 958 248594; fax: +34 958 249510.
E-mail address: amgarcia@ugr.es (A.M. García-Campaña).

cular injection. Promethazine hydrochloride (PTH) (10-[2-dimethylamino-propyl]-phenothiazine), is widely used as an antihistaminic for the symptomatic relief of hypersensitivity reactions or for enhancing the analgesic, anesthetic and sedative effects of others drugs. It is usually used as coated tablets, creams or in liquid injections.

Promazine and promethazine were analyzed by many spectrophotometric methods using UV [11,12], fluorimetric [13–15] and chemiluminescence detection [16,17].

Liquid [18–20] and gas chromatography [21] methods were also used for their determination. Thin layer chromatography [22] and electrochemical methods [23,24] have been less used.

In the literature, CE has been rarely used for the study of phenothiazine derivatives. Promethazine and thioridazine were separated and detected in spiked urine by CZE with end-column amperometric detection giving a detection limit in the 10^{-8} mol l⁻¹ range [25]. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using a micellar citrate buffer pH 3.5 containing cyclodextrins was used for the separation of thioridazine, trimeprazine, promethazine, ethopropazine and methotriimeprazine [26]. Different studies were carried out to establish the influence of different chiral selectors such as cyclodextrins [27–30] or proteins [31,32] and to study the influence of β -cyclodextrins [33] of structurally related phenothiazines. The influence of pH on the electrophoretic behavior of these structurally related phenothiazines and the

pK_a values were also determined by CZE [34]. Until now, only one CZE method has been published for the determination of thioridazine and promethazine using as electrolyte tris-acetic acid, pH 5.0, containing a fluorinated cationic surfactant to reverse the EOF [35].

In this paper, a new CZE method has been developed for the simultaneous analysis of thiazinium methylsulphate, promethazine and promazine (Fig. 1) to be applied in quality control of pharmaceutical preparations. Response surface methodology has been applied to carry out a systematic optimization. The present method has been validated and complies with the ICH guidance requirements [36] for industry.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade. Acetonitrile (MeCN), methanol and sodium hydroxide were obtained from Panreac-Química (Madrid, Spain). Hydrochloric acid was purchased from Scharlaub (Barcelona, Spain). Tris(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Thiazinium methylsulphate and promethazine hydrochloride were obtained from Alfa Pharma (Belgium) and promazine hydrochloride was

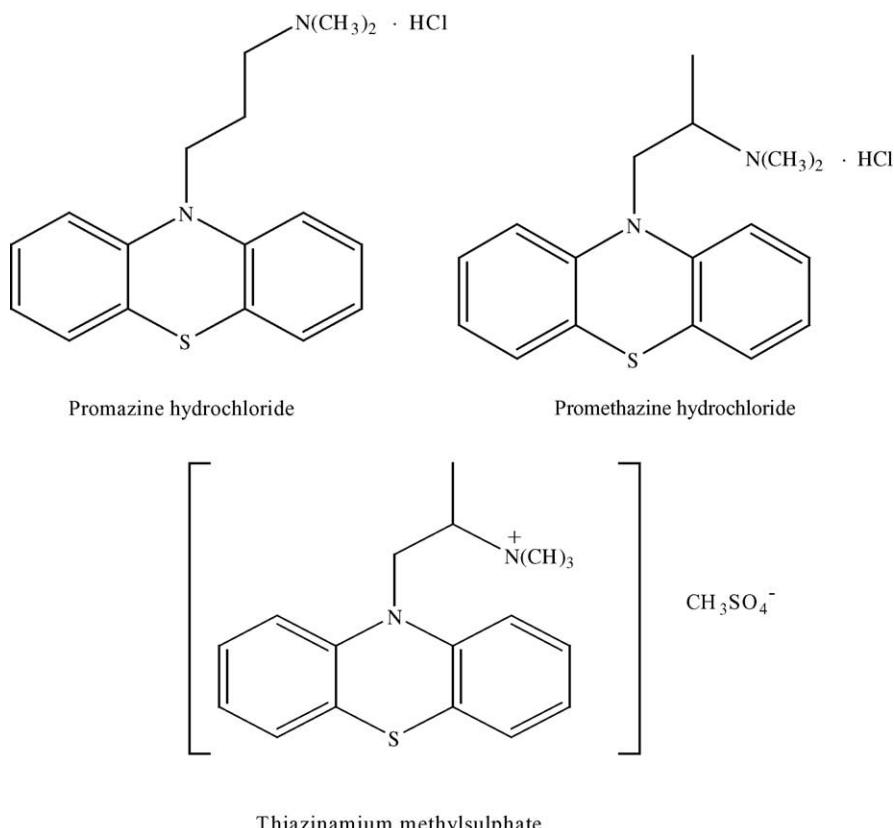


Fig. 1. Chemical structures of the studied phenothiazines. Promazine and promethazine are isomers.

obtained from Federa (Belgium). Propylparaben, used as internal standard (IS) was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). TMS ampoules were supplied by a hospital laboratory (Ghent, Belgium) and promethazine tablets (FRINOVA[®]) was purchased from local drugstore and are produced by Rhône-Poulenc. PMH ampoules were prepared in our laboratory by mixing 50 mg of promazine hydrochloride, 3.6 mg sodium citrate, 0.75 mg citric acid and 1.0 mg sodium formaldehyde sulphoxylate with 1 ml of water.

Deionized water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) was prepared with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Instrumentation and CE procedures

CE experiments were carried out with a HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode-array detector. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation, version A.09.01. Analytes were monitored at 254 nm with a bandwidth of 30 nm. Separation was carried out in a silica fused capillary $58.5 \text{ cm} \times 50 \mu\text{m}$ i.d. (effective length 50 cm) in normal mode, applying a voltage of 30 kV. For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed.

Samples injections were made in a hydrodynamic mode over 5 s under a pressure of 50 mbar. Optimized background electrolyte solution was 100 mM tris aqueous solution adjusted to pH 8.0 with hydrochloric acid and containing 15% (v/v) acetonitrile. When a new capillary was used, the capillary was conditioned 20 min with 1 M NaOH solution, followed by 30 min with deionized water. At the beginning of each day, the capillary was prewashed for 2 min with 0.1 M NaOH, 3 min with water and 7 min with running buffer. After each run, the capillary was postwashed for 1 min 0.1 M NaOH, 4 min with deionized water and 3 min with buffer to maintain adequate reproducibility of run-to-run injections.

2.3. Solutions and sample preparation

Stock solutions of phenothiazines (1 mg ml^{-1}) were prepared in water, and propylparaben solution (1 mg ml^{-1}) was prepared in a mixture water:methanol (6:4 v/v). Working solutions were prepared by dilution. Propylparaben was chosen as internal standard because it is stable, commercially available in a high purity form, inexpensive, non-toxic and possessing acceptably high UV activity at the desired wavelength, giving good peak shape. All the solutions were stored in dark-glass bottles at 4°C . At these conditions, they were stable at least 1 month.

Electrolyte solutions were prepared from stock aqueous buffer solutions of 100 mM tris adjusted to pH 8.0 with 5 M hydrochloric acid. This latter was sonicated and filtered before use through a $0.2 \mu\text{m}$ PTFE membrane (Millex-GN, Millipore).

Sample preparation for TMS ampoules was carried out as follows: 800 μl of the injectable solution (label

claim: 32.5 mg ml^{-1}) were diluted up to 100 ml with water ($260 \mu\text{g ml}^{-1}$). An aliquot of 770 μl of this solution was spiked with 500 μl of a propylparaben solution (1 mg ml^{-1}) diluting with deionized water to a final volume of 5 ml. Final concentrations of $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ for TMS and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ for propylparaben were obtained.

In the case of PMH ampoules, an aliquot of 200 μl was diluted up to 10 ml, and 500 μl of this solution were spiked with 1 ml of a propylparaben solution (1 mg ml^{-1}) diluting to 10 ml with deionized water to obtain a final concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ for PMH and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ for propylparaben.

A promethazine pill (label claim: 25 mg per unit) was finely powdered and homogenized in a mortar, being dissolved in an approximate volume of 70 ml with deionized water, sonicated for 15 min and filtered through a filter paper. The filtrate was diluted with deionized water to a final volume of 100 ml. For CE analysis, 1 ml of this solution was spiked with 500 μl of a propylparaben solution (1 mg ml^{-1}) and completed with deionized water to a final volume of 5 ml, obtaining concentrations of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of PTH and $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of propylparaben.

2.4. Statistical software

For the estimation of the regression model and for the application of experimental designs in the multioptimization procedure, STATGRAPHICS [37] was used. Peak purity evaluation was carried out by CHEMSTATION [38] software. Data analysis was carried out by using the ALAMIN [39] software to estimate the performance characteristics.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of experimental conditions

The traditional step-by-step approach for optimization purposes involves a large number of independent runs and does not consider the possible interactions between factors. To avoid these disadvantages, an experimental design strategy was applied to optimize the main variables, which could influence the separation and simultaneous quantification of the three phenothiazines by CZE: pH and concentration of the buffer, presence and concentration of organic modifier, separation voltage and capillary temperature. A face-centered Draper–Lin small composite design with three central points and 25 runs, scarcely applied in analytical chemistry, was selected as response surface design because of the number of levels is adequate for the variable ranges and because of their high efficiency compared with others composite design like Box–Wilson complete composite design or Box–Hunter fractional composite design [40]. Draper–Lin strategy reduces the number of points of the factorial design, obtaining a so-called “small composite design”, for which a minimum experimental work is required to calculate the

coefficient of the mathematical function for the response surface. The criterion to select the optimum values for the studied variables was based on obtaining a maximum for a multiple response function established as a combination of the corresponding efficiencies for the three compounds (TMS, PMH and PTH) due to they were easily separated showing adequate resolution and short analysis time.

The experimental domain for the study of the selected variables was defined based on different considerations. In order to predict the optimum pH range for the separation of phenothiazines, it is necessary to identify the pH values, at which the differences between the mobility of the studied substances are greatest and hence, at which the substances migrate more separately. The pK_a values of the phenothiazines are 9.1 for promethazine and 9.4 for promazine [34] due to the tertiary amine of the aliphatic chain. The neutral form is mainly present at pH values above the pK_a but at lower pH values, the predominant form is the cationic one. TMS has a quaternary amine function and is separated in its cationic form. From these considerations, pH was modified in the range from 7 to 9 because the use of pH values below 7 produced inadequate resolutions of the compounds and at pH values above 9, a precipitation of promazine and promethazine would be possible. Tris was selected because its pK_a value is 8.01 and has a low conductivity and sufficient UV transparency at the detection wavelength used. Borate and phosphate buffer (60 mM, pH=8.01) did not give sufficient separations of the drugs. The buffer concentration was modified between 50 and 150 mM in order to obtain an adequate current below 100 μ A, avoiding the Joule effect.

The addition of organic solvents to the electrophoretic buffer was considered because they affect several parameters such as viscosity, dielectric constant and zeta potential. Best results were obtained in the presence of MeCN, which improved the separation. In the study, the percentage of MeCN was varied between 5 and 25%.

The voltage was modified between 30 and 10 kV so as to obtain a good compromise between good separation and analysis time. The separation temperature was varied around room temperature to avoid temperature gradients in the capillary.

All the runs of the experimental design were carried using working solutions containing 50 μ g ml⁻¹ for each phenothiazine. The matrix of experiments corresponding to this design is shown in Table 1. From the multioptimization procedure, pH, buffer concentration and separation voltage were found significant on efficiency with optimum values of 100 mM tris concentration and pH 8.0, and 30 kV together with a capillary temperature of 25 °C. A 15% (v/v) MeCN concentration in the electrolyte buffer was added to improve resolution. Under these conditions, efficiencies higher than 500 000 and good resolution (higher than 1.5) were achieved, obtaining the separation of the three phenothiazines in 3 min. Some of the estimated response surfaces from which the above-mentioned optimum values have been obtained are

Table 1

Experimental design showing the coded levels for all the studied variables in the optimization of the separation of TMH, PMH and PTH

| Runs | pH | Buffer concentration | Acetonitrile (%) | Voltage | Temperature |
|------|----|----------------------|------------------|---------|-------------|
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| 7 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 |
| 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| 9 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| 10 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 |
| 11 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 |
| 12 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| 13 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| 14 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| 15 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 16 | -1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 18 | 0 | -1 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | -1 | 0 | 0 |
| 21 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 0 | 0 | -1 | 0 |
| 23 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

For each variable, -1 and 1 correspond to the high and low levels of the selected experimental range, respectively. For each interval, 0 is a central value (see the text for explanation).

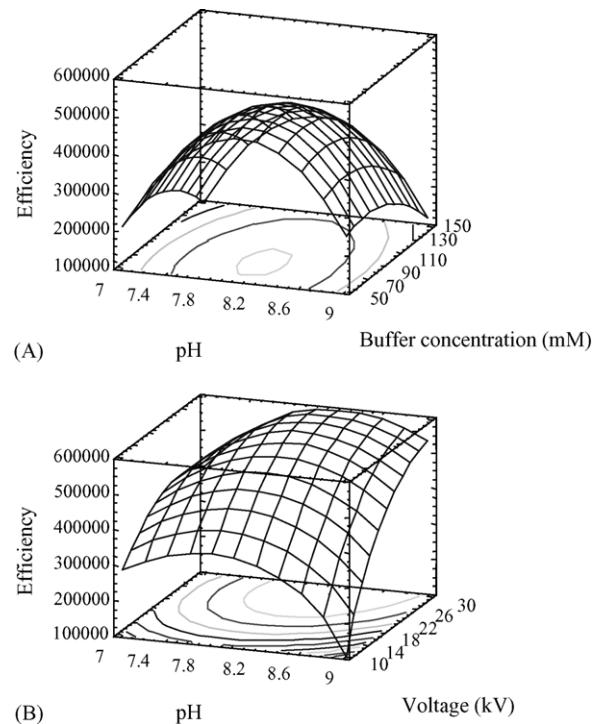


Fig. 2. Estimated response surfaces obtained in the multioptimization procedure: (A) pH vs. buffer concentration; (B) pH vs. voltage.

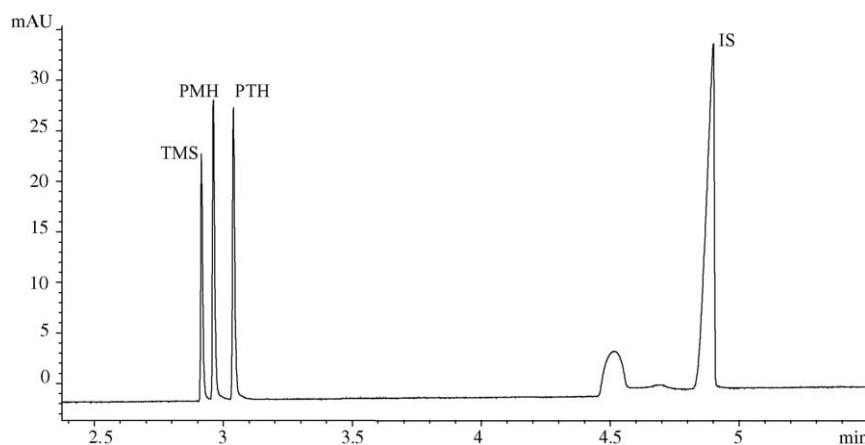


Fig. 3. CZE separation of PMH, PTH and TMS under optimized conditions: pH 8.00 using 100 mM tris containing 15% (v/v) acetonitrile. Separation voltage: 30 kV; capillary temperature: 25 °C.

shown in Fig. 2. Fig. 3 shows the separation of the three selected compounds at the optimum conditions.

3.2. Method performances for the determination of phenothiazines in pharmaceutical formulations

To demonstrate the suitability of this method for pharmaceutical quality control, it was validated with respect to linearity, limits of detection and quantification (LOD and LOQ), precision, accuracy, specificity, robustness and peak purity according the ICH recommendations [36] at the optimized operating conditions.

3.2.1. Linearity, LOD and LOQ

Six calibration standard solutions corresponding to 10, 20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were prepared for each phenothiazine and spiked with a constant concentration of propylparaben used as internal standard (IS). Two replicates were prepared at each concentration level and each was injected in triplicate. Calibration curves were established by considering the relative corrected peak areas (as the ratio analyte peak/migration time-IS peak/migration time) as a function of the analyte standard concentration. Table 2 summarized the performance characteristics calculated from the calibration data set for each compound using the ALAMIN software, as well as the calibration parameters obtained from the least-square regression. The detection and quantification limits were evaluated from this software, considering the IUPAC recommendations and using a proposal based on the study of residuals from the fitted regression curve to estimate a vir-

Table 3
Study of the system precision of the proposed method

| Analyte | Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | |
|-------------------------------|---|-----|-----|
| | 10 | 50 | 80 |
| Intraday R.S.D. (%) ($n=5$) | | | |
| TMH | 4.6 | 3.6 | 3.0 |
| PMH | 4.1 | 4.4 | 3.5 |
| PTH | 4.4 | 3.9 | 3.6 |
| Interday R.S.D. (%) ($n=5$) | | | |
| TMH | 4.7 | 5.1 | 5.1 |
| PMH | 3.4 | 3.7 | 3.7 |
| PTH | 4.7 | 5.3 | 5.2 |

tual blank signal standard deviation for chromatographic and electrophoretic techniques [41]. The P -values for the lack-of-fit test ($\alpha=0.05$) show absence of curvature. The linearity (expressed as relative standard deviation (R.S.D.) of slope) was satisfactory in all cases.

3.2.2. Precision

The precision of relative corrected areas was evaluated on mixed standard solutions at three concentration levels (10, 50 and 80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of each compound) under repeatability and intermediate precision (interday) conditions. For repeatability studies, five replicate experiments were carried out on the same day. For intermediate precision, three replicate experiments were carried out on each of 5 days using the same stock buffer solution. The results expressed as the R.S.D. of relative corrected peak areas are given in Table 3. The mean migration times obtained from intermediate precision condi-

Table 2
Statistics and performance characteristics of the proposed method

| Analyte | Linearity range ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | Calibration parameters | | | | | | LOQ ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | LOD ($\mu\text{g ml}^{-1}$) |
|---------|---|------------------------|--------|-----------------|--------|-----------|---------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | | Intercept | Slope | Lack of fit (%) | r | R^2 (%) | Linearity (%) | | |
| TMS | 10–80 | 0.0060 | 0.0076 | 57.3 | 0.9994 | 99.87 | 99.3 | 9.4 | 2.8 |
| PMH | 10–100 | 0.0111 | 0.0099 | 77.1 | 0.9994 | 99.89 | 99.4 | 10.9 | 3.3 |
| PTH | 10–100 | 0.0084 | 0.0098 | 67.3 | 0.9994 | 99.88 | 99.4 | 11.0 | 3.3 |

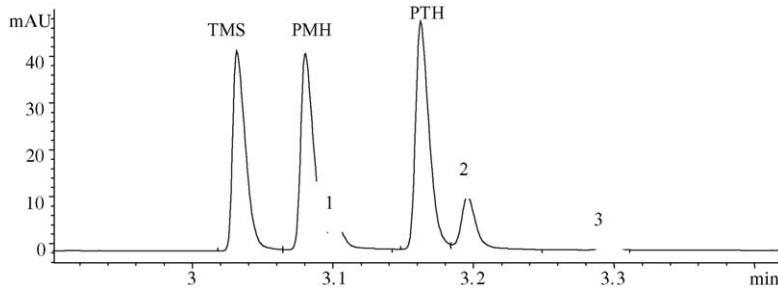


Fig. 4. (1) TMS degradation product, (2) PMH degradation product and (3) PTH degradation product.

tions was 3.05 min (1.5% R.S.D.) for TMS, 3.10 min (1.6% R.S.D.) for PMH and 3.18 min (1.7% R.S.D.) for PTH. At the studied concentrations, the proposed method provided acceptable precision.

3.2.3. Specificity

The specificity of the method was investigated by observing potential interferences between phenothiazines and degradation products obtained, when standard solutions ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) of phenothiazines were stressed by acidic, basic, oxidative, thermal and UV light conditions. TMS, PMH and PTH degradation product is obtained under oxidative and UV light conditions. Phenothiazines easily undergo oxidation; the oxidative reaction process takes place in two steps. The first one is reversible and produces a color cation-radical, then the presence of an excess of oxidant leads to the generation of the colorless sulphoxide [42], being this irreversible reaction. Under thermal stress, promethazine dissolution turns blue, but any peak was found although peak area was minor. UV spectra registered showed that sulphoxide is formed in all cases. Typical electropherogram obtained under UV light conditions is shown in Fig. 4. Stressed under acidic conditions no degradation products were obtained but in strong alkaline media, PMH and PTH precipitated.

3.2.4. Robustness

The consistency of an analytical method, robustness and ruggedness, is defined by its capacity to produce constant and unbiased results, when it is applied under different operating conditions [43]. When the intrinsic operating conditions of a method are slightly modified in an intralaboratory study, the robustness can be determined. These small and deliberate [36] changes are any deviation of a parameter of the procedure compared to its nominal value as described in the analytical method. The robustness of the proposed analytical method in relation to slight modifications of the optimized values was studied using a 2^{7-4} saturated factorial fractional design with eight randomized runs, using for each phenothiazine (TMS, PMH and PTH) a concentration of $50 \mu\text{g ml}^{-1}$. Two dummy variables were confounded with interactions.

Based on the knowledge of optimization experiments, the pH of the running buffer was found to be very critical and a variation ± 0.1 pH units around the nominal value was se-

lected. Others parameters (buffer concentration, MeCN percentage and capillary temperature) were varied of $\pm 10\%$ around the nominal values. We decided to introduce injection time in this study, with the same variation than the other parameters because injection is one of the factors more irreproducible in CE methods, which produces a lack of robustness and it may affect resolution and hence precision. The significance of the effects for these changes was estimated according with the variance in the relative peak areas for the selected concentration of the phenothiazines. The obtained results are summarized in Table 4, showing that the analytical procedure is robust for variations of $\pm 10\%$ in buffer concentration, acetonitrile percentage, capillary temperature and injection time, and for variations of 0.1 unit in the pH, being this variable the most critical (P -values $> 5\%$). Thus, a study of the system has been achieved as well as the possibility of controlling the factors that contribute to the experimental error.

3.2.5. Peak purity

An essential requisite of a separation analysis is the ability to verify the purity of the separated species, that is, to ensure that no co-migrating impurity contributes to the peak response within the LOD of the technique. Comparing peak spectra is probably the most popular method to discover an impurity. If a peak is pure, all UV-vis spectra acquired during the peak migration should be identical, considering the different intensities due to the concentration. Peak purity evaluation was assessed on test sample solutions and it was carried out with five spectra per peak, comparing spectra from 210 to 400 nm and setting an absorbance threshold of 1 mAU in order to reduce the contribution of spectral noise. A smooth factor of seven and a spline factor of five were

Table 4
Study of the robustness of the proposed method

| Variables | Nominal values | Significance (P -values, %) |
|----------------------------|----------------|--------------------------------|
| pH | 8 | None (50.7) |
| Tris (mM) | 100 | None (93.1) |
| % MeCN | 15 | None (88.5) |
| Capillary temperature (°C) | 25 | None (44.5) |
| Injection time (s) | 5 | None (69.0) |
| Dummy 1 | — | None (73.7) |
| Dummy 2 | — | None (78.5) |

Table 5

Determination of TMS and PTH in pharmaceutical formulations

| Sample | Concentration ($n=15$) (mg/mL) | R.S.D. (%) | Nominal value | Estimated <i>t</i> -value | <i>P</i> -value (%) |
|---------------------|----------------------------------|------------|---------------|---------------------------|---------------------|
| Thiazinium ampoules | 32504 ± 560 | 3.1 | 32500 | 0.015 | 98.8 |
| FRINOVA® tablets | 251 ± 3 | 2.4 | 250 | 0.641 | 53.2 |

Student's *t*-value ($\alpha=5\%$; 14 d.o.f.) = 2.145.

Table 6

Determination of PMH in ampoules ($n=3$)

| | Promazine ampoules |
|----------------------------------|--------------------|
| Recovery (%) ± S.D. (level 80%) | 98.9 ± 0.9 |
| Recovery (%) ± S.D. (level 100%) | 101.1 ± 1.6 |
| Recovery (%) ± S.D. (level 120%) | 97.9 ± 0.6 |

selected for spectra processing. Spectral noise was evaluated at 0 min with 14 spectra. For calculating the similarity curve, each individual spectrum was compared to the average spectrum. To display the similarity and threshold curves similarity/threshold ratio mode was chosen. In this mode, if the $(\text{ratio} = \frac{1000-\text{similarity}}{1000-\text{threshold}})$ [44] is less than 1, the test for peak purity passes, but if it is greater than 1, then it fails. The ratios were found 0.148 for TMS, 0.362 for PMH and 0.073 for PTH by using ChemStation software. This study showed there was no interference of excipients in the analysis of TMS, PMH and PTH.

4. Application of the proposed method to the determination of phenothiazines in pharmaceutical formulations

Method accuracy was evaluated by comparing the results obtaining from the application of the proposed method with the labeled claim in pharmaceutical formulations by using a Student's *t*-test, in the case of TMS and PTH analysis. For PMH, the accuracy was determined by performing recovery studies test at three concentration levels. An analytical placebo was spiked with PMH at concentrations corresponding to 80, 100 and 120% of the nominal value. Determinations were made in triplicate for each placebo solution corresponding to each concentration level. Acceptable results (Tables 5 and 6) were obtained, showing the possible application of the method to the quality control of these drugs. The validated method has been successfully applied to the quantitative determination of TMS and PMH in injection solutions and of PTH in tablets. It is important to consider that excipients did not interfere in the determination of the three active compounds.

5. Conclusions

We have described a complete method for quantitative analysis of three phenothiazines in pharmaceutical formula-

tions. They can be separated and detected in less than 3.5 min using tris as buffer at pH 8.0. This procedure can be used in pharmaceutical quality control due to the low cost of reagents, simplicity and speed in the analysis, satisfactory accuracy (precision and trueness) and high efficiency.

References

- [1] K.D. Altria, M.A. Kelly, B.J. Clark, Trends Anal. Chem. 17 (1998) 214.
- [2] C.J. Shaw, N.A. Guzman, in: L. Ohannesian, A.J. Streeter (Eds.), Application of Capillary Electrophoresis Technology in the Pharmaceutical Industry, Marcel Dekker, New York, 2002, p. 313.
- [3] K.D. Altria, D. Elder, J. Chromatogr. A 1023 (2004) 1.
- [4] W.O. Foye, Principios de Química Farmacéutica, Editorial Reverté, Barcelona, 1991, p. 222.
- [5] H. Beral, B. Wermescher, L. Murea, M. Madgearu, A. Cuciureanu, Rev. Chim. 15 (1964) 764.
- [6] Y.M. Dessouky, B.A. Mousa, H.M.N. El-Dim, Pharmazie 29 (1974) 579.
- [7] K. Nikolic, L. Sablic, Tehnika 22 (1967) 693.
- [8] J.H.G. Jonkman, J. Wijsbeek, S.H. Brouwer-de Boer, R.A. De Zeeuw, L.E. Van Bork, N.G.M. Orie, J. Pharm. Pharmacol. 27 (1975) 849.
- [9] J.H.G. Jonkman, J. Wijsbeek, J.E. Greving, R.E. Van Gorp, R.A. De Zeeuw, J. Chromatogr. 128 (1976) 208.
- [10] E. Smet, W.R.G. Baeyens, G. Van der Weken, F. Kiekens, C. Vervaet, J.P. Remon, J. Pharm. Biomed. Anal. 23 (2000) 175.
- [11] H. Puزانowska-Tarasiewicz, E. Wolyniec, A. Kojlo, J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1996) 267.
- [12] D. Daniel, I. Gebhardt, R. Gutz, Anal. Chim. Acta 494 (2003) 215.
- [13] B. Dembinski, A. Szydłowska-Czerniak, M. Kurzawa, Acta Poloniae Pharm. 54 (1997) 415.
- [14] C. Martinez, S.T. García, Pharmazie 47 (1992) 557.
- [15] L. De la Peña, A. Gomez-Hens, D. Perez-Bendito, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 893.
- [16] G.M. Greenway, S.J.L. Dolman, Analyst 124 (1999) 759.
- [17] A.A. Alwarthan, S.A. Al-Tamrah, A.A. Akel, Anal. Chim. Acta 282 (1993) 169.
- [18] M.C. Quintana, M.H. Blanco, J. Lacal, L. Hernández, Talanta 59 (2003) 417.
- [19] S.R. Vanapalli, S.P. Kambhampati, L. Putcha, D.W.A. Bourne, J. Chromatogr. Sci. 39 (2001) 70.
- [20] G.W. Ponder, J.T. Stewart, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 1161.
- [21] D.E. Leelavathi, D.E. Dressler, E.F. Soffer, S.D. Yachetti, J.A. Knowles, J. Chromatogr. 339 (1985) 105.
- [22] E. Curea, M. Martinovici, Ann. Pharm. Fr. 33 (1975) 505.
- [23] F. Belal, S.M. El-Ashry, I.M. Shehata, M.A. El-Sherbeny, D.T. El-Sherbeny, Mikrochim. Acta 135 (2000) 147.
- [24] R.I. Baxter, G. Svehla, B. Kerr, A.D. Woolfson, Anal. Chim. Acta 164 (1984) 171.
- [25] R. Wang, X. Lu, M. Wu, E. Wang, J. Chromatogr. B 721 (1999) 327.

