



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Departament de Química Analítica i Química Orgànica
Àrea de Química Analítica

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS
AROMÀTICS SULFONATS EN AIGÜES
PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Memòria presentada per
Maria Josep Cugat Tomàs
per optar al grau de
Doctora en Química
Tarragona, 2002



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA

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

El Dr. FRANCESC BORRULL BALLARÍN, professor titular del Departament de Química Analítica i Química Orgànica de la Facultat de Química de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEM:

Que aquesta tesi doctoral, que duu per títol "**Determinació de compostos aromàtics sulfonats en aigües per electroforesi capil·lar**", presentada per MARIA JOSEP CUGAT TOMÀS per optar al grau de Doctora en Química, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica, i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades per la doctoranda esmentada.

I, perquè consti, expedim aquest certificat.

Tarragona, 30 de novembre de 2001

Dra. Marta Calull Blanch

Dr. Francesc Borrull Ballarín

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS EN AIGÜES PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Maria Josep Cugat Tomàs

ISBN:978-84-692-5929-0/DL:T-1668-2009

ÍNDIX

OBJECTIU	1
INTRODUCCIÓ	5
CAPÍTOL I. Introducció a l'electroforesi capil·lar (CE)	13
I.1 Principis teòrics bàsics.....	16
I.2 Instrumentació	27
I.3 Tècniques de separació en electroforesi capil·lar.....	29
I.3.1 Electroforesi capil·lar per zones (CZE)	32
I.3.2 Cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC)	38
I.3.3 Electrochromatografia capil·lar (CEC).....	43
I.3.4 Electroforesi capil·lar en gel (CGE).....	45
I.3.5 Enfocament isoelectric capil·lar (IEF).....	46
I.3.6 Isotacoforesi (ITP).....	46
I.4 Bibliografia.....	48
CAPÍTOL II. Estat de la qüestió	57
II.1 Característiques i incidència mediambiental dels compostos aromàtics sulfonats: benzensulfonats (BZS) i naftalensulfonats (NS)	59
II.2 Estudi bibliogràfic de la determinació dels BZS i NS	62
II.2.1 Tècniques cromatogràfiques.....	63
II.2.2 Tècniques electroforètiques.....	71
II.3 Sistemes de preconcentració de les mostres	84
II.3.1 Sistemes d'extracció en fase sòlida aplicats a la determinació de BZS i NS	85
II.3.2 Sistemes de preconcentració <i>on-capillary</i> en electroforesi capil·lar	91
II.4 Presència de BZS i NS en mostres d'interès mediambiental	95

II.5	Bibliografia	101
II.6	Extracció en fase sòlida acoblada a l'electroforesi capil·lar aplicada a l'anàlisi mediambiental.....	109
II.7	Revisió dels mètodes electroforètics aplicats a la determinació de benzensulfonats i naftalensulfonats en aigües.....	173
CAPÍTOL III. Part experimental.....		205
III.1	Estudi comparatiu de la utilització de l'electroforesi capil·lar per zones i la cromatografia micel·lar electrocinètica per a la separació de dotze compostos aromàtics sulfonats	211
III.2	Avaluació de l'electroforesi capil·lar per zones en mode coelectroosmòtic per a l'anàlisi ràpida de dotze compostos aromàtics sulfonats	231
III.3	Separació de compostos aromàtics sulfonats per cromatografia micel·lar electrocinètica en mode coelectroosmòtic.....	259
III.4	Estudi comparatiu de la utilització de l'electroforesi capil·lar per zones i la cromatografia micel·lar electrocinètica per a la separació d'isòmers naftalendisulfonats	287
III.5	Determinació de naftalensulfonats i benzensulfonats en aigües per electroforesi capil·lar per zones amb el sistema de <i>sample stacking</i> mitjançant la injecció de grans volums de mostra com a tècnica de preconcentració	309

III.6 Preconcentració isotacoforètica i detecció per espectrometria de masses com a eines per millorar la determinació de compostos aromàtics sulfonats	337
CAPÍTOL IV. Perspectives futures	369
CAPÍTOL V. Conclusions	375
ANNEXOS.....	381
ANNEX I	383
ANNEX II.....	387

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS EN AIGÜES PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Maria Josep Cugat Tomàs

ISBN:978-84-692-5929-0/DL:T-1668-2009

OBJECTIU

L'objectiu principal que s'ha plantejat en la present tesi ha estat aprofundir en l'aplicació de l'electroforesi capil·lar per separar compostos aromàtics sulfonats: benzensulfonats i naftalensulfonats. Dins d'aquest objectiu principal se'n poden destacar d'altres de més específics:

- L'aplicació de l'electroforesi capil·lar emprant l'absorbància ultraviolada-visible com a sistema de detecció per determinar benzensulfonats i naftalensulfonats en aigües i avaluar-ne els avantatges i desavantatges.
- El desenvolupament de dos sistemes de preconcentració *on-capillary* en electroforesi capil·lar: el *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra i la isotacofresi, per determinar benzensulfonats i naftalensulfonats en aigües a baixos nivells de concentració.
- L'acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses per determinar benzensulfonats i naftalensulfonats en aigües.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS EN AIGÜES PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Maria Josep Cugat Tomàs

ISBN:978-84-692-5929-0/DL:T-1668-2009

INTRODUCCIÓ

Els compostos aromàtics sulfonats són substàncies d'origen antropogènic d'ús molt estès tant en processos industrials com en l'àmbit domèstic. Atenent la seva estructura química, es poden esmentar, entre altres, els següents tipus de compostos aromàtics sulfonats: benzensulfonats, antraquinonesulfonats, estilbensulfonats, difenilsulfonats, naftalensulfonats, àcids alcansulfonats i d'altres compostos que no es poden assignar a cap grup específic. ¹

Les aplicacions dels compostos aromàtics sulfonats són molt diverses. Per exemple, els benzensulfonats i naftalensulfonats s'utilitzen en la indústria química com a productes intermedis per fabricar fàrmacs, tints i agents adobadors per a pells. ¹ Els productes de condensació dels naftalensulfonats amb formaldehid s'empren com a additius per al ciment i com a substàncies dispersants i colorants. ² Els tints azosulfonats s'utilitzen en la indústria tèxtil com a tints i pigments per acolorir fibres naturals. ³ Els estilbensulfonats s'empren com a blanquejants en la indústria paperera. ⁴ Molts polifenols sulfonats són utilitzats com a agents dispersants i humidificants en la indústria de l'adobatge de pells.

Malgrat l'ús tan extens que es fa d'aquests productes, se'n té molt poca informació sobre la toxicologia i l'ecotoxicologia. ¹ El que sí que es coneix és la gran mobilitat en el medi aquàtic a causa del baix coeficient de distribució *n*-octanol-aigua ($\log K_{ow} < 2.2$) i el fet que alguns són força persistents en condicions aeròbiques. ^{1,6} Per tant, l'abocament produeix la contaminació de les aigües, tal com s'ha posat de manifest en diversos estudis en què s'han determinat aquests compostos en mostres d'aigües de riu, de mar, en plantes de tractament d'aigües residuals, etc. ⁷⁻¹⁴ Les concentracions d'aquests compostos trobades en afluents industrials i en plantes de tractament d'aigües residuals són força elevades, de l'ordre de mg/l. ¹⁵⁻¹⁹

Per poder controlar el nivell de contaminació d'aquests compostos a les aigües s'han desenvolupat diferents mètodes, els quals han anat evolucionant fins a millorar-ne la selectivitat i la sensibilitat. Les tècniques cromatogràfiques, sobretot la cromatografia de líquids, i les tècniques electroforètiques constitueixen actualment les eines analítiques més emprades per a la separació i determinació d'aquests compostos en mostres mediambientals.^{20,21}

En general, aquestes mostres no es poden analitzar directament amb les tècniques esmentades, ja que no permeten arribar als límits de detecció en què es troben els compostos d'interès. Aquest fet implica una etapa prèvia de tractament de la mostra per tal de preconcentrar els analits i, en alguns casos de mostres complexes, eliminar possibles interferències. La tècnica més emprada per dur a terme la preconcentració dels compostos en estudi és l'extracció en fase sòlida,²²⁻²⁴ encara que recentment també s'han desenvolupat altres tècniques com la preconcentració *on-capillary* en electroforesi capil·lar.²⁵⁻²⁷ L'extracció en fase sòlida també s'utilitza força per eliminar possibles substàncies interferents.²²⁻²⁴

L'estructura general de la memòria d'aquesta tesi es pot dividir en cinc parts ben diferenciades. La primera correspon al capítol I, on es fa una breu introducció als principis teòrics bàsics i a la instrumentació requerida en electroforesi capil·lar i es descriuen les característiques i aplicacions principals de les diferents tècniques electroforètiques.

En la segona part, corresponent al capítol II, es comenten les característiques principals, la presència i la incidència en el medi ambient dels compostos en estudi i es discuteixen els avantatges i les limitacions de les diferents tècniques emprades per determinar-los. S'hi inclouen dues

revisions bibliogràfiques de l'estat actual de les tècniques de preconcentració acoblades a l'electroforesi capil·lar i dels diferents mètodes electroforètics utilitzats per a la determinació de benzensulfonats i naftalensulfonats en mostres aquoses.

La part tercera de la memòria, corresponent al capítol III, descriu l'experimentació d'aquesta tesi doctoral, incloent-hi els diferents treballs sorgits. Cada treball està precedit d'una discussió breu del procés i de les principals conclusions que se'n deriven.

En la quarta part de la memòria, corresponent al capítol IV, es revisen els límits actuals de l'electroforesi capil·lar aplicada a la determinació dels compostos en estudi i es fa una previsió de cap on sembla que apunten les noves tendències.

En la cinquena i última part de la memòria, es recullen les conclusions sorgides arran del treball de la present tesi.

En l'apartat d'annexos s'hi inclouen: les estructures dels compostos estudiats en el decurs d'aquesta tesi (annex I) i una llista dels treballs publicats com a resultat de la tesi doctoral (annex II).

BIBLIOGRAFIA

- 1 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 2 M.C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 400 (1999) 211.
- 3 C. Redín, F.T. Lange, H.J. Brauch, S.H. Eberle, *Acta Hydrochim. Hidrobiol.*, 27 (1999) 136.
- 4 J. Riu, I. Scönsee, D. Barceló, C. Rafols, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 405.
- 5 J.M.A. Stoll, W. Giger, *Anal. Chem*, 69 (1997) 2594.
- 6 S. Patai, Z. Rappaport, *The Chemistry of Sulfonic Acids, Esters and their Derivatives*, Wiley, Chichester, New York, 1991.
- 7 E.R. Brouwer, T.M. Tol, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Química Analítica*, 12 (1993) 88.
- 8 S. Fichtner, F.T. Lange, W. Schmidt, H.-J. Braunch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353 (1995) 57.
- 9 O. Zerbinati, I. Diana, C. Baiocchi, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 74 (1999) 43.
- 10 E. Pocurull, C. Aguilar, M.C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 187.
- 11 S. Angelino, A. Bianco Prevot, M.C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 257.
- 12 S.J. Kok, G.Ph. Hoornweg, T. De Ridder, U.A.Th. Brinkman, N.H. Velthorst, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 355.
- 13 M.J. Cugat, M. Calull, F. Borrull, *Analyst*, 126 (2001) 1312.
- 14 R. Loos, J. Riu, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1197.

- 15 I.S. Kim, F.I. Sasinós, D.K. Rishi, R.D. Stephens, M.A. Brown, *J. Chromatogr.*, 589 (1991) 177.
- 16 B. Bastian, T.Knepper, P. Hoffmann, H.M. Ortner, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 674.
- 17 O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A*, 671(1994) 217.
- 18 F.T. Lange, M. Wenz, H.-J. Braunch, *J. High Resol. Chromatogr.*, 18 (1995) 243.
- 19 B. Altenbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- 20 T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A.*, 773 (1996) 473.
- 21 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 487.
- 22 E.R. Brouwer, T.M. Tol, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Química Analítica*, 12 (1993) 88.
- 23 B. Altenbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- 24 R. Loos, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 890 (2000) 225.
- 25 M.J. Cugat, M. Calull, F. Borrull, *Analyst*, 125 (2000) 2236.
- 26 J.B. Kim, J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 916 (2001) 123.
- 27 M.J. Cugat, C. Aguilar, R.M. Marcé, M. Calull, F. Borrull, *Electroforesi*, pendent acceptació.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS EN AIGÜES PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Maria Josep Cugat Tomàs

ISBN:978-84-692-5929-0/DL:T-1668-2009

CAPÍTOL I

INTRODUCCIÓ A L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR (CE)

L'electroforesi es defineix com la migració d'espècies carregades sota la influència d'un camp elèctric. Tot i que els fenòmens electroforètics eren coneguts des del segle XIX, no va ser fins a principis del XX quan va esdevenir una tècnica analítica.¹ A. Tiselius² el 1930 va dur a terme el primer estudi en què s'utilitzava l'electroforesi per separar i caracteritzar proteïnes en plasma sanguini. Els primers experiments descrits a la bibliografia en què es va fer servir l'electroforesi per zones corresponen a S. Hjerten,³ el qual el 1967 va demostrar que era possible dur a terme separacions electroforètiques fent servir capil·lars de vidre de 300 µm i detectar els compostos separats per absorció ultraviolada (UV), i a R. Virtanen,⁴ el qual el 1974 va utilitzar capil·lars de vidre amb un diàmetre intern més petit, la qual cosa li permeté aplicar camps elèctrics de més intensitat. En la dècada dels setanta, F.M. Everaerts *et al.*⁵ van desenvolupar el primer equip d'isotacoforesi capil·lar adequat per fer anàlisi de rutina. Però els treballs duts a terme per J.W. Jørgenson *et al.*^{6,7} l'any 1981 van demostrar per primer cop la capacitat de separació de l'electroforesi capil·lar per zones. El senzill i eficaç instrument que van fer servir, i que va ser la base dels equips comercials actuals, consistia en un capil·lar de sílice fosa de diàmetre intern molt petit, de menys de 100 µm, una font d'alt voltatge, 30 kV i un sistema de detecció on-column UV per a la separació d'espècies iòniques. L'any 1984, S. Terabe *et al.*^{8,9} van introduir la cromatografia micel·lar electrocinètica i van difondre l'aplicació de l'electroforesi capil·lar d'espècies carregades a espècies neutres. Aquests treballs, junt amb el desenvolupament de sistemes de detecció més selectius i sensibles, van constituir el principi del desenvolupament de les separacions electroforètiques.¹⁰⁻¹²

Des de la introducció del primer equip comercial d'electroforesi capil·lar (CE), ara fa uns deu anys, les aplicacions de la CE s'han diversificat molt.

Actualment, la CE és una tècnica analítica molt versàtil que s'utilitza satisfactòriament per separar petits ions, espècies neutres, grans biomolècules i per estudiar paràmetres fisicoquímics. També s'aplica en camps molt diversos, com ara la química analítica, la química forense, la química clínica, la química orgànica, els productes naturals, la indústria farmacèutica, les separacions quirals i la biologia molecular, entre d'altres. Aquest interès creixent per la tècnica es veu reflectit en revisions científiques recents,¹³⁻¹⁹ diversos llibres de text²⁰⁻²⁵ i pàgines web,²⁶⁻²⁸ que descriuen àmpliament la tècnica i les seves aplicacions.

I.1 PRINCIPIS TEÒRICS BÀSICS

Encara que l'objectiu de la present tesi no és fer una descripció detallada dels fonaments de l'electroforesi capil·lar com a tècnica d'anàlisi, s'ha considerat convenient comentar-ne els principis teòrics bàsics per tal de facilitar la lectura.

Electroforesi

L'electroforesi és un procés utilitzat per separar espècies carregades en solució, segons el seu moviment quan es troben sota la influència d'un camp elèctric. La força produïda per un camp elèctric sobre un ió és directament proporcional a la seva càrrega efectiva (q) i al camp elèctric aplicat (E).

$$F_e = q E$$

El moviment de translació de l'ió es veu contrarestat per una força de fricció que el retarda (F_f) i és proporcional a la velocitat de l'ió (v_e) i al coeficient de fricció (f).

$$F_f = f v_e$$

L'ió arriba, pràcticament de manera instantània, a un estat d'equilibri en què la força d'acceleració iguala la força de fricció.

$$q E = f v_e$$

Reordenant aquesta equació, es pot expressar la velocitat de l'ió com

$$v_e = \frac{q}{f} E = \mu_e E \quad \longrightarrow \quad \mu_e = \frac{q}{f}$$

La mobilitat electroforètica de l'ió (μ_e) és una propietat característica de cada ió en un determinat medi de separació.

El coeficient de fricció de l'ió en moviment (f) depèn del radi hidrodinàmic de l'ió (r) i de la viscositat del medi (η).

$$f = 6 \pi \eta r$$

Incloent aquesta expressió en la de la mobilitat electroforètica, s'obté l'equació següent:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

D'aquí es dedueix que com més gran sigui el radi hidrodinàmic d'un ió, més petita serà la seva mobilitat electroforètica.

La doble capa elèctrica

El flux característic d'un sistema d'electroforesi capil·lar pot ser el resultat d'aplicar-hi una pressió externa, però el més important resulta de la presència d'una doble capa elèctrica a la interfície entre la superfície carregada de l'interior del capil·lar i l'electròlit.

Els capil·lars de sílice fosa que s'utilitzen en les separacions electroforètiques contenen grups silanol (Si-OH). Després de l'activació de les parets interiors del capil·lar, aquests grups silanol s'ionitzen a Si-O⁻, de manera que, quan s'hi fa passar l'electròlit, els contraions (cations, sobretot) es disposen formant una capa adjacent i donen lloc a l'esmentada doble capa elèctrica. Alguns d'aquests contraions queden fixats a la superfície del capil·lar formant la capa fixa, també coneguda com *Helmholtz o Stern layer*, i no contribueixen al fenomen electroforètic. La resta es distribueixen en la solució electrolítica, formant la capa difosa, també coneguda com *Gouy-Chapman layer*. El gruix de la capa fixa depèn de la mida dels contraions, mentre que el gruix de la capa difosa depèn de la força iònica de l'electròlit. La densitat de càrrega disminueix ràpidament amb la distància a la superfície carregada negativament. A la *figura 1.1* es representa la distribució de la doble capa elèctrica.

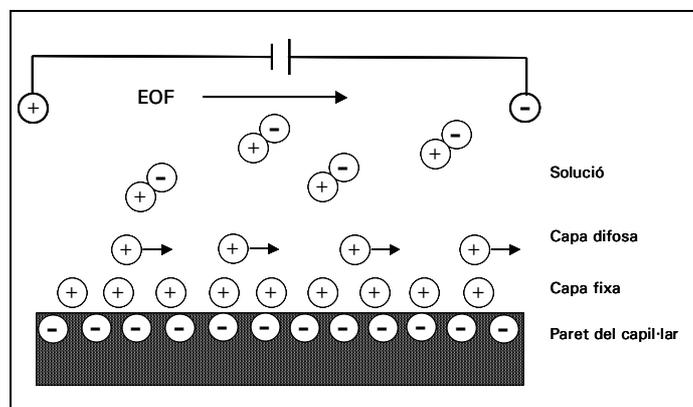


Figura 1.1 Representació de la doble capa elèctrica que es forma a la superfície interior d'un capil·lar de sílice fosa activat.

El flux electroosmòtic (EOF)

Quan s'aplica una diferència de potencial entre els extrems d'un capil·lar, es genera un camp elèctric paral·lel a la superfície. Aleshores els contraions que formen la capa difosa es desplacen en direcció a l'elèctrode negatiu (càtode) i arrosseguen la resta de ions en solució. Les interaccions dipol-dipol entre les molècules d'aigua properes a la superfície del capil·lar poden augmentar de manera molt significativa. És per això que la viscositat local de la solució s'incrementa i produeix una capa de solució aquosa propera a la superfície, que es coneix com *Stagnant*. Les forces electrostàtiques que actuen fora d'aquesta capa generen el flux electroosmòtic (EOF).²⁹

Atès que electroforesi i electroosmosi són dos fenòmens complementaris, les equacions de l'EOF són idèntiques a les desenvolupades per a l'electroforesi. La velocitat de l'EOF (v_{EOF}) ve donada

per l'equació

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E$$

on μ_{EOF} és la mobilitat de l'EOF, una constant de proporcionalitat entre la velocitat de l'EOF i la força del camp elèctric aplicat. La mobilitat electroosmòtica és directament proporcional a la constant dielèctrica del medi (ϵ) i al potencial zeta en la interfície capil·lar-electròlit (ζ) i inversament proporcional a la viscositat del medi (η).

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta}$$

El potencial zeta depèn sobretot de la naturalesa electrostàtica de la paret del capil·lar i, en menor mesura, de la força iònica de l'electròlit.

De vegades és necessari mesurar l'EOF per assegurar-se que el sistema funciona de manera adequada. L'EOF es pot determinar fàcilment injectant un solut neutre (marcador de l'EOF) i mesurant el temps que li costa d'arribar al detector. Solutos com ara la dimetilformamida, l'acetona etc. són els més emprats.³⁰⁻³³ També poden utilitzar-se com a marcadors de l'EOF les distorsions de la línia base produïdes per la injecció de solvents orgànics.

La modificació de l'EOF manipulant la composició de l'electròlit de vegades permet millorar la selectivitat i reduir els temps de migració d'una separació electroforètica. Quan s'augmenta la força iònica de l'electròlit, el perfil del potencial entre les capes compacta i difosa canvia i la capa s'estreny de manera molt significativa; això fa disminuir el potencial zeta i consegüentment l'EOF. El pH de l'electròlit afecta la ionització dels grups

silanol i modifica el potencial zeta i l'EOF. La dependència de la μ_{EOF} amb el pH ha estat molt estudiada.³⁴⁻³⁷ La μ_{EOF} a valors de pH per sota de 3 és molt baixa, augmenta gradualment a valors de pH entre 3 i 6 i de manera molt significativa a valors de pH entre 7 i 8; per sobre d'aquests valors esdevé més o menys constant.

L'efecte de l'addició de modificadors orgànics sobre l'EOF es pot explicar a partir de la influència que tenen sobre la viscositat i la constant dielèctrica de l'electròlit.³⁸⁻⁴²

La dependència de l'EOF amb la temperatura també està relacionada amb canvis de la viscositat.^{1,6} En augmentar la temperatura, disminueix la viscositat i això fa que s'incrementi la mobilitat electroosmòtica.

Els additius, com ara els tensioactius, que s'adsorbeixen a la paret del capil·lar afecten de manera molt significativa la magnitud de l'EOF i fins i tot poden arribar a invertir el sentit tant per la modificació de la càrrega de la paret com per la modificació de la viscositat. A la *taula 1.1* es recullen les variables principals que afecten un procés electroforètic.

Taula I.1

Efecte que tenen sobre l'EOF les variables electroforètiques principals

Augment de la variable	Resultat	Efecte sobre l'EOF
Força iònica	Disminueix el gruix de la doble capa	Disminueix
pH	Augmenta la ionització dels grups silanol a l'interior de la paret del capil·lar	Augmenta
Temperatura	Disminueix la viscositat de l'electròlit	Augmenta
Addició de solvents orgànics	Modifica la viscositat i la conductivitat de l'electròlit	Canvis complexos
Addició de tensioactius	Modifica la càrrega de la superfície per adsorció a la paret del capil·lar mitjançant interaccions hidrofòbiques o iòniques; pot provocar canvis puntuals de la viscositat	Els tensioactius aniònics augmenten l'EOF mentre que els catiònics poden disminuir-lo o fins i tot arribar a invertir-ne el sentit

Mobilitat aparent

La mobilitat aparent d'un analit sorgeix com a resultat de la superposició de la mobilitat electroforètica a l'electroosmòtica.

$$\mu_{ap} = \mu_c + \mu_{EOF}$$

La velocitat aparent d'un analit (v_{ap}) és directament proporcional a la μ_{ap} i a la força del camp elèctric aplicat (E).

$$v_{ap} = \mu_{ap} E$$

Considerant un sistema electroforètic en què l'extrem d'entrada del capil·lar (extrem d'injecció) està situat a l'ànode, l'extrem de sortida (extrem de detecció) està situat al càtode i l'EOF es mou en direcció al

càtode, l'ordre d'elució dels analits en funció de la seva càrrega ve determinat per les mobilitats aparents. Els analits neutres, com que no estan carregats, no tenen mobilitat electroforètica i per tant la μ_{ap} és igual a la μ_{EOF} ; això fa que migrin amb l'EOF sense separar-se. Els analits catiónics i aniònics se separen segons les diferències entre les mobilitats aparents. Atès que els cations es mouen en el mateix sentit que l'EOF, les mobilitats electroforètiques (μ_e) tenen el mateix signe que la mobilitat electroosmòtica (μ_{EOF}), per la qual cosa la μ_{ap} és més gran que la μ_{EOF} ; això fa que arribin al detector abans que l'EOF. Els anions, que es mouen en sentit contrari a l'EOF, tenen mobilitats electroforètiques (μ_e) de signe contrari a la mobilitat electroosmòtica (μ_{eof}), la qual cosa provoca que la seva μ_{ap} sigui més petita que la μ_{EOF} ; això fa que arribin al detector més tard que l'EOF. A la *figura 1.2* es pot veure la representació gràfica de la separació dels diferents tipus d'analits en funció de les mobilitats aparents.

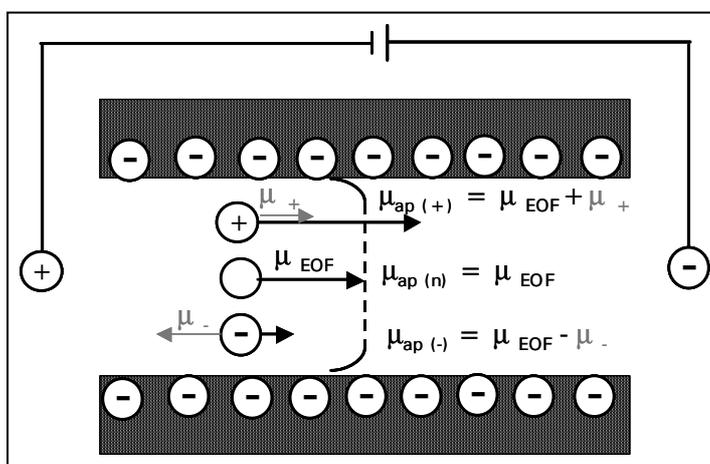


Figura 1.2 Mecanisme de separació en electroforesi capil·lar en funció de les mobilitats aparents dels analits.

Tenint en compte que els fenòmens electroforètics i electroosmòtics són els paràmetres més importants per controlar la selectivitat d'una separació electroforètica, considerem important definir l'existència de dos models de treball en funció de la càrrega de la paret del capil·lar. Prenent com a analític model els compostos aniònics, es pot distingir entre el model de separació contraelectroosmòtic i el coelectroosmòtic.

En el model contraelectroosmòtic els vectors de mobilitat electroforètica i electroosmòtica es mouen en sentits oposats perquè les parets del capil·lar estan carregades negativament. En aquesta configuració, l'EOF es mou en direcció al càtode, mentre que els compostos aniònics es mouen en direcció a l'ànode (*figura 1.2*).

Quan a través del capil·lar s'hi fa passar un electròlit que conté el que es coneix com modificador de l'EOF, per exemple un tensioactiu catiònic, en una concentració adequada es pot invertir la càrrega de la paret del capil·lar.⁴³ Tal com es pot veure representat a la *figura 1.3*, els monòmers de tensioactiu s'adhereixen a la superfície de la paret del capil·lar mitjançant interaccions iòniques entre els grups catiònics del tensioactiu i la superfície aniònica dels grups silanol; llavors, a causa d'interaccions hidrofòbiques entre les cadenes alquíliques apolars, es forma una doble capa micel·lar que fa que la paret del capil·lar quedi carregada positivament.

Aquesta inversió de la càrrega de la paret del capil·lar és la que dona lloc a l'altre model de treball, el model coelectroosmòtic. En aquest model els vectors de mobilitat electroforètica i electroosmòtica es mouen en el mateix sentit perquè les parets del capil·lar es troben carregades positivament. En aquesta configuració, tant l'EOF com els compostos

aniònics es mouen en direcció a l'ànode. Quan es treballa amb aquesta modalitat, cal invertir la polaritat de la

font de voltatge perquè la posició del detector passi de l'extrem catòdic a l'anòdic i permetre així la detecció dels compostos aniònics al seu pas pel detector.