- [26] C. Lin, K. Chen, Y. Hsiao, W. Liao, C. Chen, *J. Chromatogr. A* 971 (2002) 261.
- [27] F. Wang, M.G. Kaledi, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3460.
- [28] T. De Boer, R. Bijma, K. Ensing, *J. Cap. Elec.* 5 (1998) 65.
- [29] C. Lin, K. Chen, *J. Chromatogr. A* 930 (2001) 155.
- [30] B. Chankvetadze, I. Kartozia, N. Burjanadze, D. Bergenthal, H. Luftmann, G. Blaschke, *Chromatographia* 53 (2001) 290.
- [31] B. Sandra, K. Johan, P. Hans, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 119.
- [32] X. Zhang, F. Hong, W. Chang, Y. Ci, Y. Ye, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 175.
- [33] K. Chen, C. Lin, W. Liao, W. Lin, Y. Hsiao, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 399.
- [34] C. Lin, W. Liao, K. Chen, W. Lin, *Electrophoresis* 24 (2003) 3154.
- [35] P.G.H.M. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 395.
- [36] ICH International Conference on Harmonization, Guidelines Q2B, Validation of Analytical Procedures: Methodology, London, November 1996.
- [37] STATGRAPHICS 5.0 Statistical Graphics Corporations, Rockville, MD, 2000.
- [38] Agilent ChemStation A.09.01, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany.
- [39] A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, J.L. Sierra Fernández, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 381.
- [40] L. Gámiz-Gracia, L. Cuadros-Rodríguez, E. Almansa-López, J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, *Talanta* 60 (2003) 523.
- [41] A.M. García Campaña, W.R.G. Baeyens, G. Van der Weken, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 177.
- [42] J. Karpinska, *Anal. Sci.* 17 (2001) 249.
- [43] J.M. Bosque-Sendra, M. Nechar, L. Cuadros Rodríguez, *Fresen. J. Anal. Chem.* 365 (1999) 480.
- [44] M. Stahl, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2003.

Francisco J. Lara
Ana M. García-Campaña
Fermín Alés-Barrero
Juan M. Bosque-Sendra

Department of Analytical Chemistry,
Faculty of Sciences,
University of Granada,
Granada, Spain

Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of phenothiazines in human urine in the low nanogram per milliliter concentration range using field-amplified sample injection

A capillary zone electrophoresis (CZE) method with ultraviolet-visible detection has been established and validated for the determination of five phenothiazines: thiamizinium methylsulfate, promazine hydrochloride, chlorpromazine hydrochloride, thioridazine hydrochloride, and promethazine hydrochloride in human urine. Optimum separation was obtained on a 64.5 cm × 75 µm bubble cell capillary using a buffer containing 150 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane and 25% acetonitrile at pH 8.2, with temperature and voltage of 25°C and 20 kV, respectively. Naphazoline hydrochloride was used as an internal standard. Field-amplified sample injection (FASI) has been applied to improve the sensitivity of the detection. Considering the influence of parameters affecting the on-line preconcentration (nature of preinjection plug, sample solvent composition, injection times, and injection voltage) and due to the significant interactions among them, in this paper we propose for the first time the application of a multivariate approach to carry out the study. The optimized conditions were as follows: preinjection plug of water for 7 s at 50 mbar, electrokinetic injection for 40 s at 6.2 kV, and 32 µM of H₃PO₄ in the sample solvent. Also, a solid-phase extraction (SPE) procedure is developed to obtain low detection limits and an adequate selectivity for urine samples. The combination of SPE and FASI-CZE-UV allows adequate linearities and recoveries, low detection limits (from 2 to 5 ng/mL), and satisfactory precisions (3.0–7.2% for an intermediate RSD %).

Keywords: Capillary zone electrophoresis / Field-amplified sample injection / Phenothiazines / Solid-phase extraction / Urine analysis

DOI 10.1002/elps.200500098

1 Introduction

Phenothiazines are widely used in the treatment of certain psychiatric disorders such as schizophrenia; they are also used as sedatives, antihistaminics, antiemetics, and anesthetics. Their action mechanism is based on the

Correspondence: Prof. Ana M. García-Campaña, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuente Nueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: amgarcia@ugr.es
Fax: +34-958-249510

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; **CPH**, 3-(2-chloro-10H-phenothiazin-10-yl)-N,N-dimethylpropane-1-amine; **FASI**, field-amplified sample injection; **HLB**, hydrophilic-lipophilic balance; **IS**, internal standard; **LLE**, liquid-liquid extraction; **PMH**, N,N-dimethyl-3-(10H-phenothiazin-10-yl)propane-1-amine; **PTH**, N,N-dimethyl-1-(10H-phenothiazin-10-yl)propane-2-amine; **TDM**, therapeutic drug monitoring; **THZ**, 10-(2-(1-methylpiperidine-2-yl)ethyl)-2-(methylthio)-10H-phenothiazine; **TMS**, N,N,N,α-tetramethyl-10H-phenothiazine-10-ethanaminium methyl sulfate

blockade of nervous impulses from the central nervous system (CNS) because phenothiazines are antagonists of dopamine receptors [1]. Overdoses of these drugs are common, and are potentially life-threatening in patients admitted to emergency departments of hospitals because they may cause coma, miosis, and respiratory depression, among other disorders. The relevance of the simultaneous control of these drugs can be explained by the fact that in some cases, where they could be administered together, it has been reported that a dose of 15 mg chlorpromazine, 50 mg thioridazine, and 75 mg promethazine could be fatal for a patient [2]. Furthermore, there is a need to differentiate rapidly the phenothiazines overdose from others.

On the other hand, therapeutic drug monitoring (TDM) is a practical tool that can help the physician to provide an effective and safe drug therapy in the patients who need medication. Monitoring can be used to confirm if a drug concentration level is above or below the therapeutic

range, or if the desired therapeutic effect of the drug is not as expected. If this is the case, then dosages beyond normal have to be prescribed. Basic drugs, such as phenothiazines, usually exhibit low blood concentrations but often exhibit high- or medium-concentration levels in urine. For example, about 40% of a parenteral dose of thiazinamium methylsulfate (*N,N,N,α*-tetramethyl-10*H*-phenothiazine-10-ethanaminium methyl sulfate, TMS) is excreted in the urine, unchanged in 8 h. For other phenothiazines, about 2–10% of a dose is excreted in the urine unchanged [3]. Consequently, for these two reasons, phenothiazine overdose and TDM, it has become useful to determine these neuroleptics in urine.

We have selected five of the most frequently used phenothiazines to be analyzed: TMS; promazine hydrochloride (PMH: *N,N*-dimethyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine); chlorpromazine hydrochloride (CPH: 3-(2-chloro-10*H*-phenothiazin-10-yl)-*N,N*-dimethylpropane-1-amine); thioridazine hydrochloride (THZ: 10-(2-(1-methyl-piperidine-2-yl)ethyl)-2-(methylthio)-10*H*-phenothiazine), and promethazine hydrochloride (PTH: *N,N*-dimethyl-1-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propane-2-amine). Their structures are shown in Fig. 1. The determination of phenothiazines in urine has been carried out by conventional fluorescence [4, 5], immunoassay [6], photometry [7], GC [8], or LC-MS [9].

In the literature, CE has been rarely used for the study of phenothiazine derivatives. PTH and THZ were separated and detected in spiked urine by CZE with end-column amperometric detection giving a detection limit in the 10^{-8} mol/L range [10]. MEKC using a micellar citrate buffer pH 3.5 containing cyclodextrins was used for the separation of THZ, trimeprazine, PTH, ethopropazine, and methotriprazine [11], and recently octaethylene glycol monododecyl ether has been employed as a neutral surfactant for the separation of 12 phenothiazines [12]. Different studies were carried out to establish the influence of different chiral selectors, such as cyclodextrins [13–16] or proteins [17, 18], and to study the influence of β-cyclodextrins [19] on structurally related phenothiazines. The influence of pH on the electrophoretic behavior of these structurally related phenothiazines and the pK_a values were also determined by CZE [20]. Until now, only one CZE method has been published for the determination of THZ and PTH which uses, as an electrolyte, tris-acetic acid pH 5.0 containing a fluorinated cationic surfactant to reverse the EOF [21], and recently a new CZE method has been developed for the simultaneous analysis of THZ, PTH, and PMH to be applied in the quality control of pharmaceutical preparations obtaining detection limits of 2.8 µg/mL [22].

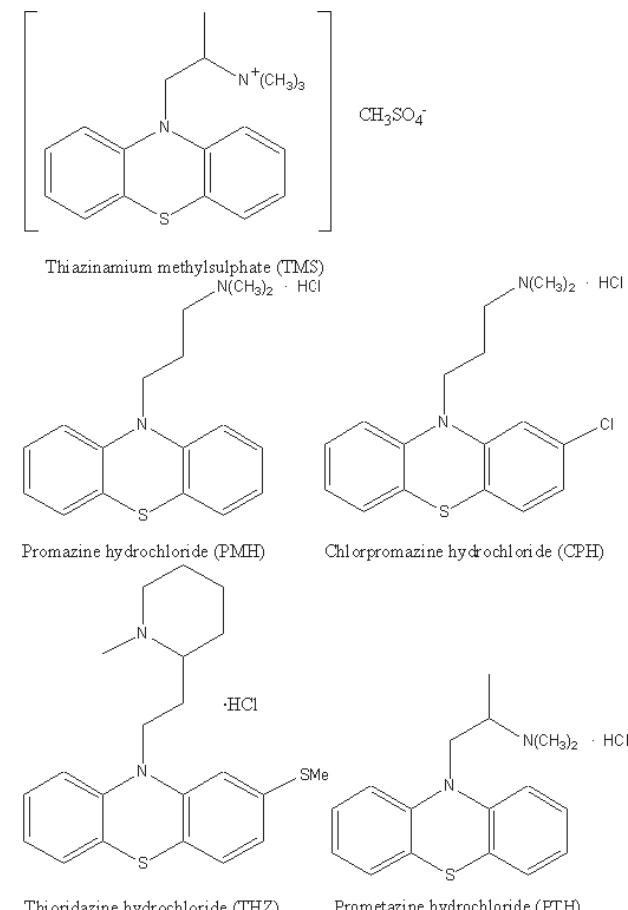


Figure 1. Chemical structures of the studied phenothiazines.

For biological samples, CE coupled to UV-visible detection presents relatively high detection limits, which is an important drawback for its application in TDM. Several on-column sample preconcentration methods can be combined with CE to increase the amount of the analyte introduced into the capillary obtaining an improvement in the sensitivity. Some reviews have been published about different sample stacking techniques [23–28] and specifically for the analysis of drugs in biological fluids [29]. Field-amplified sample injection (FASI), also called in the literature head-column-field-amplified sample stacking, is a preconcentration technique consisting in the injection of the sample diluted in a solvent of lower conductivity than that of the carrier electrolyte. A plug of low conductivity (mostly water) is hydrodynamically introduced at the capillary inlet before the sample is injected electrokinetically [30–36]. When this occurs, an electric field up to several hundred times higher than that employed in CE is established. Charged analytes are injected at a high velocity and are stacked at the interface between the low-conductivity zone and the running buffer. In this preconcentration technique several parameters, such as na-

ture of the preinjection plug, sample solvent composition, injection times, and injection voltage, must be optimized to achieve lower detection limits. Traditionally, univariate optimization has been carried out [37–43], which does not consider possible significant interactions among these factors that could change the optimum values. To overcome this, we propose in this paper for the first time, the application of the multivariate optimization of these parameters by means of experimental design methodology.

Extraction methods are necessary for CE in clinical analysis to obtain clean sample matrices and to remove compounds that can comigrate with the analytes, considering sample solvents of low conductivity. Furthermore, with these procedures it is also possible to preconcentrate the sample and thus increasing the sensitivity. Extraction methods based on SPE have proved to be a valuable alternative to liquid-liquid extraction (LLE) procedures because they are less laborious and time-consuming, reducing the total amount of organic solvents and the manipulation of the extracts. There are some SPE methods reported to extract phenothiazines from biological fluids, using C18 SPE cartridges, for application in GC-MS [8], and recently using an Oasis® (Waters, Milford, MA, USA) cartridge, for application in HPLC-UV-Vis [44], a sorbent scarcely used in the literature, despite the promising results published [45]. In our case we have developed a new SPE procedure to extract the phenothiazines from the urine samples, compatible with the applied FASI methodology. A relatively new sorbent (Oasis®) has been used, showing the feasibility of the procedure for the simultaneous enrichment and cleanup. Considering the combination of the proposed SPE procedure with the online stacking method (FASI), a very sensitive CZE-UV method able to detect and quantify phenothiazines in urine in the low nanogram per milliliter concentration range has been satisfactorily established.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade. ACN, methanol, and sodium hydroxide were obtained from Panreac-Química (Madrid, Spain). Hydrochloric acid was purchased from Scharlaub (Barcelona, Spain). Tris(hydroxymethyl)aminomethane and ammonium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Phosphoric acid and ethylene glycol were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). TMS and PTH were obtained from Alfa Pharma (Belgium), and PMH was obtained from Federa (Belgium). CPH, THZ, and naphazoline hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis,

MO, USA). Distilled water ($18.2\text{ M}\Omega/\text{cm}$) was deionized by using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Standard solutions of $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ of each phenothiazine salts were prepared in water and stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$. The work solutions of $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ of each one were made by dilution with water. Extraction cartridges containing an Oasis hydrophilic-lipophilic balance (HBL; 60 mg, 3 cc) (Waters) were used.

2.2 Instrumentation

CE experiments were carried out with an HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode-array detector. Data were collected using the software provided with the HP ChemStation version A.09.01. Separation was carried out in a bare fused-silica capillary $64.5\text{ cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$ ID (effective length 56 cm) with an optical path length of $200\text{ }\mu\text{m}$ (bubble cell capillary from Agilent Technologies). For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed with a resolution of $\pm 0.01\text{ pH}$ unit. The extraction and preconcentration process was achieved with a vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled with a vacuum pump (Büchi model B-169, Switzerland). Centrifugation was carried out in a Hettich Zentrifuge (Universal 32, Germany).

2.3 Electrophoretic procedure

Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 10 min at $60\text{ }^\circ\text{C}$, then with water for 5 min, and finally with the background electrolyte solution for 20 min. A pressure of 1 bar was applied. At the beginning of each day, the capillary was prewashed with an N_2 pressure of 7 bar for 1 min with 0.1 M NaOH , 1 min with water, and 2 min with running buffer. After each run, the capillary was postwashed with an N_2 pressure of 7 bar for 0.5 min 0.1 M NaOH , 0.5 min with deionized water, and 1 min with buffer to maintain an adequate reproducibility of run-to-run injections. The electrophoretic separation was achieved with a voltage of 20 kV (normal mode) with an initial ramp of 0.3 min. The running buffer was an aqueous solution of 150 mM Tris adjusted to pH 8.2 with 5 M hydrochloride acid and containing 25% v/v ACN. Before use, it was filtered through a $0.2\text{ }\mu\text{m}$ PTFE membrane (Millex-GN, Millipore). TMS, PMH, CPH, and PTH were monitored at 254 nm with a bandwidth of 30 nm, THZ was monitored at 264 nm with a bandwidth of 30 nm, and naphazoline hydrochloride was monitored at 220 nm with a bandwidth of 20 nm. The temperature of the capillary was kept constant at $25\text{ }^\circ\text{C}$. Before injection of the sample, a water plug was introduced into the capillary

applying a pressure of 50 mbar for 7 s. Injection of the sample occurred using a voltage of 6.2 kV (anode at the injection end) for 40 s. The current was about 16 μ A during injection and about 70 μ A during separation.

2.4 SPE procedure

Before SPE, human urine samples were treated as follows: 10 mL urine was acidified with 100 μ L 5 M HCl and spiked with the phenothiazines at different concentration levels. This mixture was centrifuged for 10 min at 4000 rpm. Five milliliters of the resulting sample was percolated through an Oasis[®] HLB cartridge (60 mg, 3 cc), which was previously activated with 2 mL of methanol and 2 mL of water. After sample percolation, the cartridge was washed with 3 mL methanol:water:NH₃ (50:48:2 v/v/v) and 3 mL water. Final elution was carried out with 3 mL methanol. The eluent was collected in a 4 mL vial with 20 μ L ethylene glycol to avoid the adsorption of phenothiazines on the walls of the vial and concentrated under a gentle nitrogen current at 40°C until almost dry. The extract was reconstituted in 0.5 mL of a mixture of methanol:water (1:1 v/v) containing 32 μ M H₃PO₄ and 1 μ g/mL naphazoline hydrochloride internal standard (IS), and injected into the CE system following the FASI procedure.

2.5 Software

The StatGraphics Plus Software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD, USA) was used to generate the experimental designs and the data processing.

3 Results and discussion

3.1 Optimization of CE experimental conditions

Preliminary studies were carried out in order to optimize the experimental parameters affecting the CE separation of the target compounds by a UV-Vis detection. The UV-Vis spectra of the analytes were independently registered choosing 254 nm with a bandwidth of 30 nm for monitoring TMS, PMH, CPH, and PTH, 264 nm with a bandwidth of 30 nm for THZ, and 220 nm with a bandwidth of 20 nm for naphazoline hydrochloride. To find a running buffer suitable for the separation of the selected phenothiazines we considered that the phenothiazine pK_a values are around 9 [20] and above this pH a precipitation occurs. For these reasons, the adequate pH range for the separation is from 7 to 9, selecting tris(hydroxymethyl)aminomethane (pK_a 8.01) as a suitable buffer. A significant improvement in resolution was observed with

the addition of ACN to the electrophoretic buffer, demanding a study using different percentages (5, 15, and 25%). Methanol was also tested obtaining similar improvement in resolution but having longer migration times, so it was discarded. An important interaction was observed between the pH and the ACN percentage, achieving the best results for a pH 8.2 and a 25% of ACN (adjusting the pH after the addition of ACN) with a resolution higher than 1.5 for all the peaks. ACN percentages lower than 25% did not get complete resolution for all the peaks at any pH. A voltage of 20 kV was chosen as optimum in order to achieve a good compromise between the running time and the electric current. Different concentrations of buffer were tested (50, 100, 150, and 200 mM). The optimum concentration was selected as 150 mM because the best stacking effect was obtained with an intensity current below 100 μ A. The effect of temperature on the separation was investigated in the range of 15–35°C. An increase in the temperature involves lower migration times but worse separations, using a capillary temperature of 25°C as the best compromise between migration time and resolution. Under these optimum conditions, peak efficiencies up to 2.5×10^5 plates per meter were obtained in less than 7 min. With hydrodynamic injection (50 mbar for 5 s) LODs were in the microgram per milliliter concentration range, but for the analysis of these compounds in urine samples it is necessary to obtain LODs in the low nanogram per milliliter concentration range, so it was necessary to improve sensitivity by means of a stacking technique.

3.2 FASI optimization

There are several stacking techniques than can be used to enhance the sensitivity in CE analysis for pharmaceutical applications [46]. In this study, we have decided to employ FASI. In contrast to in-column stacking techniques, FASI takes place at the tip of the column and has no limited injection volume, among other advantages, such as the easy application and automation and the possibility to be adapted to a mass spectrometer, providing the highest sensitivity increase reported for all the stacking techniques [47].

Using FASI, some parameters must be optimized to obtain the best results in terms of sensitivity, such as the preinjection plug (composition and volume), the sample solvent composition (organic solvent: type and percentage, and phosphoric acid concentration), the injection time, and the injection voltage. In order to reduce the experimental work and considering the possible interactions among the studied variables, we decided to carry out a univariate optimization for the selection of the

organic solvent in the sample, and for the rest of variables (five factors) we used the experimental design methodology for a multivariate optimization. To our knowledge, this is the first application of this methodology to the FASI optimization. For this purpose, we selected a half fraction factorial design, for which the number of experiments would be $2^{5-1} = 16$ runs. A more saturated screening design would not be adequate due to the high number of possible confusions between the main factors and their interactions. The sum of the heights of the five peaks was chosen as an analytical response considering that the goal is to maximize sensitivity with a satisfactory resolution. If the injected sample volume increases, peak heights increase to a critical value from which a significant band-broadening is observed, so sensitivity is not improved and a loss in resolution is produced. Due to this fact, this critical value was considered as the optimum injection volume.

The dielectric constant and the viscosity of the sample solvent affects the mobility of the analytes [47], so at a higher mobility, the amount of injected analytes increases. In this sense, we tried to improve the sensitivity modifying the sample solvent. Binary mixtures of water:methanol and water:ACN at different percentages of organic solvent (0, 25, 50, 75, and 100%) were tested using an electrokinetic injection (3 kV for 50 s) for a solution containing 0.1 µg/mL of each phenothiazine. As is shown in Fig. 2, the best results were obtained with 100% water, thus it was selected as the sample solvent. Then, a screening experiment using a half fraction factorial design with 2^{5-1} runs and three central points was carried out for the rest of variables. Sixteen runs were randomly carried out. The studied levels of the different factors concerning the FASI are summarized in Table 1, and have been imposed by the

Table 1. Studied levels of the parameters involved in FASI optimization

| | [H ₃ PO ₄] (µM) | Injection time (s) | Injection voltage (kV) | Plug time (s) | % MeOH in the plug |
|------|--|--------------------|------------------------|---------------|--------------------|
| (+1) | 100 | 50 | 7 | 7 | 100 |
| (-1) | 20 | 10 | 3 | 1 | 0 |

following considerations. In FASI, to ensure proper field amplification, a preinjection plug of a high-resistivity solvent (mainly water or water-alcohol mixtures) is frequently introduced in front of the sample zone allowing a further enhancement of sensitivity [30]. In our case, the percentage of methanol in the preinjection plug was modified from 0 to 100%. As previously reported by Zhang and Thormann [47], if the preinjection plug is very short, high temperatures are produced at the beginning of electro-injection which results in boiling of the liquid, in deposition of the solute, and damages in the inlet of the capillary. However, if the preinjection plug is too long, it causes a worsening of the efficiency of the separation [48]. Preinjection plug volume was varied from 0.2 to 1.5% of the total volume of the capillary. It has been previously reported that the usefulness of a certain amount of H⁺ in the sample is helpful for the analytes to be charged [37, 39, 47]. A decrease in the stacking efficiency was observed when the H₃PO₄ concentration was higher than 100 µM, but if it is lower than 20 µM reproducibility was not acceptable, so the selected range for the study was from 20 to 100 µM. For injection time optimization, we previously checked that the values upper to 50 s resulted in a very poor resolution, so the studied interval was from 10 to 50 s. In this initial trial, we realized that in some cases, injection voltages above 7 kV caused the phenothiazine oxidation into their corresponding sulfoxides since these analytes easily undergo oxidation [49] and that the injection is carried out in the anode. This problem has also been reported by other authors with different analytes [50]. For this reason, the optimization was carried out between 3 and 7 kV. In every run the sample was replaced by a fresh one to avoid contamination, depletion, and changes of pH of the sample solution due to electrolysis [51, 52]. Volumes of 500 µL of sample were always used regarding the influence of the sample volume in the electrokinetic injection [53]. Figure 3 shows the representation of the standardized effects of the studied variables on the selected analytical response, obtained from the applied screening design. We can observe, as significant main effects on the peak height, the phosphoric acid concentration, the injection time, and the injection voltage, and some interactions among the studied factors, mainly

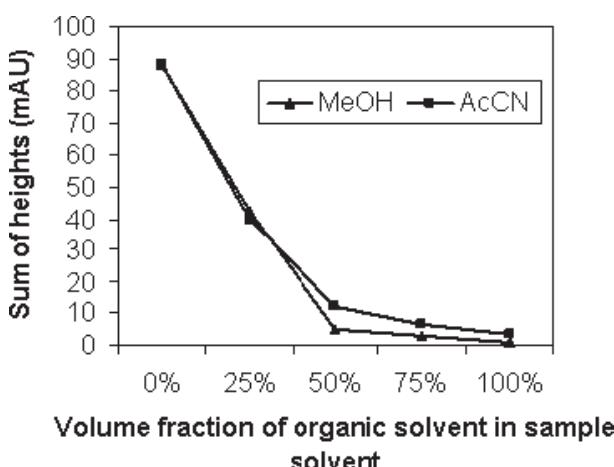


Figure 2. Effect of the organic solvent percentage on the sample solvent for the stacking.

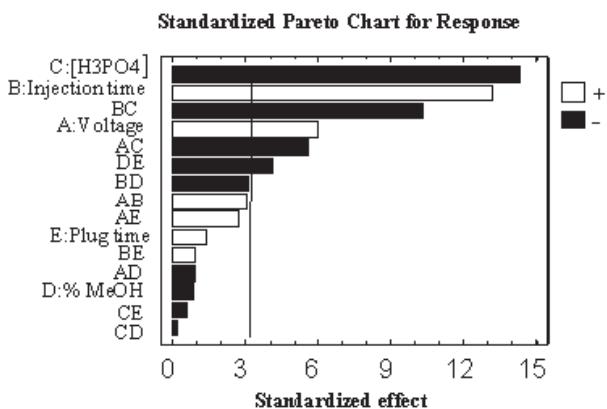


Figure 3. Pareto chart showing the significant effects on the analytical response from the screening design in the study of important variables for FASI procedure. (+) Positive effect on the response; (−) negative effect on the response. The black line shows the limit of decision to consider the significance of the factors (based on the standardized effect = estimated effect/standard error, p -value = 0.05 at 95% of confidence level).

the interaction between the injection time and the phosphoric acid concentration. As we expected, the increase of the phosphoric acid concentration has a negative effect on sensitivity but the increase of the injection time and injection voltage have a positive effect. More important is to notice that the time and the % MeOH in the preinjection plug are not significant variables in the studied range, not being necessary to optimize these parameters. We decided to inject water for 7 s at 50 mbar to improve reproducibility, because dipping the capillary inlet end and the electrode in a vial containing water is necessary to prevent contamination of the sample solution with running buffer of high conductivity, and to avoid problems caused by short preinjection plugs previously mentioned.

This previous screening design allowed us to select the significant variables to be optimized, that is, the phosphoric acid concentration, the injection time, and the injection voltage. Doehlert design [54], scarcely used in analytical chemistry [55–57], was employed as response surface design because of its high efficiency compared with other designs like Box-Behnken or central composite designs, and because of the possibility to study a high number of levels for the most significant variables. In our case, the injection voltage was studied at three levels because its range (3–7 kV) is much reduced, H₃PO₄ concentration was studied at five levels, and the injection time was studied at seven levels due to a wide range of study. The maximum and the minimum levels and the analytical response to optimize were the same as the

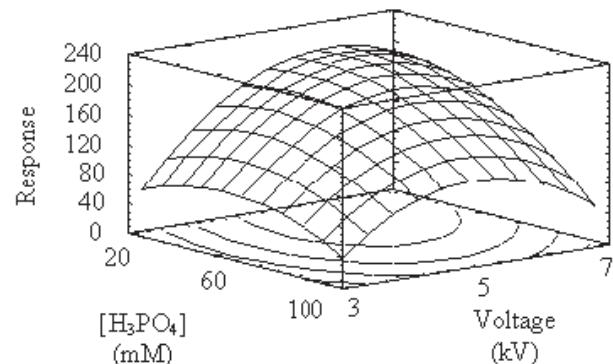
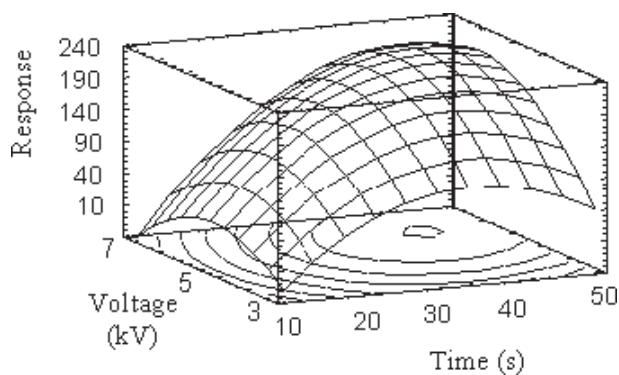


Figure 4. Estimated response surfaces obtained in the multioptimization procedure using the Doehlert design. (A) Injection voltage versus injection time. (B) (H₃PO₄) versus injection voltage.

previous screening design. Figure 4 shows the estimated response surfaces, being the optimum values for the maximum response – a phosphoric acid concentration of 32 μM, an applied voltage of 6.2 kV, and an injection time of 40 s. The lack of fit p -value for the model was 77% and the determination coefficient (R^2) was 96.5%. Unfortunately, direct application of the FASI procedure to spiked urine samples containing 10–100 ng/mL of each phenothiazine did not provide useful results due to the high conductivity of the sample matrix. Thus, an effective SPE was necessary to reduce the conductivity of the sample, to remove possible interferences, and to preconcentrate the analytes.

3.3 SPE procedure optimization

To extract the analytes from the urine samples, initial experiments were carried out employing an LLE with hexane:isopropanol (9:1 v/v), but problems occurred due to the formation of emulsions and the manipulation of the sample; therefore this procedure was discarded and we decided to employ an SPE procedure. Three different cartridges, C18 500 mg (Supelco), an Oasis[®] MCX 60 mg,

and an Oasis® HLB 60 mg (both from Waters), were studied to find the most suitable and simple conditions for the cleanup and preconcentration of phenothiazines in urine. The C18 and the HLB are RP cartridges and the MCX are cartridges containing mixed phases; they combine RP and cation-exchange mechanisms so they are very much advisable for basic compounds, such as phenothiazines. Our studies were focused on finding a simple clean-up procedure that allowed us the extraction and the preconcentration of phenothiazines. These drugs are extensively metabolized after oral administration mainly by sulfoxidation, *N*-dimethylation, hydroxylation, *N*-oxidation, and by conjugation with glucuronic acid, or sulfate but to a lesser extent (ca. 10%) [58]. Therefore, it is not worth hydrolyzing the urine to increase the concentration of the free parent drugs in the sample. The urine samples were directly introduced into the cartridges with previous acidification (1% HCl v/v) and centrifugation (4000 rpm for 10 min) to avoid the blocking of cartridges with precipitates. Recommended standard procedures of the manufacturers were employed for the three cartridges. The best results were obtained with HLB because they provided cleaner blank extracts and TMS was recovered only with these cartridges. Although with the HLB cartridges the phenothiazines were well retained and eluted, after evaporating under an N₂ stream they were not redissolved properly, thus a new optimization of the sample solvent was carried out. As we can see in Fig. 5, the best results were achieved using as solvent a mixture of methanol:water (1:1 v/v) for all the phenothiazines. The lower the methanol percentage is, the worse is the redissolution of the analytes and the higher this percentage is, the worse is the stacking effect. The new sample solvent might affect the optimized conditions for the FASI procedure. To solve this problem, it would have been necessary to optimize in the first place the SPE procedure but, in this

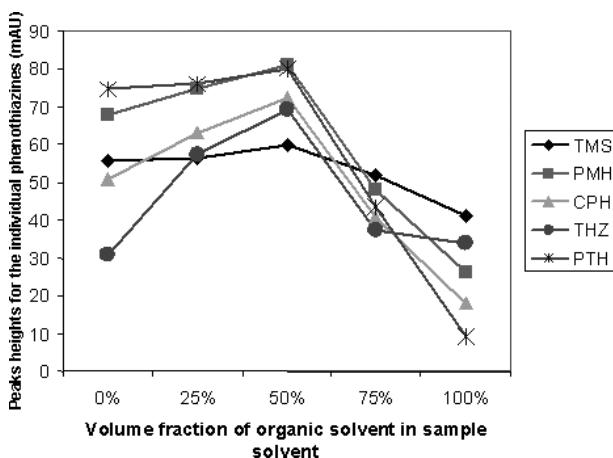


Figure 5. Effect of the methanol percentage in the sample solvent reoptimization. Result implies a combined effect on the stacking and on the extraction efficiency.

way, we should employ relatively high concentrations of phenothiazines, and some comigrating interferences in low concentration could not be observed.

Different solvents, such as ACN, ethyl acetate, hexane:isopropanol (9:1 v/v), and methanol, were tested for the elution of the phenothiazines. As can be seen in Table 2, the best results were obtained using methanol. Once methanol was selected as the elution solvent, the next step was to optimize the minimum volume of methanol to elute. Fractions of 1 mL of the elution solvent were subsequently collected and individually analyzed to check in which volume the elution of phenothiazines was completed. We observed that they were eluted almost completely in the first milliliter but as THZ is the most apolar of them ($\log P = 6.1$) 3 mL of methanol were necessary to elute it totally. When we tried to apply the SPE method to the urine samples spiked with 0.1 μ g/mL of each phenothiazine, some interferences comigrating with the analytes appeared on the electropherogram making impossible the quantification. This occurred using 2 mL of water with 5% v/v of methanol for washing, as recommended in the manufacturer instructions, so we decided to carry out an optimization of the washing step employing standard solutions of 1 μ g/mL of each phenothiazine. For this purpose, binary mixtures of water:methanol with 2% ammonia were tested and we found that methanol percentages up to 50% did not elute the analytes. If a second washing step was included, consisting in 3 mL of water, an enhancement in sensitivity was achieved maybe because the obtained extracts showed lower conductivity. The application of this washing step was found to be adequate for the elimination of interferences.

Clean extracts were obtained with this procedure but we tried to improve the sensitivity by increasing the volume of the sample, which passed through the cartridges. Using 5 mL, the breakthrough volume was not surpassed, so 5 mL was selected. Another option would be to reconstitute in 250 μ L instead of 500 μ L, but a negative effect of

Table 2. Comparison of the obtained response for each phenothiazine using different elution solvents (responses normalized to the maximum one)

| Pheno-thiazine | MeOH | ACN | Ethyl acetate | Hexane/isopropanol (9:1 v/v) |
|----------------|------|-----|---------------|------------------------------|
| TMS | 79 | 28 | 2 | 0 |
| PMH | 90 | 90 | 23 | 9 |
| CPH | 94 | 94 | 27 | 6 |
| THZ | 99 | 100 | 23 | 6 |
| PTH | 91 | 89 | 23 | 8 |

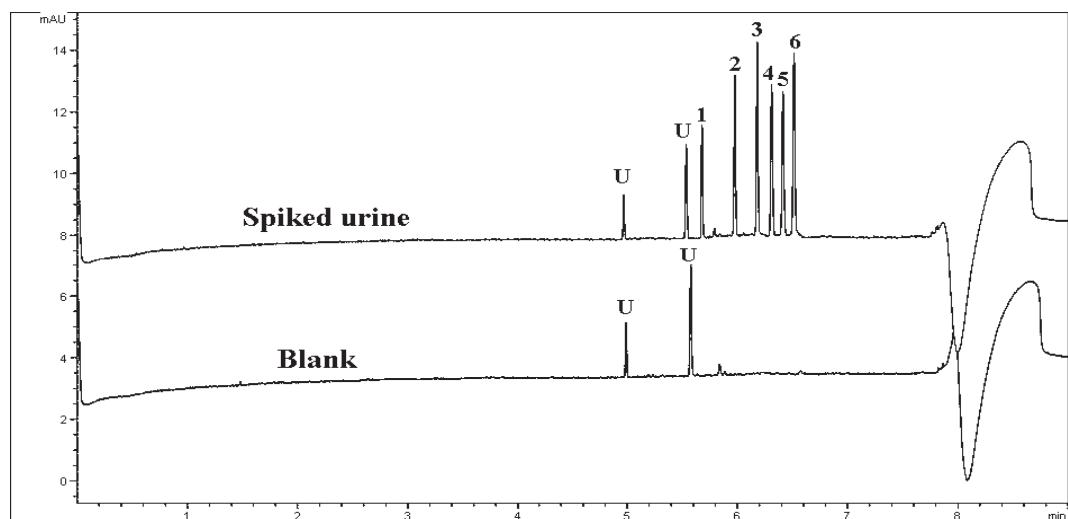


Figure 6. Separation of phenothiazines under the optimized conditions: pH 8.2 using 150 mM Tris containing 25% v/v ACN; separation voltage, 20 kV; capillary temperature, 25°C; and wavelength, 254 nm. U: unknown, 1: naphazoline hydrochloride (1 µg/mL), 2: TMS, 3: PMH, 4: CPH, 5: THZ, 6: PTH (25 ng/mL of each phenothiazine).

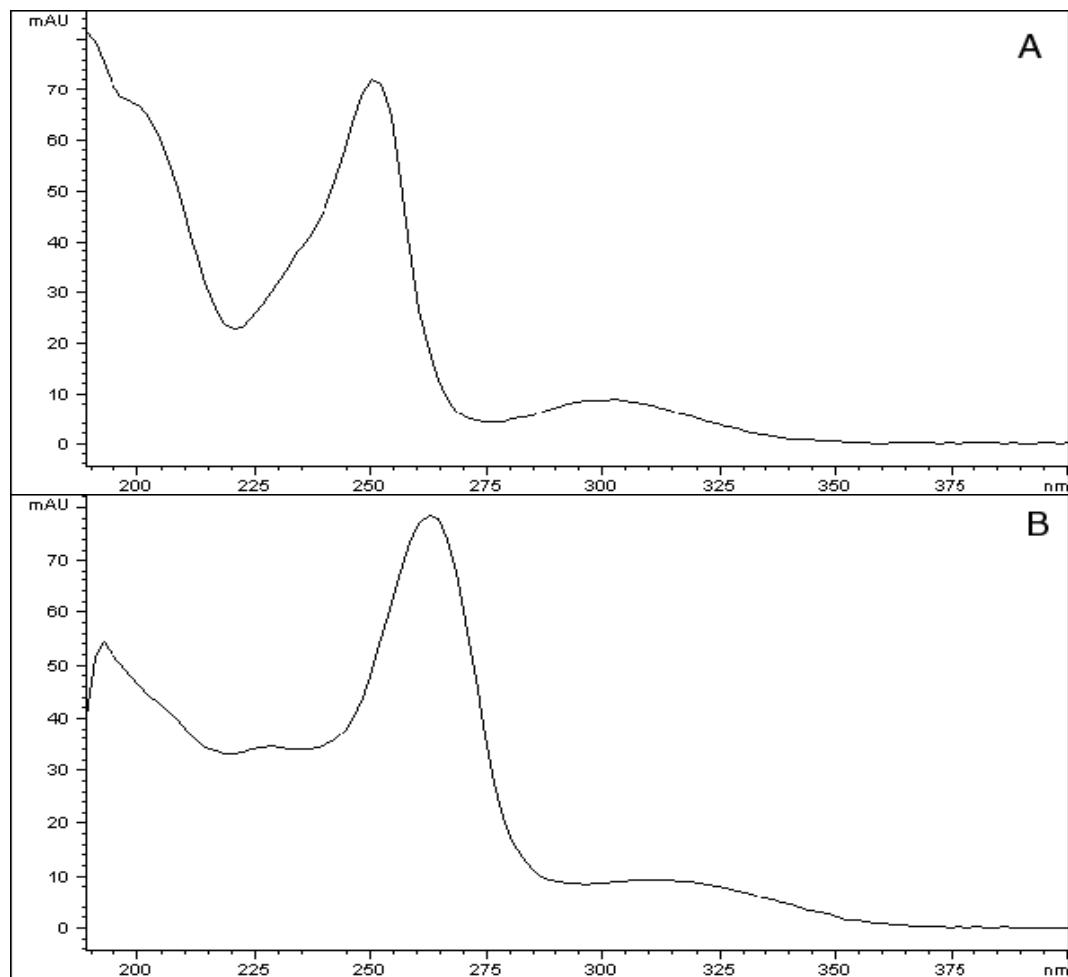


Figure 7. Phenothiazine spectra (1 µg/mL in running buffer) from 190 to 400 nm. (A) TMS, PMH, CPH, and PTH present similar spectra. (B) THZ spectrum.

decreasing the sample volume in electrokinetic injection has been reported [53]. In our case, a preconcentration factor of 10 was achieved with SPE. Electropherograms of a blank and a spiked urine sample obtained after the SPE procedure and using the optimized FASI methodology at the selected CE conditions are shown in Fig. 6. The combination of a proper sorbent and the washing study for the SPE procedure in conjunction with CE separation and UV-Vis detection provides a highly selective method. Obviously, UV-Vis detector is not as reliable as a mass detector in a confirmatory sense, but it can provide an adequate confidence level for these phenothiazines because although the maximum at 254 nm is very common in many compounds, a subsidiary peak around 300 nm is characteristic of phenothiazines. Figure 7 shows the spectra for these compounds.

3.4 Validation of the electrophoretic procedure

3.4.1 Linearity, LOD, and LOQ

The linearity of the response was established from five calibration levels corresponding to 5, 25, 50, 75, and 100 ng/mL of each phenothiazine. In all cases, 1 µg/mL naphazoline hydrochloride was added as IS. Calibration was carried out using clean urine samples from a healthy patient and spiked before SPE treatment. Two replicates were prepared at each concentration level, and each was injected in triplicate. Calibration curves were established by considering the relative corrected peak areas (as the

ratio analyte peak per migration time to IS peak per migration time) as a function of the analyte standard concentration. The statistics parameters calculated by least squares regression and the performance characteristics are presented in Table 3. The satisfactory determination coefficients and the *p*-values for the lack-of-fit test ($\alpha = 0.05$) of the analysis of variance (ANOVA) confirm that phenothiazine responses were linear over the studied range. The detection and quantification limits were evaluated considering the IUPAC recommendations and using a proposal based on the study of residuals from the fitted regression curve to estimate a virtual blank signal SD for chromatographic and electrophoretic techniques [59].

3.4.2 Recovery

In order to test the trueness of the proposed method, recovery studies at three concentration levels (20, 50, and 80 ng/mL) were carried out. Absolute recoveries were calculated comparing the obtained concentrations for the urine samples spiked before the SPE procedure and calculated from a calibration curve established with a urine blank spiked after the SPE procedure, with the added concentration. This procedure ensures the correction of possible systematic errors on the analytical signal due to the matrix effect. Three replicates were prepared at each concentration level and each one was injected in triplicate. As can be observed in Table 4, satisfactory results were achieved for all the studied levels.

Table 3. Statistics and performance characteristics of the proposed method (concentration (ng/mL) versus relative corrected peak areas

| Analyte | Linearity range (ng/mL) | Calibration parameters | | | | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---------|----------------------------|------------------------|---------------|---|-----------------------|----------------|----------------|
| | | Intercept | Slope (mL/ng) | Lack of fit <i>p</i> -value ^{a)} | <i>R</i> ² | | |
| TMS | 6–100 | 0.00122 | 0.00178 | 50.6% | 0.9999 | 2 | 6 |
| PMH | 11–100 | 0.00836 | 0.00222 | 30.6% | 0.9993 | 4 | 11 |
| CPH | 8–100 | 0.00644 | 0.00195 | 20.2% | 0.9996 | 3 | 8 |
| THZ | 9–100 | 0.00577 | 0.00189 | 43.4% | 0.9995 | 3 | 9 |
| PTH | 10–100 | 0.00870 | 0.00213 | 68.8% | 0.9993 | 3 | 10 |

a) *p*-value from the lack-of-fit test from the ANOVA to check the absence of curvature applying least square regression model

Table 4. Recovery for each phenothiazine at different spiked levels in human urine samples. Mean values, (*n* = 9)

| Added (ng/mL) | TMS | | PMH | | CPH | | THZ | | PTH | |
|------------------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| | Recovery % | RSD % |
| 20 | 96.8 | 3.0 | 95.8 | 3.3 | 94.5 | 4.3 | 90.7 | 4.6 | 100.3 | 3.1 |
| 50 | 101.3 | 5.8 | 95.8 | 6.5 | 99.7 | 6.4 | 90.9 | 7.4 | 99.0 | 8.4 |
| 80 | 99.2 | 1.8 | 94.7 | 5.5 | 101.7 | 4.7 | 90.0 | 6.3 | 98.0 | 4.3 |

3.4.3 Precision

The precision of the whole method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was evaluated on the same day by means of repetitive application of the SPE procedure to three samples (experimental replicates) at each concentration level (20, 50, and 80 ng/mL), and each one was injected in triplicate (instrumental replicates). Intermediate precision was evaluated in three consecutive days with a similar procedure for repeatability studies; in fact, the results obtained in the repeatability study were considered for the first day of the intermediate precision study. On the second day, the procedure was repeated but a new capillary was employed, and on the third day, a recently prepared buffer was used. The results, expressed as an RSD of relative corrected peak areas, are given in Table 5. Migration time variations were also studied, and the results with the corresponding RSD are included in Table 6. As can be observed, acceptable precision was obtained in all the cases.

3.4.4 Specificity

It is recommended to use several techniques for the determination of possible impurities or interferences in an electrophoretic peak [60]. In the present work, the procedures used to validate the peak purity of the studied compounds present in urine samples were as follows: (i) a blank urine was analyzed by the proposed method and no interferences were found comigrating with the analytes (see Fig. 6), (ii) measurement of absorbance at two different

wavelengths, and (iii) peak purity index calculated by ChemStation software: 0.373 for TMS, 0.595 for PMH, 0.368 for CPH, 0.509 for THZ, 0.435 for PTH, and 0.445 for IS. This test was carried out with five spectra per peak (from 210 to 400 nm) at different times, and each individual spectrum was compared to the average spectrum. A similarity coefficient between each individual spectrum and the average spectrum was calculated and compared with a threshold coefficient calculated taking into account the spectral noise. An absorbance threshold of 1 mAU was set in order to reduce the contribution of spectral noise. A smooth factor of 7 and a spline factor of 5 were selected for spectra processing. Spectral noise was evaluated at 0 min with 14 spectra. If the peak is pure, similarity coefficient is higher than the threshold coefficient; for this reason if the peak purity index calculated as (ratio = 1000-similarity/1000 threshold) [61] is less than 1, the test for peak purity passes, but if it is greater than 1, it fails. These techniques proved a high level of purity of the peaks corresponding to the compounds studied in the urine samples. Therefore, no interferences from matrix effect were observed.

4 Concluding remarks

A sensitive and rapid electrophoretic method has been developed and validated for the analysis of phenothiazines in urine. For the first time, to our knowledge, FASI has been optimized by means of experimental design proving a suitable alternative to obtain the best experimental conditions for this preconcentration technique. It has also been demonstrated that FASI can be used as a routine injection

Table 5. Study of the procedure precision of the proposed method

| Analyte | Intraday RSD (%) (<i>n</i> = 9) | | | Interday RSD (%) (<i>n</i> = 27) | | |
|---------|----------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|
| | 20 ng/mL | 50 ng/mL | 80 ng/mL | 20 ng/mL | 50 ng/mL | 80 ng/mL |
| TMS | 2.6 | 3.0 | 0.7 | 3.7 | 3.6 | 3.0 |
| PMH | 4.9 | 3.0 | 2.7 | 5.5 | 4.3 | 5.5 |
| CPH | 3.3 | 3.2 | 3.4 | 4.5 | 4.4 | 6.6 |
| THZ | 3.5 | 2.5 | 2.7 | 7.2 | 4.0 | 5.8 |
| PTH | 4.4 | 3.5 | 4.5 | 6.0 | 5.2 | 7.2 |

Table 6. Study of the migration time variation (concentration (ng/mL) versus relative corrected peak areas). Mean values, *n* = 81

| | TMS | PMH | CPH | THZ | PTH |
|-------------------------------|------|------|------|------|------|
| Migration time (min) | 5.92 | 6.15 | 6.29 | 6.40 | 6.52 |
| RSD % | 1.71 | 1.79 | 1.80 | 1.80 | 1.91 |
| Relative migration time (min) | 1.06 | 1.10 | 1.13 | 1.15 | 1.17 |
| RSD % | 0.07 | 0.17 | 0.19 | 0.19 | 0.33 |

method with good reproducibility. Prior to CZE analysis, the urine samples were purified and concentrated by SPE using Oasis® (Waters) cartridges that allow quantification of these phenothiazines at clinically relevant concentrations. The method has been validated for the analysis of the five compounds in human urine, and the combination of both strategies (SPE and FASI-CE-UV) has demonstrated its suitability for the TDM of residues of these drugs at low nanogram per milliliter concentrations.

We thank the financial support from the Fondo de Investigación Sanitaria. Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Carlos III (Proyecto nº PI-021369) and from FEDER. Francisco J. Lara would like to thank the Junta de Andalucía for an FPI grant.

Received February 7, 2005

5 References

- [1] Foye, W. O. (Ed.), *Principios de Química Farmacéutica*, Reverté, Barcelona 1991, p. 222.
- [2] Zhang, X. (Ed.), *Practical Pharmacology*, Beijing 1997, p. 308.
- [3] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Galichet, L. Y. (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.
- [4] Laassis, B., Aaron, J. J., Mahedero, M. C., *Anal. Chim. Acta* 1994, **290**, 27–33.
- [5] Laassis, B., Maafi, M., Aaron, J. J., Mahedero, M. C., *Anal. Lett.* 1997, **30**, 1541–1554.
- [6] Mounsey, A., Strachan, D., Rowell, F. J., Rowell, V., Tyson, J. D., *Analyst* 1996, **121**, 955–958.
- [7] Aman, T., Ali, A., Khokhar, I., Rashid, A., *Mikrochim. Acta* 1997, **126**, 295–300.
- [8] Olmos-Carmona, M. L., Hernández-Carrasquilla, M., *J. Chromatogr. B* 1999, **734**, 113–120.
- [9] Kumazawa, T., Seno, H., Watanabe-Suzuki, K., Hattori, H., Ishii, A., Sato, K., Suzuki, O., *J. Mass Spectrom. Sep.* 2000, **35**, 1091–1099.
- [10] Wang, R., Lu, X., Wu, M., Wang, E., *J. Chromatogr. B* 1999, **721**, 327–332.
- [11] Lin, C., Chen, K., Hsiao, Y., Liao, W., Chen, C., *J. Chromatogr. A* 2002, **971**, 261–266.
- [12] Le, D. C., Morin, C. J., Beljean, M., Siouffi, A. M., Desbène, P. L., *J. Chromatogr. A* 2005, **1063**, 235–240.
- [13] Wang, F., Kaledi, M. G., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 3460–3467.
- [14] De Boer, T., Bijma, R., Ensing, K., *J. Capil. Electrophor.* 1998, **5**, 65–71.
- [15] Lin, C., Chen, K., *J. Chromatogr. A* 2001, **930**, 155–163.
- [16] Chankvetadze, B., Kartozia, I., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Luftmann, H., Blaschke, G., *Chromatographia* 2001, **53**, S290–S295.
- [17] Sandra, B., Johan, K., Hans, P., *J. Chromatogr.* 1993, **635**, 119–126.
- [18] Zhang, X., Hong, F., Chang, W., Ci, Y., Ye, Y., *Anal. Chim. Acta* 1999, **392**, 175–181.
- [19] Chen, K., Lin, C., Liao, W., Lin, W., Hsiao, Y., *J. Chromatogr. A* 2002, **979**, 399–408.
- [20] Lin, C., Liao, W., Chen, K., Lin, W., *Electrophoresis* 2003, **24**, 3154–3159.
- [21] Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 1996, **735**, 395–402.
- [22] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., *Anal. Chim. Acta* 2005, **535**, 101–108.
- [23] Shihabi, Z. K., *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 107–117.
- [24] Qurino, J., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2000, **902**, 119–135.
- [25] Hirokawa, T., Ikuta, N., Yoshiyama, T., *J. Chromatogr. A* 2000, **894**, 3–9.
- [26] Urbánek, M., Krivánková, L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, **24**, 466–485.
- [27] Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 486–497.
- [28] Simonet, B. M., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, **22**, 605–614.
- [29] Hempel, G., *Electrophoresis* 2003, **21**, 691–698.
- [30] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J. Chromatogr.* 1991, **559**, 141–152.
- [31] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal. Chem.* 1991, **63**, 2042–2047.
- [32] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal. Chem.* 1992, **64**, 489A–496A.
- [33] Chien, R. L., Burgi, D. S., *Anal. Chem.* 1992, **64**, 1046–1050.
- [34] Wey, A. B., Thormann, W., *Chromatographia* 1999, **49**, S12–S20.
- [35] Kuldvee, R., Kubáň, P., Vunder, K., Kaljurand, M., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2879–2885.
- [36] Zhang, C. X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1998, **70**, 540–548.
- [37] Grard, S., Morin, P., Ribet, J. P., *Electrophoresis* 2002, **23**, 2399–2407.
- [38] Ho, Y. H., Ko, W. K., Kou, H. S., Wu, H. L., Wu, S. M., *J. Chromatogr. B* 2004, **809**, 111–116.
- [39] Song, J. Z., Chen, J., Tian, S. J., Sun, Z. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, **21**, 569–576.
- [40] Unger, M., Stöckigt, J., *J. Chromatogr. A* 1997, **791**, 323–331.
- [41] Chen, C. C., Wu, S. M., Huang, Y. H., Ko, W. K., Kou, H. S., Wu, H. L., *Anal. Chim. Acta* 2004, **517**, 103–110.
- [42] Wu, S. M., Ho, Y. H., Wu, H. L., Chen, S. H., Ko, H. S., *Electrophoresis* 2001, **22**, 2717–2722.
- [43] Leung, S. A., de Mello, A. J., *J. Chromatogr. A* 2002, **979**, 171–178.
- [44] Quintana, M. C., Ramos, L., González, M. J., Blanco, M. H., Hernández, L., *J. Sep. Sci.* 2004, **27**, 53–58.
- [45] Stolker, A. A. M., Schwillens, P. L. W. J., Van Ginkel, L. A., Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr. A* 2000, **893**, 55–67.
- [46] Macià, A., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* 2004, **25**, 428–436.
- [47] Zhang, C. X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 2523–2532.
- [48] Manetto, G., Tagliaro, F., Crivellente, F., Pascali, V. L., Marigo, M., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2891–2898.
- [49] Karpinska, J., *Anal. Sci.* 2001, **17**, 249–253.
- [50] Rose, D. J., Jorgenson, J. W., *Anal. Chem.* 1988, **60**, 642–648.
- [51] Guttmann, A., Schwartz, H. E., *Anal. Chem.* 1995, **67**, 2279–2283.
- [52] Krivácsy, Z., Gelencsér, A., Hlavay, J., Kiss, G., Sárvári, Z., *J. Chromatogr. A* 1999, **834**, 21–44.
- [53] de Boer, T., Ensing, K., *J. Chromatogr. A* 1997, **788**, 212–217.
- [54] Doehlert, D. H., *Appl. Statist.* 1970, **19**, 231–239.

- [55] Nechar, M., Molina Molina, M. F., Cuadros Rodríguez, L., Bosque Sendra, J. M., *Anal. Chim. Acta* 1995, 316, 185–193.
- [56] García-Campaña, A. M., Cuadros Rodríguez, L., Lupiañez-González, A., Alés-Barrero, F., Román Ceba, M., *Anal. Chim. Acta* 1997, 348, 237–246.
- [57] Ferreira, S. L. C., dos Santos, W. N. L., Quintilla, C. M., Neto, B. B., Bosque-Sendra, J. M., *Talanta* 2004, 63, 1061–1067.
- [58] Moffat, A. C. (Ed.), *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, The Pharmaceutical Press, London 1986.
- [59] García-Campaña, A. M., Baeyens, W. R. G., Van der Weken, G., Cuadros-Rodríguez, L., Alés-Barrero, F., *Biomed. Chromatogr.* 1998, 12, 177–178.
- [60] Fabre, H., Le Bris, A., Blanchin, M. D., *J. Chromatogr. A* 1995, 697, 81–88.
- [61] Stahl, M., *Peak Purity Analysis in HPLC and CE Using Diode-Array Technology*, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2003.

Francisco J. Lara
Ana M. García-Campaña
Laura Gámiz-Gracia
Juan M. Bosque-Sendra
Fermín Alés-Barrero

Department of Analytical Chemistry,
Faculty of Sciences,
University of Granada,
Granada, Spain

Received November 23, 2005
Revised February 8, 2006
Accepted February 10, 2006

Research Article

Determination of phenothiazines in pharmaceutical formulations and human urine using capillary electrophoresis with chemiluminescence detection

A CE instrument coupled with chemiluminescence (CL) detection was designed for the determination of promethazine hydrochloride (PTH) and promazine hydrochloride (PMH) in real samples. An important enhancement of the CL emission of luminol with potassium ferricyanide was observed in the presence of these phenothiazines; so this system was selected for their detection after CE separation. Parameters affecting the electrophoretic separation were optimized in a univariate way, while those affecting CL detection were optimized by means of a multivariate approach based on the use of experimental designs. Chemometrics was also employed for the study of the robustness of the factors influencing the postcolumn CL detection. The method allows the separation of the phenothiazines in less than 4 min, achieving LODs of 80 ng/mL for PMH and 334 ng/mL for PTH, using sample injection by gravity. Electrokinetic injection was used to obtain lower LODs for the determination of the compounds in biological samples. The applicability of the CE-CL method was illustrated in the determination of PTH in pharmaceutical formulations and in the analysis of PMH in human urine, using a previous SPE procedure, achieving an LOD of 1 ng/mL and recoveries higher than 85%.

Keywords: Capillary electrophoresis / Chemiluminescence / Pharmaceutical analysis / Phenothiazines / Urine analysis

DOI 10.1002/elps.200500863

1 Introduction

CE is a useful analytical technique in different fields such as proteomics [1], pharmaceutical [2], pesticides analysis [3], etc. Its main advantages are high efficiency and resolution, the low reagent and sample consumption, and short analysis times. However, its main drawback is the lack of sensitivity because only a few nanoliters of sample are introduced in the capillary. There are some strategies

to obtain lower detection limits such as the application of on-line preconcentration techniques [4, 5] or the use of more sensitive detection systems, such as luminescence methods. Among them, LIF [6–8] has been widely used but chemiluminescence (CL) remains still unfamiliar although it has proved to be, in general, very sensitive in both flow-injection analysis (FIA) and HPLC because of its low background nature [9]. When combined with a versatile and efficient separation method such as CE, CL can offer excellent analytical sensitivity [10, 11] and selectivity [12], allowing the resolution and quantification of various analytes in complex mixtures. In this sense, the coupling CE-CL could be a powerful strategy to resolve problems where extrasensitivity and also high efficiencies are needed or when reduced quantities of sample are available [13, 14]. Various CL reagents have been used in CE-CL, mainly peroxyoxalates, ruthenium complexes in the case of electrogenerated CL (ECL), and luminol and some derivatives as isoluminol isothiocyanate or *N*-(4-amino-butyl)-*N*-ethylisoluminol (ABEI). To a less extent, direct

Correspondence: Dr. Ana M. García-Campaña, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuente nueva s/n, E-18071 Granada, Spain
E-mail: amgarcia@ugr.es
Fax: +34-958-249510

Abbreviations: CL, chemiluminescence; IS, internal standard; PMH, *N,N*-dimethyl-3-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-1-amine; PTH, *N,N*-dimethyl-1-(10*H*-phenothiazin-10-yl)propan-2-amine; TMS, *N,N,N,α*-tetramethyl-10*H*-phenothiazine-10-ethanaminium methyl sulfate

oxidations have also been used for the determination of serotonin and catechol compounds [15] and alkaloids [16, 17]. The luminol-based system has been most widely used in CE, due to its high CL quantum yield and also due to its versatility since there are a lot of substances which can participate in the luminol reaction, the final CL emission being proportional to the concentration of these substances. Another important advantage is its compatibility with the electrophoretic conditions and the simplicity of the reaction because only luminol, an oxidant (generally H_2O_2) and a catalyst (Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , etc.) are needed. This fact provides a more suitable coupling of CL detection after CE separation. The luminol- H_2O_2 -based system has been employed in both direct and indirect CL detection, depending on the enhancement or decrease upon CL emission produced by the analyte, respectively. The former mode has been used for the determination of amino acids, peptides, or biogenic amines labeled with luminol derivates [18–21], proteins [22–24], and metal ions [25–29]. The indirect mode has been employed for the determination of amino acids and peptides [30–32], catecholamines [33, 34], polyamines [35], and metal ions [36].