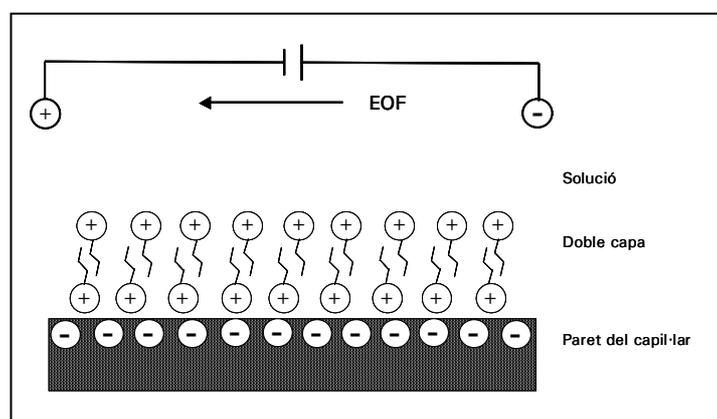


Figura 1.3 Representació esquemàtica de la inversió de l'EOF produïda per l'addició d'un tensioactiu catiónic a l'electròlit.

De vegades aquesta modificació de la paret del capil·lar s'utilitza per tal de disminuir les interaccions dels analits amb la paret del capil·lar fent servir fenòmens basats en la repulsió electrostàtica, com per exemple en la separació de proteïnes.^{44,45} En general, però, s'utilitza per modificar la selectivitat d'una separació o per reduir els temps de migració.^{46,47}

Quan es necessita suprimir l'EOF, es modifica la paret del capil·lar tot recobrint-la d'alguna substància neutra, *i.e.* tefló, o bé emprant algun additiu com ara la metilcel·lulosa.

Temperatura i eficàcia

La generació de calor en electroforesi capil·lar és resultat d'aplicar potencials elevats entre els extrems del capil·lar. Encara que aquest procés afavoreix la reducció dels temps de migració i pot contribuir a millorar l'eficàcia d'una separació electroforètica, també comporta dos problemes força significatius: la formació de gradients de temperatura a l'interior del capil·lar i de canvis de temperatura en el temps a causa d'una dissipació ineficaç de la calor.^{11,48,49}

Tenint en compte que la calor es dissipa per difusió, la temperatura al centre del capil·lar és més gran que a prop de les parets. Com que la viscositat disminueix en augmentar la temperatura, tant la mobilitat de l'EOF com l'electroforètica s'incrementaran en la mateixa mesura. Per a la majoria dels ions la mobilitat augmenta en un 2% per grau kelvin. Això té com a efecte una modificació del perfil de flux, que provoca l'eixamplament dels pics. A més a més, si la calor generada no s'elimina a mesura que es produeix, es genera un gradual però progressiu increment de la temperatura fins que s'assoleix l'equilibri. Segons les condicions experimentals específiques, es produiran variacions del temps de migració com a conseqüència de variacions de les velocitats electroforètica i electroosmòtica.

Treballant amb capil·lars d'un diàmetre intern inferior o igual a 100 µm i, principalment, fent servir sistemes de refrigeració, s'aconsegueix una dissipació de la calor efectiva.

I.2 INSTRUMENTACIÓ

Un sistema típic d'electroforesi capil·lar (*figura 1.4*) consta de quatre parts principals:

1. Un capil·lar
2. Dos elèctrodes
3. Una font d'alt voltatge connectada als elèctrodes
4. Un detector

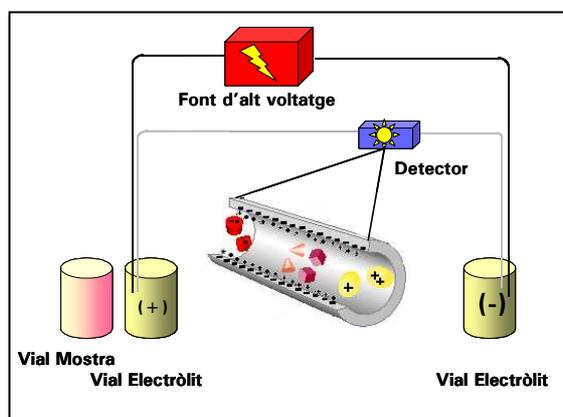


Figura 1.4 Representació esquemàtica d'un equip bàsic d'electroforesi capil·lar.

Habitualment es fan servir capil·lars de sílice fosa, amb diàmetres interns de 25-100 μm i longituds de 30-100 cm. El capil·lar ple d'electròlit permet la conducció del corrent que es genera quan s'aplica un potencial determinat entre els extrems. Aquests es troben submergits dins de vials plens d'electròlit. La font d'alt voltatge està connectada als elèctrodes, que també es troben submergits dins dels vials que contenen l'electròlit per

tancar el circuit elèctric. Els elèctrodes poden actuar com a càtode o ànode segons la polaritat de la font d'alt voltatge.

Normalment s'apliquen voltatges d'entre 5-30 kV (màxim admès pels equips comercials), que donen lloc a corrents d'entre 10-100 μ A. D'altres de més elevats poden produir problemes de sobreescalfament a l'interior del capil·lar que poden causar l'eixamplament de pics amb la consegüent pèrdua de resolució. Des del punt de vista pràctic, la calor Joule limita el potencial màxim que es pot aplicar en una determinada separació. Apareix com a conseqüència de la resistència de l'electròlit al flux de corrent. La representació gràfica de la llei d'Ohm, que estableix que el corrent desenvolupat i el potencial aplicat han de tenir una relació lineal, és de gran utilitat a l'hora de fixar el potencial màxim que es pot aplicar en unes condicions determinades. Quan es perd la linealitat, la calor generada és més gran que la dissipada i la llei d'Ohm deixa de complir-se.

El vial que conté la mostra només es fa servir durant la injecció, quan substitueix el vial d'electròlit situat a l'extrem d'entrada del capil·lar. La mostra pot ser injectada hidrodinàmicament o electrocinèticament, depèn si durant la injecció s'aplica pressió o voltatge per introduir els analits en el capil·lar. Pel que fa a l'eficàcia i a la resolució de la separació, és recomanable que la longitud de la zona injectada sigui inferior a un 1% de la longitud efectiva del capil·lar (distància entre l'extrem d'entrada del capil·lar i la finestra de detecció); això provoca que els volums injectats en electroforesi capil·lar siguin molt petits (d'aproximadament nl). El capil·lar passa pel detector que es troba situat a l'extrem contrari del d'injecció.

Durant la separació, els analits migren a través del capil·lar cap a l'extrem on se situa el detector. Els detectors més emprats són els

d'absorbància UV-visible de longitud d'ona fixa o de díodes en fila (DAD). Quan es fan servir aquest tipus de detectors, els analits es detecten a prop de l'extrem de sortida del capil·lar, emprant el mateix capil·lar com a cel·la de detecció, que es crea retirant una part del recobriment de poliimida que protegeix i dóna flexibilitat al capil·lar.

Altres detectors comercialment disponibles són els de fluorescència, de fluorescència induïda per làser, de conductivitat, etc. El desenvolupament de nous acoblaments de l'electroforesi capil·lar a detectors d'espectrometria de masses està facilitant-ne i, per tant, incrementant-ne la utilització per aconseguir informació estructural dels pics obtinguts i millorar així la selectivitat de la tècnica.

Els equips comercials d'electroforesi capil·lar estan controlats per un ordinador que permet governar els equips, transformar el senyal recollit pel detector en un senyal gràfic, que en electroforesi capil·lar es coneix com electroferograma, i fer-ne el tractament de dades posterior a partir de la integració dels pics apareguts en l'electroferograma.

I.3 TÈCNiques DE SEPARACIÓ EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

Tal com es mostra a la *taula 1.2* s'han desenvolupat sis tècniques electroforètiques que, tot i tenir mecanismes de separació diferents, es poden aplicar fent servir el mateix instrument. De fet, és molt senzill canviar d'una tècnica a l'altra perquè en la majoria dels casos només cal modificar el medi de separació (capil·lar i/o electròlit). A la *taula 1.2* també queda reflectida la selectivitat de les tècniques electroforètiques en funció dels mecanismes de separació.

Taula 1.2

Principals tècniques electroforètiques, fonaments de separació i aplicacions

Tècnica electroforètica	Fonaments de la separació	Aplicacions
Electroforesi capil·lar per zones (CZE)	Diferències de migració (relació càrrega-radi) en l'electròlit	Espècies iòniques i polars, lípids, pèptids, proteïnes, ADN i ARN
Cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC)	<u>Espècies neutres</u> : diferent distribució entre la fase aquosa i la micel·lar <u>Espècies carregades</u> : diferències de migració i diferent distribució entre la fase aquosa i la micel·lar	Espècies neutres i iòniques, lípids, pèptids, ADN i ARN
Electrocromatografia capil·lar (CEC)	<u>Espècies neutres</u> : diferent distribució entre la fase mòbil i l'estacionària <u>Espècies carregades</u> : diferències de migració en la fase mòbil i diferències de distribució entre la fase mòbil i l'estacionària	Espècies neutres i iòniques
Electroforesi capil·lar en gel (CGE)	Els analits se separen en funció de la mida	Pèptids, proteïnes, ADN i ARN
Enfocament isoelèctric capil·lar (IEF)	La separació es basa en l'existència de diferències en els punts isoelèctrics	Pèptids i proteïnes
Isotacforesi (ITP)	Els analits amb diferents mobilitats se separen en diferents zones que migren a la mateixa velocitat	Espècies iòniques i polars, pèptids i proteïnes

Les separacions electroforètiques es poden dur a terme en:

- sistemes electrolítics continus
- sistemes electrolítics discontinus

En els sistemes electrolítics continus s'utilitza un únic electròlit. Modificant-ne les propietats en el camí de migració, la separació pot tenir lloc com un procés cinètic o com un procés estacionari:

- Procés cinètic: la composició de l'electròlit és constant en tot el camí de migració. El potencial elèctric i les mobilitats efectives dels analits a separar són constants. Per tant, les substàncies migren a una velocitat constant però diferent entre si. Exemples d'aquest tipus de procés són la CZE, la MEKC i la CGE.
- Procés en estat estacionari: la composició de l'electròlit no és constant. El camp elèctric i les mobilitats efectives poden variar en el camí de migració. En aquest tipus de separació, la pràctica més habitual és la formació d'un gradient de pH en el camí de migració; després d'un interval de temps, alguns components de la mostra s'aturen, posició que correspon al punt isoelèctric. El resultat és un estat estacionari en què els analits es troben en un cert punt del camí de migració. Un exemple d'aquest tipus de procés és l'IEF.

En els sistemes electrolítics discontinus els analits migren entre dos electròlits diferents anomenats electròlit capdavanter i electròlit terminal que es caracteritzen per tenir mobilitats diferents. La ITP n'és un exemple.

A continuació es descriuen les característiques principals de les tècniques electroforètiques, incidint sobretot en aquelles que s'han utilitzat en el decurs de la present tesi (electroforesi capil·lar per zones i cromatografia micel·lar electrocinètica) i en les que es consideren especialment importants per al futur desenvolupament de la tècnica (electrocromatografia capil·lar i isotacoforesi).

I.3.1 ELECTROFORESI CAPIL·LAR PER ZONES (CZE)

L'electroforesi capil·lar per zones (CZE) és la forma més senzilla de dur a terme una separació electroforètica. La separació en CZE es fonamenta en diferències entre les mobilitats electroforètiques resultants de les diverses velocitats de migració de les espècies carregades en l'electròlit contingut en el capil·lar. La principal limitació és que només permet separar espècies carregades, ja que els compostos neutres elueixen sense separar-se arrossegats per l'EOF.

Les separacions mitjançant la CZE es duen a terme fent servir un electròlit continu i aplicant un camp elèctric constant al llarg de tot el capil·lar. El procés de separació es produeix en aplicar un potencial elevat entre els elèctrodes després de la injecció d'un petit volum de mostra envoltat pel medi de separació (electròlit). El mecanisme de separació es basa en les diferents relacions càrrega/radi dels analits per un determinat pH.

Durant la separació els components de la mostra migren d'acord amb la seva mobilitat aparent (μ_{ap}). El temps de migració d'un component de la mostra (t_{ap}) és el temps que li costa migrar des del principi del capil·lar (on és injectat) fins a la finestra de detecció; el t_{ap} es pot calcular a partir de l'expressió

$$t_{ap} = \frac{L_{ef}}{v_{ap}} = \frac{L_{ef}}{\mu_{ap}E}$$

on L_{ef} és la longitud efectiva del capil·lar (distància entre l'extrem d'entrada del capil·lar i la finestra de detecció) i v_{ap} és la velocitat aparent que, tal

com es pot veure a l'equació anterior, és funció de la mobilitat aparent (μ_{ap}) i de la força del camp aplicat (E).

A la *figura 1.5* s'esquemmatitza una separació per CZE. El flux electroosmòtic generat en els capil·lars de sílice fosa pels electròlits més emprats és força més elevat que la mobilitat electroforètica dels diferents ions presents a la mostra. Els cations són atrets cap al càtode i la velocitat es veu augmentada per la del flux electroosmòtic. Els anions, tot i ser atrets cap a l'ànode, són arrossegats cap al càtode pel flux electroosmòtic. En aquestes condicions, els cations, amb la relació càrrega/radi més gran, migraran primer, seguits dels cations amb radis més petits. Després migraran, sense separar-se, les substàncies neutres, ja que la relació càrrega/radi és zero. Finalment, migren els anions; els anions amb relació càrrega/radi més petita migraran abans que els que la tinguin més gran.

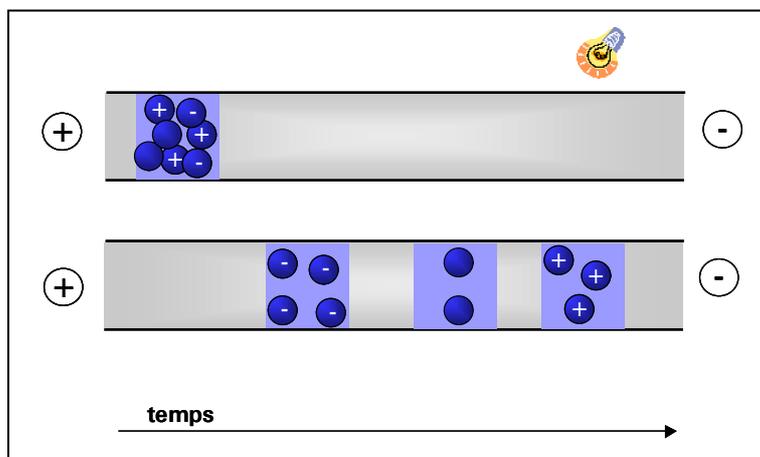


Figura 1.5 Representació esquemàtica d'una separació per CZE.

Si bé en principi tots els components d'una mostra es poden separar per CZE amb l'única condició que siguin espècies carregades, l'optimització de

diversos paràmetres (voltatge, temperatura, composició de l'electròlit, etc.) contribueix a millorar aquesta separació.

L'electròlit juga un paper molt important en qualsevol separació electroforètica. És per això que variables com el pH, la força iònica i la composició de l'electròlit, que afecten tant la selectivitat com l'eficàcia d'una separació, són les primeres de ser estudiades quan s'optimitza una separació per CZE. D'entrada, l'electròlit ha de complir uns requisits bàsics: (i) ha de proporcionar una elevada capacitat tampó dins del rang de pH de treball, (ii) ha de tenir una mobilitat electroforètica semblant a la dels analits per minimitzar la dispersió electroforètica, (iii) ha de tenir una mobilitat electroforètica baixa per minimitzar la generació de corrent i (iv) ha de presentar una absorbància UV-visible baixa a la longitud d'ona de treball (detectors d'absorbància).

La selectivitat d'una separació depèn significativament del tipus d'electròlit que es fa servir i del seu pH. Ajustant el pH de l'electròlit es pot canviar la relació càrrega/radi de molts ions, modificant-ne la ionització i per tant la mobilitat electroforètica.⁵⁰⁻⁵⁷ A la bibliografia es pot trobar un gran nombre de solucions utilitzades com a electròlits en CZE. Algunes de les més emprades són les solucions de fosfat sòdic, de borat sòdic, d'acetat sòdic o amònic i solucions zwitteriòniques, com ara les solucions de tris(hidroximetil-aminometà) (Tris) o les de l'àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic (MES).^{16,21}

La força iònica de l'electròlit també té una gran influència sobre la selectivitat i l'eficàcia d'una separació⁵⁰⁻⁵⁷ perquè ve determinada per la concentració i la càrrega dels ions en solució. Normalment s'apliquen potencials elevats per tal de reduir el temps d'anàlisi però, tenint en

compte que el corrent generat és proporcional a la força iònica de l'electròlit per a un determinat voltatge i que corrents massa elevats poden tenir efectes negatius en l'eficàcia d'una separació,^{50,51} el màxim potencial que es podrà aplicar en una separació el determinarà la força iònica de l'electròlit.

La selectivitat d'una separació electroforètica es pot modificar força amb l'addició de diverses substàncies (solvents orgànics, selectors quirals, tensioactius, urea, etc.) a l'electròlit.

Diversos autors han investigat els efectes que produeixen l'addició de diferents solvents orgànics (metanol, etanol, propanol, acetonitril, formamida, tetrahidrofurà, etc.) a l'electròlit en CZE.⁵⁸⁻⁶⁷ Els efectes observats són força diversos: poden augmentar la solubilitat d'analits poc solubles en solucions aquoses pures, poden augmentar la selectivitat a causa de la influència que tenen sobre la mobilitat electroforètica i electroosmòtica, poden influir en el pK_a, sobretot dels electròlits febles, etc. De vegades, la millora de la selectivitat per l'addició de solvents orgànics va associada a increments significatius del temps d'anàlisi.⁵⁸⁻⁶¹

La CZE normalment s'aplica en medi aquós, ja que la majoria d'espècies carregades són solubles en aquest medi i el mecanisme de separació es basa en diferències de migració d'aquestes espècies carregades en un camp elèctric. Tot i amb això, també hi ha diversos sistemes de solvents no aquosos en què és possible obtenir la conductivitat suficient per permetre que tingui lloc una separació electroforètica i en què la solubilitat dels compostos hidrofòbics és més elevada.⁶² La que es coneix com electroforesi en medi no aquós (NACE), introduïda l'any 1984 per Y. *Wahlbroehl et al.*,⁶³ és actualment una tècnica que dona bons resultats,

sobretot en el camp farmacològic.⁶⁴⁻⁶⁷ En general la NACE proporciona una elevada capacitat de separació per a substàncies molt similars sense la necessitat d'afegir-hi d'altres modificadors com tensioactius o ciclodextrines. Des del punt de vista pràctic, la NACE presenta l'avantatge de permetre la injecció directa de mostres en matrius orgàniques obtingudes després d'un procés d'extracció i, a causa de la volatilitat del solvent i els baixos corrents generats, resulta també força adequada en l'acoblament de l'electroforesi capil·lar a un detector d'espectrometria de masses. Quan es treballa amb NACE, l'elecció de l'electròlit és força important.⁶² A causa de la baixa solubilitat de molts electròlits en solvents orgànics, el nombre d'electròlits adequats és limitat, i l'acetat amònic (amb l'addició d'àcid acètic o d'acetat sòdic o sense per ajustar el pH del medi) esdevé el més emprat. La selectivitat d'una separació mitjançant la NACE es pot modificar fàcilment canviant el tipus de solvent orgànic o fent servir barreges de solvents orgànics.

Els tensioactius són un altre grup d'additius molt utilitzats per modificar la selectivitat en CZE. L'afegiment de diferents tensioactius a l'electròlit, en concentracions per sota de la seva concentració micel·lar crítica (CMC), pot modificar el procés de separació de diverses maneres. Així, les molècules monomèriques de tensioactiu poden actuar com a agents solubilitzants per a compostos hidrofòbics, com a parells iònics o com a modificadors de la paret del capil·lar.

Pel que fa als mecanismes d'interacció monòmer-solut, poden crear-se per interaccions iòniques del solut amb l'extrem carregat del tensioactiu i/o per interaccions hidrofòbiques entre la cadena alquílica del tensioactiu i les parts hidrofòbiques del solut. En funció del tipus de tensioactiu i com a conseqüència de la interacció amb la paret del capil·lar, es pot augmentar,

disminuir i fins i tot invertir l'EOF. La inversió de l'EOF es pot aconseguir addicionant tensioactius catiónics o polielectròlits catiónics a l'electròlit.⁶⁸⁻⁷⁶ Tal com s'havia esmentat anteriorment, en aquestes condicions es diu que es treballa seguint el model coelectrosmòtic, el qual en l'anàlisi d'espècies aniòniques, produeix la disminució del temps de migració dels analits perquè en aquestes condicions el flux electrosmòtic va en la mateix sentit que els anions.⁷⁷

Els selectors quirals constitueixen un altre gran grup d'additius. S'utilitzen principalment per modificar la selectivitat en separacions enantiomèriques. Encara que les ciclodextrines són els selectors quirals més utilitzats,⁷⁸⁻⁸² també hi poden actuar altres substàncies com ara els èters corona, les *bile salts*, alguns complexos metàl·lics, etc.

Les ciclodextrines (CD) són oligosacàrids cíclics no iònics que tenen la silueta d'un con truncat buit amb una cavitat determinada per al nombre d'unitats de glucosa (*figura 1.6*). Es coneixen com α , β , i γ -CD en funció del nombre d'unitats de glucosa que tenen (sis, set o vuit unitats, respectivament). Les superfícies exteriors són hidrofíliques i les cavitats interiors són hidrofòbiques. La selectivitat quiral resulta de la inclusió d'una part hidrofòbica del solut dins de la cavitat i també per l'establiment de ponts d'hidrogen amb les parts hidrofíliques quirals. La selectivitat de les separacions quirals es pot ajustar modificant la concentració de la CD emprada, canviant el tipus de CD, barrejant diferents tipus de CD o addicionant altres modificadors com ara solvents orgànics, tensioactius, urea, ions metàl·lics, etc. La utilització de derivats de les CD també s'ha fet servir per modificar la selectivitat.⁸³⁻⁸⁵

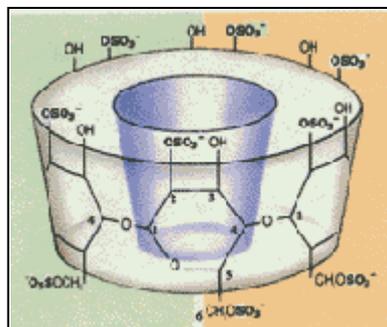


Figura I.6. Esquema d'una ciclodextrina.

I.3.2 CROMATOGRAFIA MICEL·LAR ELECTROKINÈTICA (MEKC)

Encara que la cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC) es va desenvolupar al principi per separar compostos neutres que no es podien separar mitjançant la CZE, avui dia s'utilitza de forma general amb l'objectiu de millorar la selectivitat de tot tipus de compostos (carregats o no) difícilment resolubles amb la CZE. El mecanisme de separació en MEKC es basa en la distribució dels analits entre la fase aquosa i la fase micel·lar segons les constants d'associació solut-micel·lar. Les micel·les es formen quan un tensioactiu s'addiciona a la solució electrolítica en concentracions per sobre de la concentració micel·lar crítica (CMC). Normalment, les micel·les estan formades per 40-100 molècules monomèriques de tensioactiu (número d'agregació). A la *taula 1.3* es recullen les principals característiques dels diferents tipus de tensioactius emprats en MEKC.

Taula I. 3

Concentració micel·lar crítica, CMC (mM) i número d'agregació (*n*) de diversos tensioactius emprats en MEKC

Tensioactiu	Abreviació	CMC ^a	<i>n</i> ^a
<i>Aniònics</i>			
sodium dodecyl sulphate	SDS	8.1	62
sodium tetradecyl sulphate	STS	2.1 (50°C)	138
<i>Catiònics</i>			
cetyltrimethylammonium bromide	CTAB	0.9	61
tetradecyltrimethylammonium bromide	TTAB	3.5	75
<i>No iònics</i>			
dodecyl-(polyethyleneglycol[23])-eter	Brij 35	0.1	40
polyoxyethylene[20]-sorbitane monooleate	Tween 80		
<i>Zwitteriònics</i>			
3-(3-cholamidopropyl)dimethylammonio-3-propane sulfonate	CHAPS	4.2	9.5
<i>Bile salts</i>			
sodium cholate	SC	12.5	3
sodium deoxycholate	SDC	6.4	14

^a Tret de les referències ^{21,86-88}

El medi de separació en MEKC consisteix en dues fases en moviment: una d'aquosa i una de micel·lar, també coneguda com pseudofase estacionària (*pseudo or moving stationary phase*). A la *figura I.7* es mostra esquemàticament el mecanisme de separació per a compostos neutres mitjançant la MEKC emprant un tensioactiu aniònic. Quan en un capil·lar de sílice fosa s'empra un tensioactiu aniònic, les micel·les aniòniques, malgrat que són atretes cap l'ànode, migren en direcció al càtode arrossegades pel flux electroosmòtic. La velocitat de migració d'aquestes micel·les és més petita que la del flux electroosmòtic, la qual cosa origina la pseudofase estacionària. Aquest mecanisme de separació es produeix d'una manera

semblant a com queden retinguts els analits en la fase estacionària en una separació cromatogràfica.⁸⁶⁻⁸⁹

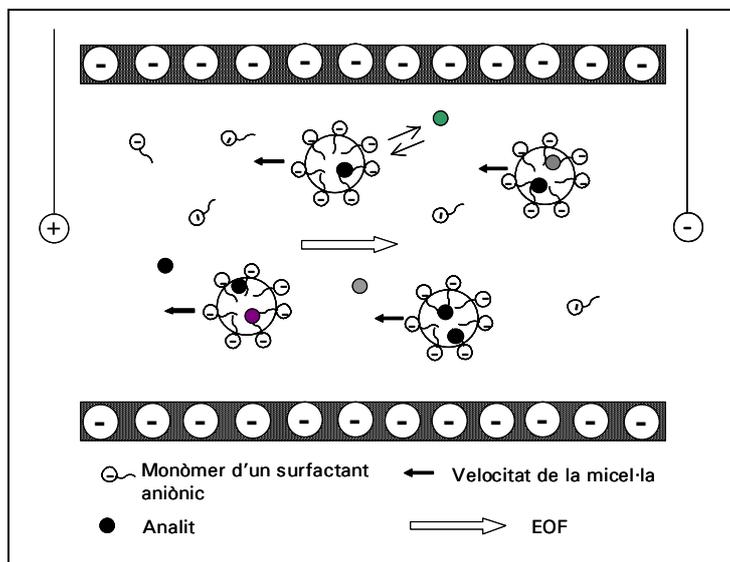


Figura 1.7 Representació esquemàtica del mecanisme de separació per compostos neutres en MEKC emprant un tensioactiu aniònic.

Un solut neutre molt hidrofílic, per exemple el metanol, que no interacciona amb la micel·la i migra amb el flux electroosmòtic eluirà primer (en un temps t_0), mentre que un solut neutre molt hidrofòbic, com ara el Sudan III, que interacciona totalment amb la micel·la, serà el darrer a eluir (en un temps t_m). El temps comprès entre t_0 i t_m es coneix com finestra de migració i juga un paper molt important en l'eficàcia d'una separació micel·lar.⁹⁰⁻⁹² La resta de soluts neutres amb hidrofobicitats intermèdies migraran dins de la finestra de migració.

En els compostos carregats el mecanisme de separació és més complex, ja que, a més a més dels mecanismes de distribució, cal considerar tant la

mobilitat electroforètica dels analits en la fase aquosa com la possible existència d'equilibris addicionals.

Les constants d'associació solut-micel·la es poden determinar a partir del factor de capacitat d'un solut (K'), que es pot expressar de la manera següent ^{8,9}:

$$K' = \frac{\frac{t_r}{t_0} - 1}{1 - \frac{t_r}{t_m}}$$

on t_r és el temps de migració del solut. Un solut que elueixi amb el solvent (t_0) té un factor de capacitat zero i un solut que elueix amb la micel·la (t_m) es considera que té un factor de capacitat infinit. Un solut que es distribueixi de la mateixa manera en la fase aquosa i en la fase micel·lar té factor de capacitat 1.

Les variables a estudiar per tal d'optimitzar una separació micel·lar són el tipus i la concentració del tensioactiu, ja que afecten tant els factors de capacitat com la selectivitat. En el cas de la separació de compostos iònics, l'elecció del tipus de tensioactiu (*taula 1.3*) és especialment important, perquè la selectivitat no només vindrà determinada per la distribució diferent dels analits en les micel·les sinó que també es veurà afectada per forces electrostàtiques d'atracció o repulsió entre l'analit i la micel·la. ^{90,91} Les barreges de tensioactius, combinant-ne de no iònics com el Brij o el Tween amb altres de iònics, també s'empren força en la manipulació de la selectivitat. ⁹³⁻⁹⁵ Les separacions micel·lars normalment es duen a terme a pH elevat en què l'EOF generat és important, sobretot quan es fan servir tensioactius aniònics. ^{95,96}

Els factors de capacitat també es poden ajustar amb l'addició de solvents orgànics i de parells iònics.⁹⁵⁻⁹⁷ L'addició de solvents orgànics està limitada a concentracions de fins al 30%, ja que a concentracions més elevades es pot trencar la micel·la. Una altra manera de modificar el factor de capacitat és ajustant la temperatura i, com que la seva dependència és diferent per a cada analit, es pot dir que la temperatura també pot afectar la selectivitat.⁹⁰

L'addició de ciclodextrines a l'electròlit micel·lar pot millorar significativament la separació de compostos quirals. En CD-MEKC, els soluts es distribueixen tant en la micel·la com en la CD o en ambdues. La resolució quiral s'obté quan la distribució dels enantiòmers en ambdues fases és diferent.

La cromatografia micel·lar electrocinètica amb microemulsions (MEEKC) és una tècnica relativament recent que es pot considerar una extensió de la MEKC. Les separacions es produeixen emprant microemulsions, que són minúscules gotes lipofíliques suspeses en un electròlit aquós. Les microemulsions es formen barrejant electròlits aquosos, solvents orgànics lipofílics (*n*-octà, *n*-heptà o *n*-octanol) i tensioactius en les proporcions adequades. La MEEKC és una tècnica electrodirigida que permet separar soluts iònics i neutres, i proporciona una bona selectivitat i una eficàcia de separació elevada, fet que possibilita separar barreges complexes de soluts de polaritats i solubilitats molt diferents.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Té com a principal inconvenient que no és compatible amb l'espectrometria de masses.⁹⁸ La selectivitat de la separació es pot manipular modificant diversos paràmetres com ara el tipus i la concentració de tensioactiu, el pH i el solvent orgànic.

I.3.3 ELECTROCROMATOGRÀFIA CAPIL·LAR (CEC)

L'electrocromatografia capil·lar (CEC) és una tècnica electroforètica en la qual es fan servir capil·lars que estan empaquetats o recoberts internament amb una fase estacionària. Anàlogament a la resta de tècniques electroforètiques, l'aplicació d'un voltatge a través del capil·lar genera un EOF que arrossega els soluts cap al detector. Els soluts interaccionen cromatogràficament amb la fase estacionària i s'obtenen separacions molt selectives. Els soluts iònics també se separen en funció de les diferents mobilitats electroforètiques.

Encara que la CEC s'ha aplicat sobretot a la separació d'espècies quirals i fàrmacs,¹⁰¹⁻¹⁰³ el fet que se'n conegui força el funcionament, el fet que es pugui aplicar mitjançant equips convencionals de CE, de vegades amb petites modificacions, i la creixent disponibilitat de capil·lars empaquetats per CEC, comporten un ràpid increment del camp d'aplicació d'aquesta tècnica.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶

En les separacions electrocromatogràfiques en què s'empren capil·lars empaquetats, cal modificar els equips convencionals amb l'objectiu de permetre l'aplicació simultània de pressió als vials d'entrada i sortida per evitar la formació de bombolles durant l'aplicació del voltatge de separació. Aquestes bombolles, degudes tant a la generació de calor Joule com a les possibles diferències en la velocitat de l'EOF entre les parts empaquetades i les no empaquetades del capil·lar, donen lloc a caigudes de corrent i a alteracions de l'EOF.^{107,108}

En general els electròlits que es fan servir contenen una part molt important de solvents orgànics (40-80%) com metanol o acetonitril. Això

permet la resolució de soluts insolubles en aigua que difícilment es poden separar per altres tècniques electroforètiques.^{23,107} De vegades es fan servir bombes d'HPLC per generar un gradient de solvents i millorar tant la selectivitat com l'eficàcia d'una separació.¹⁰⁹

Quan es fan servir capil·lars empaquetats o modificats, es parla de fases estacionàries com en HPLC; quan el material per empaquetar s'addiciona a l'electròlit base com a partícules lliures en moviment, es parla de fase pseudoestacionària. En CEC amb columnes empaquetades, els capil·lars normalment es modifiquen amb materials com l'octadecil sílice (ODS), bescanviadors catiònics forts (SCX) i ciclodextrines,^{110,111} però també es fan servir molts d'altres materials especialment selectius per separar determinats compostos. Quan la fase estacionària recobreix les parets del capil·lar formant una capa fina, la tècnica es coneix com CEC en tub obert (OTCEC).¹¹² Té com a avantatges respecte a la CEC amb columnes empaquetades que dóna separacions molt més ràpides perquè s'elimina la difusió dels analits en l'empaquetament i s'obtenen pics més simètrics perquè es fan servir capil·lars de diàmetre més petit.

Recentment, s'han emprat els polímers d'empremta molecular (MIP) per a l'empaquetament de capil·lars. Els MIP es preparen per polimerització de monòmers al voltant d'una molècula objectiu. Els monòmers, que se seleccionen en funció de l'habilitat per participar en interaccions que poden ser covalents o no, constitueixen la clau de la formació dels MIP. Són força selectius amb les espècies per a les quals es desenvolupen. Malauradament, sovint presenten la mateixa capacitat d'interacció amb la molècula objectiu que amb compostos de la seva família (*cross-reactivity*). La combinació de la CEC, que proporciona una eficàcia elevada en temps d'anàlisi curt, amb els polímers d'empremta molecular, que aporten una

metòdica de preparar fases estacionàries de selectivitat predeterminada, representa una prometedora opció per millorar l'efectivitat i la selectivitat dels sistemes electrocromatogràfics de separació. ^{16,113-115}

Pel que fa al sistema d'elució, els electròlits més emprats en CEC amb MIP contenen un 70-90% d'un solvent orgànic, com per exemple l'acetnitril, i un tampó aquós. La combinació dels MIP amb la CEC tot just comença però a partir dels resultats obtinguts es pot dir que presenta un futur força prometedor. La majoria d'estudis s'han aplicat a separacions quirals i enantiomèriques. ¹¹⁴

I.3.4 ELECTROFORESI CAPIL·LAR EN GEL (CGE)

L'electroforesi capil·lar en gel (CGE) permet separar substàncies amb una relació càrrega/massa semblant però que tenen masses moleculars diferents. Aquesta tècnica s'empra en la separació de fragments d'ADN, polisacàrids o complexos proteïna-SDS que no es poden separar ni per CZE ni per MEKC. ¹¹⁶⁻¹¹⁹

El mecanisme de separació en CGE es basa en diferències en la mida dels analítics que migren a través dels porus d'un capil·lar ple d'un gel en solució. Els gels fan de medi anticonvectiu, minimitzen la difusió dels soluts, eviten l'adsorció dels soluts a la paret del capil·lar i contribueixen a eliminar el flux electroosmòtic.

I.3.5 ENFOCAMENT ISOELÈCTRIC CAPIL·LAR (IEF)

S. Hjerten et al.^{120,121} van publicar els primers treballs utilitzant aquesta tècnica emprada habitualment per separar espècies zwitteriòniques que contenen tant grups positius com negatius, com ara els pèptids i les proteïnes.

En IEF, els analits se separen en funció dels punts isoelèctrics. El punt isoelèctric (pI) d'un compost zwitteriònic és un valor de pH pel qual el nombre de càrregues positives és exactament igual al nombre de càrregues negatives. Per tant, quan el solut es troba en el seu pI és un compost neutre.

El solut i la solució que dóna lloc al gradient de pH s'introdueixen en el capil·lar. L'extrem anòdic es posa en una solució àcida (anòlit) i el catòdic, en una solució bàsica (catòlit). Sota la influència d'un camp elèctric, els soluts carregats migren fins a la zona de pH on esdevenen neutres i llavors deixen de migrar. Els diferents soluts carregats d'una barreja tindran diferents pI i per tant quedaran separats en diferents posicions del capil·lar. A continuació, s'aplica pressió alhora que es manté el voltatge per tal d'arrossegar els soluts fins al detector.^{122,123} Per aconseguir que una separació per IEF sigui efectiva, es recomana modificar les parets del capil·lar amb metilcel·lulosa, poliàcrilamida, etc. a fi de reduir o suprimir l'EOF.^{124,125}

I.3.6 ISOTACOFRESI (ITP)

La característica principal de la isotacofresi (ITP) és que té lloc en un sistema electrolític discontinu.^{126,127} La mostra s'injecta entre un electròlit

capdavanter i un de terminal de mobilitats diferents. Els electròlits capdavanter i terminal contenen ions d'una mobilitat superior i inferior, respectivament, a la dels analits a determinar. Com en qualsevol de les altres tècniques electroforètiques, s'aplica un determinat potencial per tal de separar els constituents de la mostra. El mecanisme de separació en ITP es basa en les diferències en les mobilitats electroforètiques dels analits en la zona compresa entre els dos electròlits. Quan s'arriba a l'equilibri, els analits se separen en franges consecutives que migren a la mateixa velocitat cap al detector. Els detectors més emprats en ITP són els de conductivitat o d'absorció UV-visible.^{128,129}

La ITP també es fa servir com a sistema de preconcentració *on-capillary* quan s'utilitza acoblada a la CZE. Hi ha dues configuracions possibles per dur a terme la ITP-CZE segons s'utilitzi un o dos capil·lars. En el primer cas la preconcentració de la mostra i la separació dels analits té lloc en un únic capil·lar.^{130,131} Aquest sistema presenta els avantatges de poder-se automatitzar i de requerir una instrumentació senzilla. L'altra configuració utilitza dos capil·lars acoblats, un per fer la ITP i l'altre per fer la separació.^{132,133} El principal avantatge d'aquest sistema és que no només permet la preconcentració de la mostra sinó que funciona com a sistema de *clean-up*, ja que els constituents de la matriu que no interessen es poden eliminar injectant només la zona d'interès. *J.C. Waterval et al.*¹³⁴ van dissenyar diversos sistemes en què omplien el primer capil·lar amb un sorbent per millorar la preconcentració dels analits.

I.4 BIBLIOGRAFIA

- 1 P. Jandik, Günter Bonn, *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH Publishers, USA, 1993.
- 2 A. Tiselius, Tesi, *Nova Acta Regiae Societas Scientiarum Upsalensis* 1930, Ser. IV, 7, número 4.
- 3 S. Hjerten, *Chrom. Rev.*, 9 (1967) 122.
- 4 R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.*, 123 (1974) 1.
- 5 F.M. Everaerts, J.L. Beckers, T.P.E.M. Verheggen, *Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Practice*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- 6 J.W. Jörgenson, K.D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1298.
- 7 J.W. Jörgenson, K.D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 209.
- 8 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- 9 S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834.
- 10 W.G. Kuhr, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 403 R.
- 11 F. Foret, P. Bocek, *Advances in Electrophoresis*, Vol., 3, VCH Weinheim, (1989) 271.
- 12 Z. Deyl, R. Struzinsky, *J. Chromatogr.*, 569 (1991) 63.
- 13 B.X. Mayer, *J. Chromatogr. A*, 907 (2001) 21.
- 14 J. P. Schaeper, M. J. Sepaniak, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1421.
- 15 H.J. Issaq, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1921.
- 16 T. De Boer, R.A. de Zeeuw, G.J. de Jong, K. Ensing, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2989.
- 17 A.H. Harakuwe, P.R. Hadad, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 213.
- 18 M.-L. Riekkola, S. K. Wiedmer, I.E. Valko, H. Sirén, *J. Chromatogr. A.*, 792 (1997) 13.
- 19 E. Dabek-Zlotorzynska, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2453.

-
- 20 P.D. Grossman, J. Colburn, *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, Academic Press, INC., 1992.
 - 21 R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1993.
 - 22 S.M. Lunte, D.M. Radzik, *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Ltd 1996.
 - 23 K.D. Altria, *Analysis of Pharmaceuticals by Capillary electrophoresis*, Vieweg, Wiesbaden, 1998.
 - 24 m. G. Kaledi, *High Performance Capillary Electrophoresis, Theory, Techniques and Applications*, John Wiley & Sons Ltd, USA, 1998.
 - 25 Y. Chu, *Capillary electrophoresis in Clinical Chemistry in Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2000, 1181.
 - 26 <http://www.ceandcec.com/cetheory.htm>
 - 27 <http://corninfo2.chem.wisc.edu/624Class/Su/modes/modes.html>
 - 28 http://www.nuigalway.ie/ncbes/capillary_electrophoresis.htm
 - 29 H. Poppe, A. Cifuentes, W.Th. Kok, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 261.
 - 30 T.S. Stevens, H.J. Cortes, *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1365.
 - 31 T. Tsuda, K. Nomura, G. Nakagawa, *J. Chromatogr.* 264 (1983) 385.
 - 32 J.L. Beckers, F.M. everaerts, M.T. Ackermans, *J. Chromatogr.*, 537 (1991) 407.
 - 33 M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, *The Science of the Total Environment*, 132 (1993) 133.
 - 34 K.D. Lukacs, J.W. Jorgenson, *HRC & CC*, 8 (1985) 407.
 - 35 R.M. McCormick, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 2322.
 - 36 K. Otsuka, S. Terabe, *J. Microcolumn Sep.*, 1 (1989) 150.
 - 37 W.J. Lambert, D.L. Middleton, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1585.
 - 38 C. Schwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1801.

-
- 39 G.M. McLaughlin, J.A. Nolan, J.L. Lindahl, R.LI. Palmieri, K.W. Anderson, S.C. Morris, J.A. Morrison, T.J. Bronzert, *J. Liq. Chromatogr.*, 961 (1992) 961.
- 40 G.M. Janini, K.C. Chan, J.A. Barnes, G.M. Muschik, H.J. Issaq, *Chromatografia*, 35 (1993), 497.
- 41 K. Sarmini, E. Kendler, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 325.
- 42 K. Sarmini, E. Kendler, *J. Chromatogr. A*, 811 (1998) 201.
- 43 J.C. Reijenga, G.V.A. Aben, Th. P.E.M. Verheggen, F.M. Everaerts, *J. Chromatogr.*, 260 (1983) 241.
- 44 A. Emmer, M. Jansson, J. Roeraade, *J. Chromatogr.*, 547 (1991) 544.
- 45 P.G. Muijselaar, C.H.M.M. de Bruijn, F.M. Everaerts, *J. Chromatogr.*, 605 (1992) 115.
- 46 S. M. Masselter, A. J. Zemann, O. Bobleter, *J. Chromatogr. A*, 693 (1995) 359.
- 47 M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia* 49 (1999) 261.
- 48 J.H. Knox, *Chromatographia*, 26 (1988) 329.
- 49 S. Hjerten, *Electrophoresis*, 11 (1990) 665.
- 50 J.C. Reijenga, T.P.E.M. Verheggen, J.H.P.A. Martens, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr. A*, 744 (1996) 147.
- 51 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 206.
- 52 D. Lee, S.A. Shamsi, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2405.
- 53 N. J. Benz, J. S. Fritz, *J. High Resol. Chromatogr.*, 18 (1995) 175.
- 54 Y. Daali, K. Bekkouche, s. Cherkaoui, p. Christen, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. A*, 903 (2000) 237.
- 55 T. Perez Ruiz, C. Martínez Lozano, A. Sanz, E. Bravo, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1170.
- 56 R. Arias, R. M. Jiménez, R.M. Alonso, M. Telez, I. Arrieta, P.Flores, E. Ortiz-lastra, *J. Chromatogr. A*, 916 (2001) 297.

-
- 57 J.M. Martinez, E.F. Alfonso, G. Ramis Ramos, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2017.
- 58 J. Kruaysawat, P.J. Mariott, J. Huges, C. Trenerry, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2179.
- 59 D. Barron, E. Jiménez Lozano, J. Barbosa, *Chromatographia*, 52 2000 395.
- 60 K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 245.
- 61 K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 3.
- 62 S.H. Jansen, I. Bjornsdottir, J. Tjornelund, *Encyclopaedia of Separation Science*, 2000, 1293.
- 63 Y. Wahlbroehl, J.W. Jorgenson, *J. Chromatogr. A*, 315 (1984) 135.
- 64 J. Tjornelund, S.H. Hansen, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 38 (1999) 139.
- 65 I.E. Valko, H. Siren, M.L. Riekkola, *LC.GC Int.*, 3 (1997) 190.
- 66 M.L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Valkó, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 155.
- 67 N.W. Smith, *J. Chromatogr. A*, 887 (2000) 233.
- 68 W.R. Jones, P. Jandik, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 445.
- 69 S.M. Masselter, A.J. Zemann, *Anal. Chem*, 67 (1995) 1047.
- 70 A. Zemann, D. Volgger, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3243.
- 71 M. F.M. Tavares, R. Clomombara, S. Massaro, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 171.
- 72 J. Farré, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 47 (1998) 630.
- 73 T. Chen-Yuan, C. Yet-Ran, H. Guor-Rong, *J. Chromatogr. A*, 813 (1998) 379.
- 74 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 49 (1999) 261.
- 75 M. C. Barciela Alonso, R. Prego, *Anal. Chim. Acta*, 416 (2000) 21.
- 76 P. Doble, M. Macka, P.R. Hadad, *Trends in Anal Chem.*, 19 (2000) 10.

-
- 77 D. Volgger, A. Zemann, G. Bonn, J. High Resol. Chromatogr., 21 (1998) 3.
- 78 K.D. Altria, D.M. Goodall, M.M. Rogan, *Chromatographia*, 34 (1992) 19.
- 79 P.D. Ferguson, D.M. Goodall, *Trends in Anal Chem.*, 17 (1998) 148.
- 80 S. Hamai, H. Sakurai, *Anal. Chim. Acta*, 402 (1999) 53.
- 81 Y. Dong, A. Huang, Y. Sun, Z. Sun, *Chromatographia*, 48 (1998) 310.
- 82 S. Fanali, C. Cartón, C. Desiderio, *Chromatographia*, 54 (2001) 87.
- 83 M. Miura, Y. Terashita, K. Funazo, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 359.
- 84 A. S. Rathore, C. Hovath, *Electrophoresis*, 19 (1998) 2285.
- 85 Y. Kuwahara, S. Izumoto, H. Nishi, *Bunseki kagaku*, 50 (2001) 69.
- 86 D. N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard Company, P.N. 12-5091-6199, França 1992.
- 87 P. Muijselaar, *Micellar Electrokinetic Chromatography: Fundamentals and Applications*, Tesi, Eindhoven.
- 88 S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman Instruments Inc. USA, 1992.
- 89 K.R. Nielsen, J.P. Foley, *Micellar Electrokinetic Chromatography in Capillary Electrophoresis. Theory and Practice* (Second Edition), Ed. P. Camillery, (1998) Cap. 4, 135.
- 90 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 125 (2000) 2236.
- 91 A. Dworschak, U. Pyell, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 387.
- 92 A. Dworschak, U. Pyell, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 669.
- 93 C.P. Ong, C.L. Ng, H.K. Lee, S.F.Y. Li, *Electrophoresis*, 15 (1994) 1273.

-
- 94 M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. De Jong, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 16 (1998) 1251.
 - 95 L. Ching-Erh, C. Yu-Tai, W. Ta-Zen, *J. Chromatogr. A*, 837 (1999) 241.
 - 96 A. Dworschak, U. Pyell, *J. Chromatogr. A*, 848 (1999) 387.
 - 97 M.L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I. E. Valkó, H. Sirén, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 13.
 - 98 K.D. Altria, *J. Chromatogr. A*, 892 (2000) 171.
 - 99 S.Pedersen-bjergaard, C. Gabel-Jensen, S.H. Hansen, *J. Chromatogr. A*, 897 (2000) 375.
 - 100 C. Gabel-Jensen, S.H. Hansen, S.Pedersen-bjergaard, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1330.
 - 101 M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Electrophoresis*, 22 (2001) 2542.
 - 102 M.G. Schmid, N. Grobuschek, O. Lecnik, G. Gubtiz, *J. Biochemical and Biophysical Methods*, 48 (2001) 143.
 - 103 D. Wistuba, V. Schurig, *Electrophoresis*, 21 (2000) 4136.
 - 104 C.Y. Liu, *Electrophoresis*, 22 (2001) 612.
 - 105 Q.L. Tang, M.L. Lee, *Trends in Anal. Chem.*, 19 (2000) 648.
 - 106 L.A. Colon, G. Burgos, T.D. Maloney, J.M. Cintron, R.L. Rodríguez, *21 Electrophoresis* (2000) 3965.
 - 107 Norman Smith, *Capillary Electrochromatography*, Beckman Coulter Inc. 1999.
 - 108 H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia*, 42 (1996) 42.
 - 109 B. Behnke, E.J. Bayer, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 93.
 - 110 K. Altria, N.W. Smith, C.H. Turnbull, *Chromatographia*, 46 (1997) 664.
 - 111 M.G. Cikalo, K. D. Bartle, P. Myers, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1820.

-
- 112 L. Zhen, Z. Hanfa, Y-N. Jian, Z. Zhang, *Analytica Chim. Acta*, 378 (1999) 73.
- 113 L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A.*, 817 (1998) 5.
- 114 P.T. Vallano, V.T. Remcho, *J. Chromatogr. A.*, 887 (2000) 125.
- 115 K. Haupt, *The Analyst*, 126 (2001) 747.
- 116 <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/sep/electrop/electrop.html>
- 117 P.G. Righetti, C. Gelfi, *Capillary electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL 1996, 431.
- 118 H.J. Issaq, K.C. Chan, G.M. Muschik, *Electrophoresis*, 18 (1997) 1153.
- 119 http://www.biocom.ltd.uk/prodcats/electro/page_8.html
- 120 S. Hjerten, M.D. Zhu, *J. Chromatogr.*, 346 (1985) 265.
- 121 S. Hjerten, J..L. Liao, K. Yao, *J. Chromatogr.*, 387 (1987) 127.
- 122 <http://sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn/Research/CE/ce.html>
- 123 <http://micromachine.stanford.edu/~aeh/cIEF.html>
- 124 V. Neuhoff, W.B. Schill, H. Xternbach, *J. Biochem.*, 117 (1970) 623.
- 125 G.M. Janini, R.J. Fischer, L.E. Henderson, H.J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr.*, 18 (1995) 3617.
- 126 P. Gebauer, P. Bocek, *Electrophoresis*, 21 (2000), 3898.
- 127 F. Kvasnicka, *Electrophoresis*, 21 (2000), 2780.
- 128 T. Buzinkaiova, J. Polonský, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2839.
- 129 M. Pospíšilová, M. Polasek, V. Jolk, *J. Pharmaceutical and Biomedical Análisis*, 24 (2001)421.
- 130 J. Bergman, U. Jaehde, W. Scunack, *Electrophoresis*, 19 (1998) 305.
- 131 B. Toussaint, Ph. Hubert, U.R.Tjarden, J. Van der Greef, J. Crommen, *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 173.

- 132 S. Chen, M. Lee, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3777.
- 133 F. Kvasnicka, M. Voldrich, *J. Chromatogr. A*, 891 (2000) 175.
- 134 J.C. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwesen, A. Bult, H. Lingeman, W.J.M. Underberg, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2851.

CAPÍTOL II

ESTAT DE LA QÜESTIÓ

II.1 CARACTERÍSTIQUES I INCIDÈNCIA MEDIAMBIENTAL DELS COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS: BENZENSULFONATS (BZS) I NAFTALENSULFONATS (NS)

Els àcids aromàtics sulfònics o les seves sals no són substàncies d'origen natural sinó que se sintetitzen per sulfonació d'hidrocarburs aromàtics (benzens, naftalens, antracens i antraquinones) o dels seus derivats. Aquest procés de sulfonació comporta un nombrós conjunt de compostos isomèrics que poden contenir un nombre diferent de grups sulfònics així com altres grups (amino, hidroxí, nitro, etc.). Aquesta diversitat els confereix característiques molt diferents i en dificulta la determinació.

Els compostos aromàtics sulfonats són molt emprats, ja sigui en processos industrials o com a primeres matèries en la fabricació de diversos productes de consum.^{1,2} Són utilitzats, per exemple, com a agents dispersants i humidificadors en diversos processos industrials i en la producció d'abrillantadors, tints, fàrmacs, plaguicides, etc.^{1,3,4}

Encara que fa molts anys que aquest tipus de compostos es fabriquen i s'utilitzen, és limitada la informació que se'n té sobre la toxicologia i ecotoxicologia.^{5,6} L'estudi més complet en aquest camp data de l'any 1974 i correspon a uns treballs recollits per l'Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance (BUA) del Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh).⁵ Aquest informe posa de manifest el perfil toxicològic i ecotoxicològic de 33 substàncies classificades en diferents subgrups: benzensulfonats, estilbensulfonats, difenilsulfonats, naftalensulfonats, àcids alcansulfonats i altres compostos que no es poden assignar a un d'específic. Encara que pels resultats obtinguts a partir de diversos testos sobre toxicitat sembla que aquests compostos tenen una toxicitat baixa i no presenten

efectes genotòxics o cancerosos, la seva persistència microbiològica representa un risc mediambiental que cal tenir en compte. En aquest treball també es recullen els resultats de diversos estudis sobre la biodegradabilitat i la bioacumulació d'alguns compostos aromàtics sulfonats; malauradament, a causa del limitat nombre de compostos estudiats, a partir d'aquest estudi no se'n poden treure conclusions clares sobre el comportament mediambiental.

En general, els compostos aromàtics sulfonats són molt àcids ($pK_a < 1$) i, consegüentment, molt hidrofílics.⁷ Són molt solubles en aigua i a causa del baix coeficient de distribució *n*-octanol-aigua ($\log K_{ow} < 2.2$), gairebé no s'adsorbeixen en la matèria orgànica, cosa que els facilita la mobilitat.^{5,7} A diferència dels alquilbenzensulfonats lineals, un nombre important de compostos aromàtics sulfonats presenten una biodegradabilitat baixa i, com que habitualment no s'arriben a eliminar del tot durant els processos que tenen lloc en la majoria de plantes de tractament d'aigües residuals, fan cap al medi aquàtic.⁸⁻¹¹

Els benzensulfonats (BZS) i els naftalensulfonats (NS), objecte d'aquest estudi, constitueixen un grup important de compostos aromàtics sulfonats (*figura II.1*). Segons les condicions de sulfonació dels precursors, com ja s'ha esmentat anteriorment de forma general per als compostos aromàtics sulfonats, es poden obtenir barreges d'isòmers que contenen un o més grups sulfònics amb la presència d'altres grups o sense. Recentment, *M.C. Alonso et al.*¹² han recollit les propietats i els principals usos d'alguns BZS i NS.

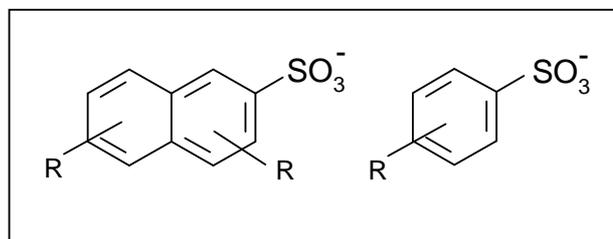


Fig. II.1 Estructures dels BZS i NS objecte d'aquest estudi. Aquests compostos poden contenir o no grups (R) com ara: SO_3^- , NH_2 , OH , NO_2

Els BZS s'utilitzen com a productes intermedis en la producció de colorants, substàncies per a l'adob de pells, catalitzadors, herbicides, fàrmacs i productes químics per a síntesi orgànica.

Els NS es fan servir com a productes intermedis en la fabricació de diversos productes com ara colorants sintètics, abrillantadors òptics, substàncies blanquejants fluorescents, plaguicides, fàrmacs, etc. També s'utilitzen com a agents humidificadors i dispersants i com a additius en la fabricació de ciment i formigó. Els NS són els precursors en la formació de productes de condensació polimèrics amb formaldehid coneguts com formaldehid-naftalensulfonats (SNFC). Els SNFC estan formats per barreges complexes d'isòmers i homòlegs, que s'utilitzen sobretot com a additius per a formigó i com a substàncies dispersants i adobants.^{1,3}

Una part important dels compostos en estudi es descarrega en les aigües residuals de producció i procés i, a causa de les seves propietats fisicoquímiques esmentades abans, s'hi mantenen. La persistència de diversos d'aquests compostos, principalment dels compostos substituïts amb grups amino, hidroxil, nitro o amb algun grup sulfonat addicional, ha estat recollida en diversos estudis microbiològics.¹³⁻¹⁸

Malgrat que són compostos no regulats, de baixa toxicitat i que no se'ls coneixen efectes genotòxics o cancerosos, el seu caràcter xenobiòtic, la persistència microbiològica d'alguns en aigües naturals i el gran volum que s'utilitzen en la fabricació d'un bon nombre de productes, han fet que l'interès hagi augmentat en els darrers temps i que força grups de treball hagin desenvolupat diferents mètodes per determinar-los. Han mirat d'establir la procedència i el camí que segueixen aquests compostos en aigües mediambientals que sovint són emprades com a font de subministrament d'aigües de consum.