The use of potassium ferricyanide as oxidant in CE-CL is not yet extensively explored, although it offers important advantages: (i) it comprises the oxidant and the catalyst at the same time; hence the CE-CL configuration is simpler, (ii) there are no problems with disruptions of current due to bubble formation occurring with H_2O_2 , (iii) it is soluble in alkaline media, and therefore, (iv) it is suitable for the luminol reaction (pH 10–11). Its use was firstly reported in CE-CL by Tsukagoshi *et al.* [37] and since then, it has been used for the direct determination of protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid [38] and of the carbohydrates labeled with 3-aminophthalhydrazide [39]. The indirect mode has been applied for the determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside and baicalin [40], and chlorogenic acid and rutin [41]. In spite of the number of CE-CL proposed methods, there are only a few number of applications to biological samples [36, 42, 43].

Phenothiazines are a group of basic drugs including a phenothiazine ring with different substituents attached at the 2 and 10 positions. Promazine hydrochloride (PMH) is a neuroleptic agent with strong anticholinergic, hypotensive, and sedative effects. It is used mainly as an anti-psychotic and antiemetic agent and additionally as an adjunct agent in the management of severe pain. It is administered in solutions for intramuscular injection. Promethazine hydrochloride (PTH) is widely used as an anti-histaminic for the symptomatic relief of hypersensitivity reactions or for enhancing the analgesic, anesthetic, and

sedative effects of others drugs. It is usually used in syrups, coated tablets, creams, or in liquid injections. It has been reported that the degradation of phenothiazines leads to formation of their corresponding sulfoxides by means of oxidative agents [44], thermal decomposition [45], and photodegradation [46]. Special care has to be undertaken to keep samples away from direct sunlight.

Several spectrophotometric methods have been reported for the determination of PMH and PTH using UV [47, 48], fluorimetric [49–51], and CL detection [52]. TLC [53], electrochemical methods [54, 55], liquid chromatography [56–58], and GC [59] were also used for their determination. CE is becoming a very useful technique for the study of phenothiazines, mainly by applying UV detection [60–70], and also using staking techniques to enhance sensitivity [71]; amperometric detection is employed as well [72]. To our knowledge, there has been no report so far that describes the determination of phenothiazines by CE-CL.

In this paper, we propose a new CE-CL method for the determination of PTH and PMH using the luminol CL reaction with potassium ferricyanide, based on the enhancement of the CL emission provided in the presence of these compounds. Considering that no commercial devices exist for CL detection in CE, we have developed a homemade CE instrument which incorporates a photon-counting system as detector just in front of the capillary reaction zone in which the analytes are efficiently mixed with the corresponding reagent to generate the CL emission. Common strategies in analytical chemistry such as a multivariate optimization of the significant variables using experimental designs, in order to consider possible significant interactions among these factors, and the use of an internal standard (IS), are used for the first time in a CE-CL system. Two injection modes have been employed depending on the detection level required: injection by gravity, used for the determination of PTH as an impurity in thiazinium methylsulfate (TMS) ampoules or for its quantification as active principle in syrups and tablets; and electrokinetic injection, used for the determination of PMH in urine samples.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade. Luminol and sodium tetraborate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Potassium ferricyanide ($K_3[Fe(CN)_6]$) was obtained from Probus (Badalona, Spain). Methanol and NaOH were from Panreac-Química (Barcelona, Spain). Hydrochloric acid and

ammonium hydroxide were provided by Merck (Darmstadt, Germany). Phosphoric acid and ethylene glycol were obtained from Carlo Erba (Milan, Italy). TMS and PTH were obtained from Alfa Pharma (Belgium), and PMH was from Federa (Belgium). TMS ampoules were obtained from a hospital laboratory (Ghent, Belgium), promethazine tablets (FRINOVA[®]), and promethazine syrup (Actithiol Antihistamínico[®]) from a local drugstore and produced by Rhône-Poulenc and Almirall Prodesfarma, respectively. Distilled water ($18.2\text{ M}\Omega/\text{cm}$) was deionized by using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Extraction cartridges containing Oasis HBL (60 mg, 3 cc) (Waters, Milford, MA, USA) were used.

2.2 Instrumentation

The first step of the development of an analytical method based on CE-CL is the design and construction of the instrument. Basically, the device (Fig. 1) consists of a high-voltage source that supplies up to 30 kV (Glassman series EL, Hampshire, England), two platinum electrodes (the anode or high-voltage electrode at the inlet and the cathode or ground electrode at the outlet), a photon-counting system (Hamamatsu M7824, Iwata-Gun, Japan) which collects the CL emission and a PEEK three-way connector with an inner diameter (id) of 508 μm

(Upchurch Scientific, WA, USA) to assemble the separation, reagent and reaction capillaries. A 3.7 cm section of the separation capillary (50 cm of total length \times 50 μm id \times 192 μm od) was introduced into the reaction capillary (11 cm length \times 320 μm id \times 450 μm od) constituting an on-column coaxial flow interface. Both fused-silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The CL reagent was siphoned into the tee connector by means of a reagent capillary consisting of a PTFE tube (Omnifit, Cambridge, England) with a length of 90 cm and id of 0.3 mm. The reagent to generate the CL reaction was delivered by gravity, the vial being located 30 cm above the end of the reaction capillary and the reagent flow was ca. 60 $\mu\text{L}/\text{min}$.

When the analytes emerged from the separation capillary, they mixed with the reagent in the reaction capillary initiating the light emission. A 1 cm detection window was made on the reaction capillary by burning off the coating. This detection window was located just in front of the detector and 2 mm of the separation capillary protruded inside the detection window. The whole system was enclosed in a black box to avoid external radiation. The electric current was monitored with a digital multimeter (Promax MD-200, Barcelona, Spain). For pH measurements, a pH meter (Crison model pH 2000, Barcelona, Spain) was employed with a resolution of $\pm 0.01\text{ pH}$ unit. The extraction and preconcentration process was

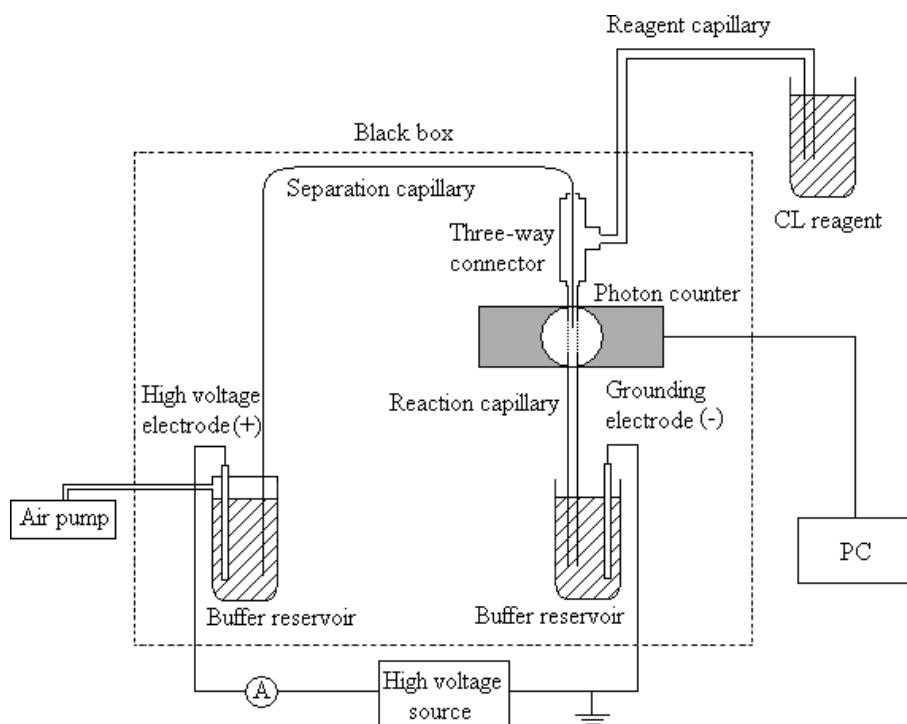


Figure 1. Schematic diagram of the CE-CL system with on-column coaxial flow interface.

achieved with a vacuum manifold system from Supelco (Bellefonte, PA, USA) coupled with a vacuum pump (Büchi model B-169, Switzerland). Centrifugation was carried out in a Hettich Zentrifugen (Universal 32, Tuttlingen, Germany).

2.3 Electrophoretic procedure

The conditioning of the separation capillary was carried out by pressurization of the inlet vial by means of an air pump (Otto SA-3500, Derby, CT, USA) which provides a pressure of 3 psi. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 30 min, then with water for 20 min, and finally with the BGE solution for 30 min. At the beginning of each day, the capillary was prewashed for 20 min with 0.1 M NaOH, 10 min with water, and 20 min with running buffer. After each run, the capillary was postwashed with 0.1 M NaOH for 5 min and with running buffer for 5 min to maintain an adequate reproducibility of run-to-run injections. Before each injection it was necessary to apply 15 kV for 5 min in order to obtain a stable baseline.

The electrophoretic separation was achieved with a voltage of 15 kV (normal mode, *i.e.*, anode located at the inlet of the capillary and cathode located at the outlet of the capillary). The running buffer was an aqueous solution of 20 mM tetraborate and 1.25 mM luminol adjusted to pH 8.5 with 5 M hydrochloric acid. It was necessary to replace the inlet vial for every run due to the decomposition of the luminol, and also the outlet vial due to the contamination by the reagent to initiate the CL emission. This one consisted of a solution of 0.27 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ in 0.01 N NaOH. The electric current was about 30 μ A during separation. Two injection modes of the sample were studied: injection by gravity and electrokinetic injection. The first mode was carried out by elevating the sample vial 20 cm above the outlet of the reaction capillary for 15 s. The second one was carried out by applying 5 kV for 30 s.

2.4 Solutions and sample preparation

Standard solutions of 100 μ g/mL of PMH and PTH were prepared in water and stored in an amber-colored bottle in a refrigerator. Adequate aliquots were diluted with water to prepare the work solutions. Sampling procedure for pharmaceutical formulations was carried out as follows. For the determination of impurities of PMH in TMS ampoules, 615 μ L of the pharmaceutical solution were diluted up to 10 mL with water so that the final concentration was within the working range. For the determination of PTH as active principle in pills, they were

finely powdered and homogenized in a mortar, and an amount corresponding to the average tablet weight was dissolved in 100 mL of water and sonicated for 15 min. One hundred-twenty microliters of this solution was diluted up to 10 mL with water after filtering through a PTFE membrane with 0.2 μ m pore diameter (Millipore). For the analysis of PTH in the syrup, 60 μ L of the syrup was diluted up to 10 mL with water without any other pretreatment.

In the case of analysis of urine samples, a method previously proposed was used for sample treatment [71]. Briefly, 10 mL of urine was acidified with 100 μ L of 5 M HCl and spiked with PMH at different concentration levels. Then, it was centrifuged for 10 min at 4000 rpm. An aliquot of 5 mL of the resulting sample was percolated through an Oasis[®] HLB cartridge (60 mg, 3 mL) which was previously activated with 2 mL of methanol and 2 mL of water. After sample percolation, the cartridge was washed with 3 mL of CH_3OH :water:NH₃ (50:48:2 v/v/v) and 3 mL of water. Final elution was carried out with 3 mL of methanol. The eluent was collected in a 4 mL vial with 20 μ L of ethylene glycol to avoid the adsorption of PMH on the walls of the vial, and concentrated under a gentle nitrogen current at 40°C until almost dry. The extract was reconstituted in 0.5 mL of a mixture of CH_3OH :water (1:1 v/v) containing 32 μ M H_3PO_4 and 1 μ g/mL of PTH (IS), and injected into the CE-CL system.

2.5 Software

Data acquisition was carried out by means of Hamamatsu M7824 software (Iwata-Gun, Japan). The StatGraphics Plus Software 5.1 (Statistical Graphics Rockville, MD, USA) was used to generate the experimental designs and for data processing.

3 Results and discussion

3.1 Selection of the CL reaction

Different FIA-CL methods have been reported based on direct oxidation [73, 74], sensitized CL [75, 76], indirect CL [77], and enhanced CL [78] for the determination of phenothiazines. These CL reactions were tested by employing our homemade CE-CL instrument in order to select the most sensitive one. In all cases, the reagent responsible of the CL emission (CL reagent) was placed at 15 cm height above the end of the reaction capillary, the applied voltage was 15 kV, and an aqueous solution of 100 μ g/mL of phenothiazine was injected by siphoning and elevating the sample vial 20 cm for 5 s. Direct oxidation was studied for the determination of PTH employing a

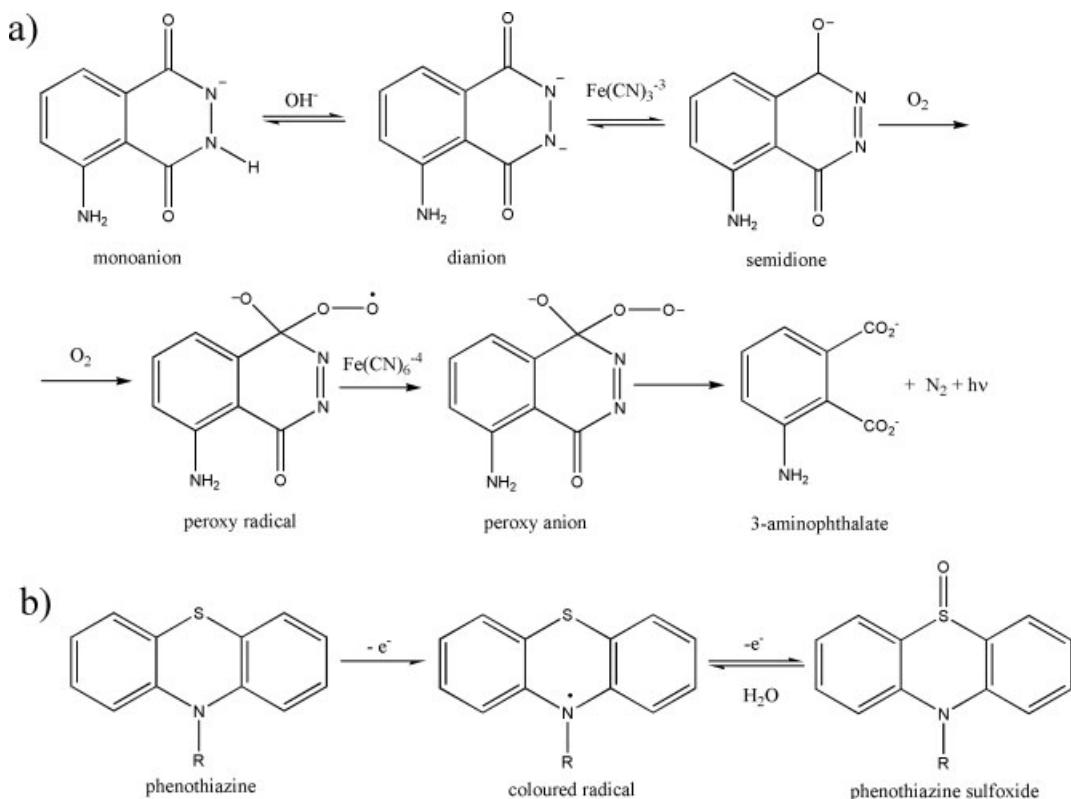


Figure 2. (a) Mechanism of the ferricyanide-catalyzed CL reaction of luminol. (b) Mechanism of the phenothiazine oxidation.

buffer solution of 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_3/\text{H}_3\text{PO}_4$ at pH 3 and as oxidant a solution of 1 mM KMnO_4 in 1 M H_2SO_4 . Although this reaction provides the simplest configuration, poor sensitivity was achieved; hence it was discarded.

In this sense, the oxidation of luminol with H_2O_2 using a metal ion as a catalyst was tested. Phenothiazines easily undergo oxidation to form the corresponding sulfoxides [79]. This feature can be used for their determination by means of the inhibition of the CL emission of luminol when oxidized by H_2O_2 as phenothiazines reduce the concentration of peroxide available in the reaction zone to oxidize luminol. When a high background CL emission is established, a negative peak can be observed when phenothiazine reaches the detection window. The electrophoretic buffer was an aqueous solution of 10 mM Na_2HPO_4 and 5 mM luminol at pH 10.8. The CL reagent was 10 mM H_2O_2 , 30 μM Cr^{3+} , and 30 μM tartaric acid in 10 mM Na_2HPO_4 buffer. The main problem was the incompatibility between the pH necessary for the luminol reaction and the pH necessary to dissolve the catalyst. No satisfactory results were obtained in terms of stability of the baseline and sensitivity using the formation of a metal ion complex to avoid its precipitation [31]. Thus,

H_2O_2 was discarded as oxidant and it was replaced by potassium ferricyanide as the latter does not need a catalyst and is soluble in alkaline media. A high background CL emission was obtained with this oxidant and it was observed that PMH and PTH do not inhibit the CL signal; on the contrary they enhance it. This CL system was selected for optimization due to its promising results obtained in terms of sensitivity for the determination of PMH and PTH. Other phenothiazines, such as TMS, chlorpromazine, or thioridazine, were tested but they were not included because the method was not sensitive enough for their determination, or because inadequate peak shapes could be obtained.

3.2 Possible mechanism of CL reaction

The fact that PMH and PTH act as enhancers of the CL emission of luminol, in spite of producing an inhibitory effect because of oxidizability by ferricyanide, can be explained by the mechanism of the ferricyanide-catalyzed CL of luminol (Fig. 2a) [80]. The dianion of luminol is oxidized by ferricyanide to a semidione structure which is subsequently oxidized to give a peroxy radical. In the next

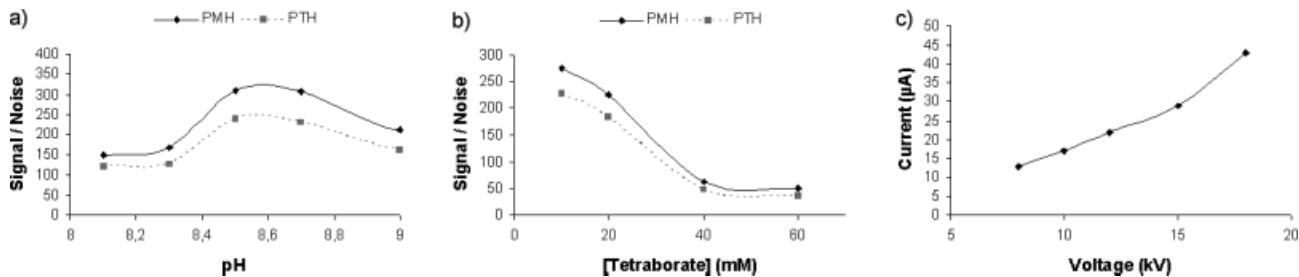


Figure 3. Optimization of the electrophoretic conditions: (a) pH, (b) buffer concentration, and (c) separation voltage. Injection by gravity: 20 cm for 5 s; 10 µg/mL PMH and 40 µg/mL of PTH.

step, the peroxy radical is reduced to a peroxy anion, the authors proposing the ferrocyanide, previously formed, as the most logical reducing agent in the absence of other reducers. In the present case, PMH and PTH in the reaction mixture might provide the electron necessary to convert the peroxy radical into the peroxy anion. In fact, it was reported that PTH can be oxidized via a radical mechanism [55, 81] to give the corresponding sulfoxide (Fig. 2b). This fact may speed up the reaction kinetics and may explain the enhancement effect upon the CL emission of these phenothiazines. Finally, the peroxy anion is decomposed to 3-aminophthalate, which is considered to be the primary emitter. Further studies, taking into account the oxidation mechanism of the phenothiazines, will be necessary to explain their different CL behaviors.

3.3 Optimization of the electrophoretic separation

A univariate study of the experimental variables was carried out in order to achieve the electrophoretic separation of PMH and PTH. The first studied parameter was the buffer composition. Taking into account that pK_a values of these phenothiazines are around 9 [82], tested buffers were 20 mM sodium tetraborate, 100 mM Tris, 20 mM sodium carbonate, and 50 mM ammonium acetate at pH 8.5. CL signals were only observed when sodium tetraborate was used. A resolution higher than 1.5 was obtained when pH values were varied from 8 to 10. Above pH 9, peak shapes became worse, as possibly above this pH a certain precipitation of the phenothiazines occurs inside the electrophoretic capillary. The optimum pH was 8.5 as it produced the best S/N (Fig. 3a).

Buffer concentration was studied at four different levels: 10, 20, 40, and 60 mM. Although the best S/N was obtained with 10 mM (Fig. 3b), a resolution higher than 1.5 was not achieved until 20 mM, so this concentration was selected as optimum. The addition of organic modi-

fiers such as methanol or ACN was discarded because they produced an increase in migration time and a decrease of the S/N ratio, with no significant improvement of resolution being observed. The applied voltage during the separation was also optimized taking into account the S/N and the Joule effect. A linear relationship between the applied voltage and the electric current was observed up to 15 kV. Above this voltage, data were not consistent with Ohm's law probably due to the influence of the Joule heating effect (Fig. 3c). Indeed, the best S/N was obtained when the applied voltage was 15 kV. At these conditions, a complete resolution between PMH and PTH was achieved in less than 3.5 min. Two injection modes were used in this work: injection by gravity and electrokinetic injection. The first mode was optimized by elevating the sample vial 20 cm above the end of the reaction capillary and varying the injection time. Band broadening was observed when injection time was higher than 15 s; hence, this time was selected as optimum. The second mode was optimized by applying a constant voltage of 5 kV and modifying the time of application. Too long injection times produced baseline instability and, therefore, a decrease of the S/N. The optimum injection time for the electrokinetic mode was 30 s.

3.4 Optimization of the CL detection

In the employed luminol-ferricyanide system it is necessary to optimize the concentration of luminol in the running buffer, the concentration of ferricyanide, and the pH of the solution acting as reagent which produces the CL emission (CL reagent). Considering that the CL reagent flow is much higher than the electrophoretic flow, the pH of the reaction zone is determined by the pH of the CL reagent, *i.e.*, by the NaOH concentration in this solution. Thus, it is possible to carry out the electrophoretic separation at a pH value different from that corresponding to the detection zone. The CL reagent flow is controlled by the height of the reagent reservoir and influences the

peak height and also peak efficiency. If the reagent flow is too high, the maximum CL emission could not be reached just inside the detection window area. All experiments were carried out at room temperature, concentrations of 1 µg/mL of PMH and 4 µg/mL of PTH were used and optimized injection by gravity was applied. The reagent reservoir height was modified from 10 to 30 cm above the end of the reaction capillary. Thirty centimeter was selected as optimum height because the best S/N was achieved with efficiencies of 7×10^4 plates/m for PMH and 6×10^4 for PTH.

Multivariate optimization of the concentrations of luminol, ferricyanide, and sodium hydroxide solutions was carried out by means of a response surface design, specifically a Doehlert design [83] with three center points, scarcely used in analytical chemistry [84–86] although it has a higher efficiency compared with other designs like Box-Behnken or central composite designs. It also has the possibility to study a high number of levels, i.e., for the most significant variables or a low number of levels for the most difficult variables to modify. Luminol concentration was studied at three levels from 0.1 to 5 mM, because higher luminol concentrations produced high background noise, and therefore, lower S/N values. NaOH concentration was studied at five levels from 0.005 to 0.2 N, as higher NaOH concentrations resulted in lower CL signals possibly because of the phenothiazines precipitating in such strong alkaline media. Ferricyanide concentration was studied at seven levels, from 0.05 to 3 mM. At higher concentrations of $K_3[Fe(CN)_6]$ a decrease of CL signals was observed, attributed to a certain autoabsorption of $K_3[Fe(CN)_6]$. For the studied CE-CL system and in order to obtain the best sensitivity, it was preferred to optimize S/N in spite of peak height, because in most of the CL systems the noise level is not constant, depending on the reagent concentrations. Only the S/N ratio of PTH was considered because its CL emission is lower than corresponding to PMH. For the first design it was not possible to obtain optimum conditions for the selected factors because the selected experimental domain was too wide and the response variation was not well defined. Therefore, a second Doehlert design was carried out in a more reduced experimental domain considering the results of the previous design. Ferricyanide concentration was studied only at three levels, from 0.0 to 3 mM, luminol concentration was studied at five levels, from 0.01 to 2 mM, and NaOH concentration was studied at seven levels, from 0.0 to 0.1 N. Figure 4 shows the estimated response surfaces, being the optimum values for the maximum response a luminol concentration of 1.25 mM, a ferricyanide concentration of 0.27 mM, and an NaOH concentration of 0.01 N. An interaction between luminol and

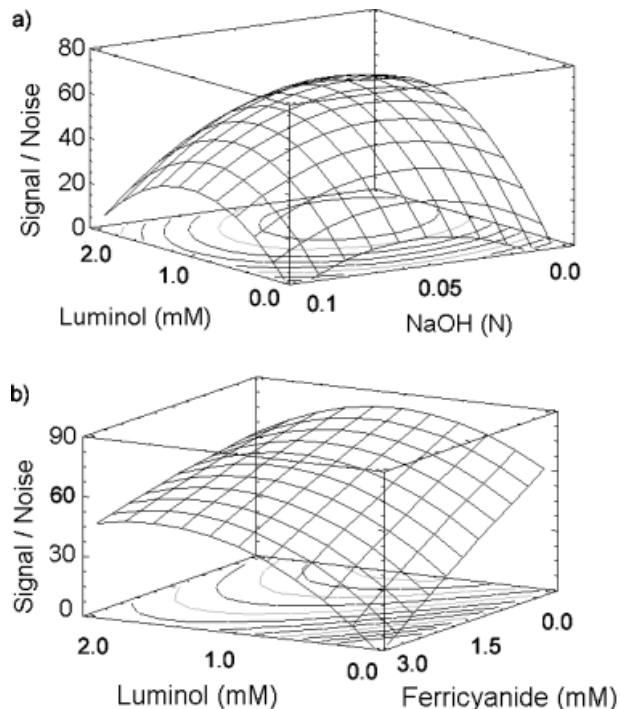


Figure 4. Response surfaces estimated for the Doehlert design of the CL-detection multivariate optimization: (a) [Luminol] vs. [NaOH], (b) [Luminol] vs. [Ferricyanide].

NaOH concentrations was found to be significant on the selected response. The lack of fit of *p*-value for the model was 33% and the determination coefficient (R^2) was 83%.

3.5 Performance characteristics of the method

3.5.1 Linearity, LOD, and LOQ

3.5.1.1 Using sample injection by gravity

Under optimized conditions, the linearity of the response was established from six calibration levels corresponding to 0.10, 0.25, 0.50, 1.00, 2.00, and 5.00 µg/mL for PMH, and 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, and 20.0 µg/mL for PTH, injected in duplicate. Calibration curves were established by considering the peak height as a function of the analyte standard concentration. The LOD was considered the minimum analyte concentration yielding an S/N ratio equal to three. The LOQ has adopted the lowest analyte concentration yielding a signal ten times greater than the noise. Table 1a summarizes the performance characteristics. The satisfactory determination coefficients and the *p*-values for the lack-of-fit test ($\alpha = 0.05$) of the ANOVA confirm that phenothiazine responses are linear over the studied range. The linear range is appropriate for the application of the proposed method to the determination of PMH and PTH in pharmaceutical formulations.

Table 1. Statistical parameters and performance characteristics of the proposed method: (a) using injection by gravity and (b) using electrokinetic injection

(a)

| Analyte | Linearity range ($\mu\text{g/mL}$) | Intercept (cu) | Slope (cu·mL/ μg) | Lack-of-fit <i>p</i> -value ^{a)} (%) | <i>R</i> ² | LOD ($\mu\text{g/mL}$) | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------|---|-------------------|----------------------------------|--|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| PMH | 0.145–2.000 | −430.5 | 7802.0 | 19 | 0.995 | 0.080 | 0.145 |
| PTH | 0.780–8.000 | −155.9 | 1094.7 | 42 | 0.997 | 0.335 | 0.780 |

(b)

| Analyte | Linearity range (ng/mL) | Intercept | Slope (mL/ng) | Lack-of-fit <i>p</i> -value ^{a)} | <i>R</i> ² | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|---------|----------------------------|-----------|------------------|--|-----------------------|-------------|-------------|
| PMH | 3.8–20.0 | 0.041 | 0.148 | 33% | 0.997 | 1.0 | 3.8 |

cu: CL units.

a) *p*-Value from the lack-of-fit test from the ANOVA to check the absence of curvature applying least-square regression model.