II.2 ESTUDI BIBLIOGRÀFIC DE LA DETERMINACIÓ DELS BZS i NS

Tal com s'ha comentat anteriorment, la provada persistència en el medi aquós d'alguns d'aquests compostos així com la dificultat que presenta la separació a causa de la gran varietat d'isòmers, ha comportat que en els darrers anys l'interès per aquests compostos hagi anat incrementant-se. Així doncs, al llarg d'aquest temps s'han establert diferents mètodes d'anàlisi que han anat evolucionant d'acord amb el desenvolupament tecnològic de la instrumentació analítica. De les diverses tècniques analítiques que s'han emprat, algunes –com la cromatografia de gasos o la de líquids de bescanvi iònic– han caigut pràcticament en desús, mentre que d'altres –com la cromatografia de líquids en fase inversa o l'electroforesi capil·lar– han esdevingut les més utilitzades.

A continuació es farà referència a cadascuna de les tècniques aplicades en la determinació d'aquest tipus de contaminants. Dels grups de compostos que formen l'extensa família dels compostos aromàtics sulfonats, ens centrarem en la determinació dels benzensulfonats (BZS) i

naftalensulfonats (NS) , ja que són els compostos que s'han estudiat en la present tesi.

Tal com es recull en diverses revisions científiques, el nombre de mètodes desenvolupats per determinar BZS i NS és força important.^{19,20} Això ve motivat pel fet que aquests compostos són difícils de separar a causa de la polaritat i la diversitat i similitud dels seus isòmers. En general, són àcids forts, gairebé completament dissociats en solucions aquoses dins d'un ampli interval de pH. Es tracta de compostos no volàtils i la selectivitat de la separació depèn de manera molt significativa del nombre de grups sulfonats que contenen, del caràcter de l'anell aromàtic i de la naturalesa, quantitat i posició dels substituents.

II.2.1 TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES

Cromatografia de gasos

La cromatografia de gasos (GC) és una de les tècniques més emprades per determinar diversos contaminants en mostres mediambientals de característiques diferents. El seu elevat poder de resolució així com els sensibles i selectius detectors que s'hi poden acoblar han fet que la GC sigui considerada una eina poderosa en la determinació d'un ampli ventall de compostos.

Malgrat les seves característiques i haver estat una de les primeres tècniques aplicades a la determinació de BZS i NS,^{21,22} actualment té una aplicabilitat limitada perquè es tracta de compostos no volàtils, amb pressions de vapor baixes que difícilment es poden derivatitzar, sobretot en

presència d'altres grups funcionals.²³⁻²⁸ Els diversos procediments de derivatització descrits a la bibliografia només són efectius per als isòmers monosulfonats i no per als isòmers amb més d'un grup sulfonat ni tampoc per als que contenen d'altres grups com ara hidroxil, nitro, o amino; a més a més, de vegades és necessari introduir etapes de neteja de les mostres per tal d'evitar la descomposició dels productes durant la formació dels derivats.²³⁻²⁸ Malgrat tot això, encara hi ha alguns autors que continuen utilitzant la GC amb columnes capil·lars perquè proporciona molt bones separacions per als compostos isomèrics; en aquests moments, s'estan desenvolupant nous sistemes de derivatització més ràpids i senzills.²⁶⁻²⁹

Cromatografia de líquids

La introducció de la cromatografia de líquids va resoldre la problemàtica que plantejava la cromatografia de gasos en la determinació dels compostos aromàtics sulfonats en estudi. Aquest fet, juntament amb al gran progrés dels darreres anys en l'acoblament entre la cromatografia de líquids i l'espectrometria de masses, ha contribuït que aquesta tècnica sigui àmpliament emprada per molts autors.

Cromatografia de líquids de bescanvi iònic

La cromatografia de líquids de bescanvi iònic³⁰⁻³⁴ ha estat ocasionalment emprada en la determinació de BZS i NS però ha caigut en desús a causa de la manca de selectivitat pel que fa a la separació de diferents compostos isomèrics i, sobretot, per la forta retenció d'alguns d'aquests compostos en diverses reïnes de bescanvi iònic.³⁰ Malgrat això, recentment *G. Socher et al.*³⁵ l'han utilitzat acoblada a l'espectrometria de masses en la determinació d'una barreja de compostos aromàtics sulfonats, entre els quals diversos

BZS i NS, emprant una columna aminopropílica i una fase mòbil d'acetat amònic-àcid acètic i acetonitril en règim de gradient. Els autors conclouen que la resolució cromatogràfica del seu mètode és comparable a l'obtinguda mitjançant la cromatografia de líquids amb addició de parells iònics.

Cromatografia de líquids d'alta resolució en fase inversa

La cromatografia de líquids d'alta resolució en fase inversa amb ^{34,36-72} o sense ^{26,28,73-83} l'addició de parells iònics és la tècnica més emprada en la determinació dels compostos d'interès.

En l'anàlisi de BZS i NS mitjançant la cromatografia de líquids, amb l'addició de parells iònics o sense, les columnes més emprades són les sílices enllaçades amb grups funcionals octadecil (C₁₈), ^{26,34,36-64,73-80} encara que en alguns casos també s'han emprat columnes que contenen grups octil (C₈). ^{28,36,37,65-70,81} Generalment s'utilitzen les columnes C₁₈ perquè permeten separar la majoria de compostos aromàtics sulfonats, tot i que les de C₈, de vegades, donen millors resultats per a alguns compostos com ara els naftalensulfonats no substituïts. ⁶⁸ Recentment, alguns autors han introduït les microcolumnes (columnes de diàmetre intern més petit) de C₁₈ en la determinació dels compostos en estudi. ⁷⁸⁻⁸⁰ Aquestes columnes presenten diversos avantatges: permeten reduir el consum de fase mòbil, ja que treballen amb fluxos més baixos que les columnes convencionals; permeten treballar amb volums de mostra més petits augmentant l'eficàcia de les columnes empaquetades respecte les columnes convencionals, i faciliten l'acoblament a l'espectrometria de masses, pel fet de treballar amb volums més petits. Malauradament també presenten certs inconvenients que en limiten l'ús, entre els quals cal esmentar el cost elevat i la limitada estabilitat mecànica.

Les columnes polimèriques, sobretot les d'estirè-divinilbenzè (PS-DVB), també s'han utilitzat per determinar BZS i NS.^{38,71} Per exemple, *H. Sirén et al.*³⁸ van avaluar tres columnes de diferents característiques –una de PS-DVB, una d'estirè-divinilbenzè metacrilat (PS-DVBMA) i una C₁₈– en l'optimització de la separació cromatogràfica d'una barreja d'àcids naftalensulfònics amb substituents nitro i hidroxil. Com a resultat del seu estudi, els autors conclouen que les columnes polimèriques, igual que les de base sílice convencionals, permeten la separació d'hidroxi-naftalensulfonats substituïts dins d'un ampli interval de pH; les polimèriques, però, presenten un poder de retenció més elevat i milloren la separació.

Es poden trobar també algunes referències en què es van emprar sílices enllaçades amb altres grups, com el cianopropil (CN),^{82,83} per separar naftalenmonosulfonats no substituïts o d'altres en què, per determinar diversos compostos aromàtics sulfonats, es va emprar la tri-*n*-octilamina com a fase estacionària.⁷¹

Cromatografia de líquids sense addició de parells iònics

En la cromatografia de líquids sense addició de parells iònics s'empren fases mòbils que contenen un solvent orgànic (metanol, isopropanol o acetonitril) i una solució aquosa amb sals inorgàniques (sulfats, fosfats, acetats) en concentracions de 0.1-0.5 M per tal de controlar la separació dels BZS i NS.^{26,28,73-83} Encara que per a la majoria de compostos aromàtics sulfonats els resultats obtinguts amb l'addició de parells iònics és millor, ja que s'obtenen separacions satisfactòries amb un temps d'anàlisi més curt, en algun cas es recomanen fases mòbils sense addició de parells iònics.

*P. Jandera et al.*³⁷ van comparar els resultats obtinguts emprant una fase mòbil amb addició de parells iònics amb una altra amb addició de sals inorgàniques. Encara que el comportament cromatogràfic per a alguns dels compostos estudiats va ser molt semblant, es van trobar certes diferències de selectivitat per a d'altres. Per exemple, la separació d'una barreja de naftalensulfonats que tenia d'un a quatre grups sulfònics només es va aconseguir en les fases mòbils que contenien sals inorgàniques.

Recentment, *P. Jandera et al.*⁸⁰ van aplicar a la separació de NS mitjançant la cromatografia de líquids la seva experiència en la utilització de ciclodextrines per controlar la selectivitat en separacions electroforètiques de barreges complexes d'aquests compostos. En aquest estudi els autors van fer servir com a fases mòbils solucions d'aigua o d'aigua-metanol amb sulfat sòdic o hidrogensulfat de tetrabutilamoni amb l'addició de β -ciclodextrina i trietilamina o sense. Els autors van concloure que la complexació dels NS amb la β -ciclodextrina augmentava la retenció d'aquests compostos i modificava satisfactòriament la selectivitat de la separació.

Cromatografia de líquids amb addició de parells iònics

En la cromatografia de líquids amb addició de parells iònics s'utilitzen fases mòbils aquoses^{34,36-72} que contenen un solvent orgànic (metanol o acetonitril) i un reactiu de parell iònic afegit per tal de millorar el procés de separació cromatogràfica. En la majoria d'aquests treballs s'addicionen diferents sals iòniques (perclorats, sulfats, fosfats, clorurs, etc.) com a modificadors de la força iònica en l'equilibri de distribució dels analits entre les fases orgànica i aquosa.

Encara que el parell iònic més emprat és el tetrabutilamoni (TBA),^{34,36,37,39,41-49,51-54,59,60} també es poden trobar algunes referències en què s'utilitzen altres reactius de parell iònic com ara el tetrametilamoni (TMA),³⁷ el tetraetilamoni (TEA),³⁷ el tetradeciltrimetilamoni (TDTMA),³⁸ o el cetiltrimetilamoni (CTA).^{28,38,50,67,68} Quan s'empren parells iònics de cadena més llarga, les concentracions necessàries per obtenir separacions satisfactòries són més baixes que quan es fan servir els de cadena més curta.

*A. Ohki et al.*⁴⁰ van emprar reactius diònics com a parells iònics. Els reactius diònics són ions lipofílics difosfònics que tenen dos centres catiònics per molècula. Els autors van utilitzar l'octametilbis(tributilfosfoni) i el tetrabutilfosfoni com a parells iònics per separar quatre naftalendisulfonats i van concloure que, en la separació d'espècies dianiòniques com els naftalendisulfonats, els parells iònics amb més d'un centre iònic són més efectius que els que només en tenen un.

Els resultats obtinguts en els diferents estudis realitzats per avaluar la influència dels principals paràmetres cromatogràfics (fase estacionària, temperatura de la columna, composició de la fase mòbil i sistema d'elució) en diferents barreges de compostos aromàtics sulfonats, que continguin entre d'altres els analits d'interès, posen de manifest que el nombre de grups sulfònics així com la presència o absència d'altres substituents (grups amino i/o hidroxil) i, fins i tot, la posició respecte els grups sulfònics, tenen un paper molt important i fan que no sigui possible generalitzar els efectes produïts pels diversos paràmetres.^{36-39,41-45,50,51,68,71} Un exemple molt aclaridor del que s'acaba de comentar es pot trobar en el treball de *C. Prandi et al.*,³⁶ on es determinen un grup de 108 sulfonats aromàtics (25

benzensulfonats, 72 naftalensulfonats i 11 antraquinones) i s'estableixen les relacions entre l'estructura dels compostos i el comportament cromatogràfic.

Cromatografia de líquids electroquímicament modulada

La cromatografia de líquids electroquímicament modulada (EMLC) ⁸⁴⁻⁸⁶ també s'ha emprat en la separació dels compostos en estudi. Aquesta tècnica cromatogràfica consisteix en la manipulació electroquímica dels factors de capacitat dels analits, tant abans com durant l'elució d'una columna empaquetada amb una fase estacionària conductiva. El principal avantatge és la capacitat de manipular la retenció i millorar l'eficàcia de separació només a través dels canvis de potencial aplicats a la fase estacionària. *M.D. Porter et al.* ⁸⁴⁻⁸⁶ han demostrat que l'EMLC pot ser satisfactòriament aplicada a la separació de diferents analits, incloent-hi diversos BZS i NS.

Detectors

Un altre aspecte important en el desenvolupament d'un mètode analític és el sistema de detecció emprat. Encara que el detector més àmpliament utilitzat en cromatografia de líquids per determinar els compostos d'interès ha estat el d'absorbància UV-visible, ^{36-52,59-61,71-76,79-83} cada cop hi ha més publicacions en què recorren a detectors més sensibles i selectius com són els de fluorescència ^{28,51,53,79,66} i els d'espectrometria de masses. ^{26,54,55,58,60,73,78}

Avui dia hi ha un interès creixent en l'ús de l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses. Malauradament, aquesta tècnica amb addició dels parells iònics convencionals, sals de

tetralquilamoni, és inviable per diversos motius derivats de la no-volatilitat d'aquestes sals. Això ha motivat diversos autors a introduir parells iònics volàtils, com ara les amines alifàtiques, en l'acoblament d'aquestes tècniques. Encara que la trietilamina^{54,55-58,62-64,70} és el parell iònic volàtil més emprat, alguns autors proposen fer servir d'altres trialkilamines, com ara la tri-*n*-butilamina, sobretot per als compostos més polars.^{70,73}

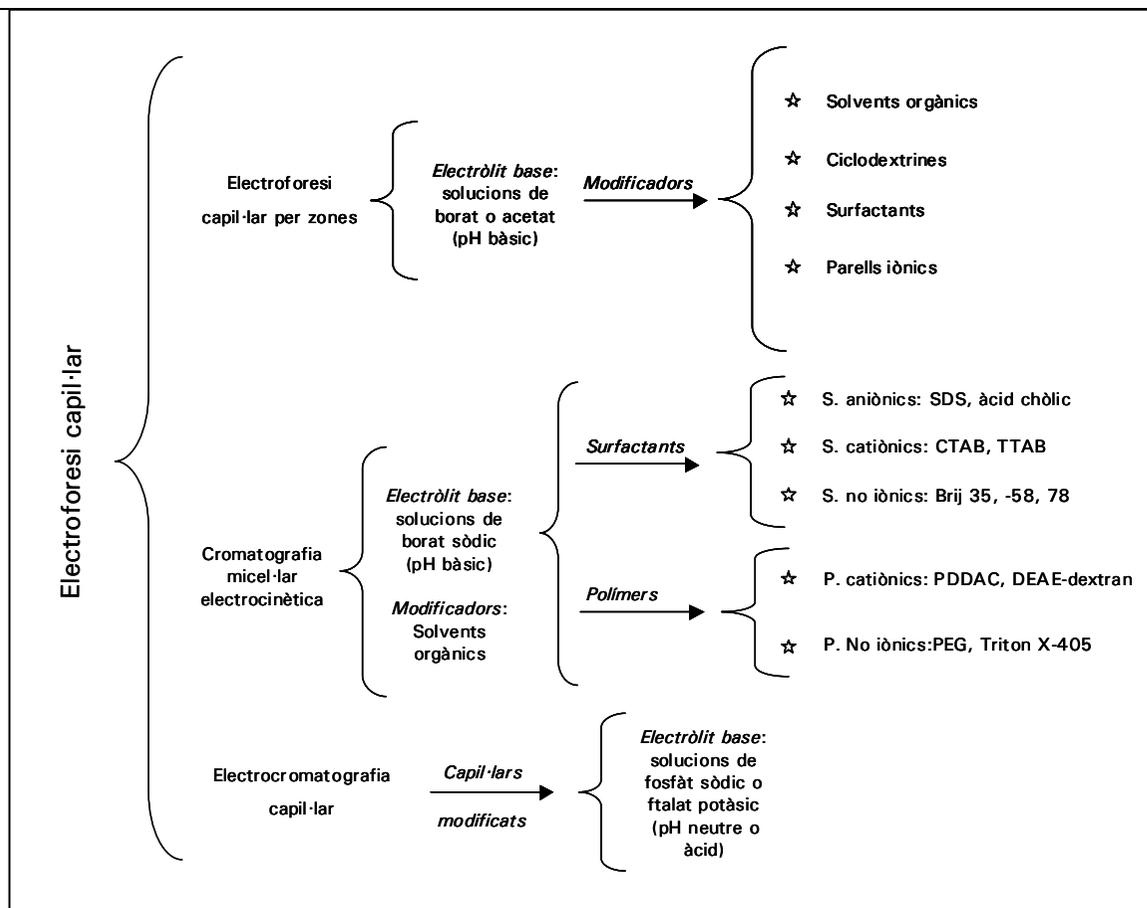
*T. Storm et al.*⁷⁰ van estudiar l'aplicabilitat de tres trialkilamines (trietilamina, *N,N*-dimetil-*n*-butilamina i tri-*n*-butilamina) com a parells iònics en la determinació d'una barreja de 19 compostos aromàtics sulfonats, entre els quals diversos BZS i NS, en un sistema amb detecció per espectrometria de masses. En aquest estudi es va posar de manifest que amb la trietilamina i la *N,N*-dimetil-*n*-butilamina només es retenien prou alguns compostos monosulfonats, com ara l'1- i el 2-naftalesulfonat, però no els compostos més polars disulfonats- i trisulfonats i els compostos hidroxinaftalensulfonats. En canvi, amb la tri-*n*-butilamina fins i tot els compostos més polars eren fortament retinguts en les mateixes condicions.

Recentment, *G. Socher et al.*⁶⁰ han desenvolupat un mètode amb què es determinen, entre d'altres, diversos BZS i NS emprant un parell iònic no volàtil (una sal de TBA) i un sistema de detecció mitjançant l'espectrometria de masses. En aquest estudi, els autors introdueixen un cartutx supressor de bescanvi catiònic entre el detector UV-visible i la interfície (electrosprai o ionització química de pressió atmosfèrica) de l'espectròmetre de masses per eliminar el parell iònic. Els resultats obtinguts els han permès concloure que amb el sistema desenvolupat es poden eliminar completament els ions de TBA sense perdre resolució cromatogràfica i que, per tant, és totalment compatible amb l'espectrometria de masses.

II.2.2 TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES

Des de principis dels anys noranta, l'ús de l'electroforesi capil·lar en l'anàlisi de BZS i NS s'ha incrementat. Els avenços recents en la instrumentació i la gran versatilitat d'aquesta tècnica, que com ja s'ha comentat en el capítol anterior permet operar en diferents modes de separació emprant un únic instrument, juntament amb els avantatges que presenta, com ara una elevada eficàcia de separació, rapidesa o consum mínim de reactius i mostra (de l'ordre de nl), han possibilitat que esdevingui una alternativa a les tècniques cromatogràfiques esmentades més amunt.^{19,20,87-90} En general, els autors que han comparat l'efectivitat d'ambdues tècniques per a la determinació de BZS i NS conclouen que les dues són adequades i en certa manera complementàries, ja que mentre l'electroforesi capil·lar és més ràpida, senzilla, econòmica i dona separacions amb eficàcies més elevades, la cromatografia de líquids és més sensible.⁸⁸⁻⁹⁰

Encara que les tècniques electroforètiques més emprades en l'anàlisi de BZS i NS són l'electroforesi capil·lar per zones (CZE)^{88,90,91-123} i la cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC),^{89,95,98-100,103,115,117,124-126} també es poden trobar algunes referències en què s'utilitza l'electrocromatografia capil·lar (CEC).¹²⁷⁻¹²⁹ Moltes d'aquestes aplicacions se centren en l'estudi del procés de separació i això implica l'optimització de diferents variables com poden ser la composició de l'electròlit, les característiques del capil·lar, les condicions de separació (potencial i temperatura), el mode de treball o el sistema d'injecció. A la *figura II.2* s'esquematitzen les diferents tècniques electroforètiques desenvolupades per separar els compostos aromàtics sulfonats en estudi.



Abans de començar a discutir els diversos paràmetres emprats per optimitzar la separació dels compostos en estudi, s'ha considerat convenient comentar-ne el comportament electroforètic en termes generals quan es treballa en condicions de pH bàsic, que són les més habituals. La càrrega elèctrica d'un naftalensulfonat o d'un benzensulfonat en el pH de treball ve determinada pels valors de pK_a dels diferents grups (SO_3^- , NH_2 , OH) presents en el compost. Com que els àcids sulfònics són àcids molt forts, en condicions de pH bàsic, cada grup SO_3^- representa una càrrega negativa; això explica, per exemple, que els isòmers amb un sol grup SO_3^- elueixin abans que els que en tinguin dos. Atès que els isòmers amb grups NH_2 tenen pK_a inferiors a 6, la influència d'aquests grups serà més significativa quan es treballi en condicions de pH àcid. La influència dels substituents hidroxil és força important en condicions de pH bàsic; amb valors de pK_a de 9.2 i 9.5 per als grups 1- i 2-OH respectivament, cal esperar que la mobilitat electroforètica dels compostos que continguin un o més grups OH es vegi fortament influïda dins d'aquest l'interval de pH.

Electroforesi capil·lar per zones

En electroforesi capil·lar per zones (CZE), l'elecció del tipus i de la composició (força iònica i pH) de l'electròlit és el primer pas per optimitzar una separació electroforètica. Les solucions més habitualment emprades com a electròlits en la separació dels compostos d'interès són les solucions de fosfat sòdic (10-70 mM, pH 7.0-8.0)^{88,91-93,124,125} i les de borat sòdic (10-50 mM, pH 8.7-9.2).^{88,90,94-116,126} En alguns casos també s'han emprat barreges fosfat/borat (25 mM 1:1, pH 8.0)⁸⁸ i solucions d'acetat amònic (10-100 mM, pH 10.5).^{108,118,119} En la separació de naftalensulfonats no substituïts també s'han utilitzat solucions molt poc habituals com ara l'àcid 2-(N-morfolino)etanosulfònic (MES, 10 mM, pH 6.0),¹²⁰ l'àcid clorhídric (10

mM, pH 2.0)¹²¹ i l'àcid fòrmic/perclorat sòdic (20 mM, pH 2.8).¹²² De totes, les solucions de borat sòdic són les més adequades per a la separació dels compostos en estudi, excepte en l'acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses, en què es fan servir solucions d'acetat amònic per la seva volatilitat.

El pH de l'electròlit és el paràmetre més important en l'optimització de la separació d'una barreja de compostos iònics, ja que afecta tant el flux electroosmòtic com la càrrega global dels analits. La influència del pH en la separació de barreges de BZS i NS ha estat investigada per diversos autors.^{97,99,102,103} Petites variacions de pH (de 0.1 unitats) poden afectar molt significativament la selectivitat d'aquests compostos.^{99,102,103}

Atès que els naftalensulfonats no substituïts són àcids molt forts, no se'n pot aconseguir la separació ajustant el pH de l'electròlit, ja que es troben totalment ionitzats dins d'un interval de pH molt ampli. Els amino-naftalensulfonats, en canvi, són àcids febles i la ionització sí que es pot controlar ajustant el pH de l'electròlit si es treballa a pH àcid; a pH bàsic, però, es troben en forma no ionitzada i tampoc es poden separar. Per altra banda, la ionització dels compostos amb grups hidroxil sí que es pot modificar ajustant el pH de l'electròlit en condicions bàsiques.

*M. Zenki et al.*⁹⁷ van aprofitar el fet que els naftalensulfonats amb grups amino són àcids febles per estudiar la resolució d'una barreja de deu amino-naftalensulfonats isomèrics (pK_a 2.2-4.8) en unes condicions de treball en què el pH de l'electròlit fos proper al seu pK_a . En aquest estudi es va utilitzar una solució de borat (pH 9.2) com a electròlit i diversos sucres per ajustar el pH al pK_a dels analits. Comparant els resultats obtinguts a valors de pH propers al pK_a dels analits amb els obtinguts al pH de l'electròlit sense

ajustar, els autors van observar una millora molt significativa de la resolució dels compostos quan es treballava a valors de pH propers al seu pK_a . Aquest estudi va demostrar la possibilitat de resoldre aquests analits a pH àcid.

La selecció de les condicions de separació (voltatge i temperatura) és el pas següent en l'optimització d'una separació electroforètica. *S.J. Kok et al.*⁹⁹ van fer un estudi exhaustiu per comprovar com afectava la temperatura a la separació d'una barreja de 21 naftalensulfonats isomèrics. Augmentar la temperatura de -6°C a 46° produïa una disminució de 6 min en el temps d'anàlisi. Malauradament, també van observar una petita però significativa pèrdua de resolució per a alguns dels compostos. Els autors van establir treballar a temperatura ambient, ja que ni el temps d'anàlisi ni les millores de resolució obtingudes treballant a -6°C eren gaire significatives.

Introducció de modificadors en CZE

En la separació de compostos com els que ens ocupen, entre els quals hi ha diversos isòmers amb mobilitats tan semblants que no s'arriben a separar optimitzant els paràmetres bàsics, l'addició de diferents modificadors com ara solvents orgànics, tensioactius, ciclodextrines etc. a l'electròlit base contribueix significativament a millorar la selectivitat de la separació.

Solvents orgànics

L'afegiment de solvents orgànics a l'electròlit produeix efectes molts complexos en la selectivitat d'una separació, ja que pot afectar tant el flux electroosmòtic com les mobilitats electroforètiques dels analits.

*S.J. Kok et al.*⁹⁹ van estudiar l'efecte que produïa l'addició de diferents solvents orgànics (metanol i acetonitril) en la separació d'una barreja de naftalenmonosulfonats- i disulfonats. Els autors van demostrar que la selectivitat no només es veia afectada pel percentatge de solvent orgànic sinó també, i de manera molt significativa, per la naturalesa. Mentre que l'addició d'un 15% (v/v) d'acetonitril va permetre millorar la resolució de diversos compostos, l'addició de metanol (1-5% (v/v)) només va contribuir a eixamplar pics. *M.J. Cugat et al.*¹¹⁵ també van estudiar com afectava l'addició de diferents solvents orgànics (metanol, etanol, isopropanol i acetonitril) en concentracions de fins al 20% (v/v) en la separació d'una barreja de naftalendisulfonats. Els autors van demostrar que per separar aquests compostos en estudi els solvents pròtics eren més adequats que els apròtics i que la millora de la selectivitat de la separació anava molt estretament lligada a la longitud de la cadena dels solvents pròtics, especialment els de cadena més llarga.

Ciclodextrines

Les ciclodextrines són àmpliament emprades en CZE com a selectors quirals en la resolució d'isòmers òptics. Però, tal com s'ha comentat en el capítol anterior, a causa de l'accessibilitat diferent a la cavitat present en la seva estructura, també poden contribuir a millorar la resolució d'isòmers posicionals com ara els naftalensulfonats.

P. Jandera et al.^{88,102} van estudiar com afectava afegir a l'electròlit diferents tipus de ciclodextrines (α -, β - i γ -ciclodextrines) a la selectivitat de la separació de diverses barreges de naftalenmonosulfonats- a tetrasulfonats i d'hidroxi- i amino- derivats. Mentre que l'addició de β - ciclodextrines va permetre resoldre els derivats hidroxi- i amino-, els isòmers no substituïts

només es van resoldre afegint-hi barreges d' α - i γ -ciclodextrines. L'optimització del pH de l'electròlit va tenir un paper molt important en la resolució dels derivats i l'aplicació de pressions elevades durant la separació va contribuir de manera molt significativa a reduir els temps d'anàlisi sense perdre resolució.

S. Hamai et al.^{91,123} van provar l'efectivitat de l'addició de la β -ciclodextrina en la resolució dels isòmers 1- i 2-naftalensulfonat, proposant la utilització de l'isòtop deuterat D com a modificador per millorar la resolució en aquest tipus de separacions. Els autors van concloure que la substitució de H₂O per D₂O a l'electròlit augmentava els temps de migració i, en aquest cas, afavoria la complexació d'inclusió de la β -ciclodextrina i el naftalensulfonat, i en millorava la resolució.

L'addició de ciclodextrines modificades (hidroxipropil α - i β -ciclodextrines) a l'electròlit per millorar la selectivitat d'una barreja de 21 isòmers, va produir canvis en l'ordre de migració dels compostos, eixamplament dels pics i, consegüentment, una pèrdua general de resolució.⁹⁹

Tensioactius

La selectivitat d'una separació electroforètica per CZE també es pot modificar amb l'addició de tensioactius en concentracions per sota de la seva concentració micel·lar crítica (si són superiors es produeix la MEKC). L'addició d'un tensioactiu catiònic (bromur de cetiltrimetilamoni, CTAB) a l'electròlit en la determinació d'una barreja de BZS i NS no només va contribuir a invertir el flux electroosmòtic sinó que va introduir interaccions addicionals que van modificar la selectivitat de la separació.¹¹⁰ Considerem important destacar que quan el procés es va dur a terme sense l'addició de

solvents orgànics, no es va aconseguir separar cap dels compostos estudiats; en canvi, afegint-hi diferents solvents orgànics (metanol, etanol, 1-, 2-propanol, 1-, 2-butanol i acetonitril), es va obtenir la resolució de la majoria dels analits. Els millors resultats es van assolir amb l'addició de 2-propanol. *S.J. Kok et al.*⁹⁹ també van observar que l'addició d'aquest tipus de modificadors (bromur de tetraetilammoni, TTAB, i CTAB) sense l'addició de solvents orgànics només donava pics amples no resolts.

Parells iònics

Alguns autors han utilitzat diversos parells iònics per tal de millorar la selectivitat en separacions de barreges de naftalensulfonats no substituïts.

T. Takanayagi et al.^{92,93,96,104-106,120} van dur a terme diferents estudis en què s'avaluava com afectava l'addició de diversos parells iònics (sals d'amoni quaternàries, viològens catiònics, etc.) a la selectivitat d'una barreja d'isòmers posicionals entre els quals hi havia 4 naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats- i disulfonats). El autors van provar l'efectivitat dels parells iònics en la separació d'aquests compostos, van determinar les constants d'associació dels analits amb el reactiu de parell iònic i van establir que els principals factors que motivaven les interaccions per a la formació dels parells iònics eren la hidrofobicitat dels parells iònics i la càrrega dels analits.

*K. Takahashi et al.*¹²¹ van fer servir poliamines macrocícliques ([9]aneN₃ i [14]aneN₃) com a parells iònics per modificar la selectivitat d'una barreja de naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats- i disulfonats). Amb l'addició de [14]aneN₃ (15 mM) a una solució electrolítica molt poc emprada per analitzar aquests compostos (0.01 mM HCl, pH 2.0), van aconseguir

resoldre gairebé tots sis isòmers estudiats. L'addició de cations poliamònics a un electròlit de característiques similars (20 mM àcid fòrmic/NaClO₄, pH 2.8) també va permetre la resolució de tres naftalendisulfonats no substituïts.¹²²

Cromatografia micel·lar electrocinètica

Un mètode senzill de millorar la selectivitat en electroforesi capil·lar per separar compostos amb mobilitats molt semblants, com els analits d'interès, és la cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC), en la qual s'afegeixen tensioactius a l'electròlit base en concentracions per sobre de la seva concentració micel·lar crítica. En la separació de barreges de BZS i NS s'han emprat tant tensioactius com polímers. Entre els primers se n'han utilitzat d'aniònics (SDS, àcid xòlic),^{89,95,98-101,103,115} de catiònics (CTAB, TTAB)^{99,111,115} i de no iònics (Brij 35, 58, 78).^{98,103,89,126,111,115} Els polímers emprats han estat el clorur de poli(dialildimetilamoni) (PDDAC), el (dietilamino)etil-dextran (DEAE-dextran), el Triton X-405 i el polietilenglicol (PEG).^{124,125,100} En alguns casos la selectivitat de la separació s'ha ajustat amb l'addició de diferents solvents orgànics (metanol, isopropanol).^{111,115}

La selectivitat dels diferents tipus de tensioactius rau en les interaccions que poden establir amb els analits. A continuació es descriuen les interaccions que governen la selectivitat dels principals tensioactius emprats en la separació dels compostos d'interès. L'SDS és un tensioactiu aniònic que té una marcada tendència a establir enllaços per pont d'hidrogen. El Brij 35 és un tensioactiu no iònic que actua com una base amb enllaços per pont d'hidrogen forts i com un àcid amb enllaços per pont d'hidrogen febles; té, doncs, una gran capacitat per establir interaccions entre parells iònics. A més a més, l'absència de repulsions electrostàtiques analit-micel·la amb els

tensioactius no iònics afavoreix la distribució amb els agregats, els quals migren amb el flux electroosmòtic i es redueix per tant el temps d'anàlisi. El mecanisme de separació en sistemes micel·lars que fan servir tensioactius catiónics com el CTAB inclou interaccions hidrofòbiques i electrostàtiques entre analits aniònics i micel·les.

L'any 1990 *S. Terabe et al.*^{124,125} van publicar dos treballs en què avaluaven l'efectivitat d'addicionar dos polímers catiónics, el PDDAC i el DEAE-dextran, a l'electròlit per manipular la selectivitat de la separació d'una barreja de naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats i disulfonats). Els resultats obtinguts van posar de manifest que la selectivitat dels ions polimèrics per als naftalensulfonats anava lligada al nombre de grups SO_3^- presents en els compostos. Els isòmers monosulfonats només es van resoldre amb l'addició del PDDAC i, encara que ambdós polímers van permetre resoldre els diferents isòmers disubstituïts, amb l'addició del DEAE-dextran la separació dels compostos es va assolir en un temps d'anàlisi significativament més curt.¹²⁴

*M. Zenki et al.*¹⁰⁰ van comparar com afectava a la selectivitat de la separació d'una barreja de naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats i disulfonats) l'addició a l'electròlit d'un tensioactiu aniònic (SDS) i de dos polímers no iònics (Triton X-405 i PEG). En les condicions de treball els millors resultats es van obtenir amb l'addició dels polímers no iònics; de fet, la selectivitat de la separació no es va veure gaire afectada per l'addició del tensioactiu aniònic a l'electròlit. En aquest cas, els autors també van observar que la selectivitat dels polímers estudiats respecte als naftalensulfonats anava lligada al nombre de grups SO_3^- presents en els compostos: mentre que el Triton X-405 va ser més selectiu per als isòmers monosulfonats, el PEG ho va ser per als isòmers disulfonats.

L'addició del tensioactiu aniònic SDS a l'electròlit va contribuir a millorar de manera molt significativa la resolució de diversos amino- i/o hidroxinaftalenmono-^{98,99,103} i disulfonats.¹¹⁵ En la separació de la barreja de naftalendisulfonats,¹¹⁵ la selectivitat va millorar de manera molt significativa en addicionar isopropanol a l'electròlit; malauradament, tot i augmentar la temperatura a 40°C, el temps d'anàlisi va ser massa llarg.

Hi ha diversos estudis en què es compara la selectivitat del tensioactiu aniònic, SDS, amb la del no iònic, Brij 35, en la resolució de diverses barreges de naftalenmonosulfonats i disulfonats.^{89,98,103,115} En tots, els autors coincideixen que, per diversos motius, el tensioactiu no iònic resulta més adequat per separar els compostos en estudi. Entre aquests motius cal destacar que treballant amb Brij 35 a temperatura ambient s'obtenen separacions semblants o millors a les obtingudes amb l'SDS però amb temps d'anàlisi més curts per l'absència de repulsions electrostàtiques analit-micel·la; un altre punt a ressaltar és la millora de la resolució i la simetria dels pics perquè la càrrega neutra no produeix increments en el corrent generat.

*T. Takayanagi et al.*¹²⁶ van comparar la selectivitat de tres tensioactius no iònics (Brij 35, Brij 58 i Brij 78) en la formació de micel·les amb diversos anions aromàtics entre els quals es trobaven alguns naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats i disulfonats). Els autors no van observar diferències significatives pel que fa a la reactivitat dels analits amb els diferents tensioactius, la qual cosa els va suggerir que era la hidrofobicitat del grup polietilè dels diferents tensioactius la responsable de la interacció amb els analits.

La selectivitat obtinguda en la separació de barreges de naftalenmonosulfonats i disulfonats per l'addició d'un tensioactiu catiònic (CTAB) a un electròlit amb un cert percentatge d'isopropanol va ser comparable a l'obtinguda quan es van fer servir l'SDS o el Brij 35.^{111,115} De fet, tots els naftalendisulfonats no substituïts només es van separar en presència del CTAB.¹¹⁵

Electrocromatografia capil·lar

A principis dels noranta, *E.S. Yeung et al.*^{127,128} van publicar dos treballs en què s'avaluava l'efectivitat de l'electrocromatografia capil·lar (CEC) en la separació de diversos naftalensulfonats amb grups amino i hidroxil. En el primer d'aquests treballs,¹²⁷ es va aconseguir separar 5 amino-naftalensulfonats fent servir capil·lars modificats amb fases estacionàries hidrofòbiques per minimitzar el flux electroosmòtic i introduint un procés de distribució cromatogràfic utilitzant un reactiu de parell iònic. En el segon treball,¹²⁸ van modificar la selectivitat d'una separació de dos amino-naftalensulfonats fent servir un capil·lar modificat amb una fase estacionària hidrofòbica que va actuar com un bescanviador iònic en fer servir un electròlit que contenia una sal d'amoni quaternària (CTAB). Malgrat els bons resultats obtinguts en aquests treballs, han hagut de passar deu anys abans no apareguessin d'altres publicacions emprant la CEC en la separació de compostos aromàtics sulfonats. Recentment, *E. Minnoor et al.*¹²⁹ han demostrat l'efectivitat de la CEC utilitzant un capil·lar de sílice fosa modificat químicament amb un polímer sulfonat i un electròlit senzill (fosfat sòdic 10 mM, pH 2) per separar una barreja de BZS.

Detectors

En la majoria dels mètodes descrits a la bibliografia per determinar BZS i NS mitjançant tècniques electroforètiques el detector més emprat és el d'absorbància UV-visible de longitud d'ona fixa o de díodes en fila (DAD).^{90,100,102,117,120-126,128} La detecció UV-visible emprant un detector de díodes en fila (DAD) permet l'adquisició simultània de l'espectre de cadascun dels analits en una mateixa anàlisi.^{104,89,116} Això possibilita identificar els diferents analits mitjançant la comparació dels seus espectres amb els espectres de les substàncies patró i la quantificació de la mostra a diferents longituds d'ona, fet que permet determinar la concentració de cada analit a la seva longitud d'ona de màxima absorbància, i millorar així els límits de detecció. De vegades, però, pot conduir a identificacions errònies, ja que els espectres dels diferents isòmers posicionals són molt semblants. Per aquest motiu, cada cop s'estan utilitzant sistemes de detecció més selectius.

Alguns autors han desenvolupat mètodes de determinació d'aquests compostos emprant detectors de fluorescència^{108,127} i de fluorescència induïda per làser (LIF).^{101,107,109} Actualment, els detectors de fluorescència, sobretot els detectors de LIF, són els sistemes de detecció més sensibles en CE; a més a més, els detectors de LIF són molt selectius per a analits que, com els NS, presenten una fluorescència natural, ja que proporcionen informació estructural. Recentment també s'ha estudiat el potencial d'un altre sistema de detecció força sensible en la determinació de NS, el detector de fosforescència.¹¹²⁻¹¹⁴

En l'anàlisi mediambiental la sensibilitat no és, però, l'únic requisit en el desenvolupament de qualsevol mètode analític. Un altre dels aspectes importants a tenir en compte és la identificació dels diferents analits

presentes a la mostra. En aquest sentit, l'acoblament de la CE amb l'espectrometria de masses (MS) és de gran importància. *W.C. Brumley*⁹⁴ va desenvolupar la primera aplicació de la CE acoblada a la MS per determinar NS. Gairebé una dècada després han aparegut dues noves aplicacions en què s'empra una interfície d'electrosprai en l'acoblament d'ambdues tècniques per determinar BZS i NS en aigües.^{118,119}

II.3 SISTEMES DE PRECONCENTRACIÓ DE LES MOSTRES.

Els BZS i els NS es determinen en general emprant les tècniques cromatogràfiques o electroforètiques esmentades més amunt. Malauradament, els límits de detecció obtinguts amb aquestes tècniques no són prou baixos com per poder-les aplicar directament a la determinació d'aquests compostos en aigües. Per aquesta raó, quan es volen determinar aquests analits en aigües on la matriu de la mostra pot influir significativament en la determinació, es fa necessària una etapa de pretractament per netejar i/o preconcentrar la mostra.^{19,20,130,131}

En aquest apartat es comenten i es discuteixen els avantatges i les limitacions de l'extracció en fase sòlida i dels sistemes de preconcentració *on-capillary* en electroforesi capil·lar per determinar BZS i de NS a baixos nivells de concentració en aigües.

II.3.1 SISTEMES D'EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA APLICATS A LA DETERMINACIÓ DE BZS I DE NS

L'extracció en fase sòlida (SPE) és una tècnica de pretractament de mostres que es basa en processos de migració diferencials en els quals els compostos són retinguts o eluïts segons l'afinitat que tinguin per al sorbent i per a l'eluent. Perquè un procés d'extracció sigui efectiu les interaccions entre l'analit i la superfície del sorbent han de ser reversibles. Aquestes interaccions solen ser de tipus hidrofòbic (forces de Van der Waals), polars (ponts d'hidrogen i forces dipol-dipol) o iòniques.

En la determinació de BZS i de NS, la SPE s'ha emprat principalment per preconcentrar els analits en diferents tipus de mostres, però també hi ha diverses aplicacions en les quals s'utilitza per eliminar substàncies interferents de la matriu i per emmagatzemar i transportar analits.

En la preconcentració de BZS i NS, s'han utilitzat sorbents de base sílice convencional, sobretot el de C₁₈,^{11,28,46,47-49,50-52,81} ja que s'ha demostrat que la seva capacitat per extreure aquests compostos és lleugerament superior a la d'altres sílices (C₈);^{66,81} però també s'han emprat diversos tipus de sorbents polimèrics com ara les reïnes polimèriques de PLRP-S (reïnes d'estirèdivinilbenzè)^{51,52,55,65,71} i els sorbents polimèrics d'estirèdivinilbenzè altament entrecreuats com ara l'EnviChrom,⁸¹ l'Isolute ENV+,^{6,12,58,62,64,90} el LiChrolut EN,^{12,59,81,90} l'HP-R⁹⁰ i el sorbent copolimèric de divinilbenzè-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB).⁹⁰ A la bibliografia també es poden trobar diversos treballs que utilitzen altres sorbents com ara els bescanviadors iònics^{47,66} o el carbó negre grafititzat (GCB).^{11,78,79}

Emprant l'extracció en fase sòlida amb C₁₈ i parells iònics se solen obtenir recuperacions del 70-80% en l'extracció de 50-100 ml de mostra per a la majoria de BZS i NS, excepte per als compostos més polars. En un estudi comparatiu entre un sorbent C₁₈ i un sorbent PLRP-S per extreure naftalensulfonats emprant l'extracció amb parell iònic, els millors resultats es van obtenir amb el sorbent polimèric, amb recuperacions superiors al 85% en l'extracció de 20 ml d'una solució estàndard de 10 µg/l; malauradament, amb tots dos sorbents es van obtenir recuperacions baixes en extreure volums més grans de mostra per als compostos més polars com els amino-hidroxi-naftalensulfonats.⁵²

Els sorbents polimèrics d'estirèdivinilbenzè altament entrecruats (EnviChrom-P, Isolute ENV+, Lichrolut EN, HP-R) i el sorbent copolimèric Oasis HLB presenten un elevat grau d'entrecruament i són materials força porosos; consegüentment la seva àrea superficial específica es veu incrementada i permeten més interaccions del tipus π - π amb els analits.

En un estudi comparatiu entre els sorbents Isolute ENV+ i LiChrolut EN per a l'extracció de diversos BZS i NS afegint el parell iònic a l'eluent, amb l'Isolute ENV+ es van obtenir recuperacions superiors al 70% per a la majoria de compostos excepte per a un parell de naftalendisulfonats (l'1,5-NDS i el 2-NH₂-1,5-NDS) en extreure 150 ml d'una mostra d'aigua subterrània, fortificada amb 50 µg/l dels analits; en canvi amb el LiChrolut EN, les recuperacions dels naftalensulfonats amb més d'un grup sulfònic van ser inferiors al 10%.¹² En un altre estudi comparatiu per a l'extracció de BZS i NS sense l'addició de parells iònics emprant diferents sorbents polimèrics (l'Isolute ENV+, el Lichrolut EN, l'HP-R i l'Oasis HLB), es van obtenir les millors recuperacions per a la majoria dels compostos amb LiChrolut EN i el HP-R.⁹⁰ Aquests dos sorbents van proporcionar

recuperacions similars, que eren un 20% superiors a les obtingudes amb l'Isolute ENV+. Malauradament, amb cap dels sorbents emprats es van poder recuperar els compostos amb més d'un grup sulfònic. Els autors van concloure que aquests compostos no es podien extreure amb sorbents polimèrics sense l'addició de parells iònics. Així doncs, el LiChrolut EN i el HP-R adsorbien millors els analits perquè tant la mida de partícula com el diàmetre del porus són més petits i l'àrea superficial específica és més gran en comparació de l'Isolute ENV+.

Diversos autors han demostrat els avantatges dels sorbents de carbó grafititzat en la preconcentració de compostos aromàtics sulfonats.^{11,78,79} *B. Altenbach et al.*¹¹ van estudiar el potencial de la combinació de mecanismes hidrofòbics i de bescanvi iònic característics del carbó negre grafititzat per separar amino- i hidroxí- BZS i NS. Els autors van demostrar que la capacitat d'extreure compostos aromàtics sulfonats de l'aigua i la possibilitat d'eluir-los després del GCB depenia significativament del tipus i de la quantitat de grups funcionals i de la mida de l'anell aromàtic. Els BZS i NS sense grups funcionals protonats van ser fàcilment eluïts, mentre que els compostos amb grups amino van ser escassament recuperats. D'acord amb altres autors, van suggerir que les interaccions irreversibles tenien lloc entre el grup amino lliure dels analits i els grups quinona de la superfície del GCB. La solució va ser reduir les quinones a hidroxiquinones pretractant el sorbent amb àcid ascòrbic. Amb aquest procediment es van obtenir recuperacions superiors al 90% per a la majoria de compostos estudiats en extreure 100 ml de mostra, fins i tot per als que tenien un grup amino. Malauradament, les recuperacions de compostos que tenien dos grups amino o grups hidroxí van ser baixes.

L'extracció de BZS i NS amb bescanviadors aniònics ha donat recuperacions de fins al 98% per als àcids monosulfònics en extreure 250 ml de mostra, ⁴⁷ però tant per als compostos disulfònics com per als derivats amino i/o hidroxilats les recuperacions van ser molt baixes. ^{47,66}

Els BZS i els NS són escassament retinguts en alguns d'aquests sorbents, sobretot en els C₁₈ i en les reïnes polimèriques, a causa del caràcter marcadament polar. Per tal de resoldre aquesta limitació, s'utilitzen parells iònics amb l'objectiu de disminuir la polaritat dels compostos i fer-ne possible la seva l'extracció.

Els reactius de parell iònic emprats més sovint en l'extracció dels compostos d'interès són el tetrabutilamoni (TBA) ^{11,46-49,51,52,59,65,71} i el cetiltrimetilamoni (CTMA) ^{28,50,66,67,69} amb sistemes de detecció UV-visible/fluorescència, i la trietilamina (TEA), ^{6,12,55-58,62-64} per la seva volatilitat, amb detectors d'espectrometria de masses.

La introducció del parell iònic al procés d'extracció és duu a terme de diverses maneres: en alguns casos s'addiciona a la mostra, ^{11,46,49,51,55,59,65,71} en d'altres s'introdueix condicionant-hi el cartutx abans de fer-hi passar la mostra ^{28,47,49,50,52,55,69} i, alguns autors, l'afegeixen a l'eluent. ^{6,12,58,62-64} C. Sarzanini *et al.* ⁵⁰ van dur a terme un estudi en què es demostrava que la presència del parell iònic (CTMA) en el C₁₈ millorava molt significativament la recuperació de diversos compostos aromàtics sulfonats, mentre que l'addició del parell iònic a la mostra en reduïa significativament la recuperació.

En alguns treballs en què s'empen sorbents polimèrics altament entrecruats com ara l'EnviChrom o el LiChrolut EN sense l'addició de parells

iònics, s'obtenen recuperacions del 80% per a molts compostos aromàtics sulfonats, excepte també per als més polars, en extreure 250 ml de mostra.

81

En electroforesi capil·lar el parell iònic pot afectar negativament la separació, és per això que cal evitar-ne la presència. *S.J. Kok et al.*^{99,101,109} utilitzen l'extracció amb un C₁₈ i amb parell iònic (CTMA) per a la preconcentració de diversos NS. Però, com que els parells iònics són incompatibles amb el procés electroforètic ja que poden contribuir a deteriorar l'eficàcia de la separació a causa de la capacitat que tenen de modificar tant el flux electroosmòtic com l'electroforètic, els autors introdueixen una altra etapa en el procés d'extracció, després de la de preconcentració, emprant un cartutx de bescanvi catiònic per eliminar el parell iònic abans d'injectar la mostra en el sistema electroforètic; això implica més manipulació de la mostra amb tots els inconvenients que comporta.

És per aquest motiu que actualment en electroforesi capil·lar es fan servir sorbents polimèrics d'estirèdivinilbenzè altament entrecruats ja que permeten l'extracció de la majoria dels compostos sense l'addició de parells iònics. *R. Loos et al.*¹⁰⁸ van ser els primers autors a utilitzar l'extracció en fase sòlida sense l'addició de parells iònics emprant un sorbent polimèric, el LiChrolut EN, en CE. En extreure 200 ml de mostra fortificada amb 2 µg/l dels analits, els autors van obtenir recuperacions de més del 70% per a la majoria dels compostos, excepte per a aquells amb més d'un grup sulfònic, i per a alguns amino-naftalensulfonats i benzensulfonats.

L'extracció en fase sòlida pot dur-se a terme *off-line* o bé acoblada *on-line* al sistema cromatogràfic. En ambdós mètodes es realitza de forma

similar, excepte el pas de desorció, en el qual en l'acoblament *on-line* els analits retinguts són eluïts directament de la precolumna a la columna de separació.

L'extracció *off-line* ha estat força més emprada que l'*on-line* en la determinació de BZS i NS en mostres aquoses mitjançant la cromatografia de líquids.^{11,28,46,62,79,81,90} Té com a avantatges principals la gran flexibilitat i el fet que permet analitzar el mateix extracte mitjançant diverses tècniques; per exemple, *O. Zerbinati et al.*²⁸ van utilitzar aquest sistema per analitzar el mateix extracte mitjançant l'electroforesi capil·lar i la cromatografia de gasos.

L'ús de l'acoblament *on-line* presenta nombrosos avantatges, la qual cosa ha fet que en els darrers anys hagi augmentat considerablement l'ús. Entre aquests cal destacar la no-manipulació de la mostra entre l'extracció i l'anàlisi, evitar el risc de pèrdua i contaminació, i obtenir millors límits de detecció i reproductibilitat. No obstant això, el nombre d'aplicacions en què es determinen BZS i NS mitjançant l'acoblament *on-line* és inferior al que utilitzen el mètode *off-line*.^{50,54,55,59}

Totes les aplicacions descrites a la bibliografia on s'utilitza la SPE com a sistema de preconcentració de BZS i NS en electroforesi capil·lar utilitzen el sistema *off-line*.

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'extracció en fase sòlida emprant sorbents C₁₈ sense l'addició de parell iònic s'utilitza molt freqüentment com a etapa prèvia de *clean-up* per eliminar substàncies interferents apolars.^{47,53,67,70,99,118}

La SPE també s'ha utilitzat per facilitar el transport i reduir l'espai d'emmagatzematge de mostres que contenen BZS i NS. *M.C. Alonso et al.*⁵⁸ van estudiar l'estabilitat d'un grup de BZS i NS en cartutxos d'extracció d'Isolute ENV+ en diferents condicions de temperatura i temps. Els autors van observar que emmagatzemant les mostres a 4°C alguns compostos es degradaven després d'una setmana mentre que emmagatzemant-les a -20°C eren estables durant diverses setmanes. Els compostos amb grups amino i/o hidroxil eren menys estables que els sulfonats no substituïts.

II.3.2 SISTEMES DE PRECONCENTRACIÓ *ON-CAPILLARY* EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR

L'escassa sensibilitat de la CE, a causa de la reduïda mida de la finestra en la detecció *on-capillary* mitjançant detectors d'absorbància UV-visible i el petit volum de mostra injectat per obtenir una elevada eficàcia de separació, limita l'aplicabilitat d'aquesta tècnica en l'anàlisi de mostres aquoses reals. Amb els detectors d'UV-visible convencionals, la sensibilitat obtinguda en CE és, com a mínim, d'un ordre de magnitud més baixa que en HPLC.

Com ja s'ha comentat més amunt, per millorar la sensibilitat de la tècnica aplicada a la determinació de BZS i NS a baixos nivells, s'han utilitzat sistemes de detecció més sensibles (detectors de LIF i de fosforescència),^{101,107,109,112-114} capil·lars amb una finestra de detecció ampliada (*bubble cell*)¹¹⁵ i també l'extracció en fase sòlida com a sistema de preconcentració de la mostra.^{90,95,99,118,119} No obstant això, aquests mètodes són cars o allarguen el temps d'anàlisi. És per això que, aprofitant les característiques de la tècnica, recentment s'han emprat alguns dels procediments de

preconcentració *on-capillary* desenvolupats per millorar la sensibilitat en CE, és a dir, els límits de detecció dels compostos en estudi.

En la CE convencional només es poden injectar volums de mostra molt petits per tal de mantenir una bona eficàcia de separació. Tot i amb això, s'han aplicat diferents procediments per augmentar el volum de mostra injectat que milloren la sensibilitat de la tècnica sense perdre eficàcia de separació.

Els sistemes de preconcentració *on-capillary* que utilitzen un únic electròlit s'anomenen en general *sample stacking*. Aquests procediments van ser desenvolupats per *R.L. Chien et al.*¹³³ són adequats per sistemes en els quals la conductivitat de la mostra és més petita que la de l'electròlit.

El mecanisme de preconcentració del *sample stacking* es fonamenta en la diferència de velocitats electroforètiques dels analits entre la zona de la mostra on el camp elèctric és elevat (zona de baixa conductivitat) i la zona de l'electròlit on el camp elèctric és baix (zona d'elevada conductivitat). Els ions de la mostra migren més ràpidament en la zona de la mostra que en la zona de l'electròlit i redueixen la velocitat en acostar-se a la zona de l'electròlit. Els analits (ions més lents) es preconcentren (*stack up*) en un volum més petit quan assoleixen el límit entre ambdues zones i augmenta la concentració de la zona de la mostra.

Un d'aquests procediments de preconcentració aplicat a la determinació de BZS i NS, és el *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra (LVSS).¹¹⁶ En LVSS, la preconcentració es du a terme injectant hidrodinàmicament un gran volum de mostra dissolta en aigua o en una matriu de conductivitat més baixa que l'electròlit i, per tal de mantenir una

bona resolució, s'elimina la matriu de la mostra després que el procés d'*stacking* s'ha completat i abans que es produeixi la separació electroforètica. La manera més habitual d'eliminar la matriu de la mostra és aplicant un voltatge negatiu (càtode a l'extrem de detecció) per invertir el sentit del flux electroosmòtic i arrossegar així amb ell substàncies interferents fora del capil·lar. En emprar el procediment descrit a la determinació de BZS i NS en aigües per CZE, la resposta del detector d'absorbància va augmentar en un factor de 40 respecte a l'obtinguda mitjançant la injecció hidrodinàmica convencional, tot i que va mantenir la mateixa eficàcia de separació. ¹¹⁶

Dels diferents procediments de *sample stacking* aplicats a la MEKC desenvolupats per *J.P. Quirino et al.*, el que dóna millors resultats s'anomena *sweeping* ¹³⁴ i es du a terme en condicions àcides per rebaixar el flux electroosmòtic. El mecanisme de preconcentració d'aquesta tècnica es basa en la capacitat dels analits de distribuir-se en una fase micel·lar. La mostra, dissolta en una matriu de conductivitat semblant a la de l'electròlit però que no conté micel·les, s'injecta hidrodinàmicament en un capil·lar ple d'una solució micel·lar aniònica. Quan s'aplica un potencial positiu (ànode a l'extrem de detecció), les micel·les aniòniques interaccionen amb els analits de la zona de la mostra i els concentren en franges estretes. En les condicions de treball, les micel·les migren electroforèticament cap al detector i hi arrosseguen els analits. Recentment, *J.B. Kim et al.* ¹¹⁷ ha desenvolupat un procediment de *sweeping* emprant tensioactius catiònics per ampliar l'aplicabilitat a analits carregats com ara els naftalensulfonats no substituïts (monosulfonats i disulfonats). Mitjançant aquest procediment de preconcentració els autors van augmentar en un factor de 700 la resposta obtinguda sense aquesta etapa de preconcentració. Aquest procediment, però, no es va aplicar a l'anàlisi d'aigües.