3.5.1.2 Using electrokinetic sample injection

For the application of the proposed method in a biological matrix (human urine) it was necessary to achieve lower LODs, so electrokinetic injection was applied. With the aim of reducing the high irreproducibility associated with this kind of sample injection, we proposed the use of one of the phenothiazines as IS. Thus, the determination of PMH was carried out using PTH as IS. The calibration curve was established from five calibration levels corresponding to 5, 10, 15, 20, and 25 ng/mL of PMH and using clean urine samples from a healthy patient, spiked before SPE treatment. In all cases, 1 $\mu\text{g/mL}$ PTH was added as IS. Each calibration level was injected in triplicate. Calibration curves were built by considering the relative peak heights (as the ratio analyte peak-to-IS peak) as a function of the analyte concentration. The statistic parameters calculated by least-squares regression and the performance characteristics are presented in Table 1b. The LOD and the LOQ were adequate for the determination of PMH in urine samples.

3.5.2 Precision

3.5.2.1 Using sample injection by gravity

The precision of the method, considering peak height, was determined by measuring repeatability (intraday) and intermediate precision (interday). The repeatability was assessed by the RSD of replicate experiments ($n = 4$) at three different concentrations. Intermediate precision was evaluated at three consecutive days with a similar proce-

dure for repeatability studies. On every day, a recently prepared buffer was used. The results are listed in Table 2a.

3.5.2.2 Using electrokinetic sample injection

The precision of the whole method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was evaluated on the same day by means of repetitive determinations of two samples (experimental replicates) at three concentration levels and each one was injected by duplicate (instrumental replicates). Intermediate precision was evaluated on three consecutive days with a similar procedure for repeatability studies. It is important to notice that if just peak height was considered as the response, an RSD higher than 26% was obtained, but when relative peak height was considered, RSD was always lower than 8.2% for both repeatability and intermediate precision. Therefore, this demonstrates the necessity for the use of an IS for quantification purposes. The results are listed in Table 2b.

3.5.3 Robustness of the variables affecting CL detection

The consistency of an analytical method, robustness and ruggedness, is defined by its capacity to produce constant and unbiased results when applied under different operating conditions [87]. When the intrinsic operating conditions of a method are slightly modified in an intralaboratory study, the robustness can be determined. These

Table 2. Study of the precision of the proposed method: (a) using injection by gravity and (b) using electrokinetic injection (a)

| | Intraday RSD (%) (<i>n</i> = 4) | | | Interday RSD (%) (<i>n</i> = 12) | | |
|---------------|----------------------------------|------------|------------|-----------------------------------|------------|------------|
| Concentration | 0.20 µg/mL | 0.75 µg/mL | 1.50 µg/mL | 0.20 µg/mL | 0.75 µg/mL | 1.50 µg/mL |
| PMH | 6.9 | 4.5 | 7.8 | 10.8 | 9.6 | 11.5 |
| Concentration | 0.8 µg/mL | 3.0 µg/mL | 6.0 µg/mL | 0.8 µg/mL | 3.0 µg/mL | 6.0 µg/mL |
| PTH | 11.7 | 5.1 | 6.4 | 7.9 | 7.9 | 9.3 |

| (b) | Intraday RSD (%) (<i>n</i> = 4) | | | Interday RSD (%) (<i>n</i> = 12) | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|
| PMH concentration | 5 ng/mL | 10 ng/mL | 15 ng/mL | 5 ng/mL | 10 ng/mL | 15 ng/mL |
| With IS | 7.5 | 4.1 | 5.6 | 6.3 | 4.4 | 6.4 |
| Without IS | 12.5 | 16.5 | 7.8 | 17.8 | 14.6 | 26.9 |

small and deliberate changes are any deviation of a parameter of the procedure compared to its nominal value as described in the analytical method. The robustness of the proposed analytical method was studied using a 2^{3-1} saturated half-fractional design with three center points (seven runs). 0.75 and 3.00 µg/mL of PMH and PTH, respectively, were employed. Factors involved in this study were luminol, NaOH and ferricyanide concentrations, and they were varied $\pm 10\%$ around the optimum value. The significance of the effects for these changes was estimated according to the variance in peak heights for the selected concentration of both phenothiazines. Although the temperature is a factor that could affect the CL response, all experiments were carried out at room temperature, considering that only slight modifications occurred during the experimental work, so its possible effect on the CL signal was considered as random error and evaluated into the system irreproducibility. The obtained results are summarized in Table 3, showing that the analytical procedure is robust. Thus, the possibility of controlling the most critical factors for experimental error was achieved.

Table 3. Study of the robustness of variables affecting CL detection

| Variables | Nominal values | Significant <i>p</i> -values ^{a)} (%) |
|----------------|----------------|--|
| (Luminol) | 1.25 mM | None (7.3) |
| (Ferricyanide) | 0.27 mM | None (28.9) |
| (NaOH) | 0.01 N | None (67.0) |

a) *p*-Value from the lack-of-fit test from the ANOVA to check the significance of the studied factors on the selected response.

3.6 Applications

3.6.1 Analysis of pharmaceutical compounds

The proposed method, using injection by gravity, was applied to the determination of PTH as impurity in TMS ampoules (excipients: EDTA·2Na, ascorbic acid, and sodium chloride). When an ampoule was conveniently diluted and subjected to the CE-CL method, a peak was observed at the PTH migration time (Fig. 5). It is quite probable that PTH is formed during TMS synthesis taking into account their closely related structures. Three ampoules were analyzed and each one was injected in triplicate. This method was also used for the determination of PTH as active principle in syrups (excipients: carbocysteine, saccharose, methylparaben, propylparaben, ethanol, sodium hydroxide, pineapple essence, and peach essence) and in tablets (excipients: starch, lactose, wax, saccharose, levilite, magnesium stearate). Two aliquots were injected in triplicate in the first case, and in the second one, nine determinations were carried out. Excipients did not interfere in the PTH determination, and the obtained results showed a good agreement between the found value and the labeled content of the pharmaceutical formulations, as it was demonstrated using a Student's *t*-test (Table 4).

3.6.2 Analysis of urine samples

Phenothiazines and their metabolites are excreted conjugated with glucuronic acid, primarily in the urine and to a lesser extent in bile [88]. In order to test the trueness and the applicability of the proposed method to the analysis of PMH in human urine using PHT as IS, recovery studies at three concentration levels were carried out using electro-

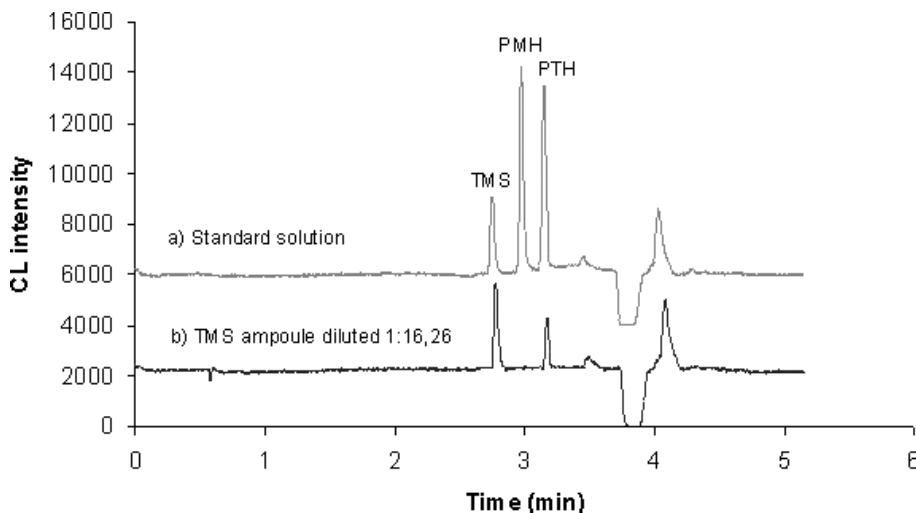


Figure 5. (a) Separation of a standard solution containing 1 mg/mL TMS, 1 µg/mL PMH, and 8 µg/mL PTH under optimized conditions: pH 8.5 using 20 mM borate containing 1.25 mM luminol, separation voltage: 15 kV; injection by gravity at 20 cm for 15 s, CL reagents reservoir at 30 cm of height containing 0.27 mM ferri-cyanide and 0.01 N NaOH. (b) Electropherogram of a diluted TMS ampoule showing a PTH impurity.

Table 4. Determination of PTH in pharmaceutical formulations

| Sample | Concentration (µg/mL) | RSD (%) | Nominal value (µg/mL) | Estimated <i>t</i> -value | Tabulated <i>t</i> -value |
|---------------------------------------|-----------------------|---------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| ACTITHIOL syrup (<i>n</i> = 6) | 492 | 10.6 | 500 | 0.390 | 2.571 |
| FRINOVA tablets (<i>n</i> = 9) | 255 | 9.4 | 250 | 0.590 | 2.306 |
| Thiazinamium ampoules (<i>n</i> = 9) | 43 | 11.0 | — | — | — |

Student's *t*-value: $\alpha = 5\%$.

kinetic injection. Figure 6 shows the typical electropherograms of a blank urine and urine spiked with 10 ng/mL of PMH. No interferences were found comigrating with PMH and PTH showing the proper specificity of the proposed method. Absolute recoveries were calculated comparing the obtained concentrations for urine samples spiked before the SPE procedure and calculated from a calibration curve established with a urine blank spiked after the SPE procedure, with the added concentration. This procedure ensures the correction of possible systematic errors upon the analytical signal due to matrix effects. Each concentration level was injected in triplicate. As can be observed from Table 5, satisfactory results were achieved for all the studied levels.

Table 5. Recovery for PMH at different spiked levels in human urine samples

| Added (ng/mL) | Recovery (%) | RSD (%) (<i>n</i> = 3) |
|---------------|--------------|-------------------------|
| 5 | 88.8 | 14.6 |
| 10 | 85.1 | 10.9 |
| 15 | 94.4 | 15.3 |

4 Concluding remarks

A CE-CL instrument was built for the determination of PMH and PTH. A systematic study of the most suitable CL reaction has been carried out in order to achieve a sensitive determination of the analytes. Electrophoretic parameters were optimized in a univariate way, and it achieved good resolution, as well as excellent efficiencies and short analysis time. Parameters affecting CL detection were optimized by means of experimental design, to our knowledge for the first time, providing a suitable alternative to obtain the best experimental conditions for this detection technique. The method was characterized using two different injection modes (gravity and electrokinetic injection) providing acceptable results in terms of detection limits and precision. Finally, the method was satisfactorily applied to the determination of PTH in pharmaceutical formulations and of PMH in human urine. Obviously, the more important limitation in the application of CL detection in CE resides on the lack of commercial instruments including this kind of detection, mainly due to the differences in configurations required depending on the specific CL reaction to

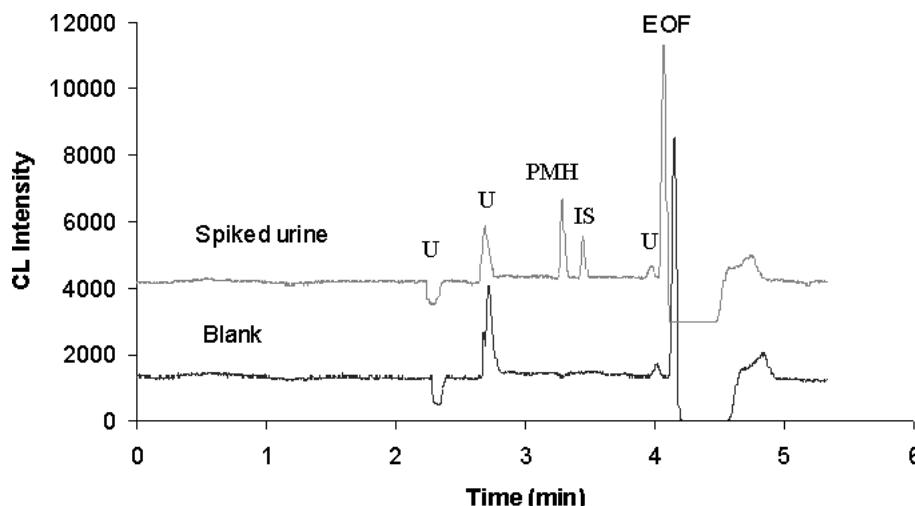


Figure 6. Electropherograms of a blank and a urine sample spiked with 10 ng/mL of PMH. Electrokinetic injection: 5 kV for 30 s. Other conditions as in Fig. 5. Peak identification: U, unknown; PMH, promazine hydrochloride; IS, internal standard; and EOF.

be used and the different modes to incorporate the CL reagents and to make compatible the CL requirement with the conditions for the CE separation. However, further improvements of the proposed designs, such as a higher automation grade, could lead to instruments more reproducible, easier to use, and with higher throughput.

The authors thank the Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health) (Project PI021369) and EU Funds (FEDER) for financial support. F. J. L. thanks the Junta de Andalucía for a FPI grant and L. G. G. for a research contract to the Plan Propio of the University of Granada.

5 References

- [1] Simpson, D. C., Smith, R. D., *Electrophoresis* 2005, 26, 1291–1305.
- [2] Natishan, T. K., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 1115–1160.
- [3] Hernández-Borges, J., Frías-García, S., Cifuentes, A., Rodríguez-Delgado, M. A., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 947–963.
- [4] Chien, R. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 486–497.
- [5] Simonet, B. M., Valcárcel, M., *Trends Anal. Chem.* 2003, 22, 605–614.
- [6] Tao, L., Kennedy, R. T., *Trends Anal. Chem.* 1998, 8 + 9, 484–491.
- [7] Lin, Y. W., Chiu, T. C., Chang, H. T., *J. Chromatogr. B* 2003, 793, 37–48.
- [8] Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Galera, R., *Electrophoresis* 2005, 26, 2384–2390.
- [9] García-Campaña, A. M., Baeyens, W. R. G., *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York 2001.
- [10] Liu, Y. M., Liu, E. B., Cheng, J. K., *J. Chromatogr. A* 2001, 939, 91–97.
- [11] Liu, E. B., Liu, Y. M., Cheng, J. K., *Anal. Chim. Acta* 2002, 456, 177–181.
- [12] Yang, W. P., Zhang, Z. J., Deng, W., *J. Chromatogr. A* 2003, 1014, 203–214.
- [13] Huang, X. J., Fang, Z. L., *Anal. Chim. Acta* 2000, 414, 1–14.
- [14] García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., Baeyens, W. R. G., Alés-Barroso, F., *J. Chromatogr. B* 2003, 793, 49–74.
- [15] Lee, Y. T., Whang, C. W., *J. Chromatogr. A* 1997, 771, 379–384.
- [16] Gong, Z., Zhang, Y., Zhang, H., Cheng, J. K., *J. Chromatogr. A* 1999, 855, 329–335.
- [17] Barnett, N. W., Hindson, B. J., Lewis, S. W., *Analyst* 2000, 125, 91–95.
- [18] Zhao, J. Y., Labbe, J., Dovichi, N. J., *J. Microcol. Sep.* 1993, 5, 331–339.
- [19] Hashimoto, M., Tsukagoshi, K., Nakajima, R., Kondo, K., *J. Chromatogr. A* 1999, 832, 191–202.
- [20] Tsukagoshi, K., Nakamura, T., Nakajima, R., *Anal. Chem.* 2002, 74, 4109–4116.
- [21] Liu, Y. M., Cheng, J. K., *J. Chromatogr. A* 2003, 1003, 211–216.
- [22] Tsukagoshi, K., Nakahama, K., Nakajima, R., *Anal. Chem.* 2004, 76, 4410–4415.
- [23] Tsukagoshi, K., Fujimura, S., Nakajima, R., *Anal. Sci.* 1997, 13, 279–281.
- [24] Zhang, Y., Gong, Z., Zhang, H., Cheng, J. K., *Anal. Commun.* 1998, 35, 293–296.
- [25] Huang, B., Zhang, L., Li, J. J., Cheng, J. K., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2366–2369.
- [26] Zhang, Y., Cheng, J. K., *J. Chromatogr. A* 1998, 813, 361–368.
- [27] Huang, X. J., Pu, Q. S., Fang, Z. L., *Analyst* 2001, 126, 281–284.
- [28] Liu, E. B., Liu, Y. M., Cheng, J. K., *Anal. Chim. Acta* 2001, 443, 101–105.
- [29] Yang, W. P., Zhang, Z. J., Deng, W., *Anal. Chim. Acta* 2003, 485, 169–177.
- [30] Liao, S. Y., Chao, Y. C., Whang, C. W., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 667–669.
- [31] Liao, S. Y., Whang, C. W., *J. Chromatogr. A* 1996, 736, 247–254.
- [32] Yang, W., Zhang, Z., Deng, W., *Talanta* 2003, 59, 951–958.
- [33] Zhang, Y., Huang, B., Cheng, J. K., *Anal. Chim. Acta* 1998, 363, 157–163.

- [34] Tsai, H. C., Whang, C. W., *Electrophoresis* 1999, 20, 2533–2538.
- [35] Huang, X., Ren, J., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2003, 26, 355–367.
- [36] Ren, J., Huang, X., *Anal. Chem.* 2001, 73, 2663–2668.
- [37] Tsukagoshi, K., Ouchi, Y., Nakajima, R., *Anal. Sci.* 2001, 17, 1003–1005.
- [38] Han, S., Liu, E., Li, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 733–738.
- [39] Wang, X., Wang, Q., Chen, Y., Han, H., *J. Chromatogr. A* 2003, 992, 181–191.
- [40] Han, S., Li, H., Liu, E., *Microchim. Acta* 2005, 150, 167–171.
- [41] Jiang, H. L., He, Y. Z., Zhao, H. Z., Hu, Y. Y., *Anal. Chim. Acta* 2004, 512, 111–119.
- [42] Wang, J., Ren, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 2402–2408.
- [43] Wang, J., Huang, W., Liu, Y., Cheng, J. K., Yang, J., *Anal. Chem.* 2004, 76, 5393–5398.
- [44] Underberg, W. J. M., *J. Pharm. Sci.* 1978, 67, 1133–1138.
- [45] Underberg, W. J. M., *J. Pharm. Sci.* 1978, 67, 1128–1131.
- [46] Yamamoto, R., Fujisawa, S., *Kongr. Pharm. Wiss.* 1964, 1963, 509–515.
- [47] Puzanowska-Tarasiewicz, H., Wolyniec, E., Kojlo, A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 14, 267–271.
- [48] Daniel, D., Gebhardt, I., Gutz, R., *Anal. Chim. Acta* 2003, 494, 215–224.
- [49] Dembinski, B., Szydłowska-Czerniak, A., Kurzawa, M., *Acta Pol. Pharm.* 1997, 54, 415–419.
- [50] Martínez, C., García, S. T., *Pharmazie* 1992, 47, 557–558.
- [51] De la Peña, L., Gomez-Hens, A., Perez-Bendito, D., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, 11, 893–896.
- [52] Greenway, G. M., Dolman, S. J. L., *Analyst* 1999, 124, 759–762.
- [53] Curea, E., Martinovici, M., *Ann. Pharm. Fr.* 1975, 33, 505–511.
- [54] Belal, F., El-Ashry, S. M., Shehata, I. M., El-Sherbeny, M. A., El-Sherbeny, D. T., *Microchim. Acta* 2000, 135, 147–154.
- [55] Baxter, R. I., Svehla, G., Kerr, B., Woolfson, A. D., *Anal. Chim. Acta* 1984, 164, 171–180.
- [56] Quintana, M. C., Blanco, M. H., Lacal, J., Hernández, L., *Talanta* 2003, 59, 417–422.
- [57] Vanapalli, S. R., Kambhampati, S. P., Putcha, L., Bourne, D. W. A., *J. Chromatogr. Sci.* 2001, 39, 70–72.
- [58] Ponder, G. W., Stewart, J. T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13, 1161–1166.
- [59] Leelavathi, D. E., Dressler, D. E., Soffer, E. F., Yachetti, S. D., Knowles, J. A., *J. Chromatogr.* 1985, 339, 105–115.
- [60] Madej, K., Wozniakiewicz, M., Kala, M., *Chromatographia* 2005, 61, 259–263.
- [61] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., *Anal. Chim. Acta* 2005, 535, 101–108.
- [62] Le, D. C., Morin, C. J., Beljean, M., Siouffi, A. M., Desbene, P. L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1063, 235–240.
- [63] Lin, C. E., Liao, W. S., Chen, K. H., Lin, W. Y., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154–3159.
- [64] Lin, C. E., Liao, W. S., Chen, K. H., *Electrophoresis* 2003, 24, 3139–3146.
- [65] Chen, K. H., Lin, C. E., Liao, W. S., Lin, W. Y., Hsiao, Y. Y., *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 399–408.
- [66] Lin, C. E., Chen, K. H., *J. Chromatogr. A* 2001, 930, 155–163.
- [67] Chankvetadze, B., Kartozia, I., Burjanadze, N., Bergenthal, D. et al., *Chromatographia* 2001, 53, S290–S295.
- [68] Wang, R., Lu, X., Xin, H., Wu, M., *Chromatographia* 2000, 51, 29–36.
- [69] De Boer, T., Bijma, R., Ensing, K., *J. Capil. Electrophor.* 1998, 5, 65–71.
- [70] Muijselaar, P. G. H. M., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 395–402.
- [71] Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., *Electrophoresis* 2005, 26, 2418–2429.
- [72] Wang, R., Lu, X., Wu, M., Wang, E., *J. Chromatogr. B* 1999, 721, 327–332.
- [73] Kojlo, A., Michalowski, J., Wolyniec, E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 22, 85–91.
- [74] Sultan, S. M., Hassan, Y. A. M., Abulkibash, A. M., *Talanta* 2003, 59, 1073–1080.
- [75] Huang, Y., Chen, Z., *Talanta* 2002, 57, 953–959.
- [76] Aly, F. A., Alarjaf, N. A., Alwarthan, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1998, 358, 255–262.
- [77] Alwarthan, A. A., Al-Tamrah, S. A., Akel, A. A., *Anal. Chim. Acta* 1993, 282, 169–174.
- [78] Yang, J., Huang, Y., *Yaowu Fenxi Zazhi* 2002, 22, 453–456.
- [79] Karpinska, J., *Anal. Sci.* 2001, 17, 249–253.
- [80] Shevlin, P. B., Neufeld, H. A., *J. Org. Chem.* 1970, 35, 2178–2182.
- [81] Bishop, E., Hussein, W., *Analyst* 1984, 109, 229–234.
- [82] Lin, C., Liao, W., Chen, K., Lin, W., *Electrophoresis* 2003, 24, 3154–3159.
- [83] Doehlert, D. H., *Appl Stat.* 1970, 19, 231–239.
- [84] Nechar, M., Molina-Molina, M. F., Cuadros-Rodríguez, L., Bosque-Sendra, J. M., *Anal. Chim. Acta* 1995, 316, 185–193.
- [85] García-Campaña, A. M., Cuadros-Rodríguez, L., Lupiáñez-González, A., Alés-Barrero, F., Román-Ceba, M., *Anal. Chim. Acta* 1997, 348, 237–246.
- [86] Ferreira, S. L. C., dos-Santos, W. N. L., Quintilla, C. M., Neto, B. B., Bosque-Sendra, J. M., *Talanta* 2004, 63, 1061–1067.
- [87] Bosque-Sendra, J. M., Nechar, M., Cuadros-Rodríguez, L., *Fresenius' J. Anal. Chem.* 1999, 365, 480–488.
- [88] Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., Galichet, L. Y. (Eds.), *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, Pharmaceutical Press, London 2004.

Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry

Francisco J. Lara,[†] Ana M. García-Campaña,^{*,†} Fermín Alés-Barrero,[†] Juan M. Bosque-Sendra,[†] and Luis E. García-Ayuso[‡]

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain, and Department of Quality Control, Puleva Biotech S.A., Camino de Purchil, 66, E-18004 Granada, Spain

A new analytical method based on capillary zone electrophoresis–tandem mass spectrometry (CZE–MS/MS) is proposed and validated for the identification and simultaneous quantification of eight quinolones for veterinary use in bovine raw milk. The studied quinolones include danofloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, and flumequine, whose contents are regulated by the EU Council Regulation no. 2377/90 in animal edible tissues. Different parameters (i.e., separation buffer composition and electrospray conditions) were optimized in order to obtain both an adequate CE separation and a high sensitivity, using experimental design methodology to consider the interactions among the studied variables. MS/MS experiments using an ion trap as analyzer operating in the multiple reaction monitoring mode were carried out to achieve the minimum number of identification points according to the 2002/657/EC European Decision. For the quantification in bovine raw milk samples, a two-step solid-phase extraction procedure was developed using Oasis MAX and HLB cartridges without protein precipitation. Satisfactory results were obtained in terms of linearity (r^2 between 0.989 and 0.992) and precision (RSD below 18%). The limits of detection and quantification (below 6 and 24 ppb, respectively) were in all cases lower than the maximum residues limits tolerated for these compounds in milk, the recoveries ranging from 81 to 110%, indicating the potential of the CZE–MS/MS for the analysis of regulated quinolone antibiotics in the food quality and safety control areas.

In the past few years, the public concern about the utilization of antibiotics in food-producing animals has increased due to the transfer of antibiotic-resistant bacteria to man.¹ This is an increasingly prominent problem because antibiotics are used in animals both to treat infections and as growth promoters and so antibiotic-

resistant strains can emerge in both healthy and sick animals. This fact would make useless the antibiotic treatment in common human infections, and some authors² have even pointed out that “we are at the gate of an uncertain future in which the conditions that existed before 1940, in the pre-antibiotic era, may recur”. Other problems related to the misuse of antibiotics are as follow: (a) they can produce allergic hypersensitivity reaction in some persons; (b) fermentation processes, such as the yogurt elaboration, could fail; and (c) the presence of antibiotics could hide the existence of pathogens in foodstuffs when bacteriological analyses are carried out. For these reasons, it is important to control the antibiotic residue content in edible animal tissues.

An important group of antibiotics are quinolones, which were introduced in the early 1960s with nalidixic acid, and now are still among the most used ones because they are highly active against a wide spectrum of Gram-negative bacteria but also moderately active against Gram-positive bacteria.³ Their activity is based on the inhibition of bacterial DNA synthesis, and they are widely used in human as well as in veterinary medicine for the treatment of pulmonary, urinary, and digestive infections. The wide application range and the extensive use and misuse of quinolones in veterinary medicine represent a potential hazard because residues of these antibiotics may persist in edible tissues or foodstuffs, such as milk or eggs. Some quinolones have been specifically developed for veterinary medicine, but when metabolized, it is possible to find quinolones intended for human use in food-producing animals, which is the case of enrofloxacin and its major metabolite ciprofloxacin.

The European Union has set maximum residue limits (MRLs) of antibiotics in foodstuffs of animal origin by means of the directive 2377/90/EEC.⁴ On the other hand, in order to achieve unambiguous identification of the antibiotic residues, it is necessary to reach the minimum number of identification points established in the 2002/657/EC European decision.⁵ Therefore, sufficiently sensitive multiresidue methods that provide reliable determinations of quinolones in foodstuff of animal origin are

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: amgarcia@ugr.es.
Fax: +0034 958 249510.

[†] University of Granada.

[‡] Puleva Biotech S.A.

(1) Piddock, L. J. V. *J. Antimicrob. Chemother.* 1996, 38, 1.

- (2) Pérez-Trallero, E.; Zigorraga, C. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1995, 6, 59.
(3) Fernandes, P. B.; Chu, D. T. W. *Annu. Rep. Med. Chem.* 1988, 23, 133.
(4) EU Council Regulation 2377/90/EEC concerning the establishment of MRLs of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
(5) Commission Decision 2002/657/EEC. *Off. J. Eur. Comm.* 2002, L221, 23.

needed in order to implement these directives. Traditionally, quinolones have been determined by liquid chromatography^{6,7} using ultraviolet^{8,9} or fluorescence detection,^{10–13} although for regulatory purposes mass spectrometry^{14–17} is the preferred technique due to its intrinsic characterization power. In spite of its possibilities in the analysis of antibiotics,¹⁸ capillary electrophoresis (CE) has been less used so far for the determination of quinolones in foods, mainly with ultraviolet detection,^{19–21} although laser-induced fluorescence detection²² has also been employed. CE–mass spectrometry (CE–MS) is still not much used for quantification purposes^{23,24} although some papers indicated the great potential of such a coupling in the determination of pesticides^{25–28} and antibiotics.²⁹ To our knowledge, only in one previous paper was the applicability of CE–MS/MS for the separation of quinolones³⁰ investigated, but sarafloxacin (SAR), difloxacin (DIF), and oxolinic acid (OXO)—which are EU-regulated quinolones—were not included, no quantification was carried out, and the method was not applied to real samples.

The goal of this work is, therefore, to demonstrate for the first time the possibilities of CE–MS/MS to quantify and identify simultaneously all quinolones for veterinary use in a complex matrix such as bovine raw milk. To achieve this purpose, after selecting the separation conditions, an optimization of the electrospray ionization was carried out using experimental design. Although this methodology is still not actually common in the optimization of CE–MS methods,^{25,26} it represents an interesting strategy in contrast to the univariate traditional approach when

- (6) Carlucci, C. *J. Chromatogr., A* **1998**, *812*, 343.
- (7) Hermo, M. P.; Barrón, D.; Barbosa, J. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1104*, 132.
- (8) Bailac, S.; Ballesteros, O.; Jiménez-Lozano, E.; Barrón, D.; Sanz-Nebot, V.; Navalón, A.; Vilchez, J. L.; Barbosa, J. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1029*, 145.
- (9) Turiel, E.; Bordin, G.; Rodríguez, A. R. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1008*, 145.
- (10) Yang, G.; Lin, B.; Zeng, Z.; Chen, Z.; Huang, X. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 1688.
- (11) Golet, E. M.; Alder, A. C.; Hartmann, A.; Ternes, T. A.; Giger, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3632.
- (12) Zeng, Z.; Dong, A.; Yang, G.; Chen, Z.; Huang, X. *J. Chromatogr., B* **2005**, *821*, 202.
- (13) Ramos, M.; Aranda, A.; García, E.; Reuvers, T.; Hooghuis, H. *J. Chromatogr., B* **2003**, *789*, 373.
- (14) Volmer, D. A.; Mansoori, B.; Locke, S. *J. Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4143.
- (15) Turnipseed, S. B.; Roybal, J. E.; Pfenning, A. P.; Kijak, P. J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *483*, 373.
- (16) Ballesteros, O.; Sanz-Nebot, V.; Navalón, A.; Vilchez, J. L.; Barbosa, J. *Chromatographia* **2004**, *59*, 543.
- (17) Van Hoof, N.; De Wasch, K.; Okerman, L.; Reybroeck, W.; Poelmans, S.; Noppe, H.; De Brabander, H. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *529*, 265.
- (18) García-Ruiz, C.; Marina, M. L. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 266.
- (19) Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Bailac, S.; Barbosa, J. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *477*, 21.
- (20) Hernández, M.; Borrell, F.; Calull, M. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 506.
- (21) Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Bailac, S.; Barbosa, J. *J. Chromatogr., B* **2002**, *767*, 313.
- (22) Horstkötter, C.; Jiménez-Lozano, E.; Barrón, D.; Barbosa J.; Blaschke, G. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3078.
- (23) Ohnesorge, J.; Neusüss, C.; Wätzig, H. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3973.
- (24) Ohnesorge, J.; Sänger-van de Griend, C.; Wätzig, H. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2360.
- (25) Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. A.; García-Montelongo, F. J.; Cifuentes, A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2065.
- (26) Hernández-Borges, J.; Rodríguez-Delgado, M. A.; García-Montelongo, F. J.; Cifuentes, A. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 948.
- (27) Rodríguez, R.; Picó, Y.; Font, G.; Mañes, J. *J. Chromatogr., A* **2002**, *949*, 359.
- (28) Núñez, O.; Moyano, E.; Galcerán, M. T. *J. Chromatogr., A* **2002**, *974*, 243.
- (29) Santos, B.; Lista, A.; Simonet, B. M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1567.
- (30) McCourt, J.; Bordin, G.; Rodríguez, A. R. *J. Chromatogr., A* **2003**, *990*, 259.

different parameters are to be optimized in order to consider possible interactions or quadratic effects that can be found among them. In the case of CE–MS coupling, it is not so obvious to know the order in which the optimization of parameters involved in the electrospray phenomena must be carried out or if all of them are really significant for the selected response so as to require a rigorous optimization. The application of experimental design methodology can solve these problems by means of the use of screening and response surface designs. A preliminary screening design can be used to determine the significant and nonsignificant factors on the selected response, in order to reduce their number in the optimization study. Next, response surface designs can be applied to obtain the optimum values for the significant factors in the selected experimental region. By means of the study of the interactions between factors, it is possible to obtain a better knowledge of the electrospray ionization process. In this way, a more efficient spray can be obtained and lower limits of detection are achieved.

One of the main difficulties in the development of an analytical method for a complex matrix is the sample treatment, which becomes more complicated when several analytes with different chemical properties are implied. This is the case for this specific study, in which we intended to carry out a multiresidue method for all the veterinary quinolones, regulated by the EU, among which appear two well-differentiated types: acidic and zwitterionic quinolones. Particularly, in the determination of these antibiotics in milk samples, the proposed methods usually involve solid-phase extraction (SPE) after protein precipitation using organic solvents in conjunction with strong organic or inorganic acids.^{31,32} These conditions can affect in a different way the retention of quinolones in the selected solid-phase cartridge; hence, procedures to make the retention conditions compatible for chemically different quinolones should be developed to obtain satisfactory recoveries in a multiresidue method.

In this paper, we propose a specific and sensitive method based on the use of CE coupled to tandem mass spectrometry for the identification and simultaneous quantification of all quinolones for veterinary use. Previously, a direct SPE procedure in two steps was developed for the regulated quinolones in milk, without protein precipitation, achieving good recoveries for all the analytes. With the present study we have provided the following: (a) a sensitive and selective CE–MS/MS method for the identification and quantification of eight quinolones below the MRLs established by the EU legislation; (b) an exhaustive knowledge about the electrospray ionization process by means of a rigorous study of the instrumental and chemical variables involved by using experimental design methodology; (c) a new strategy to solve the problem of sample treatment when acidic and zwitterionic quinolones are simultaneously determined in bovine raw milk samples. These results demonstrate the possibilities of CE–MS/MS within the European framework of confirmatory methods for the analysis of antibiotics in foodstuffs.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. All chemicals and solvents were of analytical grade. Acetonitrile, methanol, ammonium hydroxide, and sodium

- (31) Marazuela, M. D.; Moreno-Bondi, M. C. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1034*, 25.
- (32) Cinquina, A. L.; Roberti, P.; Giannetti, L.; Longo, F.; Draisici, R.; Fagiolo, A.; Brizioli, N. *R. J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 221.

Table 1. Main Parameters of the MS/MS Method and Obtained Identification Points.

| | segment time (min) | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|-----------|--|
| | 0–13.0 | | 13.0–13.9 | | | 13.9–15.1 | | | 15.1–18.0 | |
| | LOM | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU | |
| width (<i>m/z</i>) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| cutoff (<i>m/z</i>) | 96 | 98 | 106 | 91 | 99 | 98 | 110 | 71 | 71 | |
| amplitude (V) | 0.7 | 0.7 | 0.7 | 0.6 | 0.6 | 0.7 | 0.7 | 0.5 | 0.5 | |
| precursor ion | 352.1 | 358.1 | 386.0 | 332.1 | 363.1 | 360.1 | 400.0 | 262.0 | 262.0 | |
| fragment ions | 334.1, 308.1, 288.2, 265.1 | 340.1, 314.2 | 368.1, 342.2, 299.1 | 314.1, 288.2, 245.1 | 345.1, 320.0, 276.1 | 342.1, 316.1, 245.1 | 382.1, 356.2, 299.3 | 244.0 | 244.1 | |
| identification points | 7 | 4 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 5.5 | 2.5 | 2.5 | |

hydroxide were supplied by Panreac (Madrid, Spain). 2-Propanol, formic acid, and ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Danofloxacin (DAN), SAR, and DIF were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Flumequine (FLU) and lomefloxacin (LOM) were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), and OXO were acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). Marbofloxacin (MAR) was kindly supplied by Vetoquinol S.A. (Madrid, Spain). Distilled water ($18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$) was deionized by using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). A mixture of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each quinolone was prepared in MeCN/H₂O (1:1) (v/v) and stored at 4 °C in an amber-colored bottle. The working solutions were made by dilution with water. Two different extraction cartridges containing Oasis MAX and HLB (60 mg, 3 cm³) (Waters, Milford, MA) were used.

CE Conditions. CE experiments were carried out with an HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a UV-visible detector working at 275 nm with a bandwidth of 20 nm. Separation was carried out in a bare fused-silica capillary 96 cm total length \times 50 μm inner diameter (360 μm outer diameter) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Injections were made at the anodic end using a pressure of 50 mbar for 75 s (~3% of the total capillary volume, 60 nL). The electrophoretic separation was achieved with a voltage of 25 kV (normal mode) with an initial ramp of 0.3 min. The running buffer was an aqueous solution of 70 mM ammonium acetate adjusted to pH 9.1 with 5 N ammonium hydroxide. The temperature of the capillary was kept constant at 25 °C. Under these conditions, the capillary current was ~35–40 μA avoiding corona discharge and disruptions of the CE separations. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 10 min at 60 °C, then with water for 5 min, and finally with the background electrolyte solution for 20 min. A pressure of 1 bar was applied. At the beginning of each day, the capillary was prewashed with a N₂ pressure of 7 bar for 4 min with 0.1 M NaOH, 3 min with water, and 5 min with running buffer. After each run, the capillary was prewashed at 7 bar for 1 min with buffer to maintain an adequate repeatability of run-to-run injections.

ESI Interface. The Agilent coaxial sheath-liquid sprayer was used for CZE–MS coupling (Agilent Technologies). The fused capillary was mounted in a way that the tip just protruded from the surrounding steel needle ~1/4 of the capillary outer diameter. The sheath liquid consisted of 2-propanol/water/formic acid (50:49:1 v/v/v) and was delivered at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ by a PU-2085 Jasco high-pressure pump (Jasco Analítica, Madrid,

Spain), equipped with a splitter 1:100. The ESI voltage was set to –4 kV. Other electrospray parameters at optimum conditions were as follows: nebulizer pressure at 10 psi, dry gas flow at 6 L/min, and dry gas temperature at 150 °C. In order to avoid the entrance of air bubbles during the injection step due to the Venturi effect caused by the nebulizer gas, it was necessary to carry out the preconditioning and the sample injection with the nebulizer pressure and the ESI voltage set at zero, and a delay of 2 min was introduced after the sample injection before setting the optimum spray gas and ESI voltage.

MS and MS/MS Conditions. MS was performed using an Agilent 1100 Series LC/MSD SL mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an ion trap analyzer. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode and scanned at 190–410 *m/z* (target mass 360 *m/z*, compound stability 100%) at 13 000 *m/z*/s. In the MS experiments, the trap parameters were selected in ion charge control mode using a target of 50 000, maximum accumulation time of 300 ms, and five averages per experiment. In MS/MS experiments, the maximum accumulation time was set at 50 ms with two averages per experiment in order to obtain 10 spectra per peak. Fragmentation was carried out by means of collision-induced dissociation with the helium present in the trap for 40 ms in multiple reaction monitoring (MRM) mode. MS/MS parameters are summarized in Table 1 and MS/MS spectra and their corresponding structures are shown in Figure 1.

Sample Preparation. Bovine raw milk was taken from a local farm. Before the SPE procedures, the milk samples were treated as follows: A 5-g aliquot of bovine raw milk was accurately weighed in a test tube and spiked with quinolones at different concentration levels. A 400- μL aliquot of concentrated NH₃ was added and the mixture vortexed for ~10 s. A 2.5-mL aliquot of this mixture was centrifuged at 18 000 rpm for 10 min in two different Eppendorf vials, and then the solid fat was separated from the aqueous portion with a spatula. A 2-mL aliquot of the resulting sample was percolated through an Oasis MAX cartridge (60 mg, 3 mL), which was previously activated with 2 mL of methanol and 2 mL of 2% NH₃ solution in water. After sample percolation, the cartridge was washed with 2 mL of 2% NH₃ solution in water and 1 mL of 2% NH₃ solution in acetonitrile to eliminate salts and proteins. Finally, the cartridge was vacuum-dried and the elution was carried out with 3 mL of 2% formic acid in MeOH. The eluent was collected in a 4-mL vial and concentrated under a gentle nitrogen current at 40 °C until dryness. The extract was reconstituted in 3 \times 1 mL of 50 mM phosphate buffer at pH

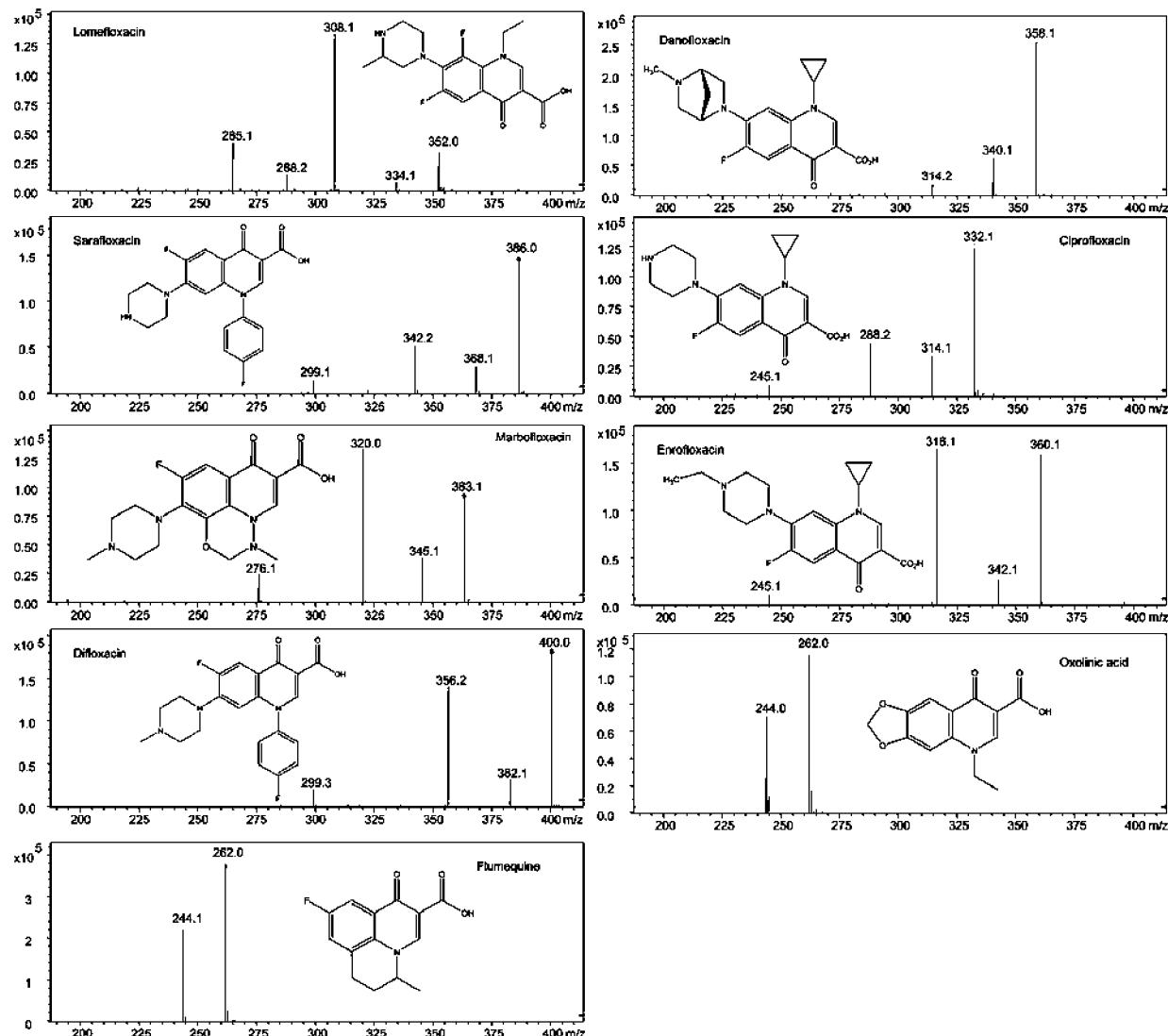


Figure 1. MS/MS spectra of the studied quinolones and their corresponding structures.

7 and percolated through an Oasis HLB cartridge (60 mg, 3 cm³), which was previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. After application of the extract, the cartridge was rinsed with 2 mL of water and vacuum-dried. The quinolones were eluted from the column with 3 mL of MeOH. The eluate was evaporated to dryness at 40 °C under a stream of nitrogen. The residue was reconstituted in 250 μL of 1 N NH₃ solution in water containing 1 μg/mL lomefloxacin as internal standard (IS). Finally the extract was filtered through a 0.22-μm nylon membrane and injected in the CE system.

Software. UV-visible electropherograms were acquired using the software provided with the HP ChemStation version A.09.01. The MS spectrometer was controlled by a PC running the Esquire software 4.1 from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). The StatGraphics Plus Software 5.1 (Statistical Graphics, Rockville, MD) was used to generate the experimental designs and data processing.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrophoretic Separation. Previous to the coupling with the mass spectrometer, an optimization of the electrophoretic separation was carried out using a UV-visible detector. Some

important considerations have to be taken into account when a CE method is developed before its coupling with mass spectrometry detection. For example, a volatile buffer of low conductivity (i.e., electric current below 50 μA) is required to avoid plugging of the dielectric capillary between the spray chamber and the mass spectrometer, as well as to obtain a stable electrospray. As was previously reported and according with the pK values,³⁰ adequate separation between quinolones can be achieved with basic buffers; hence, for this reason, only ammonium acetate and ammonium carbonate buffers were studied, selecting the first one because better peak shapes were obtained. With this buffer, a systematic study of the pH effect was carried out between pH 8 and 10; finally, pH 9.1 was chosen because at this value the best resolution among the eight quinolones occurred. Although comigrating quinolones can be separated by the mass spectrometer, a minimum resolution is preferred to avoid ionization suppression and because it is easier to insert time segments with different MS/MS conditions in the MRM mode. The optimized buffer concentration was 70 mM as it was found to provide a good compromise among peak shape, electrical current intensity, and analysis time. The separation voltage was also optimized, and a value of 25 kV was selected

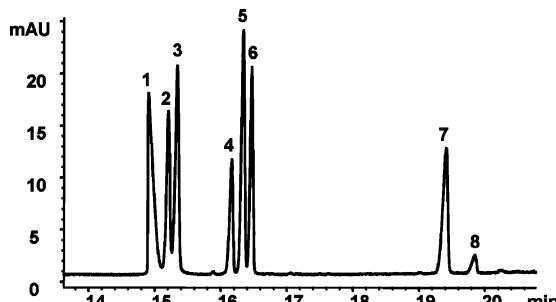


Figure 2. Separation of the quinolones. Optimized conditions using CE–UV–visible: 70 mM ammonium acetate at pH 9.1; separation voltage, 25 kV; capillary temperature, 25 °C; wavelength, 275 nm; injection, 50 mbar × 10 s; capillary length, 96.5 cm. Peak identifications: (1) DAN, (2) SAR, (3) CIP, (4) MAR, (5) ENR, (6) DIF, (7) OXO, and (8) FLU (100 µg/mL of each quinolone).

because higher voltages increased the electric current intensity up to values higher than 50 µA and no significant improvement in analysis time and resolution were observed. Finally, the temperature of the capillary was set to 25 °C because lower temperatures worsened the resolution among MAR, ENR, and DIF, and higher temperatures worsened the resolution among DAN, SAR, and CIP. The addition of organic modifiers—such as acetonitrile or methanol—did not improve the resolution between the quinolones; therefore, they were not employed. Figure 2 shows an electropherogram using UV–visible detection at optimum separation conditions.

CE–ESI–MS/(MS) optimization. First, it was necessary to select the organic solvent present in the sheath liquid. Mixtures of acetonitrile, methanol, ethanol, and 2-propanol with water were tested, all of them at 1:1 v/v and containing 1% formic acid. The best results in terms of intensity of MS signals for the studied quinolones were obtained using a mixture 2-propanol/water. Under these conditions, and with the aim to detect the significant factors related to the electrospray conditions that influence the analytical response, a half-fraction factorial screening design 2^{6-1} in two blocks plus three central points per block (38 runs) was carried out. The selected response was the signal-to-noise ratio of DAN as this is the quinolone with the lowest MRL. The ranges for the different factors studied in this design were as follows: nebulizer pressure (2–10 psi), dry gas flow (2–10 L/min), dry gas temperature (50–300 °C), sheath liquid flow rate (2–8 µL/min), percentage of 2-propanol in the sheath liquid (20–80%) and percentage of formic acid in the sheath liquid (0.2–1.5%). The studied intervals for these parameters were imposed by different constraints such as stability of the spray or instrumental limitations. Although direct infusion has been used in the study of the variables influencing the electrospray using a screening design,²⁵ in the present work, we have used for the first time a more realistic approach that implies the study of their effects under CE separation conditions. The study and the conclusions from the design are in fact obtained at the same instrumental conditions that will be applied in further experiments using CE–MS to establish the analytical method. Moreover, in order to obtain useful results, it is necessary to use the same response in the screening design to select the significant factors and in the response surface design to optimize these variables. From the screening design, a Pareto Chart (Figure 3) is obtained, in which

neither the percentage of formic acid nor the dry gas temperature was found significant in the studied range for the signal-to-noise ratio of DAN. A possible explanation to understand the nonsignificant effect of the formic acid could be that even when 0.2% formic acid is used, DAN appears totally in its cationic form, so an increase in this value does not improve the signal-to-noise ratio. A similar explanation could be suggested to understand the nonsignificant effect of the dry gas temperature; a complete desolvation was obtained even at 50 °C. For further experiments, these values were fixed close to the central point of the experimental design that is 1% formic acid and 150 °C as dry gas temperature, considering that extreme values of the selected experimental region must be avoided because slight deviations of the operating conditions could affect the robustness of the method. Other interesting conclusions were the signs (positive or negative) of the main effects on the response. As we can see in Figure 3, surprisingly, an increase of the 2-propanol percentage produced a negative effect in the response; however, the opposite effect was expected since a higher content of 2-propanol should cause a better desolvation process. The rest of the main factors had an expected sign, for example, the increase in the sheath liquid flow rate produced a lower response maybe due to an increase of the dilution of the DAN into the spray. Nebulizer pressure and dry gas flow had a positive effect on the response. These facts can be explained by considering that higher nebulizer pressures produce smaller droplets in the spray, and, therefore, the desolvation process takes place more easily; a similar result can be observed if the dry gas flow is increased. It is most important to note that the interactions between percentage of 2-propanol–dry gas flow and nebulizer pressure–dry gas flow were found significant, showing the convenience of utilizing the experimental design methodology in the multivariate optimization process. Figure 4 shows these interactions among the significant effects. In Figure 4a it can be seen that when the percentage of 2-propanol in the sheath liquid is low, a higher dry gas flow is necessary to obtain better signal-to-noise ratios. This behavior could be explained considering that it is more difficult to evaporate water than 2-propanol; therefore, a higher dry gas flow is necessary to achieve a complete desolvation of DAN molecules. Figure 4b shows that the best results in terms of signal-to-noise ratios are obtained when high nebulizer pressure and dry gas flow are applied. In this situation, smaller droplets in the spray are obtained, as a consequence of the high nebulizer pressure, and a complete desolvation is achieved, due to the high dry gas flow. The limitation is imposed by the stability of the spray, because if the nebulizer pressure and the dry gas flow are too high, the capillary tip can dry off, especially when the percentage of 2-propanol is high as well, and it would not be possible to close the electric circuit.

The next step was the optimization of the significant factors once identified. This task was carried out by means of a Doehlert design³³ plus three central points (23 runs). This kind of response surface design is scarcely used in analytical chemistry^{34–36} in spite of advantages such as its high efficiency compared with other

(33) Doehlert, D. H. *Appl. Stat.* **1970**, *19*, 231.

(34) Nechar, M.; Molina-Molina, M. F.; Cuadros-Rodríguez, L.; Bosque-Sendra, J. M. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *316*, 185.

(35) García-Campaña, A. M.; Cuadros-Rodríguez, L.; Lupiáñez-González, A.; Alés-Barrero, F.; Román-Ceba, M. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *348*, 237.

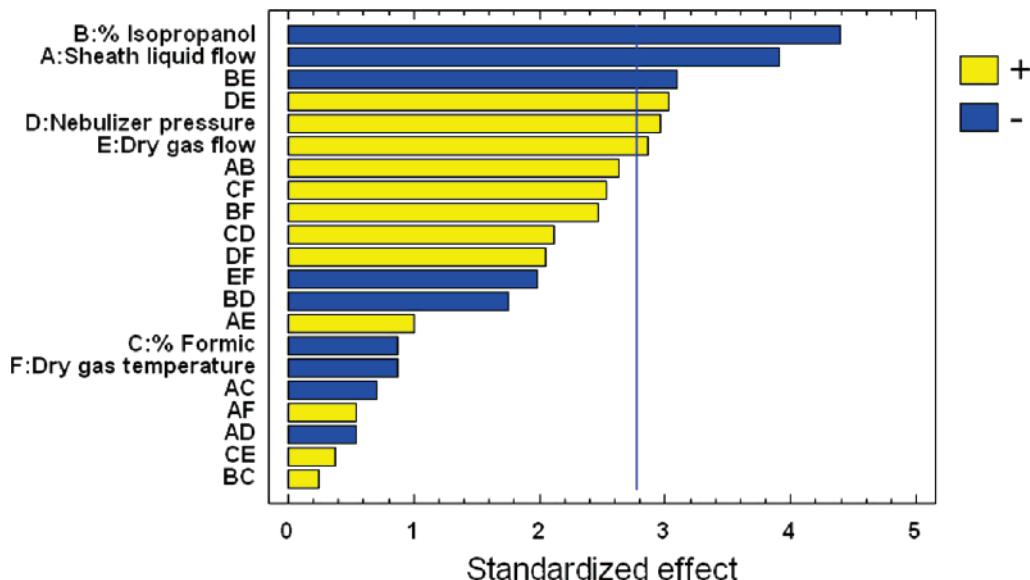


Figure 3. Pareto chart showing the significant effects on the DAN signal-to-noise ratio from the screening design in the study of important variables for ESI conditions. (+) Positive effects on the response; (−) negative effects on the response. Black line shows the limit of decision to consider the significance of the factors (based on the standardized effect = estimated effect/standard error, P -value = 0.05 at 95% of confidence level).

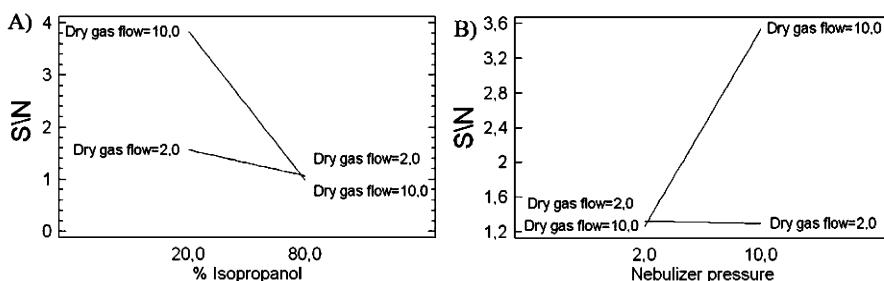


Figure 4. Interaction plots for (A) % 2-propanol–dry gas flow and (B) nebulizer pressure–dry gas flow.

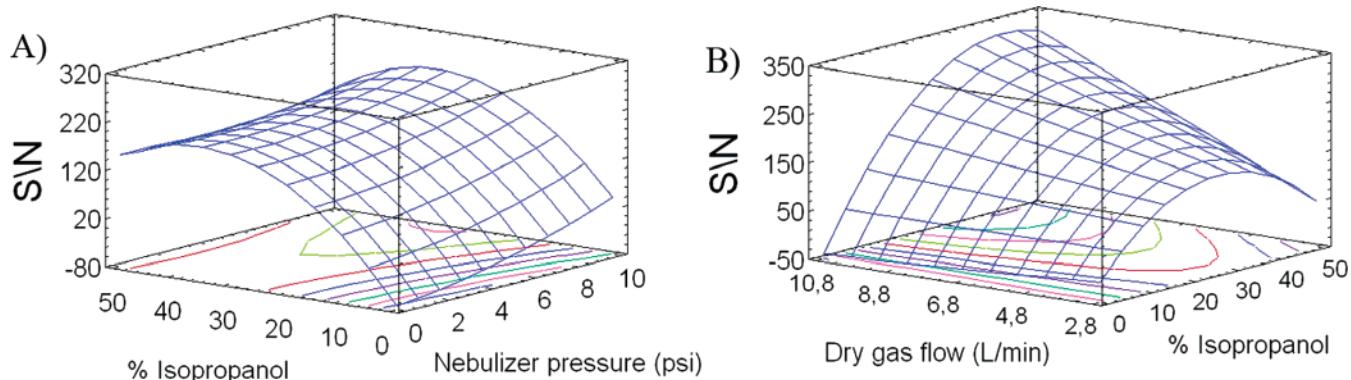


Figure 5. Estimated response surfaces obtained in the multioptimization procedure using Doehlert design. (A) % 2-propanol–nebulizer pressure and (B) dry gas flow–% 2-propanol.

designs like Box-Behnken or central composite designs, and because of the possibility to study a higher number of levels for the most significant variables, taking into account the observed effects from the screening design. In our case, the percentage of 2-propanol in the sheath liquid (0–50%) and the sheath liquid flow (2–8 μ L/min) were studied at seven levels, the nebulizer pressure (2–10 psi) at five levels, and the dry gas flow (3–9 L/min) at three. The analytical response to be optimized was the same as

in the previous screening design. The response surfaces corresponding to the significant interactions are shown in Figure 5, as optimum values: a percentage of 2-propanol in the sheath liquid of 50%, nebulizer pressure of 10 psi, sheath liquid flow of 3 μ L/min, and dry gas flow of 6 L/min. The lack of fit P -value for the model was 50% and the determination coefficient (R^2) was 88%, indicating that the predicted model fitted well the experimental data.