Els sistemes de preconcentració *on-capillary* que utilitzen un sistema electrofòrtic discontinu es coneixen com a isotacoforesi (ITP).¹³⁵⁻¹³⁷ Aquest procediment resulta força útil en la preconcentració de mostres amb una conductivitat relativament elevada. En ITP la mostra s'injecta entre un electròlit capdavanter (LE), format per una solució que conté ions amb una mobilitat superior als continguts en la mostra, i un electròlit terminal (TE), format per una solució que conté ions amb una mobilitat inferior als continguts en la mostra. Els analits amb mobilitats entre l'LE i el TE es concentren en diferents zones que migren isotacofòrticament fins al límit de l'LE. Un cop finalitzada la preconcentració isotacofòrtica es produeix la separació electrofòrtica. La ITP aplicada a la CZE es pot dur a terme emprant un únic capil·lar o dos capil·lars acoblats. En el primer cas tant la preconcentració com la separació tenen lloc en el mateix capil·lar, mentre que en el segon cas la preconcentració té lloc en el primer capil·lar i la separació electrofòrtica en el segon. Els principals avantatges de la primera configuració són la facilitat d'automatització i que la instrumentació requerida és senzilla; l'avantatge fonamental de la segona és que la ITP també es pot utilitzar com a procediment de neteja de la mostra, ja que només s'injecta en el capil·lar la zona que conté els analits i s'elimina totalment la matriu de la mostra. En aplicar un procediment de ITP-CZE en un sol capil·lar per determinar BZS i NS en aigües a baixos nivells de concentració,¹¹⁹ la resposta va augmentar en un factor de 100 respecte a l'obtinguda mitjançant la injecció hidrodinàmica convencional.

II.4 PRESENCIA DE BZS I NS EN MOSTRES D'INTERÈS MEDI AMBIENTAL

Tal com s'ha comentat en la primera part d'aquest capítol, els BZS i els NS són compostos amb una elevada mobilitat i persistència en el medi aquós. Els compostos més detectats són els naftalensulfonats no substituïts, sobretot els monosulfonats i disulfonats, i diversos hidroxiamino-naftalendisulfonats, tot i que també s'han detectat altres com ara diversos amino-naftalensulfonats i benzensulfonats. Aquests compostos s'han determinat a concentracions molt diverses i en diferents mostres aquoses tant d'origen industrial com natural, fins i tot en aigües de consum humà (aigües de xarxa i envasades).

A continuació es detallen els resultats obtinguts per diferents grups de treball que han determinat la presència d'aquests compostos en diferents aigües; en alguns es posa de manifest la seva mobilitat, la seva persistència en el medi aquós i els sistemes que s'utilitzen per a la degradació en les plantes de tractament d'aigües.

*E.R. Brouwer et al.*⁶⁵ van detectar la presència de l'1,5-NDS tant en aigües del riu Meuse (Holanda) com en aigües de xarxa de la ciutat d'Amsterdam en concentracions d'1 µg/l.

O. Zerbinati et al.^{28,66,67,69} han dut a terme estudis exhaustius determinant la presència de diversos BZS i NS en diferents aigües de rius italians (Bormida, Po i Sangone). Els autors van detectar la presència del 2-NS en les aigües dels rius Po i Sangone en baixes concentracions (17.2-220 ng/l i 8.9-50 ng/l, respectivament).²⁸ En canvi, van trobar nombrosos BZS i NS (1-, 2-NS; 1,5-, 2,6-, 2,7-NDS; 3-, 4-NH₂-BZS; 7-NH₂-1,3-NDS, 2-OH-

6,8-NDS i 2-OH-3,6-NDS) dins d'un rang molt ampli de concentracions (des de fraccions de $\mu\text{g/l}$ fins a mg/l) en diverses mostres d'aigües del riu Bormida, que rep afluents d'una indústria productora de tints.^{66,67,69} Els compostos detectats més sovint en aquestes aigües van ser el 2-NS, el 2,7-NDS i el 2-OH-6,8-NDS. Els autors van atribuir la coloració fosca de les aigües d'aquest riu a la formació de subproductes acolorits resultants de la transformació química de sulfonats aromàtics no acolorits.⁶⁹ Per tal de demostrar la seva hipòtesi van dur a terme un treball en què simulaven la degradació fisicoquímica que tenia lloc en el riu, avaluant com afectava a 22 compostos (BZS i NS). Els resultats obtinguts van demostrar que la degradació d'alguns dels compostos estudiats, en particular els productes de degradació dels hidroxinaftalensulfonats, van donar lloc a compostos acolorits. Això els va suggerir que si aquests productes es formaven en el riu podien ser els responsables de l'enfosquiment de les aigües.

Els mateixos autors,²⁸ analitzant les aigües de xarxa de quatre ciutats italianes, van detectar la presència del 2-NS (6-21 ng/l) en les aigües de la ciutat de Torí, que rep part del seu subministrament del riu Po; també van trobar aquest compost en diferents aigües envasades (1-2.8 ng/l).

*S. Angelino et al.*⁸⁹ també van detectar l'1-NS, el 2-NS i el 2-OH-3,6-NDS en elevades concentracions (20-30 g/l) en diverses mostres d'afluents industrials italians.

*F.T. Lange et al.*⁴⁸ van localitzar NS en dos afluents de plantes de tractament d'aigües residuals industrials situats a llarg del riu Rin (Alemanya), concretament van detectar l'1,5-NDS (9.4-120 $\mu\text{g/l}$ afluent 1, 1.2-3.2 mg/l afluent 2) i el 2-OH-3,6-NDS (9.6 $\mu\text{g/l}$ afluent 1). En analitzar les aigües tractades d'una depuradora que rebia aigües de l'afluent 2, van

confirmar la persistència de l'1,5-NDS després dels diversos tractaments físics i biològics. Només es va observar l'eliminació d'un 61% d'aquest compost després de sotmetre les aigües a un tractament d'ozonització. Aquest compost tampoc es va poder eliminar emprant filtres de carbó activat. Analitzant mostres de les aigües del riu Rin recollides en la mateixa zona, es va detectar la presència de 2-NS (0.14 µg/l), 1,5-NDS (0.72 µg/l), 2,6-NDS (0.04 µg/l), 2,7-NDS (0.09 µg/l) i 1,6-NDS (0.25 µg/l). Exceptuant l'1,5-NDS, es va comprovar que els compostos eren completament eliminats mitjançant els processos de tractament d'aigües.

En un altre treball del mateix grup ⁴⁹ en què van monitoritzar durant 10 mesos diferents mostres de les aigües del riu Elbe, que també rep aigües de diferents afluents industrials, es va detectar la presència de vuit NS (2-NS; 1,5-, 2,6-, 2,7-NDS; 1,3,6-NTS, 1-OH-3,6-NDS, 2-OH-3,6-NDS, 2-NH₂-4,8-NDS). En general, les concentracions d'aquests compostos eren més elevades que les determinades en les mostres del riu Rin. L'anàlisi d'aquestes mostres després de la degradació biològica i de fer-les passar per carbó activat, va tornar a posar de manifest la persistència de l'1,5-NDS i del 1,3,6-NTS. Recentment, *T.P. Knepper et al.* ⁵⁴ també han demostrat que l'1,5-NDS no es pot eliminar emprant filtres de carbó activat.

Tres anys més tard de la monitorització de les aigües del riu Elbe per part de *F.T. Lange et al.* ⁴⁹, *S.J. Kok et al.* ^{101,109} ho van tornar a fer i van detectar 7-NH₂-1,3-NDS (1.1-6.4 µg/l), 1,3,6-NTS (2.2-3.1µg/l) i 1,3,5- NTS (1.3-14 µg/l) en diferents punts del recorregut. També van trobar 2-NS (13 µg/l) i 7-NH₂-1,3-NDS (9 µg/l) en aigües residuals. ¹⁰⁷

B. Altenbach et al. ¹¹ van trobar 3 BZS (3-NH₂-BZS, 3-, 4-NO-BZS) i 6 NS (1-, 2-NS; 1,5-, 1,6-, 2,6-, 2,7-NDS) tant a l'entrada com a la sortida d'una

planta municipal de tractament d'aigües residuals localitzada a Herisau (Suïssa). Un 50% de les aigües que rebia aquesta planta procedia de tres indústries tèxtils. Encara que les concentracions a la sortida eren considerablement més baixes que a l'entrada, cap dels compostos va ser totalment eliminat durant el procés de tractament de les aigües.

*T. Storm et al.*⁷⁰ van detectar la presència de diversos NS (1-, 2-NS; 1,5-, 1,6-, 1,7-, 2,6-, 2,7-NDS) en concentracions de 0.1-2.1 mg/l en aigües de procés d'una indústria tèxtil; alguns (1-, 2-NS; 1,5-, 2,6-, 2,7-NDS) es van localitzar en les aigües de l'afluent de la planta de tractament d'aigües residuals d'aquesta indústria en concentracions de 0.1-1 mg/l.

F. Borrull et al.^{52,55,59,116,119} han determinat la presència d'alguns NS, principalment de l'1- i 2-NS, en diverses mostres aquoses recollides a la zona de Tarragona en diferents nivells de concentració. L'1-NS es va determinar en una concentració de 4 µg/l en una mostra del riu Ebre;⁵² l'1-, i el 2-NS es van determinar en nivells de 0.8 i 0.14-0.5 µg/l, respectivament, en mostres d'aigua de mar recollides en el litoral tarragoní;^{55,59} el 5-NH₂-2-NS i el 2-NS es van trobar en concentracions de 104 µg/l i 2.1 mg/l, respectivament, en diferents mostres d'aigües superficials.^{116,119} Els autors també van detectar la presència i la persistència d'alguns BZS i NS en afluents de diverses plantes de tractament d'aigües residuals; l'1-/2-NS es va determinar en dos afluents d'entrada a les plantes depuradores en concentracions de 55-166 µg/l.^{116,119}

*M.C. Alonso et al.*¹² van trobar l'1- i el 2-NS en diverses mostres recollides en rius europeus (alemanys i espanyols) en concentracions de 0.1-5 µg/l, excepte en un riu espanyol (Llobregat), on es van detectar concentracions molt més elevades, de 10-50 µg/l, probablement perquè rep

aigües de diferents afluents industrials (tèxtils, etc.) sense tractar. El possible focus de contaminació va ser confirmat en detectar la presència de diversos NS (1-, 2-NS; 2,6-NDS; 1-NH₂-6-NS; 1-NH₂-7-NS) en diferents mostres recollides en afluents sense tractar d'indústries de tints europees (sueques, portugueses i espanyoles). Aquests compostos van ser determinats dins d'un rang molt ampli de concentracions, de µg/l a mg/l; l'1- i el 2-NS van ser els compostos quantificats en concentracions més elevades, de fins a 1 mg/l. La comparació dels resultats obtinguts d'analitzar mostres a l'entrada i a la sortida de tres plantes de tractament d'aigües localitzades a Suècia i Espanya i en les quals es va detectar la presència de diversos NS, va posar de manifest que els isòmers dels naftalenmonosulfonats poden ser eliminats durant el tractament biològic de les aigües, però no amb el tractament fisicoquímic; els isòmers dels naftalendisulfonats van ser escassament eliminats amb qualsevol dels tractaments proposats.

Resultats semblants, determinant aquests compostos en diferents aigües residuals industrials sense tractar i en afluents a la sortida de diverses plantes de tractament d'aigües, han estat recollits en diversos treballs del mateix grup.^{56,57,118} Els resultats d'aquests estudis han portat els autors a remarcar la importància dels sistemes de tractament biològics per eliminar aquests compostos, ja que l'1- i el 2-NS, considerats els contaminants més importants, només s'eliminaven gairebé del tot mitjançant aquests mètodes. Recentment, aquests autors també han dut a terme diversos estudis de toxicitat en què s'avalua la incidència dels compostos d'interès en diverses mostres.⁶²⁻⁶⁴

En una monitorització de les aigües del riu Danubi (Hongria) en diferents punts del recorregut així com dels afluents, també es va detectar la

presència de diversos NS (2-NS; 1,5-, 1,6-, 2,6-, 2,7-NDS; 1,3,5-, 1,3,6-, 1,3,7-NTS).⁵³ La mobilitat d'aquests compostos es va confirmar en ser detectats en concentracions més elevades en el punt més baix del recorregut del riu.

M.J.F. Suter et al.^{78,79} van detectar la presència de BZS (BZS, 3-NH₂-BZS) i NS (1-, 2-NS; 1,5-, 1,6-, 1,7-, 2,7-NS; 1,3,6-NTS; 2-NH₂-1,5-NDS, 2-NH₂-4,8-NDS) en diverses mostres recollides en abocadors residuals suïssos, dins d'un rang molt ampli de concentracions (d'escassos µg/l a diversos mg/l). Els autors van destacar que la presència i la concentració d'aquests compostos anava estretament lligada al tipus de residu abocat. També van trobar BZS i NS en aigües subterrànies contaminades per filtracions dels abocadors propers; en aquestes mostres les concentracions determinades van ser considerablement més baixes (d'escassos ng/l a diversos µg/l).

A continuació, després de la bibliografia, s'inclou una còpia dels treballs publicats en les revistes *Trends in Analytical Chemistry*, 20 (2001) 487-499 i *Journal of Chromatography A*, 902 (2000) 65-89 sorgits arran de l'estudi bibliogràfic realitzat en aquest apartat.

II.5 BIBLIOGRAFIA

- 1 H. Dresler, *Encyclopaedia of Chemical Technology*, Wiley, New York, Vol., 16 (1995) 984.
- 2 O. Lindner, *Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry*, VCH, Weinheim, Vol., A3, 507.
- 3 R. Heusch, K. Reizlein, *Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry*, VCH, Weinheim, Vol., A8, 586.
- 4 T. Poiger, J.A. Field, T.M. Field, W. Giger, *Anal. Methods. Instrum.*, 1 (1993) 104.
- 5 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R.Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 6 M. Castillo, M.C. Alonso, J. Riu, D. Barceló, *Environm. Sci. Technol.* 33 (1999) 1300.
- 7 S. Patai, Z. Rappaport, *The Chemistry of Sulfonic Acids, Esters and Their Derivatives*, Wiley, New York, 1991, 261.
- 8 M.A. Cook, A.M. Kertesz, T. Leisinger, *FEMS Microbiol. Rev.* 15 (1994) 195.
- 9 T. Reemtsma, M. Jekel, *Water Res.*, 31 (1997) 1035.
- 10 R. Krull, D.C. Hempel, *Bioprocess Eng.*, 10 (1994) 229.
- 11 B. Altenbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- 12 M.C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 400 (1999) 211.
- 13 D. Zurrer, A.M. Cook, T. Leisinger, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 1459.
- 14 R. Wittich, H.G. Rast. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 1842.
- 15 W. Haug, A. Schmidt, B. Nörtemenn, D.C. Hempel, A. Stolz, H.J. Knackmuss, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 3144.

-
- 16 A.M. Cook, A. Kertesz, T. Leisinger, *FEMS Microbiol. Rev.* 15 (1994) 195.
 - 17 A.M. Cook, H. Laue, F. Junker, *FEMS Microbiol. Rev.* 22 (1998) 399.
 - 18 A. Stolz, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 23 (1999) 391.
 - 19 T. Reemtsma, *J. Chromatogr. A.*, 773 (1996) 473.
 - 20 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 487.
 - 21 J.L. Kirkland, *Anal Chem.*, 32 (1960) 1388.
 - 22 J.S. Parsons, *J. Gas Chromatogr.* 5 (1967) 254.
 - 23 A. Amer, E. G. Alley, C.U. Pittman Jr., *J. Chromatogr.* 362 (1986) 413.
 - 24 H. Kataoka, T. Okazaki, M. Makita, *J. Chromatogr.* 473 (1989) 276.
 - 25 Ng Lay-Keow, M. Hupé, *J. Chromatogr.*, 513 (1990) 61.
 - 26 H.Fr. Schröder, *J. Chromatogr. A*, 777 (1977) 127.
 - 27 W.H. Ding, J.H. Lo, S.H. Tzing, *J. Chromatogr. A*, 818 (1998) 270.
 - 28 O. Zerbinati, I. Diana, C. Baiocchi, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 74 (1999) 43.
 - 29 C.H. Liu, W.H. Ding, *J. Chromatogr. A*, 926 (2001) 341.
 - 30 R.H. Stehl, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 1802.
 - 31 P. Jandera, J. Churacek, *J. Chromatogr.*, 86 (1973) 423.
 - 32 C.G. Bear, C.W. Lawley, R. Riddle, *J. Chromatogr.*, 302 (1984) 65.
 - 33 I.S. Kim, F.I. Sasinos, D.K. Rishi, R.D. Stephens, M.A. Brown, *J. Chromatogr.*, 589 (1991) 177.
 - 34 H.F.Zou, Y.K. Zhang, M.F. Hong, P.C. Lu, *J. Liquid Chromatogr.*, 16 (1993) 1069.
 - 35 G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 53.
 - 36 C. Prandi, T. Venturini, *J. Chromatogr. Science*, 19 (1981) 308.
 - 37 P. Jandera, J. Churacek, B. Taraba, *J. Chromatogr.*, 262 (1983) 121.
 - 38 H. Sirén, L. Huhanantti, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 332 (1988) 245.

-
- 39 H. Zou, Y. Zhang, P.LU, *J. Chromatogr.*, 545 (1991) 59.
- 40 A. Ohki, J. Okamoto, K. Naka, S. Maeda, *Chromatographia*, 32 (1991) 73.
- 41 H.F. Zou, Y.K. Zhang, M.F. Hong, P.C. Lu, *Chromatographia*, 32 (1991) 329.
- 42 Y.K. Zhang, H.F.Zou, M.F. Hong, P.C. Lu, *Chromatographia*, 32 (1991) 538.
- 43 H.F.Zou, Y.K. Zhang, M.F. Hong, P.C. Lu, *Chromatographia*, 34 (1992) 14.
- 44 H.F.Zou, Y.K. Zhang, M.F. Hong, P.C. Lu, *J. Chromatogr.*, 644 (1993) 269.
- 45 H.F.Zou, Y.K. Zhang, M.F. Hong, P.C. Lu, *Chromatographia*, 35 (1993) 390.
- 46 T. Reemtsma, M. Jekel, *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 199.
- 47 B. Bastian, T.Knepper, P. Hoffmann, H.M. Ortner, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 674.
- 48 F.T. Lange, M. Wenz, H.-J. Braunch, *J. High Resol. Chromatogr.*, 18 (1995) 243.
- 49 S. Fichtner, F.T. Lange, W. Schmidt, H.-J. Braunch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353 (1995) 57.
- 50 C. Sarzanini, M.C. Bruzzinoti, G. Sacchero, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A*, 739 (1996) 63.
- 51 R.H. El Harrak, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Química Analítica*, 16 (1997) S251.
- 52 R.H. El Harrak, M. Calull, R.M. Marcé, F. Borrull, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 64 (1998) 295.
- 53 P. Literathy, F. László, *Wat. Sci. Tech.*, 40 (1999) 17
- 54 T.P. Knepper, F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, F. Karrenbrock, O. Roeden, K. Lindner, *Waste Managment*, 19 (1999) 77.

-
- 55 E. Pocurull, C. Aguilar, M.C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 187.
- 56 M.C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2586.
- 57 M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3769.
- 58 M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 231.
- 59 R.A. Gimeno, R.M. Marcé, F. Borrull, *Chromatographia*, 53 (2001) 22.
- 60 G. Socher, R. Nussbaum, K. Rissler, E. Lankmayr, *Chromatographia*, 54 (2001) 65.
- 61 T. Takahashi, H. Hoshino, T. Yotsuyanagi, *Anal. Sciences*, 17 (2001) 847.
- 62 M. Farré, O. Pasini, M.C. Alonso, M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 155.
- 63 M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 253.
- 64 M. Castillo, M.C. Alonso, J. Riu, M. Reinke, G. Klöter, H. Dizer, B. Fischer, P.D. Hansen, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 265.
- 65 E.R. Brouwer, T.M. Tol, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Química Analítica*, 12 (1993) 88.
- 66 O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A*, 640 (1993) 231.
- 67 O. Zerbinati, G. Ostacoli, *J. Chromatogr. A*, 671(1994) 217.
- 68 C. Sarzanini, M.C. Bruzzinoti, G. Sacchero, E. Mentasti, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 4494.
- 69 O. Zerbinati, M. Vincenti, S. Pittavino, M.C. Genaro, *Chemosphere*, 35 (1997) 2295.
- 70 T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 175.
- 71 J.C. Kraak, F.K. Huber, *J. Chromatogr.*, 102 (1974) 333.
- 72 E.R. Brouwer, J. Slobodnik, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, *Analisis*, 20 (1992) 121.
- 73 T. Storm, C. Hartig, T. Reemtsma, M. Jekel, *Anal. Chem.* 73 (2001) 589.

-
- 74 P. Jandera, J. Churacek, *J. Chromatogr.*, 197 (1980) 181.
- 75 H. Grossenbacher, T. Thurnheer, D. Zürrer, A.M. Cook, *J. Chromatogr.*, 360 (1986) 219.
- 76 H.F.Zou, Y.K. Zhang, X. Wen, P.C. Lu, *J. Chromatogr.*, 523 (1990) 247.
- 77 M. Holcapek, P.Jandera, J. Prikryl, *Dyes and Pigments*, 43 (1999) 127.
- 78 M.J.-F. Suter, S. Riediker, W. Giger, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 897.
- 79 S. Riediker, M.J.-F. Suter, W. Giger, *Wat. Res.*, 34 (2000) 2069.
- 80 P. Jandera, S. Buncekova, J. Planeta, *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 139.
- 81 O. Fiehn, M. Jekel, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3083.
- 82 S. Husain, D. Muralidharan, R. Narasimha, U.T. Bhalerao, V.V.N. Reddy, P.V.K. Raju, *J. Chromatogr.*, 354 (1986) 498.
- 83 S. Husain, P.N. Sarma, N.S. Swamy, S.N. Alvi, R.N. Rao, *J. Chromatogr.*, 558 (1991) 435.
- 84 R.S. Deinhammer, E.-Y. Ting, M.D. Porter, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 237.
- 85 M.S. Abdelatif, M.D. Porter, *Talanta*, 47 (1998) 681.
- 86 E.-Y. Ting, M.D. Porter, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 94.
- 87 C.M. Shelton, J.T. Koch, N. Desai, J. F. Wheeler, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 455.
- 88 P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerova, P. Zvonicek, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 201.
- 89 S. Angelino, A. Bianco Prevot, M.C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 257.
- 90 R. Loos, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 890 (2000) 225.
- 91 S. Hamai, H. Sakurai, *Bunseki Kagaku*, 46 (1997) 495.
- 92 E. Wada, T. Takanayagi, S. Motomizu, *Analyst*, 123 (1998) 493.

-
- 93 T. Takanayagi, E. Wada, M. Oshima, S. Motomizu, *The Chemical Society of Japan*, 72 (1999) 1785.
- 94 W.C. Brumley, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 267.
- 95 W.C. Brumley, C.M. Brownrigg, *J. Chromatogr.*, 646 (1993) 377.
- 96 T. Takanayagi, S. Motomizu, *Chemistry Letters*, (1995) 593.
- 97 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 227.
- 98 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 627.
- 99 S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, O. Zerbinati, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
- 100 M. Zenki, H. Yukutake, M. Irizawa, *Bunseki Kagaku*, 45 (1996) 181.
- 101 S.J. Kok, E.H. Kristenson, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 771 (1997) 331.
- 102 J. Fischer, P. Jandera, V. Stanek, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 385.
- 103 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatografia*, 46 (1997) 204.
- 104 T. Takanayagi, S. Motomizu, *Analytical Sciences*, 13 (1997) 783.
- 105 T. Takanayagi, E. Wada, S. Motomizu, *Analyst*, 122 (1997) 57.
- 106 T. Takanayagi, E. Wada, S. Motomizu, *Analyst*, 122 (1997) 1387.
- 107 S.J. Kok, G.Ph. Hoornweg, T. De Ridder, U.A.Th. Brinkman, N.H. Velthorst, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 355.
- 108 R. Loos, R. Niessner, *J. Chromatogr. A*, 822 (1998) 291.
- 109 S.J. Kok, I.C. Isberg, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman, N.H. Velthorst, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 109.
- 110 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 49 (1999) 261.
- 111 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 50 (1999) 229.
- 112 J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1384.
- 113 J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1305.
- 114 J. Kuijt, E. de Rijke, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 15.

-
- 115 M.J. Cugat, M. Calull, F. Borrull, *Analyst*, 125 (2000) 2236.
- 116 M.J. Cugat, M. Calull, F. Borrull, *Analyst*, 126 (2001) 1312.
- 117 J.B. Kim, J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 916 (2001) 123.
- 118 R. Loos, J. Riu, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1197.
- 119 M.J. Cugat, C. Aguilar, R.M. Marcé, M. Calull, F. Borrull, *Electrophoresis*, pendent d'acceptació.
- 120 T. Takanayagi, Y. Ohba, H. Haruki, E. Wada, S. Motomizu, *Analytical Sciences*, 14 (1998) 311.
- 121 K. Takahashi, T. Nakagawa, T. Imato, *Anal. Communications*, 35 (1998) 221.
- 122 T. Okada, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1158.
- 123 S. Hamai, H. Sakurai, *J. Chromatogr. A*, 800 (1998) 327.
- 124 S. Terabe, T. Isemura, *Anal. Chem.* 62 (1990) 652.
- 125 S. Terabe, T. Isemura, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 667.
- 126 T. Takayanagi, S. Motomizu, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 55.
- 127 W.D. Pfeffer, E.S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 557 (1991) 125.
- 128 T.W. Garner, E.S. Yeung, *J. Chromatogr.*, 640 (1993) 397.
- 129 E. Minnoor, Y. Liu, D.J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A*, 884 (2000) 297.
- 130 R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A.*, 885 (2000) 273.
- 131 M.C. Carson, *J. Chromatogr. A.*, 885 (2000) 343.
- 132 M.C. Henion, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 73.
- 133 R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 489A.
- 134 J.P. Quirino i S. Terabe, *Science* 282 (1998) 465.
- 135 N. J. Reinhoud, *Bioanalytical Capillary Electrophoresis*, Ph Dr Thesis 1995.
- 136 P. Gerbauer, P. Bocek, *Electrophoresis*, 21 (2000) 3898.
- 137 S. Chen, S.W. Graves, M.L. Lee, *J. Microcolumn separations*, 11 (1999) 341-345.

**II.6 EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA ACOBLADA A
L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR APLICADA A L'ANÀLISI MEDI
AMBIENTAL**

**SOLID-PHASE EXTRACTION COUPLING TO CAPILLARY ELECTROPHORESIS
WITH EMPHASIS ON ENVIRONMENTAL ANALYSIS**

ABSTRACT

This article reviews the status of solid phase extraction (SPE) coupled with capillary electrophoresis (CE). It focuses on some of the organic pollutants which have captured the interest of analytical chemists—phenols, surfactants, dyes, polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), aromatic and aliphatic amines, aromatic acids and aromatic sulfonic acids—and, in particular, on monitoring pesticides from different sources. It shows that the coupling of SPE to CE has considerable potential in the analysis of environmental pollutants.

Keywords: Reviews; Solid-phase extraction; Environmental analysis; Preconcentration; Surfactants; Polinuclear aromatic hydrocarbons; Dyes; Amines; Sulfonic acids; Pesticides; Phenols; Aromatic acids

CONTENTS

1. Introduction	112
2. Significant modes in capillary electrophoresis	122
3. Solid-phase extraction and solid-phase microextraction procedures .	123
4. Other methods for manipulating sensitivity in CE	127
5. SPE-CE applications	129
5.1. Surfactants.....	129
5.2. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).....	133
5.3. Dyes.....	135
5.4. Aliphatic and aromatic amines	140
5.5. Aromatic acids and aromatic sulfonic acids.....	145
5.6. Pesticides	148
5.7. Phenols	158
5.8. Miscellaneous	160
6. Nomenclature	163
References	164

INTRODUCTION

In recent decades, pollutant compounds in the environment have been increasingly studied because of their toxicity, persistence and bioaccumulation. Hundreds of compounds have been identified, many of which have been qualified as priority by the US Environmental Protection Agency (EPA) and the European Union (EU). Most of these compounds are released into the environment as a consequence of human activity. The environment is subject to such excessive strains as farming, industry and

densely populated areas which inflict serious damage on the ecological balance.

The main steps in environmental analysis have been described in the literature.^{1,2} They are (i) sampling and sample preparation, (ii) clean-up and/or extraction, and (iii) final separation and qualitative and quantitative determination. Since analytes can be contained in a wide variety of matrices (i.e. aqueous samples can include rain and tap waters, river, marine and ground waters, and industrial waters; solid samples can include soils and sediments and other types of solid waste; and air samples) a considerable amount of effort has been made to deal with the handling of environmental samples before CE.²

When applied in the environment, some of these pollutant compounds undergo degradation and dilution. Thus, they—and their metabolites—can only be determined at trace levels in environmental matrices with highly efficient separation methods which have good sensitivity and selectivity.

Chromatographic techniques—particularly gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC)—have certain characteristics which have given them a privileged position among the analytical techniques used in environmental analysis. GC is a very efficient technique with a high resolution power for volatile but non thermally labile compounds, which can be coupled to very sensitive and specific detectors.³⁻⁵ HPLC is suitable for determining soluble analytes and solves the problem of thermally labile and polar compounds which require a previous derivatization step if they are to be determined by GC.^{6,7}

In the environmental field, capillary electrophoresis (CE) is becoming increasingly popular as an important analytical technique which can complement the chromatographic techniques. The rapid expansion of research into both the instrumentation and applications of CE has demonstrated that it is an interesting tool for many analytical separations and that it is highly efficient at separating all sort of polar and non-polar compounds, including a wide variety of pollutants.⁸⁻¹⁸ So, interesting reports in this field are being published continuously.¹⁹⁻²¹ Moreover, the different modes of CE such as capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) and capillary electrochromatography (CEC) have considerably increased the applicability of this technique. Many publications^{8,17,20,21} have demonstrated that CE can be a good alternative for some environmental pollutants that are usually monitored by HPLC or GC.