Once the spray conditions were established using MS mode, the optimization of the MS/MS mode was carried out. Taking

(36) Ferreira, S. L. C.; dos-Santos, W. N. L.; Quintilla, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. *Talanta* 2004, 63, 1061.

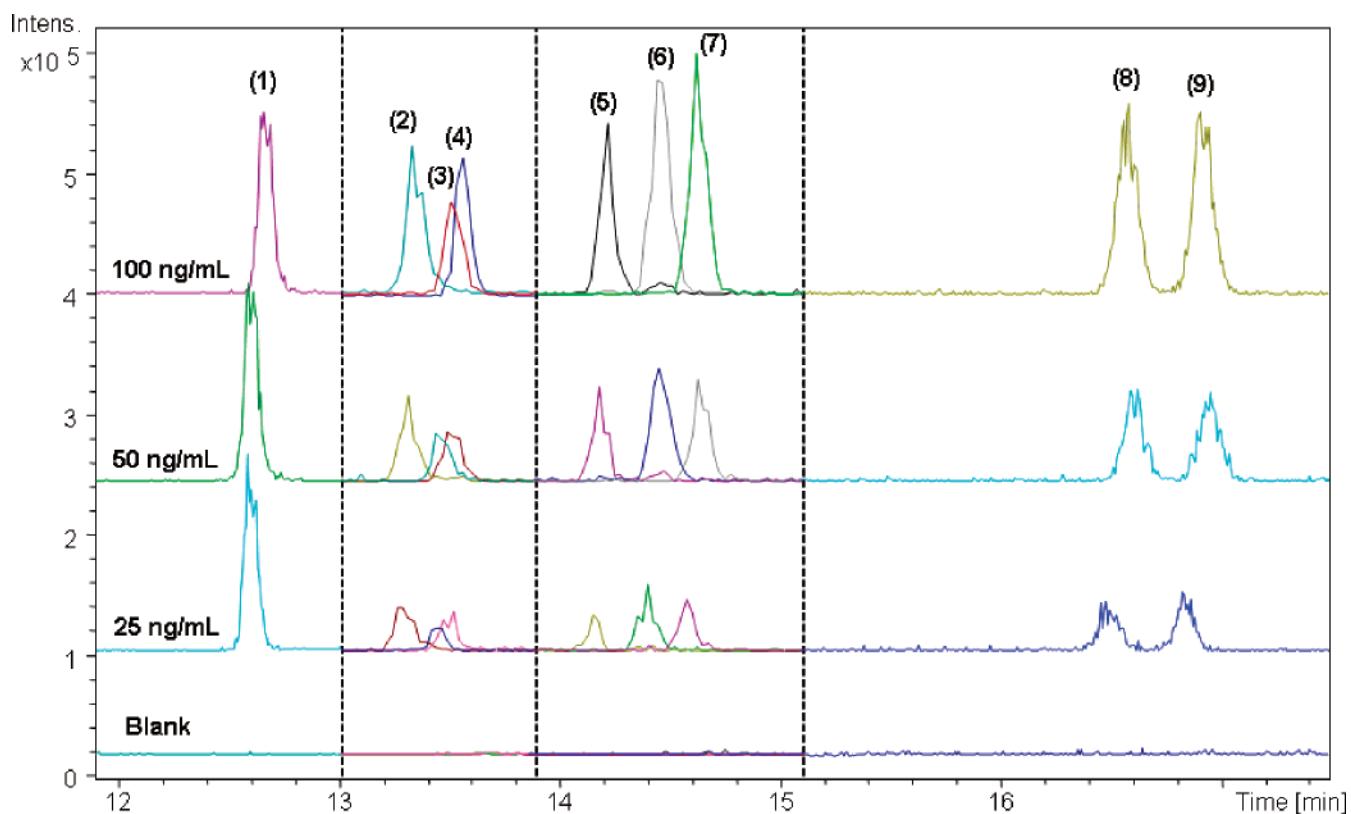


Figure 6. CE-MS/MS electropherograms at optimum conditions obtained after SPE of milk samples spiked at different concentration levels. Peak identifications: (1) LOM ($1\mu\text{g}/\text{mL}$, IS), (2) DAN, (3) SAR, (4) CIP, (5) MAR, (6) ENR, (7) DIF, (8) OXO and (9) FLU.

into account that some peaks could not be well-resolved, the MRM mode was the preferred option. For fragmentation experiments, a cutoff of 27% of the precursor mass, i.e., the minimum m/z of the fragment ion able to be trapped by the analyzer, was set. Quinolones were fragmented using the SmartFrag option that automatically ramps the fragmentation energy from 30 to 200% of the excitation amplitude. The fragmentation amplitude was manually varied and optimized by monitoring the intensities of the fragment ions in order to reach a maximum and also allowing us to see the precursor ion in the trap. With these conditions, the losses of CO_2 and H_2O can be observed for DAN, SAR, CIP, ENR, and DIF. MAR exhibited losses of CH_3CO and H_2O , and OXO and FLU only exhibited the loss of H_2O . Unfortunately, it was not possible to achieve the minimum number of identification points required by the EU⁵ in the case of OXO and FLU; even if MS³ experiments were intended, no additional fragment ions were observed.

Before optimizing the sample treatment procedure, the selection of the IS was carried out. The use of a compound with properties similar to those of the studied analytes can be most useful for quantification purposes in CE-MS.²⁴ LOM was selected as IS because it is a quinolone for human use; therefore, it is not supposed to be present in bovine raw milk samples; its migration time is adequate because it does not increase the analysis time and does not interfere with quinolone or matrix peaks.

Study of Sample Treatment. In order to apply the optimized method in bovine raw milk, it was necessary to develop a sample treatment procedure. Different strategies were adopted to extract quinolones from biological fluids including direct solvent extraction after pH adjustment of the sample and extraction after protein

precipitation. Direct solvent extraction was not applied because a strong emulsification of the milk samples was observed, as reported by Idowu and Peggins.³⁷ These authors proposed a method based on protein precipitation by the addition of acetonitrile and phosphoric acid, offering good recoveries for ENR and CIP; unfortunately this method is not suitable for acidic quinolones, due to the use of dichloromethane in acidic conditions, an extra preconcentration not being achieved. The utilization of solid-phase cartridges permits a sensitivity increase, preconcentrating the sample and eliminating matrix interferences. This alternative has proved to be suitable for the determination of quinolones in meat,³⁸ milk,³⁹ eggs,⁴⁰ wastewaters,^{41,42} and biological fluids.⁴³ In this work, a rigorous study was carried out testing three different cartridges: a cationic exchange cartridge (MCX), a polymeric phase cartridge (HLB), and an anionic exchange cartridge (MAX), all from Oasis. The SPE procedures for MAX and HLB cartridges are those described in the sample preparation section. When MCX cartridges were used, the procedure was as follows: preconditioning of the cartridges with 2 mL of MeOH plus 2 mL of water, loading of the sample, washing with 2 mL of 2% formic acid in

(37) Idowu, O. R.; Peggins, J. O. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 143.

(38) Jiménez-Lozano, E.; Roy, D.; Barrón, D.; Barbosa, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 65.

(39) Ho, C.; Sin, D. W. M.; Tang, H. P. O.; Chung, L. P. K.; Siu, S. M. P. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1061*, 123.

(40) Samanidou, V. F.; Christodoulou, E. A.; Papadoyannis, I. N. *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 555.

(41) Golet, E. M.; Alder, A. C.; Hartmann, A.; Ternes, T. A.; Giger, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3632.

(42) Ferdig, M.; Kaleta, A.; Vo, T. D. T.; Buchberger, W. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1047*, 305.

(43) Hernández, M.; Borrull, F.; Calull, M. *J. Chromatogr., B* **2000**, *742*, 255.

Table 2. Statistics and Performance Characteristics of the Proposed Method^a

| analyte | linearity range (ng/mL) | intercept | slope (mL/ng) | <i>r</i> ² | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) | MRL (ng/mL) |
|---------|-------------------------|-----------|---------------|-----------------------|-------------|-------------|------------------|
| DAN | 18–400 | 0.078 | 0.0086 | 0.992 | 4 | 18 | 30 |
| SAR | 24–400 | 0.043 | 0.0072 | 0.991 | 6 | 24 | ne ^b |
| CIP | 17–400 | 0.158 | 0.0079 | 0.989 | 5 | 17 | 100 ^c |
| MAR | 17–400 | 0.052 | 0.0088 | 0.991 | 4 | 17 | 75 |
| ENR | 18–400 | 0.035 | 0.0160 | 0.990 | 5 | 18 | 100 ^c |
| DIF | 17–400 | 0.018 | 0.0135 | 0.990 | 5 | 17 | ne |
| OXO | 19–400 | 0.068 | 0.0137 | 0.992 | 5 | 19 | ne |
| FLU | 18–400 | 0.070 | 0.0134 | 0.992 | 5 | 18 | 50 |

^a In all cases, the lack-of-fit *P*-values were higher than 5%. Concentration (ng/mL) versus relative peak areas. ^b ne, not established in milk samples. ^c MRL (ENR + CIP) = 100 ng/mL.

water, and a final elution with 3 mL of 2% NH₃ solution in MeOH. The other steps were similar to those described for the other cartridges.

It was necessary to control the pH of the sample in order to achieve an optimum retention of the quinolones. With MCX cartridges, it was possible to retain quinolones from an acidic pH to pH 7, and with HLB cartridges, the optimum retention was obtained at pH 7 observing elution of quinolones at acidic and basic pH values. In the case of MAX, the retention of all quinolones was complete just above pH 9; at pH 7, it would be possible to retain all quinolones except CIP. These results could explain the low recovery obtained for this analyte with this type of cartridge.³⁸ Considering that the pH of milk is between 6 and 7, it would be possible to apply milk samples directly into the cartridge without the need of controlling the pH in the case of MCX and HLB cartridges. If MAX cartridges are used, however, it is necessary to add 2% NH₃ solution to the milk sample. After sample centrifugation at 13 000 rpm for 10 min and fat elimination, the aqueous portion was loaded in the different cartridges using the procedures described in the Experimental Section. No peaks were observed when MCX cartridges were used, perhaps due to the complexation of quinolones with proteins. Attempts to eliminate proteins by precipitation with strong acids in organic solvents did not provide good results; therefore, these cartridges were not used further. In the case of HLB cartridges, good peak shapes were obtained but the recoveries were ~50% for all quinolones, maybe because a previous cleanup is necessary in order to eliminate the remaining fat and proteins. When MAX cartridges were used, the recoveries were higher than 90% for all quinolones, but quite bad peak shapes were obtained because the extracts were highly conductive and stacking was not produced. From these facts, we suggested that a step where only the neutral and zwitterionic substances were retained might solve this problem. For these reasons, a two-step SPE procedure was established: in the first one, MAX cartridges are used to eliminate proteins and the remaining fat by means a washing step using acetonitrile with 2% NH₃ solution, and the cleaner extracts obtained are used later for a second step using HLB cartridges to eliminate salts. This procedure showed good results in terms of recoveries and peak shapes, and a preconcentration factor of 8 was achieved; therefore, it was adopted for the validation of the optimized method in bovine raw milk samples. Total ion electropherograms of bovine raw milk samples spiked at different concentration levels are shown in Figure 6.

Table 3. Study of the Procedure Precision of the Proposed Method.

| n | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU | Intraday RSD (%) |
|----|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------------------|
| | | | | | | | | | (min) |
| 6 | 50 ng/mL | 5 | 12 | 11 | 14 | 8 | 11 | 9 | 10 |
| | 100 ng/mL | 8 | 8 | 9 | 9 | 6 | 7 | 9 | 8 |
| | 200 ng/mL | 6 | 14 | 11 | 6 | 10 | 6 | 5 | 7 |
| 18 | mig time (min) | 13.1 | 13.3 | 13.3 | 13.9 | 14.2 | 14.3 | 16.2 | 16.5 |
| | RSD (%) | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.7 |
| 18 | Interday RSD (%) | | | | | | | | |
| | 50 ng/mL | 12 | 14 | 16 | 15 | 12 | 15 | 15 | 12 |
| | 100 ng/mL | 18 | 16 | 18 | 12 | 10 | 9 | 14 | 12 |
| | 200 ng/mL | 17 | 15 | 10 | 17 | 12 | 16 | 13 | 12 |
| 54 | mig time (min) | 13.4 | 13.6 | 13.7 | 14.3 | 14.6 | 14.8 | 16.9 | 17.2 |
| | RSD (%) | 2.2 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 2.6 | 2.7 | 3.4 | 3.5 |

Validation of the Method. The whole analytical method was validated in terms of linearity, limits of detection (LOD), limits of quantification (LOQ), repeatability, intermediate precision, and trueness, by means of recovery studies. Calibration curves for the quinolones with CE–MS/MS were obtained using clean bovine raw milk samples spiked before SPE treatment. The linearity of the response was established from five calibration levels corresponding to 25, 50, 100, 200, and 400 ng/mL, intending to establish the MRLs in the middle of the linear calibration range. In all cases, 1 μ g/mL LOM was added as IS. Two replicates were prepared at each concentration level, and each one was injected in triplicate. Calibration curves were established by considering the relative peak areas (ratio analyte peak vs IS peak). Although a previous calibration curve using standard solutions showed that the MS response was linear at least 2 orders of magnitude (i.e., from 100 ng/mL to 10 μ g/mL), the studied working range was considered appropriate since real milk samples with higher contents only occur rarely. A comparison between the calibration curve with standard solutions in 1 N NH₃ solution and the matrix calibration curve with spiked samples was performed using a Student *t*-test with a confidence level of 95%, showing that no significant differences exist between the slopes and intercept, so the matrix does not produce systematic errors for some analytes, making it possible to use directly the standard calibration curve for the quantification of DAN, SAR, MAR, and DIF in bovine milk samples, without significant errors. For the other quinolones, significant differences were found, so a matrix calibration curve

Table 4. Recovery for Each Quinolone at Different Spiked Levels in Bovine Raw Milk Samples^a

| <i>n</i> = 6 | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|--------------|---------|--------|---------|----------|---------|----------|----------|---------|
| 50 ng/mL | 91 (9) | 85 (9) | 81 (4) | 92 (9) | 88 (5) | 99 (11) | 101 (9) | 99 (6) |
| 100 ng/mL | 87 (11) | 87 (9) | 81 (10) | 93 (13) | 88 (11) | 94 (8) | 99 (10) | 99 (8) |
| 200 ng/mL | 102 (5) | 99 (7) | 91 (5) | 105 (17) | 101 (9) | 107 (16) | 110 (12) | 106 (8) |

^a Mean recovery (RSD).

with spiked and treated samples would be necessary in order to take into account the matrix effect or the losses due to the sample treatment.

The LOD was considered as the minimum analyte concentration yielding an S/N ratio equal to three. The LOQ was adopted as the lowest analyte concentration yielding a signal 10 times greater than the noise. To evaluate the noise, a blank sample was treated with the developed SPE procedure and no matrix peaks were found comigrating with the analytes. It is important to notice that the obtained LOQs are below the MRLs for all quinolones. The statistic parameters calculated by least-squares regression and the performance characteristics are presented in Table 2.

The precision of the whole method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was assessed on the same day by means of repetitive application of the SPE procedure to two samples (experimental replicates) at each concentration level (50, 100, and 200 ng/mL), and each one was injected in triplicate (instrumental replicates). Intermediate precision was assessed for three consecutive days with a similar procedure for repeatability studies. The results, expressed as relative standard deviation (RSD) of relative peak areas and migration times, are given in Table 3. As can be observed, acceptable precision was obtained in all cases.

In order to test the efficiency of the sample treatment, recovery studies at three concentration levels (50, 100, and 200 ng/mL) were carried out. Two replicates were prepared at each concentration level and each one was injected in triplicate. Absolute recoveries were calculated by comparing relative peak areas of milk samples spiked before the SPE procedure with relative peak areas of milk samples spiked after the SPE procedure. Recoveries higher than 80% were obtained in all cases with acceptable RSD. The results are shown in Table 4.

CONCLUSION

A sensitive and specific CE–MS/MS method is described for the determination of eight quinolones for veterinary use in bovine

raw milk samples below the MLRs as legislated by the EU. The proposed method eliminates the need to separate quantification and confirmation procedures as required by most published methods for quinolones; moreover, it presents the advantages of the application of CE as separation technique such as simplicity, low cost, and analysis time (up to three samples per hour can be analyzed) combined with the characteristics inherent to MS detection. The detailed study carried out to select and optimize the significant variables that affect the electrospray ionization by means of experimental designs appears to be a suitable alternative to the traditional univariate optimization. Using this strategy, it is possible to achieve a most efficient ionization in order to obtain limits of detection below the established MLRs. The utilization of SPE in the sample treatment without any doubt proves to be a valuable alternative for liquid–liquid extraction procedures even without the necessity to precipitate proteins. This sample treatment avoids the use of organic solvents or chlorinated acids, harmful for the environment. The developed method could be satisfactorily applied as a routine procedure to identify and quantify quinolones for veterinary use in laboratories of food quality and safety control, due to its robustness and feasibility, demonstrating the possibilities of CE–MS/MS, scarcely used so far for quantification purposes.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are thankful for the financial support from the National Institute of Agricultural and Food Research and Technology (INIA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Project Ref CAL03-096-C2-1 and 2) and EU Funds. F.J.L. thanks the Junta de Andalucía for a FPI grant.

Received for review June 1, 2006. Accepted August 29, 2006.

AC061006V

**In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem
mass spectrometry for the multiresidue detection of antibiotics in meat by
pressurized liquid extraction**

Francisco J. Lara, Ana M. García-Campaña^{*}, Fermín Alés-Barrero and Juan M. Bosque-Sendra

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuente nueva s/n, E-18071 Granada, Spain

Correspondence: Dr. Ana M. García-Campaña, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, Avd. Fuente nueva s/n, E-18071 Granada, Spain. e-mail: amgarcia@ugr.es Fax: +0034 958 249510.

Abbreviations: **AC**, analyte concentrator; **DAN**, Danofloxacin **CIP**, Ciprofloxacin; **DIF**, Difloxacin; **ENR**, Enrofloxacin; **DIF**, Difloxacin; **FLU**, Flumequine; **LOM**, Lomefloxacin; **OXO**, Oxolinic acid; **SAR**, Sarafloxacin.

Keywords: Capillary electrophoresis / In-line SPE / Mass spectrometry / Quinolones / Meat.

Electrophoresis (in press)

Abstract

We have developed and validated a capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) method using an in-line solid-phase extraction (SPE) device (analyte concentrator, AC) to determine eight quinolones of veterinary use whose maximum residue levels in animal edible tissues are established by the EU Council Regulation 2377/90, i.e., danofloxacin, sarafloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, oxolinic acid and flumequine. Different parameters affecting the AC performance, such as its design (in this case frit-free), the kind of sorbent (Oasis® MCX), sample pH, volume and composition of the elution plug and injection time were studied. The method was validated using standard solutions obtaining limits of detection between 17 - 59 ng/L. Finally, a pressurized liquid extraction (PLE) method was developed to determine these antibiotics in chicken muscle samples. The whole analytical method was validated in terms of linearity ($r^2 \geq 0.992$), recoveries (63-112%), repeatability and intermediate precision (RSD $\leq 20\%$), limits of detection (40-140 ng/kg) and quantification (130-470 ng/kg), showing the usefulness of the combination of in-line SPE-CE-MS/MS with PLE for the identification and simultaneous quantification of eight regulated quinolone antibiotics in chicken muscle at very low concentration levels.

1 Introduction

In-line chromatographic preconcentration mechanisms [1], based on the use of an analyte concentrator (AC) inserted near the inlet of the separation capillary, can solve one of the main disadvantages of capillary electrophoresis (CE), i.e., its poor concentration sensitivity, in a higher extension than electrophoresis preconcentration mechanisms [2]. Despite of their higher preconcentration capacity, since its introduction in 1991 by Guzman et al. [3], their application has been limited due to several common problems, such as current disruptions in the electrophoretic separations and band broadening effect. To avoid these problems, different designs for the construction of an AC have been developed; such as open tubular capillaries, monolithic microcartridges, impregnated membranes and packed beds. Packed beds can be prepared quite straightforwardly in a short time by unskilled operators. In this case, solid phase extraction (SPE) material is generally retained by means of two frits to prevent solid particles from entering and blocking the CE capillary but the use of these frits is unadvisable because they can cause a disturbance of the electroosmotic flow (EOF) and in some cases, bubble formation leading to band broadening, current disruptions and irreproducibility of the migration times. To solve these problems, in this paper we have constructed an AC by applying a scarcely used approach in spite of its simplicity and usefulness [4,5,6] which avoids the use of frits using particles with higher diameters than the internal diameter of the capillary.

Two types of applications have been reported using AC: characterization of metabolite and biopolymer mixtures [7,8,9,10,11] and determination of small molecules, such as hypoglycemic drugs [12], oxprenolol [13], verapamil [14], doxepin [15], terbutaline [16], ceftiofur [2], chlorophenols [17] and 3-nitrotyrosine [6]. Quantification was just attempted in case of small molecules and it was limited to only one or two compounds, using in all cases UV-Vis detection. In most cases, a rigorous validation of the proposed method in real samples has not been carried out.

Strategies for in-capillary sample preconcentration and clean up based on SPE coupled with CE result extremely interesting in the field of food safety and quality control. Specifically, the determination of antibiotic residues in animal-edible tissues at very low concentration levels has become into public concern due to the transfer of antibiotic-resistance bacteria to man. It is at very low concentration level when the antibiotic does not destroy the bacteria completely and they become resistance to the drug. This fact

makes useless pharmaceuticals that some years ago could be very effective for the treatment of certain infections. This is the case of first-generation quinolones, such as nalidixic acid or pipemidic acid which were satisfactorily used for the treatment of urinary infections but nowadays they had lost their activity against bacteria and they have to be replaced by a new generation of quinolones, the fluoroquinolones. The public concern arises because the pharmaceutical companies have every day more difficulties to find new pharmacologically-active compounds. This fact has promoted preventive measurements by some governments in order to avoid that the pre-antibiotic era recurs. The European Union has set maximum residue limits (MRLs) of antibiotics in foodstuffs of animal origin by means of the directive 2377/90/EEC [18]. Also, in order to achieve unambiguous identification of the antibiotic residues it is necessary to reach the minimum number of identification points established in the 2002/657/EC European decision [19]. In this sense, European Governments are dedicating huge quantities of money, as advertising campaigns and scientific projects, in order to avoid the misuse of antibiotics in both animals and humans.

In this article we propose a useful alternative to identify and quantify simultaneously very low quantities (at the ng/kg level) of antibiotic residues in chicken meat by pressurized liquid extraction (PLE) and a combination of in-line SPE with CE-tandem mass spectrometry (SPE-CE-MS/MS). To our knowledge, this is the first application of in-line SPE-CE-MS/MS for a simultaneous quantification and identification of such a high number of analytes in a complex matrix, showing a comprehensive characterization of the AC efficiency and a rigorous validation in a real sample.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

All chemicals and solvents were of analytical grade. Dichloromethane, n-hexane, methanol, ammonium hydroxide, phosphoric acid and sodium hydroxide were supplied by Panreac (Madrid, Spain). Isopropanol, formic acid, acetic acid and ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstad, Germany). Danofloxacin (DAN), sarafloxacin (SAR) and difloxacin (DIF) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Flumequine (FLU), lomefloxacin (LOM) and quartz sand (-50 +70 mesh) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin

(ENR) and oxolinic acid (OXO) were acquired from Fluka (Buchs, Switzerland). Marbofloxacin (MAR) was kindly supplied by Vetoquinol S.A. (Madrid, Spain). Pelletized diatomaceous earth was obtained from Dionex (California, USA). Distilled water ($18.2\text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) was deionized by using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). A mixture of $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ of each quinolone was prepared in MeCN:H₂O (1:1) (v/v) and stored at 4°C in an amber-colored bottle. The working solutions were made by dilution with water or ammonium acetate buffers. Extraction cartridges containing Oasis HLB (60 mg, 3 cc) (Waters, Milford, MA, USA) were used for sample treatment and a mixed-mode cation exchange sorbent, Oasis MCX (Waters, Milford, MA, USA), with an average particle size of 60 μm and a pore size of 80Å was used for the construction of the AC.

2.2 Instrumentation

CE experiments were carried out with a HP^{3D} CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separation was carried out in a bare-fused silica capillary 130 cm total length × 50 μm inner diameter (360 μm outer diameter) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Before injections the capillary was conditioned as follows: 1N NH₃ for 2 min at 7 bar, H₂O for 1 min at 7 bar and 50 mM ammonium acetate (without pH adjustment for standard solutions and at pH 5 for chicken samples) for 1 min at 7 bar. Injections were made at the anodic end using a pressure of 7 bar for 15 min (ca. 135 μL using the Hagen-Poiseuille equation). The sample solvent was 50 mM ammonium acetate for standard solutions and 50 mM ammonium acetate at pH 5 for chicken samples. After the injection, the sample solvent was displaced of the capillary with running buffer by applying 7 bar for 0.5 min. The analytes were eluted by injecting a plug of MeOH:H₂O:NH₃ (60:38:2 v/v/v), using a pressure of 50 mbar for 100s (ca. 2.3 % of the total capillary volume = 60 nL). Before applying the separation voltage, the elution plug was displaced of the AC with running buffer by applying 1 bar for 0.5 min in order to avoid undesirable interactions of the analytes with the retention sorbent. The electrophoretic separation was achieved with a voltage of 25 kV (normal mode) with an initial ramp of 1 min. The running buffer was an aqueous solution of ammonium acetate 50 mM adjusted to pH 9.1 with ammonium hydroxide 5 N. The temperature of the capillary was kept constant at 20°C. In these conditions, the capillary current was about 20 μA, avoiding corona discharge and disruptions of the CE

separations. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing with 1 M NaOH for 10 min at 60 °C, then with water for 5 min, and finally with the background electrolyte solution for 20 min. A pressure of 7 bar was applied. At the beginning of each day, the capillary was pre-washed with a N₂ pressure of 7 bar for 4 min with 1 N NH₃, 3 min with water and 5 min with running buffer. After each run, the capillary was pre-washed at 7 bar for 5 min with MeOH:NH₃ (98:2 v/v) and 3 min with MeOH in order to avoid carry-over between consecutive injections.

2.3 ESI-interface

The Agilent coaxial sheath-liquid sprayer was used for CZE-MS coupling (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The fused-capillary were mounted in a way that the tip just protruded from the surrounding steel needle ca. ¼ of the capillary outer diameter. The sheath liquid consists of isopropanol/water/formic acid (50:49:1 v/v/v) and was delivered at a flow rate of 3 µL/min by a PU-2085 Jasco high pressure pump (Jasco Analítica, Madrid, Spain) equipped with a splitter 1:100. The ESI voltage was set to - 4 kV. Other electrospray parameters at optimum conditions were: nebulizer pressure at 3 psi, dry gas flow at 6 L/min and dry gas temperature at 150°C. When treated chicken muscle samples were injected and in order to avoid the entrance of compounds with low volatility into the mass spectrometer, it was necessary to carry out the sample injection with the nebulizer pressure and the ESI voltage set to zero, and a delay of 0.5 min was introduced after the sample injection before setting the optimum spray gas and ESI voltage. When standard solutions were injected this step was not necessary.

2.4 MS/MS conditions

MS was performed using an Agilent 1100 Series LC/MSD SL mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an ion trap analyzer. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode and scanned at 150-410 *m/z* (target mass = 360 *m/z*, compound stability 100%) at 13000 *m/z* per second. In MS/MS experiments, the trap parameters were selected in ion charge control mode using a target of 50000, maximum accumulation time of 100 ms and 2 averages per experiment. Fragmentation was carried out by means of collision induced dissociation (CID) with the helium present in the trap for 10 ms in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

MS/MS parameters are summarized in Table 1. LOM was used as internal standard (IS). No ramp was applied for the fragmentation energy. In a previous article [20] it was not possible to achieve the minimum number of identification points for FLU and OXO due to the low fragmentation. A significant improvement in the number of identification points can be achieved if the MS/MS optimization is carried out without ramp for the fragmentation energy.

2.5 Construction of the analyte concentrator

The first step in the construction of the AC was to cut ca. 2.5 mm of bare-fused silica capillary of 150 μm of inner diameter and 360 μm of outer diameter. A proper cut in both sides of this capillary is essential to obtain an optimum performance of the AC. The entire process of fabricating the AC was monitored under a microscope (Euromex CSL, Holland). This small piece of capillary was connected to a vacuum pump and the sorbent (MCX particles, 60 μm) were carefully loaded. When the AC was successfully loaded, it was introduced until the half of a 1.5 cm piece of 0.3 mm i.d. PTFE tube (Omnifit, Cambridge, England). Then, a 9.5 cm piece of bare-fused silica capillary (50 μm I.D. \times 360 μm O.D.) was coupled to one side of the PTFE tube and finally, the column was extended to full length connecting another piece of bare-fused silica capillary (50 μm I.D. \times 360 μm O.D.) in the other side of the PTFE tube. The constructed AC was fit in the CE cartridge and checked for abnormal flow restriction by applying a pressure of 7 bar to a vial containing water. The constructed AC is shown in Figure 1.