Typically, CE separations are performed in fused silica capillaries with internal diameters of 25-100 μm and they provide high theoretical plate numbers. These diameters, however, and the fact that only a small sample volume can be injected are responsible for the major limitation of the technique: its sensitivity, particularly with UV absorbance detection. The sensitivity of CE can be improved either by using a more sensitive detection method or by performing a preconcentration step before separation. This preconcentration step consist of either an extraction process like solid-phase extraction (SPE)^{4,5,22-24} or the injection of larger sample volumes into the capillary by means of the different systems described in the literature.²⁵⁻²⁸

The purpose of this review is to outline the status of SPE coupling with CE in the environmental field. The groups of compounds which have received most attention are phenols, surfactants, dyes, polynuclear aromatic

hydrocarbons (PAHs), aromatic and aliphatic amines, and aromatic acids and aromatic sulfonic acids and pesticides. The review also shows that the different CE modes provide different separation efficiencies for many pollutants. Whenever possible, applications of the described procedures to real samples have been reported. The SPE-CE applications are summarised in Table 1.

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
SURFACTANTS						
LAS	RP- C ₁₈ and SAX	CD-MEKC	250 mM borate, pH 8, 30% acetonitrile	1 mg l ⁻¹	River and waste water samples	92
Sulfophenylcarboxilates	Carbopack B	CE	20 mM citrate buffer, pH 4 and 60 mM α-CD	µg l ⁻¹ range	Sewage water	94
PAHs						
16 US EPA priority PAHs	PDMS fiber (SPME)	CD-CZE	50 mM borate buffer, pH 9.2, 35 mM SB-β-CD, 10 mM M-β-CD and 4 mM α-CD	8-75 µg l ⁻¹	Water samples	53
DYES						
Sulfonated azo dyes	SDB disks and SCX cartridges	MEKC	50 mM Boric/Borate and 100 mM sodium cholate	µg g ⁻¹ (spiked levels)	Water and Soil samples	30
8 Mono- and disulfonated commercial dyes	Isolute ENV + and LiChrolut EN	MEKC	Ammonium acetate 9.2 mM and Brij 35 0.05%	10-150 µg l ⁻¹	Groundwater samples	107 108
4 Industrial dyes	SAX Bond Elut		20 mM Borate or 50 mM citric acid/ 10%acetonitrile	5x10 ⁻⁸ - 1x10 ⁻⁷ M	Aqueous solutions	109
7 Synthetic dyes	SCX, C ₁₈ cartridges	MEKC	50 mM boric/ borate, 100 mM sodium cholate and 10% acetone	µg g ⁻¹ (spiked levels)	Water and soil samples	110
Fluorescent dyes	SDVB		40 mM borate	10 ⁻⁴ M	Groundwater samples	111

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
Photoactive dyes	Amino and SAX columns	CZE	50 mM boric acid/ 10 mM sodium borate, pH8.5	0.08-0.19 $\mu\text{g l}^{-1}$	Coffee cherries, green roasted beans	112
ALIPHATIC AND AROMATIC AMINES						
Aliphatic amines	SCX cartridge-disks, C ₁₈		5 mM Imidazole or 5.5 mM N-ethylbenzylamine	0.02 mM	Aqueous solutions	113
21 Aromatic amines	SDVB	CZE	50 mM phosphate, pH 2.35 and 7 mM 1,3-diaminopropane	0.06-1.8 mg l^{-1}	Real samples	114
Heterocyclic aromatic amines	Extrelut, Bond-elut, PRS, C ₁₈ cartridges	CZE	10 mM KCl-HCl (pH 2.2)	25-45 $\mu\text{g l}^{-1}$	Beef extract	23
4 Heterocyclic aromatic amines	Extrelut-20, C ₁₈ cartridges	CZE	30 mM Na ₂ PO ₄ , 30% methanol, and 20 mM NaCl at pH 2.0	0.08-0.16 mg l^{-1}	Cooked foods	115
Biogenic amines	C ₁₈	MEKC	100 mM borate, pH 9.4 and 30 mM SDS	0.1 mg ml^{-1}	Soy samples	116
AROMATIC ACIDS AND AROMATIC SULFONIC ACIDS						
Aromatic acids	Sep-Pak C ₁₈	CZE	13 mM sodium borate pH 9.68	Low mg l^{-1}	Natural waters	117
21 Naphthalene sulfonates	C18, SCX cartridge	CZE, MEKC	50 mM boric with 100 mM SDS or 15% acetonitrile	sub- $\mu\text{g l}^{-1}$	River water	118 119

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
14 Aromatic sulfonates	SDVB (Lichrolut EN)	CZE	25 mM sodium borate, pH 9.3	$\mu\text{g/l}$ range	Tap, river, seepage W.S.	120
PESTICIDES						
Hydroxymetabolites of atrazine	Amberchrom resin	CZE	80 mM acetate, 62 mM phosphate buffer, pH 4.70	Sub- $\mu\text{g l}^{-1}$	Potable water	121
Triazines herbicides	C ₁₈ , Oasis HLB cartridges	CZE	Acetonitrile-methanol (50:50, v/v), 7.5 mM perchloric acid and 17 mM SDS	0.01-0.05 $\mu\text{g l}^{-1}$	Natural waters	122
Chlorophenoxy acid herbicides	C ₁₈ disks	CD-CZE	0.1 M Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , pH 5.6	Sub- $\mu\text{g l}^{-1}$	Lake water	123
Sulfonylurea herbicides	C ₁₈ , silica cartridges	CZE	50 mM acetate buffer, pH 4.76	Sub- $\mu\text{g kg}^{-1}$	Soil samples	124
Sulfonylureas herbicides	RP-102, SAX, alumina cartridges	CZE	50 mM ammonium acetate, 50 mM acetic acid, 12% acetonitrile	0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$	Different water matrices	31 32
Linuron, metalachlor, atrazine, and metsulfuron	C ₁₈ cartridges	MEKC	50 mM sodium borate, pH 8.0, 35 mM SDS, 10% methanol	$\mu\text{g l}^{-1}$	Tap water	125
Chlorsulfuron, chlorimuron and metsulfuron	C ₁₈ cartridges	MEKC	30 mM sodium borate, , pH 7, 80 mM SDS, 14% MeOH, 20% isopropanol	10 $\mu\text{g l}^{-1}$	Soil samples	126

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
Monuron, linuron, diuron, isoproturon and monolinuron	C ₁₈ cartridges	MEKC	4 mM sodium tetraborate, 12 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7.0, 30 mM SDS	0.04 µg l ⁻¹	Rain and surface water samples	127
Simazine, cyanazine, atrazine, ametryne, propazine, prometryne and terbutryne	C ₁₈ cartridges	MEKC	60 mM Borate buffer, pH 9.2, and 50 mM SDS	Sub-µg l ⁻¹	Natural waters	128
Pesticide mixture	Carbopack, C ₁₈ cartridges	MEKC	20 mM phosphate, pH 7, with 50 mM SDS and butanol	Sub-µg l ⁻¹	Water samples	41
Triazine dione herbicide	ENVI-Carb cartridges	MEKC	12 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM sodium borate, 50 mM SDS and 15% methanol	Sub-µg l ⁻¹	Groundwater	42
Atrazine and terbutylazine metabolites	SDVB (LiChrolut EN)	MEKC	30 mM sodium borate, pH 9.3, 30 mM SDS	Sub-µg l ⁻¹	Tap and river water	129
11 Carbamates	SDVB	MEKC	Sodium borate, 50 mM SDS and methanol	µg l ⁻¹	Tap water	130
Carbamates and their hydrolytic metabolites	Activated carbon, RP-C ₁₈ , XAD-2, Florisil, Sordolit PAD I and LiChrolut-EN	MEKC	25 mM phosphate and 20 mM borate, pH 8, with 40 mM SDS.	µg l ⁻¹	River and pond water	131

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
2 Organotin compounds	C ₁₈ , C ₈ , phenyl functionalized sorbent, Amberlite XAD-2 and Amberlite XAD-4	CZE	20 mM tartaric acid, 20% methanol, 4 mM BTMA	μg l ⁻¹	Natural waters	132
7 Enantiomeric pesticides	Oasis HLB cartridges	CD-MEKC	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7, 50 mM sodium cholate, 15 mM DM-β-CD	μg l ⁻¹	Lake water	133
Carbamates and triazines	C ₁₈ cartridges	MEKC	50 mM borate, pH 8, 30 mM SDS	0.1 μg l ⁻¹	Drinking water	72
6 Organonitrogen pesticides	C ₁₈ cartridges	MEKC	12.5 mM sodium borate, pH 9, 50 mM SDS	0.8 μg l ⁻¹	Drainage water	73
9 Urea herbicides	C ₁₈ cartridge	CEC	NaH ₂ PO ₄ , pH 6/ ACN 40:60 (v/v)	0.1 μg l ⁻¹	Water samples	134
Triazines	On-line C ₁₈	CZE	50 mM phosphate	μg l ⁻¹	Water samples	135
Triazines	At line C ₁₈ SPE mini-column	MEKC	10 mM NaH ₂ PO ₄ , 60 mM SDS, 8% ACN, pH 9.5	μg l ⁻¹	River water samples	67
PHENOLS						
11 EPA priority phenols	SDVB	CZE	20 mM borate, pH 9.9	μg l ⁻¹	River and industrial waste water	136
Pentachlorophenol	Graphitized carbon black cartridges	CZE	40 mM sodium borate, pH 10	ng l ⁻¹	Drinking water	40

Compounds	SPE sorbent	CE mode	Electrophoretic buffer	Detection limits	Sample matrix	Ref.
Chloro and nitrophenols	Cross-linked polystyrene cartridges	CZE	40 mM sodium borate, pH 9.8	$\mu\text{g l}^{-1}$	Tap waters	138
Pentachlorophenol	On-column SPME, (PA fiber)	CZE	20 mM sodium borate, pH 9.9	$\mu\text{g l}^{-1}$	Water samples	52
Chlorophenols	Cross-linked polystyrene-divinylbenzene copolymer cartridges	MEKC	50 mM N-(2-acetoamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES) at pH: 6.1 with 22 mM SDS	$0.1 \mu\text{g l}^{-1}$	River water	140
MISCELLANEOUS						
Haloacetic acids	SAX, SDVB, graphitized carbon black, OASIS HLB	CZE	4 mM 2,6-naphthalene dicarboxylic acid, 0.5 mM CTAB (pH 7.5)	$\mu\text{g l}^{-1}$	Chlorinated waters	38
Metallo-cyanide complexes	Sep-Pak C ₁₈ cartridges	CZE	5 mM trimellitic acid, pH 9.5	mg l^{-1}	Leaching solutions from a gold mine	143
EDTA	SAX disks	CZE	30 mM ammonium formiate pH 3 with formic acid	$0.15 \mu\text{g l}^{-1}$	Water samples	145
Alkylphosphonic acids	Barium, silver and H ⁺ cartridges	CZE	200 mM boric acid, 16 mM phenyl-phosphonic acid, 0.03% Triton X-100, 0.35 mM DDAOH, pH 4.	$1-50 \mu\text{g l}^{-1}$	Water and soil samples	147

SIGNIFICANT MODES IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS.

Capillary electrophoresis has been increasingly used in the last few years to separate and determine a wide range of analytes. CE have been extensively used in biomedical fields for such important analyses as DNA sequencing, protein identification, drug analysis... More recently, CE is also being used in the field of environmental analysis. Environmental pollutants comprise a wide variety of compounds, and different strategies are required to separate them.

Capillary zone electrophoresis (CZE) separation is based on differences in the electrophoretic mobilities (determined by size and charge) of charged analytes in an electric field. However, since many environmental pollutants are uncharged or have very similar chemical structures, they often cannot be separated by CZE and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) has to be used. MEKC separations are based on the differential solubilization of the analytes in the micellar phase. So, they are partitioned between the micelle (the so-called pseudostationary phase) and the aqueous phase which means that they can be retained differently and then resolved, even when they have no charge or when the charged compounds are badly resolved by CZE.

Capillary electrochromatography (CEC) uses an electric field and an electroosmotic flow to drive solutes through a capillary column packed with a chromatographic type stationary phase. Separation is based on partitioning the analytes between the running buffer and the stationary phase, and, in the case of charged analytes, on their electrophoretic mobility.

SOLID-PHASE EXTRACTION AND SOLID-PHASE MICROEXTRACTION PROCEDURES

Preconcentration and clean-up systems such as liquid-liquid extraction (LLE), solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction (SPME) are needed to determine concentrations of pollutants in environmental samples. Nowadays, LLE is being replaced by SPE and SPME because they do not require large amounts of generally toxic and inflammable solvents, and the concentration step is cheaper and shorter.

Sometimes, before the analytes are separated, the sample must be cleaned up to avoid interferences. In some studies^{23,29-32} SPE has been used as a clean-up and preconcentration technique so that the selectivity and limits of detection of the analytes are better. Krynitsky³¹ presents an extraction/clean-up system for analysing sulfonylurea and sulfonamide herbicides by CE in marsh water. First of all, the samples were extracted with a reversed-phase RP-102 SPE cartridge and then the extract was cleaned up with a tandem system consisting of a strong-anion exchange (SAX) SPE cartridge stacked on top of an alumina SPE cartridge. The extracts were clean enough to confirm $\mu\text{g l}^{-1}$ levels of the herbicides. Apart from the main goal of extracting traces of the compounds of interest and removing the interfering components from the matrix, SPE is also used to change the solvent (e.g. aqueous to organic) and store and transport the analytes.³³

Nowadays, new sorbents have been commercialised, mainly for the extraction of polar analytes: C_{18} specially designed for polar compounds,^{34,35} several styrene-divinylbenzene copolymers,^{22,36-38} graphitized carbon blacks,³⁹⁻⁴² and divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone copolymers.^{38,43,44}

Recently, a new extraction technique, solid phase microextraction (SPME) has been introduced as an alternative to conventional techniques.⁴⁵ SPME is a rapid solvent-free technique for extracting organic compounds from environmental samples and it is easily automated with certain modifications.⁴⁶ SPME is based on the partition equilibrium of target analytes between a polymeric stationary phase, which is coated on a fused silica fiber, and the sample matrix. SPME can easily be coupled to GC and, with some modifications, to LC and CE.⁴⁷⁻⁵³

Very few applications of SPME in conjunction with CE have been reported. The SPME-CE coupling is more difficult than SPME-LC because the interface must allow for the introduction of the very small injection volumes used in CE. However, the miniature nature of the extraction fiber suggests that in the immediate future many SPME-CE separations will be developed. In environmental analysis, SPME with CE has been applied to determine 16 EPA priority PAHs using CD-modified CE.⁵³ A polydimethylsiloxane (PDMS) fiber was used to absorb the compounds from diluted samples and the analytes were directly released into the CE electrolyte stream, using an adapter. Whang and Pawliszyn⁵² designed an interface that enables the SPME fiber to be inserted directly into the injection end of a CE capillary. They prepared a "custom-made" polyacrylate fiber to reach the SPME-CE interface (Figure. 1). This interface was tested for determining phenols in water samples.

The advantages of on-line over off-line SPE or SPME are that it is more sensitive and manipulates the samples less. This makes it more precise and easier to automate. Some studies have shown the potential of on-line SPE in CE.⁵⁴⁻⁶⁴ A small amount of sorbent, either a bed of solid-phase packing material⁵⁷⁻⁶² or an adsorbing polymeric membrane^{63,64} is placed on-line as a

microcartridge at the inlet end of the capillary in the CE instrument. Recently Petersson et al.⁶² presented the construction of an enrichment capillary to be used in on-line SPE-CE. The enrichment capillary was made small enough to be used in a commercial instrument and once installed in the CE instrument no manual handling was required. To prepare the enrichment capillary, three capillaries of two different inner diameters (IDs) were used. The smaller ID capillary was inserted between other capillaries with higher IDs and fixed with epoxy glue. Concentration factors of three to four orders of magnitude were reached.

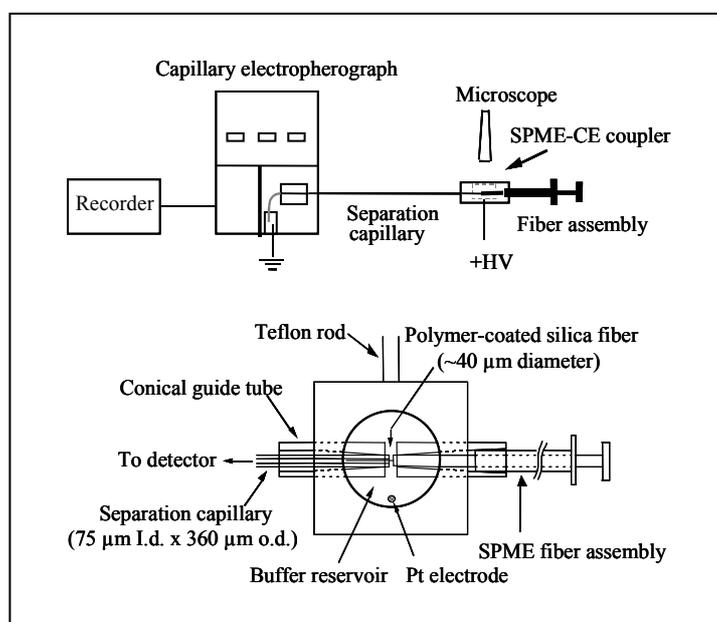


Figure 1 Schematic of the SPME-CE system. Reproduced from Ref. 52, with permission of The Royal Society of Chemistry.

Veraart et al.⁶⁵ presented an at-line SPE device for CE. An automated SPE unit is connected to the CE instrument by means of a laboratory-made interface (Figure. 2). The polyetherether ketone (PEEK) tubing interface

allows a continuous flow of the CE buffer through the interface and at the end of the SPE step the analytes are desorbed using a solvent that is flushed through the interface via a loop. The system was used to analyse about 900 complex biological samples for a year and the loop, interface and capillary did not block up during this period.

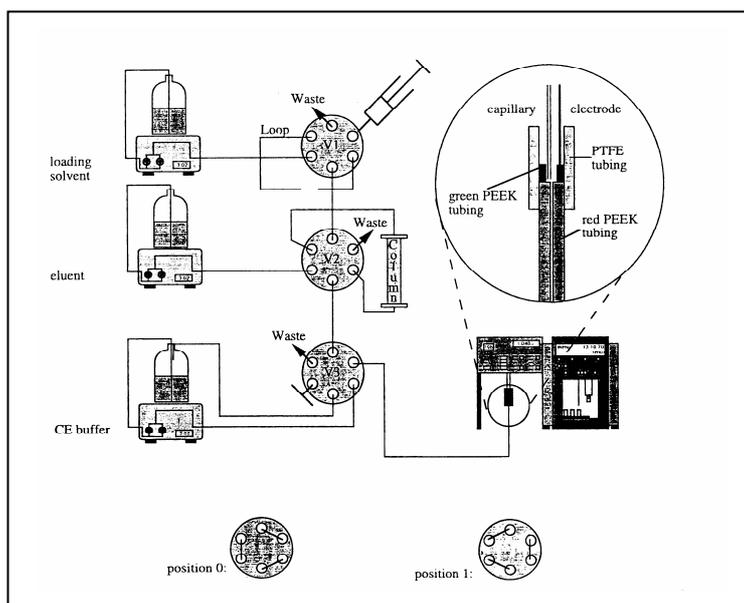


Figure 2 Schematical representation of the LC-CE configuration. Reprinted with permission from Ref. 65.

Valcárcel et al. ^{24,66,67} coupled an automated continuous flow system (CFS) for sample preconcentration to a commercial CE instrument using a mechanical and electronic interface. A SPE process was incorporated in the CFS for automatic preconcentration. The mechanical interface was a laboratory-made programmable arm which directly injected the sample into the sample vial in the autosampler of the CE instrument. The system

enabled pesticides present in real samples at trace levels to be preconcentrated and determined completely automatically.⁶⁷

OTHER METHODS FOR MANIPULATING SENSITIVITY IN CE

The sample size in CE is determined by the length of the sample introduction procedure. When the injection time increases, the length of the sample plug injected into the capillary also increases, and detection limits can be lower. However, the increase in the sample injection is limited by the impact of peak broadening, and can negatively influence the separation efficiency. To increase the amount of sample injected beyond the optimal conditions, but to still maintain high resolution, the sample matrix must be removed after the stacking process is completed.⁶⁸⁻⁷⁰ One way of doing this is to pump the matrix out of the column using the electroosmotic flow. However, this pumping technique works only on ions that have negative mobility with respect to the electroosmotic flow. The main advantage of this system is that, without modifying the instrument, large volume injections give enrichment factors of more than 500, which make it possible to make analyses at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.

The maximum filled length of sample which is possible without loss of any analytes using this technique has been studied theoretically.⁶⁸ Nevertheless, some authors^{69,70} have concluded that results are good when the whole capillary is filled with the sample solution. Recently, this technique has been used in such environmental applications as the determination of phenols^{69,71} and pesticides.⁷²⁻⁷⁵ In all these examples, the limits of detection were reduced, and it can be seen that the technique can be used to separate and detect low amounts of analytes in relatively clean

samples. However, it can be problematic in real samples in which the matrix components can interfere and mask the analytes of interest.

Isotachopheresis (ITP) is an electrophoretic technique which is carried out in a discontinuous buffer system. ITP can be used to preconcentrate samples in CE.^{76,77} The on line ITP-CE combination can be used in several different arrangements.⁷⁸⁻⁸⁰ With on line ITP-CE, two capillaries are connected. The ITP capillary enables the analytes to be concentrated and the matrix components to be removed, and the narrow-diameter CE capillary ensures the sensitivity of the analysis. The potential of the on-line ITP-CE technique has been shown by the environmental trace analysis of herbicides, such as diquat and paraquat, and other polar pollutants.⁷⁸ With ITP-CE, the minimum detectable concentration of these compounds can be reduced by a factor of 10^3 - 10^4 compared to single CE. The on-line coupling of ITP and CE has also been used to determine traces of iron in water at the $\mu\text{g l}^{-1}$ level.⁸¹ Water samples from different sources showed that no peaks interfered in the iron determination.

Several research groups have carried out interesting studies with LC components coupled on-line to CE. Like on-line ITP-CE, two capillaries are coupled together. The LC capillary is used for preconcentration and clean up, and traps the analytes when large sample volumes are loaded. The CE capillary separates the analytes retained in the LC capillary. The on-line LC-CE system has been used in samples which have higher salt concentrations than the CE electrolyte for which the electric field over the sample plug is too low and the peak sharpening effect is less effective.⁸² When LC is coupled to CE, however, the peak shape of the analyte is the same for different salt concentrations.

SPE-CE APPLICATIONS

The review mainly focuses on organic pollutants of environmental interest, but the miscellaneous section discusses other applications, which are not the main focus of environmental analysis but they show that SPE-CE is increasingly applied to a broader range of compounds.

SURFACTANTS

Surfactants are applied as complex homologous and isomeric mixtures in such household and industrial products as laundry detergents, cosmetics and pharmaceuticals. Surfactants have a toxic impact on aquatic organisms and long-term effects on soils and sediments after they have been deposited.

Surfactants present a variety of analytical problems: they are made up of many different components, they are not volatile and they occur as interferences in environmental analyses. CE, however, can provide high resolution separation of a wide variety of ionic and nonionic surfactants, and can analyse standard mixtures and industrial products, as well as complex formulations such as detergents, cosmetics, pharmaceuticals and environmental samples.⁸³⁻⁸⁶ Likewise, homologous oligomers and isomers can be resolved in a short analysis time. Despite these advantages it has one main drawback: its detection limit is higher than the limit of chromatographic separations.

Linear alkylbenzenesulfonates (LAS) are the most widely used anionic surfactants in detergent formulations and they are the surfactants which

have most been studied. They are present in commercial formulations as complex mixtures of C10-C14 homologues and of the positional isomers which results from the attachment of the phenyl ring to the carbon atoms (from the second to the central one) of the linear alkyl chain. Due to their detergent properties, they have a toxic influence on aquatic organisms. Therefore, the selective and sensitive determination of LAS in environmental samples is of great importance.^{87,88}

CE is very suitable for determining LAS because they have both charge and UV absorbance. LAS have been determined as total LAS and separated into homologues and isomers in industrial and household formulations. Total LAS content, which is sufficient for general assessment of the pollution of waste water and surface water, can be determined by CZE using phosphate or borate buffers without adding organic solvents.⁸⁹ Homologous and isomeric separations are important in industrial and environmental samples, because detergent properties, biological degradation and aquatic toxicity depend on the alkyl chain length and the position of the phenyl.

Using organic solvents like acetonitrile as buffer modifiers, alkyl homologues of LAS can be separated.⁸⁹⁻⁹¹ The isomeric separation of LAS has been extensively studied by Vogt et al.^{89,92} They separated the LAS isomers using host-guest interactions with cyclodextrins in technical products^{85,89} and they also described a method for almost complete resolution of LAS isomers based on the formation of association complexes with SDS in phosphate-acetonitrile buffers.⁹² They applied both methods to determine total LAS and homologous distribution in various real samples after enrichment by SPE. They used a combination of RP-C₁₈ columns and SAX cartridges to preconcentrate and clean up LAS. The SAX cartridge was used for the clean-up step to remove disturbing non-ionic compounds, to

prevent an irreversible contamination of the inner capillary surface and to stop matrix components overlapping LAS peaks. In waste water samples, recoveries were high, but enrichments were low for the longer chain homologues. The limit of detection was found to be 1 mg l^{-1} . In sewage sludge samples (Figure. 3) LAS homologues were quantified at low mg g^{-1} levels and after SAX extraction recoveries were between 33.1% and 70.5%. The authors conclude that CE was efficient and sensitive enough to analyse LAS in samples such as household detergents, river waters, waste waters and sewage sludges. They recommend that the preconcentration process be carefully optimised according to sample composition.

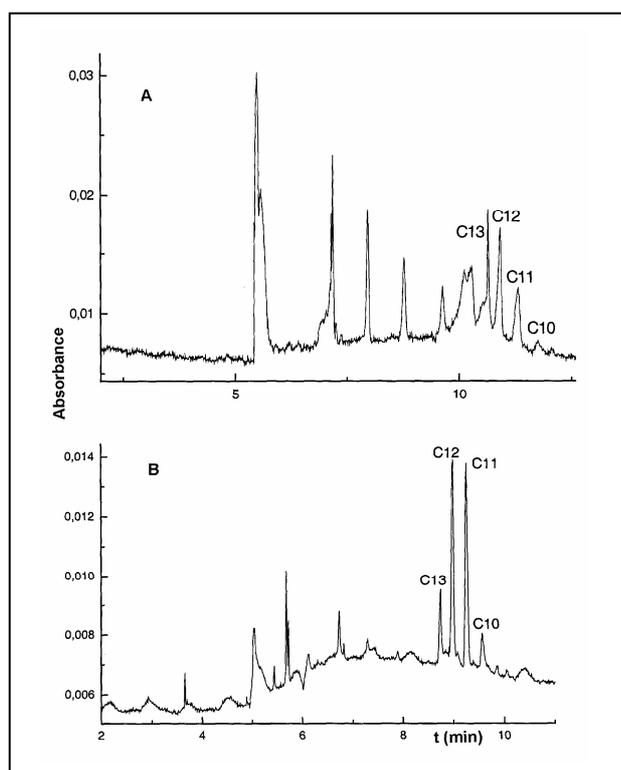


Figure 3 Analysis of sewage sludge for LAS (a) after methanolic and SAX extraction. Capillary, 50/57 cm x 75 μm ID; voltage: 25 kV; detection, UV at 200 nm; buffer, 250 mM borate (pH 8)-30% acetonitrile. Reproduced from Ref. 92, with permission of The Royal Society of Chemistry.