2.6 Sample treatment

Chicken muscle was bought in a local supermarket. Samples were ground in a kitchen blender (Taurus, Barcelona, Spain), and stored at -18 °C until analysis. A portion of 1 g of spiked sample was mixed with 1.5 g of pelletized diatomaceous earth in a mortar with a pestle until the mixture became homogeneous in order to dehydrate and disperse the sample, and to facilitate solvent penetration into sample matrixes [21]. The mixture was loaded into a 10 mL cell with a cellulose filter at the bottom. The dead volume was filled with quartz sand in order to reduce the consumption of organic solvent. PLE was performed in a ASE 100 from Dionex (Sunnyvale, CA, USA) using the following optimized conditions: extraction solvent, dichloromethane 20 mL; extraction pressure,

never exceeded 1700 psi; pre-heating time, 5 min; static extraction time, 0 min; extraction temperature, 50 °C; number of static cycles, 1; purge time, 60 s; flush volume, 60 %. Once the PLE was carried out, the dichloromethane extracts were treated using a procedure similar to that described by Jiménez-Lozano et al. [22]. The organic phase was extracted twice with 5 mL of 1N NaOH. The aqueous phase was separated from the dichloromethane by centrifugation (5 min×2500 rpm) and carefully transferred to a clean centrifuge tube using a Pasteur pipette. Then the pH was adjusted to pH 3 with 3M H₃PO₄. The extract was defatted by adding 10 mL of N-hexane. After centrifugation (5 min×2000 rpm), the aqueous phase was passed through a HLB cartridge which was previously activated with 2 mL of MeOH and 2 mL of 50 mM phosphate buffer at pH 3. After sample percolation, the cartridge was washed with 2 mL of H₂O. Finally, the cartridge was vacuum dried and the elution was carried out with 3 mL of MeOH. The eluent was collected in a 4 mL vial and concentrated under a gentle nitrogen current at 40°C until dryness. The extract was reconstituted in 1 mL of 50 mM ammonium acetate buffer at pH 5 containing 5 µg/L of LOM as IS. Finally the extract was filtered through a 0.22 µm Acrodisc GHP membrane (Pall Corporation, MI, USA) and injected into the CE system. Between consecutive PLE procedures, a rinse of the complete system was carried out in order to overcome any extract carry-over.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1 In-line SPE-CE set-up

The first step consisted of the selection of the extraction sorbent. C18 derivatized silica particles are the preferred material to construct the AC due to their wide application range. However they present some disadvantages related with their limited use at alkaline pH, which is frequently necessary for conditioning the electrophoretic capillary and with the requirement of high organic solvent content in the elution plug which could compromise the electrophoretic performance. On the other hand, applications of ion-exchange SPE coupled with CE are relatively uncommon [23] although in this approach the use of organic solvents for the elution step could be avoided, but there are other limitations because this alternative implies to fill-in the separation capillary with an electrophoretic buffer with a low ion-exchange selectivity coefficient to prevent removal of the adsorbed analytes from the AC. The use of a mixed-mode sorbent, such

as MCX from Oasis®, combining reversed-phase and ion-exchange mechanisms could avoid the limitations previously mentioned. Also, its high retention capacity is a very interesting characteristic for its use as a sorbent in an AC because it is possible to reduce the size of the SPE bed with similar retention capacity. A normal length for a C18-AC is about 10 mm and with MCX, just 2.5 mm is enough. This is advantageous since the impediment to the normal EOF is going to be lower and the CE performance will be less affected. Moreover, when the elution step takes place, the analytes will be focused in a narrower band which reduces the lost in efficiency usually observed with these devices.

Another important property is that this MCX-AC can be used in a wide pH range, from 0 to 14, which makes easier the conditioning of the capillary with alkaline solutions without removing the AC. But the main advantage of the MCX sorbent maybe that it is fully compatible with the optimized CE separation of quinolones since the elution step requires an alkaline medium and the electrophoretic buffer has also an alkaline pH. However with this buffer it is not possible to elute the analytes since they remain retained by means of apolar interactions. Therefore, for an efficient elution of the compounds, a combination of an alkaline pH and MeOH is necessary, using in this case, a plug of MeOH:H₂O:NH₃ (60:38:2 v/v/v). This plug has lower conductivity than the running buffer, so when a positive electric field is applied, the analytes in their anionic forms due to the alkaline pH are focused in the rear boundary of the elution plug with the incoming running buffer. Then, they are mixed with the running buffer and they can be separated without any losing of efficiency. At optimum conditions, efficiencies between 81000 and 165000 plates were obtained, which are similar to the values obtained without AC. Finally, it is important to mention that MCX sorbent is available with an average particle size of 60 µm, therefore if we use capillaries with I.D. of 50 µm it is possible to avoid the use of frits to retain the sorbent.

3.2 Electrophoretic separation

Although the electrophoretic conditions for the separation of these eight quinolones were already studied in a previously article [20], it was necessary to modify them when an AC is mounted in a CE capillary. A serious problem when using an AC is the bubble formation due to the Joule heating effect. To avoid that, the buffer concentration was reduced from 70 mM to 50 mM, the temperature was decreased from 25 to 20 °C, the

capillary length was increased from 96 cm to 130 cm and it was also necessary to reduce the nebulizer pressure from 10 to 3 psi in order to maintain a good resolution among the different compounds. Under these conditions, a stable current about 20 μ A was achieved.

3.3 Optimization of the in-line SPE-CE-MS/MS method

Several parameters must be optimized in an SPE-CE method in order to achieve the optimum performance: injected solution pH, injection time, elution plug composition and elution plug volume. Injected solution pH is a very important parameter since it can greatly affects the retention of the analytes in the AC when ionic interactions are established. We studied the injected solution pH for standard and sample solutions at four pH values: 3, 5, 7 and 9, using buffers containing formic acid, acetic acid and ammonia. When standard solutions containing 10 μ g/L of each analyte were injected at 1 bar for 2 min., the highest area values were obtained with 50 mM of ammonium acetate. We tried to eliminate the ammonium acetate of the sample solvent, using just Milli-Q water, but the peak area decreased. In the case of chicken muscle samples, the best results were obtained with 50 mM acetic acid/ammonium acetate at pH 5. This difference could be attributed to the matrix effect.

In the next step, the injection time was optimized using standard solutions containing 10 μ g/L of each quinolone injected at 7 bar from 1 to 30 min. Saturation was not observed even when the sample was injected for 30 min., which indicates the high retention capacity of the MCX sorbent even when a reduced quantity is used for the construction of the AC. For further experiments, injection time of 15 min was selected as a compromise between sensitivity and analysis time.

The above-studied variables were optimized using a elution plug of MeOH:H₂O:NH₃ (50:48:2 v/v/v), injected at 50 mbar for 75 s. But consecutive analysis, without sample injection and post-conditioning steps, showed an incomplete elution of the retained analytes. In order to improve this elution, we kept constant the percentage of NH₃ and the percentage of MeOH was modified from 0 to 80 %. The best results in terms of peak area were obtained with a MeOH percentage of 60 % which is not a very high content of organic solvent, permitting the use of a larger elution plug without perturbation of the current stability. Finally, the optimization of the elution plug length was carried out by modifying the injection time from 12 to 125 s. The peak area increased with the elution

plug until 100 s; above this value they remained constant. An electropherogram of a standard solution with 50 ng/L of each quinolone at optimum conditions is showed in Figure 2.

3.4 Validation of the in-line SPE-CE-MS/MS method

A detailed validation of the method was carried out. The statistic parameters calculated by least-squares regression and the performance characteristics are presented in Table 2. The calibration curves were established from six concentration levels corresponding to 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 µg/L; each level was injected by triplicate. The correlation coefficients showed a satisfactory linearity between peaks areas and quinolone concentration at least two orders of magnitude. The limit of detection (LOD) was considered as the minimum analyte concentration yielding an S/N ratio equal to three. The limit of quantification (LOQ) was adopted as the lowest analyte concentration yielding a signal 10 times greater than the noise. It was possible to determine concentration levels as low as parts per trillion, showing the great improvement in sensitivity achieved with this AC.

The repeatability of the method was also studied by means of repetitive injections ($n=3$) of standard solutions of each quinolone at three concentration levels: 0.1, 1.0 and 10.0 µg/L. Each level was injected by triplicate and the obtained relative standard deviations (RSD) of the peak areas, ranging from 1.9 to 12.9 %, were similar to those obtained from a conventional CE-MS/MS method without AC, which shows the use of the AC does not introduce important contributions to the random error. The inter-day reproducibility was also evaluated at the same above mentioned concentration levels. Each level was injected by triplicate for three consecutive days ($n=9$) and using the same AC. The obtained RSD values were ranged from 6.9 to 15.5 %, which are also acceptable. In this paper, we have estimated also the reproducibility among different ACs, which is not often reported in articles dealing with this preconcentration device. The evaluation of this parameter can be very useful to characterize the method because the AC life-time is not usually very long; in our case no more than 20-30 injections can be done. This study was carried out by using three different ACs for three consecutive days ($n=9$) at the same concentration levels above mentioned. Although the RSD values for the peak area were slightly higher, from 4.2 to 17.7 %, they were also adequate.

3.5 Optimization of the sample treatment

PLE, also called accelerated solvent extraction (ASE) allows the use of solvents above their boiling points due to the use of high pressure. This characteristic can improve the recoveries, reducing the organic solvent consumption compared with the most traditional Soxhlet extraction. It has proven to be successful for the extraction of quinolones in several matrixes such as soil [24], eggs [25] and feeds [26], using in all cases, a mixture of acetonitrile and an aqueous acid as extraction solvent, applying always HPLC as analytical technique. In this paper, we have evaluated the use of dichloromethane in PLE to extract quinolone antibiotics in chicken muscle in order to have extracts more CE compatible, considering that this solvent produces very clean extracts using other extraction methodologies [27]. In our case, this is an important requirement in order to obtain successful results in the application of the AC to real samples, otherwise the matrix components could affect the retention of the analytes in MCX beads and therefore the sensitivity would be worse. Moreover, both acidic and zwitterionic quinolones can be extracted with this solvent, for these reasons dichloromethane was selected. Other parameters to be optimized in a PLE extraction are the cell volume, the extraction temperature and the extraction time. To select the cell volume, two different sizes were checked: 34 mL and 10 mL, using an extraction temperature of 75 °C; a static time of 5 min; a number of cycles of 1, a flush volume of 60 % and a purge time 60 s. A portion of 5 g of chicken muscle and 7.5 g of diatomaceous earth were used with the 34 mL extraction cell and just 1 g sample portion and 1.5 g of diatomaceous earth were used in the 10 mL extraction cell. It was observed that if no AC was used and the samples were spiked at relatively high concentrations (100 µg/kg), the recoveries were similar with both cell volumes, but if the AC was used and the samples were spiked at 5 µg/kg, the recoveries obtained with the biggest cell worsened. This difference could be attributed to the different dichloromethane volumes used: if the 34 mL cell is used, the organic solvent consumption is around 60 mL, but if the 10 mL cell is used, the organic solvent consumption is around 20 mL. So, this influences the efficiency of the following extraction with 2×5 mL of 1N NaOH, which is lower in case of 60 mL than in case of just 20 mL. Obviously it would be possible to increase the volume of NaOH used but this option leads to higher volumes, more difficult to handle, so we selected the 10 mL extraction cell. Three different extraction temperatures were tested: 50, 75 and 100 °C,

and also three different static times: 0, 2 y 5 min. Basically the study showed that if higher temperature or longer static times were applied, the peak area decreased maybe because at these conditions the extracts were not so clean due to a co-extraction of matrix components which compete with the analytes in the retention process onto the AC. So finally, 50 °C as extraction temperature and 0 min as static time were selected as optimum conditions.

A new optimization of the sample pH was carried out at four different values: 3, 5, 7 and 9, using the previously mentioned buffers. The highest areas were obtained at pH 5, which is different to the optimum pH value obtained with standard solutions. This fact could be attributed to some interactions of the analytes with the matrix components, which are pH-dependents. Therefore, the extracts were reconstituted in 50 mM acetic acid/ammonium acetate at pH 5.

3.6 Validation of the analytical PLE-SPE-CE-MS/MS method

The whole analytical method was validated in matrix in terms of linearity, LOD, LOQ, repeatability, intermediate precision and trueness by means of recovery studies. Calibration curves for the selected quinolones by applying the PLE-SPE-CE-MS/MS were obtained using clean chicken muscle samples spiked before sample treatment. The linearity of the response was established from four calibration levels corresponding to 0.5, 2, 8 and 20 µg/kg. In all cases, 5 µg/L of LOM was added as IS in the reconstitution step. Two replicates were prepared at each concentration level. Calibration curves were established by considering the relative peak areas (as the ratio analyte peak -to- IS peak). The statistic parameters, calculated by least-squares regression and the performance characteristics are presented in Table 3, obtaining very low LODs and LOQs at the ng/kg levels. Figure 3 shows the electropherograms corresponding to three different concentration levels and Figure 4 shows the electropherograms corresponding to (A) a blank sample (no interference peaks appear), (B) the lowest level of the calibration curve and (C) a blank after injecting a sample spiked at 8 µg/kg showing that the carry-over is negligible.

The precision of the whole method was evaluated in terms of repeatability and intermediate precision. Repeatability was assessed on the same day by means of repetitive application of the sample treatment procedure to three samples (experimental replicates) at each concentration level (0.5, 2 and 8 µg/L). Intermediate precision was

assessed in three consecutive days with a similar procedure for repeatability studies. The results, expressed as RSD of peak areas, were $\leq 19\%$ in all cases which can be considered as acceptable.

In order to test the efficiency of the sample treatment, recovery studies at three concentration levels (0.5, 2 and 8 $\mu\text{g/kg}$) were carried out. Three replicates were prepared at each concentration level. Absolute recoveries were calculated by comparing peak areas of chicken muscle samples spiked before the sample treatment with peak areas of chicken muscle samples spiked after the sample treatment. Recoveries between 63 and 112% were obtained in all cases with acceptable RSD. The results are shown in Table 4.

4 Concluding remarks

This article attempts to establish some guidelines in the development and characterization of an AC and at the same time shows that the in-line coupling of solid-phase extraction (SPE) with capillary electrophoresis (CE) tandem mass spectrometry (MS/MS) can be a very useful methodology for solving current real problems such as the selective and sensitive multiresidue determination and identification of quinolones antibiotics of veterinary use in meat. Moreover, AC could have a promising future in many fields such as doping control, biomarker discovery, environmental analysis or food characterization since it is possible to determine simultaneously very low levels of interesting compounds that otherwise they would not being detected.

Acknowledgements

The authors thank the financial support from the National Institute of Agricultural and Food Research and Technology (Project Ref. CAL03-087-C2-1), the Ministry of Education and Science (Project Ref. AGL2007-64313/ALI) and EU founds (FEDER). FJL thanks the Junta de Andalucía for a FPI grant.

FIGURES

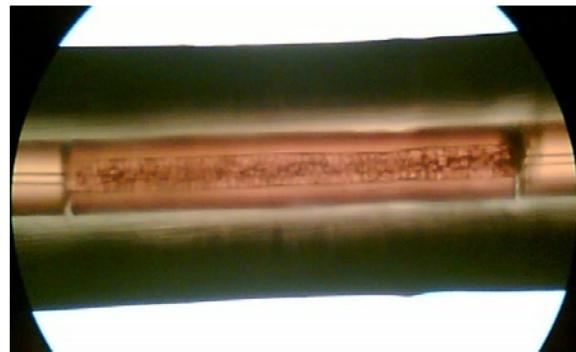


Figure 1. Picture of the AC under 4 \times optic microscope.

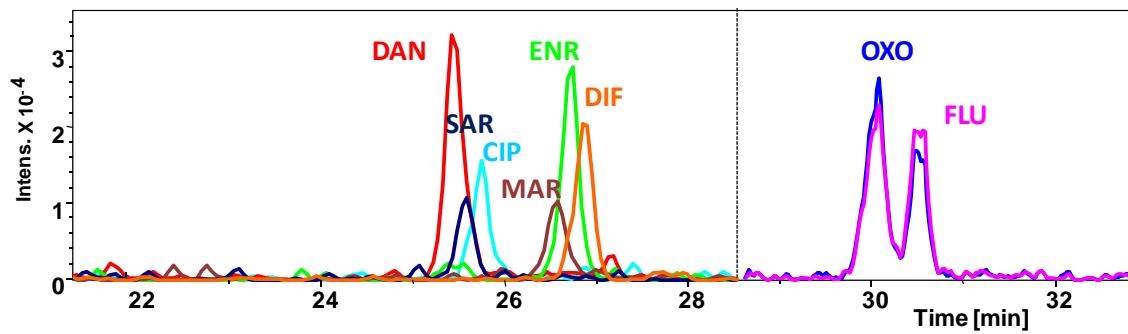


Figure 2. Electropherogram of a standard solution containing 50 $\mu\text{g/L}$ of each quinolone at optimum conditions. Peak identifications: (1) DAN, (2) SAR, (3) CIP, (4) MAR, (5) ENR, (6) DIF, (7) OXO and (8) FLU.

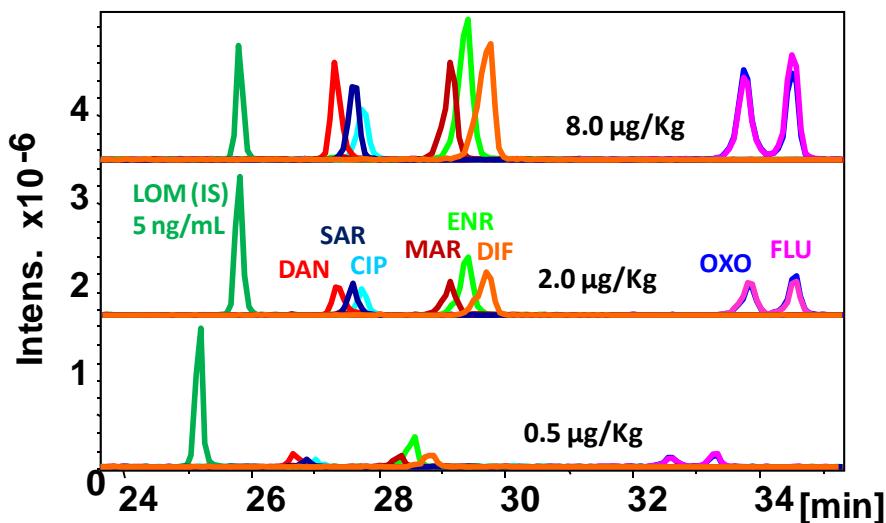


Figure 3. In-line SPE-CE-MS/MS electropherograms at optimum conditions obtained after treating chicken muscle samples spiked at different concentration levels. Peak identifications: (1) LOM (5 µg/L, IS), (2) DAN, (3) SAR, (4) CIP, (5) MAR, (6) ENR, (7) DIF, (8) OXO and (9) FLU.

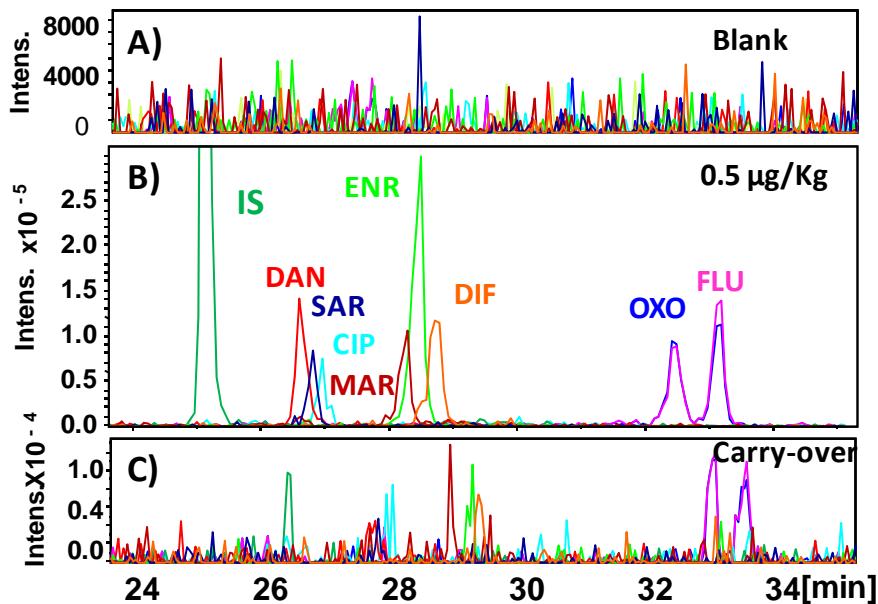


Figure 4. Electropherograms of a blank sample (A), a chicken muscle sample spiked at 0.5 µg/kg (B) and carry-over after an injection (7 bar ×15 min) of a chicken muscle sample spiked at 8 µg/kg (C).

TABLES

Table 1. Main parameters of the MS/MS method and obtained identification points.

| | LOM | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Width (m/z) | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Cutt-off (m/z) | 120 | 120 | 140 | 110 | 130 | 120 | 140 | 140 | 140 |
| Amplitude (V) | 1.1 | 1.1 | 1.2 | 1.0 | 1.0 | 1.2 | 1.2 | 2.2 | 2.2 |
| CID (ms) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Precursor ion | 352.1 | 358.1 | 386.1 | 332.1 | 363.1 | 360.1 | 400.1 | 262.1 | 262.1 |
| Fragment ions | 334.2 | 340.2 | 368.1 | 314.1 | 345.0 | 342.0 | 382.2 | 244.0 | 244.0 |
| | 308.2 | 314.2 | 342.1 | 288.1 | 320.1 | 316.2 | 356.2 | 233.9 | 237.9 |
| | 288.1 | | 322.0 | | 276.0 | | 299.2 | 216.0 | 220.0 |
| | 265.1 | | 299.0 | | | | | 172.0 | 202.0 |
| | 237.0 | | | | | | | 159.9 | 174.0 |
| Identification points | 8.5 | 4 | 7 | 4 | 5.5 | 4 | 5.5 | 8.5 | 8.5 |

Table 2. Statistics and performance characteristics of the in-line SPE-CE-MS/MS method using the proposed AC.

| Analyte | Linearity range ($\mu\text{g/L}$) | Intercept (a.u.) | Slope (a.u. $\cdot\text{L}/\mu\text{g}$) | r^2 | LOD ($\mu\text{g/L}$) | LOQ ($\mu\text{g/L}$) |
|---------|-------------------------------------|------------------|---|-------|-------------------------|-------------------------|
| DAN | $0.10\text{-}10$ | $3.2\cdot 10^5$ | $4.5\cdot 10^6$ | 0.996 | 0.021 | 0.10 |
| SAR | $0.25\text{-}10$ | $2.4\cdot 10^5$ | $1.9\cdot 10^6$ | 0.991 | 0.055 | 0.25 |
| CIP | $0.18\text{-}10$ | $3.6\cdot 10^5$ | $2.3\cdot 10^6$ | 0.992 | 0.040 | 0.18 |
| MAR | $0.27\text{-}10$ | $3.0\cdot 10^5$ | $1.7\cdot 10^6$ | 0.993 | 0.059 | 0.27 |
| ENR | $0.10\text{-}10$ | $5.8\cdot 10^5$ | $4.5\cdot 10^6$ | 0.999 | 0.022 | 0.10 |
| DIF | $0.10\text{-}10$ | $3.5\cdot 10^5$ | $3.5\cdot 10^6$ | 0.998 | 0.022 | 0.10 |
| OXO | $0.08\text{-}10$ | $7.4\cdot 10^5$ | $3.8\cdot 10^6$ | 0.993 | 0.017 | 0.08 |
| FLU | $0.08\text{-}10$ | $6.1\cdot 10^5$ | $3.4\cdot 10^6$ | 0.997 | 0.017 | 0.08 |

a.u.: area units

Table 3. Statistics and performance characteristics of the proposed PLE-SPE-CE-MS/MS method for chicken meat samples.

| Analyte | Linearity range ($\mu\text{g/kg}$) | Intercept | Slope ($\text{kg}/\mu\text{g}$) | r^2 | LOD (ng/kg) | LOQ (ng/kg) | MRL ($\mu\text{g/kg}$) |
|---------|--------------------------------------|-----------|-----------------------------------|-------|-------------|-------------|--------------------------|
| DAN | 0.22-20 | 0.074 | 0.157 | 0.995 | 65 | 220 | 200 |
| SAR | 0.36-20 | 0.085 | 0.070 | 0.993 | 110 | 360 | N.E. |
| CIP | 0.47-20 | 0.008 | 0.057 | 0.994 | 140 | 470 | 100 ^{b)} |
| MAR | 0.29-20 | -0.032 | 0.138 | 0.993 | 90 | 290 | N.E. |
| ENR | 0.13-20 | -0.039 | 0.308 | 0.992 | 40 | 130 | 100 ^{b)} |
| DIF | 0.30-20 | -0.028 | 0.320 | 0.993 | 90 | 300 | 300 |
| OXO | 0.32-20 | 0.032 | 0.209 | 0.994 | 95 | 320 | 100 |
| FLU | 0.22-20 | 0.112 | 0.208 | 0.998 | 65 | 220 | 400 |

b) MRL (ENR + CIP) = 100 $\mu\text{g/kg}$

N.E. Not established in chicken meat samples.

Table 4. Recovery (%) for each quinolone at different spiked levels in chicken muscle^{a)}

| n = 3 | DAN | SAR | CIP | MAR | ENR | DIF | OXO | FLU |
|----------------------|----------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|----------|
| 0.5 $\mu\text{g/kg}$ | 105 (15) | 81 (16) | 63 (7) | 71 (16) | 82 (14) | 87 (5) | 91 (4) | 93 (12) |
| 2 $\mu\text{g/kg}$ | 86 (12) | 66 (13) | 67 (13) | 67 (14) | 90 (7) | 94 (5) | 112 (4) | 110 (10) |
| 8 $\mu\text{g/kg}$ | 103 (16) | 66 (15) | 66 (16) | 85 (12) | 84 (11) | 92 (6) | 99 (8) | 105 (4) |

a) Mean recovery (RSD, %)

References

- [1] Saavedra, L., Barbas, C., *J. Biochem. Biophys. Methods* 2007, **70**, 289-297.
- [2] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C., *Anal. Chim. Acta* 2007, **587**, 208-215.
- [3] Guzman, N.A., Trebilcock, M.A., Advis, J.P., *J. Liq. Chromatogr.* 1991, **14**, 997-1015.
- [4] Bateman, K.P., White, R.L., Thibault, P., *J. Mass Spectrom.* 1998, **33**, 1109-1123.
- [5] Tomlinson, A.J., Braddock, W.D., Benson, L.M., Oda, R.P., Naylor, S., *J. Chromatogr. B* 1995, **669**, 67-73.
- [6] Saavedra, L., Maeso, N., Cifuentes, A., Barbas, C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, **44**, 471-476.
- [7] Strausbauch, M.A., Landers, J.P., Wettstein, P.J., *Anal. Chem.* 1996, **68**, 306-314.
- [8] Phillips, T.M., *Luminescence* 2001, **16**, 145-152.
- [9] Sandra, K., Lynen, F., Devreese, B., Van Beeumen, J., Sandra, P., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, **385**, 671-677.
- [10] Naylor, S., Tomlinson, A.J., *Biomed. Chromatogr.* 1996, **10**, 330.
- [11] Figgeys, D., Ducret, A., Aebersold, R., *J. Chromatogr. A* 1997, **763**, 295-306.
- [12] Strausbauch, M.A., Xu, S.J., Ferguson, J.E., Nunez, M.E., Machacek, D., Lawson, G.M., Wettstein, P.J., Landers, J.P., *J. Chromatogr. A* 1995, **717**, 279-291.
- [13] De Rossi, A., Desiderio, C., *J. Chromatogr. B* 2006, **839**, 6-11.
- [14] He, J., Shibukawa, A., Zeng, M., Amane, S., Sawada, T., Nakagawa, T., *Anal. Sci.* 1996, **12**, 177-181.
- [15] Swartz, M.E., Merion, M., *J. Chromatogr.* 1993, **632**, 209-213.
- [16] Petersson, M., Wahlund, K.G., Nilsson, S., *J. Chromatogr. A* 1999, **841**, 249-261.
- [17] Zhang, L.H., Wu, X.Z., *Anal. Chem.* 2007, **79**, 2562-2569.
- [18] EU Council Regulation 2377/90/EEC concerning the establishment of MRLs of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commu.* 1990, **L224**, 1.
- [19] Commision Decision 2002/657/EEC, *Off. J. Eur. Comm.* 2002, **L 221**, 23.
- [20] Lara, F.J., García-Campaña, A.M.; Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M., García-Ayuso, L.E., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 7665-7673.

-
- [21] Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L., Cruz-Sicilia, A.D., González-Rodríguez, M.J., Plaza-Bolaños, P., *Anal. Chim. Acta* 2006, **558**, 42-52.
- [22] Jiménez-Lozano, E., Roy, D.; Barrón, D., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2004, **25**, 65-73.
- [23] Hutchinson, J.P., Macka, M., Avdalovic, N., Haddad, P.R., *J. Chromatogr. A* 2006, **1106**, 43-51.
- [24] Golet, E.M., Strehler, A., Alder, A.C., Giger, W., *Anal. Chem.* 2002, **74**, 5455-5462.
- [25] Herranz, S., Moreno-Bondi, M.C., Marazuela, M.D., *J. Chromatogr. A* 2007, **1140**, 63-70.
- [26] Pecorelli, I., Galarini, R., Bibi, R., Floridi, Al., Casciarri, E., Floridi, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, **483**, 81-89.
- [27] Bailac, S., Barrón, D., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2006, **580**, 163-169.