Biodegradation of LAS leads to a series of mostly chiral isomeric sulfophenylcarboxylates (SPC) which can be detected in treated sewage effluents. CE was applied with α -cyclodextrin as the chiral selector to separate the enantiomers of p-sulfophenyl-2-butyrate (SP2B) and p-sulfophenyl-3-butyrate (SP3B).⁹⁴ Using SPE on the graphitized carbon black Carbo-pack B sorbent, and applying a stacking technique in CE, chiral biodegradation intermediates were determined at the $\mu\text{g l}^{-1}$ level in mechanically treated sewage effluent. Samples of filtered sewage water were passed through the Carbo-pack B cartridge, and the analytes were eluted with ammonium acetate in dichloromethane/methanol. The eluate was evaporated and the residues were redissolved in water and analysed by CE using citrate buffer containing α -CD, with a detection limit for SP3B of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Recently, considerable attention has been paid to the cleaning of processing equipment within the pharmaceutical industry to ensure that no cross contamination of the manufactured product arises from material left over from a previously manufactured product. Although they did not use a preconditioning step, Altria et al.⁹⁵ reported that CE could be used with a simple, high-pH buffer to quantitatively monitor detergent residues at trace level after processing equipment had been cleaned. They improved the sensitivity of the CE analysis using indirect UV detection and low wavelengths (200 nm), where many solutes have enhanced UV activity. The limit of detection was found to be 0.6 mg l^{-1} , which meant that the method is well suited for routine purposes in the pharmaceutical industry.

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs)

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous pollutants of anthropogenic origin which are a potential health concern because of their toxicity, mutagenicity and carcinogenicity in animals. They can be detected in the atmosphere as well as in surface waters, sediments and soils. Several laws on water for public consumption include control over PAHs.

PAHs are difficult to separate using CZE because they are uncharged and highly hydrophobic. As reported in previous papers ^{16,96} a number of different approaches, such as MEKC ^{97,98}, CD-modified CE ⁹⁹⁻¹⁰¹ and CEC ¹⁰²⁻¹⁰⁴, have been used to separate these compounds. In order to improve the sensitivity detection compared to on-line absorbance detection, laser-induced fluorescence (LIF) detection has been used. ¹⁰⁵

Luong et al. ^{53,99,106} developed several cyclodextrin-modified CE procedures to separate the 16 US EPA priority PAHs using LIF detection. A separation method using a mixture of a negatively charged β -CD and a neutral β -CD was able to separate the 16 US EPA priority PAHs as well as other aromatic hydrocarbons with high efficiency in 20 min ¹⁰⁶. The method developed was used to analyse PAHs in contaminated soils. Soils were extracted using CO₂ supercritical fluid extraction (SFE), and the extract was provided in dichloromethane/methanol. The extracts were diluted 50-fold in methanol-water and analysed, providing sensitive detection of 11 of the 16 compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.

Nguyen and Luong ⁵³ developed the first application of SPME with CD-modified CE using a UV detector to separate and analyse PAHs (Figure. 4). A hand-made PDMS fiber was used to absorb the 16 US EPA priority PAHs

from the diluted sample until equilibrium was reached. Then, the SPME fiber was connected to a separation capillary via an adapter and the absorbed analytes were directly released into the CE buffer stream. The electrophoretic separation was performed using a mixture of α - and β -CDs in borate buffer. The highest limit of detection was $75 \mu\text{g l}^{-1}$ for acenaphthene and the lowest was $8 \mu\text{g l}^{-1}$ for pyrene. The reproducibility was very satisfactory with respect to migration time and peak area for repetitions in which the same capillary and adapter were used and the extraction fiber was discarded after each analysis. The sensitivity is only slightly lower than for CE equipped with LIF. Nguyen and Luong announced that work is currently in progress to couple SPME-CE for the detection and quantification of PAHs in contaminated soils and water.

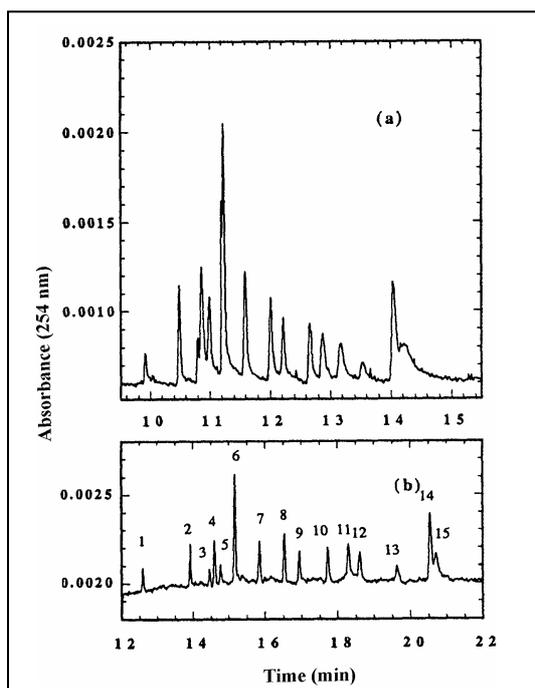


Figure 4 Electropherograms obtained with 35 mM SB- β -CD, 10 mM M- β -CD, 4 mM α -CD in 50 mM borate buffer, pH 9.2. (a) without microextraction, sample 40x, 57 cm capillary. (b) with microextraction, sample 4000x, 67 cm capillary.

Peaks: (1) Dibenz[a,h]anthracene, (2) Acenaphthylene, (3) Acenaphthene, (4) Naphthalene, (5) Fluorene, (6) Anthracene, (7) Phenanthrene, (8) Chrysene, (9) Benz[a]anthracene, (10) Benzo(k)fluoranthene, (11) Fluoranthene, (12) Benzo[a]pyrene, (13) Pyrene, (14) Benzo[b]fluoranthene, (15) Indeno[1,2,3-cd]pyrene. Reprinted with permission from Ref. 53. © 1998 American Chemical Society.

The considerable number of PAH capillary electrophoretic separation procedures described in the bibliography show that it is a useful technique for separating PAHs. However, only a few environmental applications have been reported in the period covered by this review.

DYES

Large quantities of dyes are produced and used in the manufacturing of various products such as textiles, paint pigments, printing inks and food colouring. Dyes are difficult to determine because they encompass many chemical functionalities with considerable differences in solubility, volatility, etc.

Sulfonated azo dyes are widely used in the textile industry to colour natural fibres. Their degradation products include amines which are known to be carcinogenic. Sulfonated azo dyes are incompatible with GC because they are nonvolatile and thermally unstable compounds, and some problems have been found in the determination of these compounds by LC. Although most of these compounds are charged, the MEKC mode is usually preferred to separate them.

Brumley et al.³⁰ used MEKC with borate at pH 8.3 and cholic acid as running buffer to determine 56 aromatic-containing organic acids (AOAs) including several azo and other dyes. They extracted two sulfonated azo dyes (Triptan Blue and Orange II) and five aromatic organic acids by means of Empore polystyrene-divinylbenzene extraction disks and strong cation exchange (SCX) cartridges. Spiked water samples were extracted by Empore disks and eluted in two ways: with an organic aqueous solvent and with an ion-pairing agent. Fractions were passed through the SCX cartridge.

Solid samples were extracted by either sonication or Soxhlet methods, and the extracts were subsequently treated like the water samples. Recoveries for the polysulfonated dye Triptan Blue in soil were only about 28% and this was attributed to the complex structure of the dye. In water, the recoveries were higher. The monosulfonated dye Orange II was extracted with good recoveries for both water and soil samples.

Schönsee et al. ¹⁰⁷ reported a MEKC method for determining eight mono- and disulfonated commercial dyes. An automated off-line SPE (ASPEC XL) followed by a MEKC analysis was optimised. Separation by MEKC with a buffer of ammonium acetate and Brij 35 provided good efficiency, resolution and reproducibilities. Two highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene sorbents, Isolute ENV+ and LiChrolut EN, were compared as solid phases for the extraction of spiked groundwater samples, obtaining best recoveries (up to 71%) when Isolute ENV+ was used. So, it was selected for further investigations. The UV detection limits of the dyes for the preconcentrated spiked water samples ranged between 10 µg l⁻¹ and 150 µg l⁻¹. As is shown in Figure. 5 satisfactory results were obtained for spiked ground water samples.

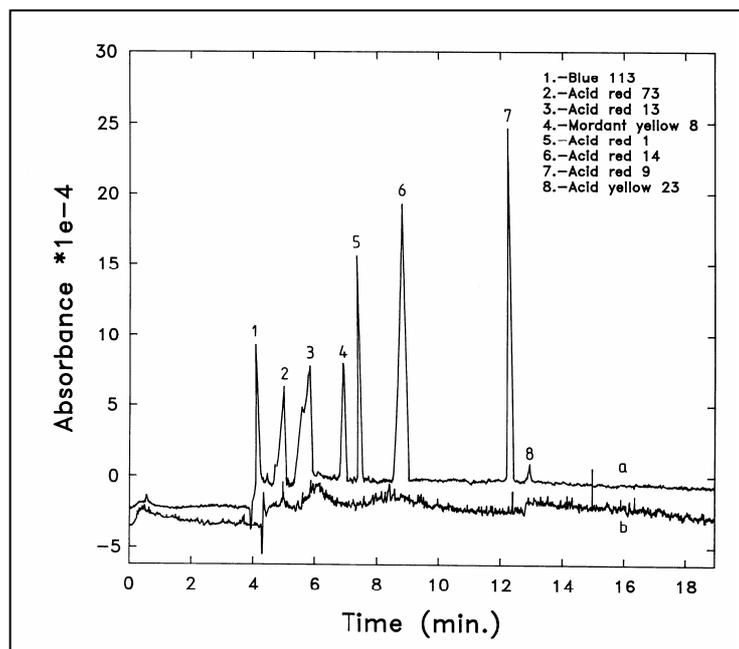


Figure 5 (a) CE-UV (214 nm) Electropherogram of the separation of eight sulfonated azo dyes spiked in groundwater (3 mg l^{-1}) after off-line SPE with Isolute ENV+ cartridges. Separation was carried out with a buffer solution of ammonium acetate 9.2 mM and Brij 35 0.05%. Peaks: (1) Acid Blue 113, (2) Acid Red 73, (3) Acid Red 13, (4) Mordant Yellow 8, (5) Acid Red 1, (6) Acid Red 14, (7) Acid Red 9, (8) Acid Yellow 23, concentration: $50 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$. (b) CE-UV (214 nm) Electropherogram of an unspiked groundwater after SPE with Isolute cartridges. The injected blank was 20-fold higher concentrated than sample (a). Reprinted with permission from Ref. 107.

Recently, the same authors¹⁰⁸ determined one monosulfonated (Mordant Yellow 8) and seven disulfonated azo dyes (Acid Red 1, Mordant Red 9, Acid Red 13, Acid Red 14, Acid Red 73, Acid Yellow 23 and Acid Blue 113) in spiked groundwater samples and industrial effluents by automated SPE coupled to CE with UV and MS detection. CE/MS was used to confirm that the dyes were present in the extracted water samples. For the CE/UV analysis, the MEKC separation was carried out using ammonium acetate and

Brij 35 in water as electrophoretic buffer, but for the CE/MS analysis, no Brij 35 was added to the buffer solution because it was found to suppress the ionization. In both ¹⁰⁷ and ¹⁰⁸, Isolute ENV+ and LiChrolut EN were compared, but in ¹⁰⁸ an amine base (TEA) was added to the solvent mixture to enhance the effectiveness of the elution step. Using Isolute ENV+ as sorbent and 100% MeOH (0.01% TEA) as eluent, recoveries varied from 64 to 83% for most dyes. With LiChrolut EN, and even when the eluent was optimised, recoveries were poorer (up to 49%). Sulfonated azo dyes were determined in real samples from industrial effluents, with detection limits between 10 and 150 µg l⁻¹ for CE/UV detection and from 100 to 800 µg l⁻¹ for CE/MS under time-scheduled selected-ion monitoring conditions. The selectivity of the technique was good, particularly in the analysis of industrial effluents, where the number of interferences is high.

Farry et al. ¹⁰⁹ investigated the limits of detection of four structural types of industrial dyes given by CE. The dyes used were Malachite green (MG), Indigo Carmine (IC), Cibacron Blue 3GA (CB) and Remazol Black B (RB). Off-line concentration using SAX Bond Elut cartridges was found to be an effective method for concentrating the hydrolysed Remazol dyes from 1 l sample volumes. The SAX Bond Elut cartridge is a strong anion exchanger which binds negatively charged species like the hydrolysed Remazol dyes. Such species were only eluted with a counter ion such as Cl⁻. When 30% Conc. HCl in MeOH was used, recoveries for hydrolysed Remazol dyes were about 90% and detection limits were in the range 5 x 10⁻⁸- 1 x 10⁻⁷ M, which are 20-50 times better than the limits obtained using on-capillary stacking with reverse polarity CE.

Brumley et al. ¹¹⁰ compared capillary liquid chromatography (cLC) with MEKC using LIF detection to separate synthetic dyes (Nuclear Fast Red,

Cresol Red, Acid Red 151, Acid orange 8, Orange II, Acid Blue 40, Tropaeolin O). Both techniques were capable of resolving the compounds studied at high efficiency. The MEKC buffer consisted of boric acid/sodium borate, sodium cholate and acetone. Four dyes (Cresol Red, Acid orange 8, Acid Blue 40, Tropaeolin O) were selected for detailed studies of the extraction/clean-up of the dyes from water and soil matrices. Water samples were extracted using the polystyrene-divinylbenzene Empore extraction disks. Water to be extracted was adjusted to pH 1 or solid cetyldiethylmethylammonium bromide (CEMA) was added to the spiked water for ion-pairing extraction. CEMA was removed from the extractant via an SCX cartridge. Both pH adjustment via acid and ion-pairing via cationic surfactant were investigated for isolating dyes. Recoveries of dyes from water at 1 mg l⁻¹ were relatively good with both methods. Soils were extracted by sonication, and the diluted extract (pH 1) was passed through the Empore extraction disk. The compounds were isolated as for spiked water. An additional C₁₈ SPE cartridge was used to clean up the samples isolated from the extraction disk. Recoveries were good (between 80-100%) for most compounds, except for Tropaeolin O, from 3 mg l⁻¹ spiked soil samples. It was clear that MEKC and reverse phase cLC complemented each other because of their ability to quantitate and identify analytes, respectively.

Groundwater migration is an important factor which determines the distribution and fate of environmental pollutants originating from various waste sites. Fluorescent dyes can be used as groundwater migration tracers; they are a suitable choice because they are easily detected at low concentrations. Logically, CZE/LIF applications should be ideal for determining anionic or cationic dyes. In CZE, the dyes are separated simply on the basis of their mobilities in aqueous buffers. Ferguson et al.¹¹¹ used

CE/LIF detection to determine fluorescein dye as a tracer compound for groundwater migration and compared the results to those obtained with traditional spectrofluorimetry. Fluorescein was isolated from spiked deionized water samples or groundwater samples using SPE with styrene-divinylbenzene extraction disks. The SPE allowed the detection limit to be extended to 10^{-4} M in spiked water samples. The detection limits achieved by CE/LIF were as good as or better than those of traditional spectrofluorimetry, but specificity was increased because of the separation based on ion mobilities.

Alcantara-Licudine et al.¹¹² developed a method for analysing phloxine B and uranine. These photoactive dyes, were evaluated as fruit fly toxicants in coffee cherries and green roasted beans. The analytes were determined by HPLC and CZE using UV and fluorescence detection after clean-up with disposable amino cartridges. Several types of SPE columns (amino, SAX, cyano, diol, octadecyl, and phenyl) were first tested to cleanup the extracts. Amino and SAX were further investigated. The efficiency of the clean-up and elution was evaluated as recoveries of the dyes from the columns. The amino column was preferred because a higher concentration of base was required to elute the dyes from the SAX column. A mixture of MEOH/ACN/n-butylamine effectively extracted phloxine B and uranine, with good recoveries of each compound from both tested samples. The major advantages of CZE are the short analysis time and the inexpensive columns and aqueous buffer.

ALIPHATIC AND AROMATIC AMINES

Aliphatic amines are commonly used chemicals: they are used as starting materials in the manufacturing of pharmaceuticals, insecticides, herbicides,

fungicides, polymers, surfactants and rubber accelerators. The many commercial uses of aliphatic amines suggest that they will appear in the environment as pollutants. Thus, they are target analytes of several US EPA procedures.

Matchett and Brumley ¹¹³ used CE with indirect UV detection to determine several aliphatic amines (C1 to C4 alkyl-substituted primary, secondary and tertiary amines) and some alkanolamines in water. Amines with similar mobilities were resolved by adding nonionic surfactants or selecting the pH and optimising the match between the mobility of amines and the running buffer. Various SPE adsorbents and systems for the preconcentration of such compounds were evaluated. Three adsorbent systems were examined: cation exchange (SCX) cartridges, ion-pairing with C₁₈ extraction disks and cation ion exchange extraction disks. The average recoveries, from diluted aqueous solutions, for propyl-, dipropyl- and tripropylamine, using C₁₈ extraction disks and sodiumdodecylbenzenesulfonate as ion pairing agent, were nearly 100%. Using cation exchange disks, the recoveries for the same compounds compared well with the best ion-pairing results. Recoveries for some analytes, however, were disappointing. In particular, methyl- and ethylamine were not quantitatively recovered from the disks. Butyl-, dibutyl- and tributylamine approached quantitative recovery levels. The detection was in the range of 0.02 mM with preconcentration. These results demonstrated that CE with indirect UV detection is useful for determining organic amines in aqueous solutions and also that SPE can routinely achieve concentration factors in the order of 100-fold or more for selected analytes.

Substituted anilines and benzidines are widely used in the chemical industry as intermediates in the production of dyes, pesticides,

pharmaceuticals, etc. These compounds are very well known because of their toxicity and suspected carcinogenicity. Owing to their high solubility in water, aromatic amines can easily permeate soil and contaminate groundwater. Cavallaro et al.¹¹⁴ used a mixture of keto-derivatized and underivatized poly(styrene-divinylbenzene) copolymer for the selective SPE of 21 aromatic amines in environmental samples (Figure. 6). Before extraction, water samples were adjusted to pH 6.5-8, and the retained compounds were eluted with phosphoric acid in water-acetone. The extract was then analysed by CZE, using phosphate (pH 2.35) and 1,3-diaminopropane buffer, with UV detection. Linearity was good for all amines over more than two orders of magnitude of concentration. The limits of detection ranged from 0.06 to 1.8 mg l⁻¹. The recoveries for the amines were better than 82% except for the most hydrophilic ones, for which they were about 60%. The proposed method is simple and fast, and complex matrices do not need to be prepared.

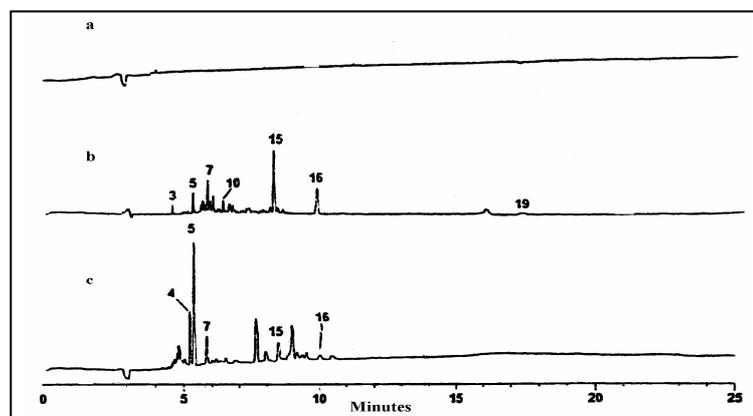


Figure 6 Electropherograms of real samples after 1000-fold SPE preconcentration. (a) tap water. (b) First layer groundwater. Peaks: (3) Benzidine (2.7 µg/l), (5) Aniline (1.8 µg/l), (7) *p*-Anisidine (1.5 µg/l), (10) Ethylaniline (0.5 µg/l), (15) *o*-Chloroaniline (9.9 µg/l), (16) 3,4-Dichloroaniline (2.9 µg/l), (19) 2,4-Dichloroaniline (1.1 µg/l). (c) Soil sample from industrial plant. Peaks: (4) *o*-Toluidine (600 µg/kg), (5) Aniline (801 µg/kg), (7) *p*-Anisidine (11.2 µg/kg), (15) *o*-Chloroaniline (15.2 µg/kg), (16) 3,4-Dichloroaniline (1.8 µg/kg). Buffer, 50 mM NaH₂PO₄-7 mM 1,3-diaminopropane (pH 2.35, adjusted with H₃PO₄); capillary: underivatized silica, 65 cm x 50 µm ID, applied potential, 30 kV; detection, UV at 280 nm. Reprinted with permission from Ref. 114.

Heterocyclic aromatic amines (HAAs) are carcinogenic in rodents and may cause common human cancers as well. As reported in the literature, some beef flavours also contain potent mutagenic HAAs. Puignou et al.²³ developed a method to determine 5 HAAs by CE in a commercial meat extract. Sample preparation and clean up were carried out according to the method proposed by Gross using: EXTrelut extraction cartridges (a specially processed wide-pore kieselguhr with a high pore volume from Merck), the functionalized polystyrene-divinylbenzene Bond-elut polypropylsulfonil silica gel sorbent and C₁₈ cartridge. The absorbed HAAs were eluted from the C₁₈ SPE column and analysed by CZE using KCl-HCl at pH 2.20 as running electrolyte. Detection limits ranged from 35 to 50 µg l⁻¹ for hydrodynamic injection and from 25 to 45 µg l⁻¹ for electrokinetic injection. CE separation proved to be an efficient technique for analysing complex matrices such as beef extracts; more than 25 peaks were resolved in a very short time, but only two HAAs, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (MeIQ), were identified and quantified in the beef extract. They were quantified at 9.3 ng g⁻¹ and 10.4 ng g⁻¹ levels with recoveries of 77.7% and 66.6%, respectively. Selective and sensitive detectors were required to confirm the identities of the peaks resolved.

Mardones et al.¹¹⁵ also developed a method for the simultaneous determination of 4 heterocyclic aromatic amines, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PHIP), in fried beefsteak, meat extract, and baked salmon. The Gross extraction procedure was also used for isolating the amines. Using Na₂PO₄, methanol, and NaCl at pH 2.0, the HAAs were separated within 20 min. The detection

limits of this method were between 0.05 and 0.22 mg l⁻¹ with hydrodynamic injection and, from 0.08 to 0.16 mg l⁻¹ with electrokinetic injection. The method was applied to the analysis of real samples; recoveries ranged from 6% for PHIP to 91% for 4,8-DiMeIQx from various cooked foods. The recoveries of IQ, MeIQx and 4,8-DiMeIQx at concentrations within the range of interest provided a reliable quantification.

Biogenic amines can occur in a wide variety of foods such as soy sauce, fishery products, wine, or other fermented food. Biogenic amines may also have some potential carcinogenic effects. Arce et al.²⁴ reported the first method for the separating biogenic amines in wines using CE and indirect UV detection coupled with a minicolumn for SPE in a flow injection (FI) system 66. Their objective was to determine the major biogenic amines which are normally found at levels above 1 mg l⁻¹ in wine. Prior to separation by CE, the samples were cleaned-up to prevent interferences and concentrate the amines. A new interface for coupling FI with CE was developed to automate the treatment of samples and their transfer to the CE equipment. Weak cation-exchange adsorbents formed of carboxylic groups (CBA), and strong cation exchangers (SCX) made up of sulphonic groups and octadecylsilane (C₁₈) were tested and compared. The C₁₈ minicolumn was chosen to concentrate the amines, which were separated within 15 min using copper(II) sulphate, formic acid and 18-crown-6 as running buffer and detected with limits of detection in the range 0.05-0.1 mg l⁻¹. The overall process was successfully used to identify biogenic amines in various types of wines. Rodriguez et al.¹¹⁶ used ion-pair SPE to extract biogenic amines from soy sauce samples. Several variables were studied to establish conditions which led to the highest recoveries: type of ion-pairing agent, mode of extraction, and pH. With a C₁₈ packing and dodecylbenzenesulfonic acid as ion-pair reagent, recoveries were high. The extracted amines were

derivatized with fluorescein isothiocyanate, separated by MEKC and detected by LIF detection. Biogenic amines in soy samples were separated and quantified with detection limits in the order of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$, depending on the sample source.

AROMATIC ACIDS AND AROMATIC SULFONIC ACIDS

Aromatic acids such as vanillic, p-coumaric, ferulic and salicylic acid are important compounds in the aquatic environment. Distribution of these degradation products in the aquatic environment can provide basic information on the different sources of the overall dissolved organic matter. Deng et al.¹¹⁷ developed a method for determining aromatic acids by CZE in combination with UV detection. The method was applied to analyse these compounds in natural waters. The aromatic acids were preconcentrated by means of SPE using Sep-Pak C₁₈ PLUS cartridges at pH 2. Recoveries were quite successful for all compounds, except for the more polar ones, in 50 μM spiked samples. The low recovery of the salicylic acid may be attributed to the high polarity and the low affinity for the non-polar packing material in the C₁₈ PLUS column.

Aromatic sulfonates like benzene- naphthalene- anthraquinone- and stilbenesulfonates are widely used in industrial and domestic processes. Because of their low n-octanol-water partition coefficients (K_{ow}) they are highly mobile within the aquatic system. Therefore, they can easily pollute surface waters and pass through water treatment plants. The trace analysis of highly soluble aromatic sulfonates is still being developed and is not yet routine practice. Although they can be determined by CE, there are few reports about the analysis of such compounds and even fewer about real samples at trace levels.^{118,119}

Kok et al. ¹¹⁸ separated a mixture containing 21 naphthalene sulfonates in two runs, using a CZE and a MEKC. They analysed spiked river water samples using a three-step sample clean-up and enrichment procedure. Firstly, apolar interferences were removed using a C₁₈ SPE column, and then the naphthalene sulfonates were trapped on a C₁₈ column which was loaded with an ion-pair reagent (cetyltrimethylammonium bromide, CTMABr). Subsequently, the analytes were eluted with MeOH, which was then evaporated to dryness. Ion-pair reagents, like CTMABr, are non-volatile and cannot be removed during the final evaporation step and consequently they are still present in the final extract. Bearing in mind that ion-pair reagents will deteriorate the CE separation efficiency by influencing the EOF, a final clean-up step was added which used a SCX column to remove the ion-pair reagent was added. For most analytes, recoveries were between 78 and 108%.

Kok et al ¹¹⁹ also combined the method described above with LIF detection so that the sensitivity could be improved and many real-life samples with lower concentrations could be analysed. The use of LIF detection is highly appropriate because these compounds show native fluorescence. However, rather expensive LIF detection systems have to be used because the absorption wavelengths of naphthalene sulfonates are relatively short. SPE increased the concentration by approximately 30-fold before the CE separation and the recoveries were between 50 and 100%, except for two amino-hydroxy substituted isomers which had a much lower value (< 5%). The low to sub- $\mu\text{g l}^{-1}$ detection limits enabled two naphthalenetrisulfonates and an amino-naphthalenedisulfonates to be identified and quantified in river water samples. The data obtained satisfactorily agree with those obtained by ion-pair HPLC.

Recently Loos and Niessner ¹²⁰, proposed a new SPE enrichment procedure using the styrene-divinylbenzene adsorbent LiChrolut EN. They combined SPE and CE allowed 14 different aromatic sulfonates to be determined in water samples in the low $\mu\text{g l}^{-1}$ range (Figure. 7).

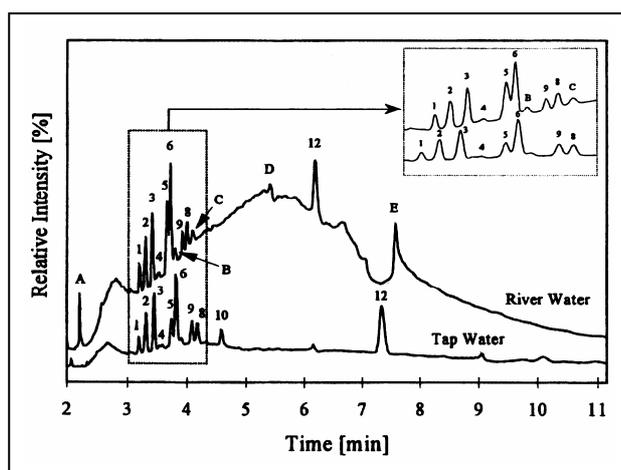


Figure 7 Electropherogram of a river Isar extract after SPE with LiChrolut EN (enrichment factor 2000). Lower plot: 14-compound sulfonate standard at 5 mg/l. Conditions: running electrolyte 25 mM sodium borate, pH 9.3, capillary 55 cm (45 cm to detection window) x 75 μm ID, voltage 25 kV, temperature 30°C, pressure injection 50 mbar for 12 s, UV detection at 230 nm. Peaks: (1) Diphenilamine-4-sulfonate, (2) Anthrachinone-2- sulfonate, (3) Diphenyl-4-sulfonate, (4) 1-Amino-5-naphthalenesulfonate, (5) 2-Amino-1-naphthalenesulfonate, (6) Naphthalene-1-sulfonate, (8) 4-Chlorobenzenesulfonate, (9) Toluene-4-sulfonate, (10) Benzenesulfonate, (12) 1-Naphthol-4-sulfonate. Reprinted with permission from Ref. 120.

After the LiChrolut EN cartridge had been conditioned, the spiked water samples adjusted to acidic pH were passed through the cartridge. The aromatic sulfonates were eluted with a MeOH:acetone solvent mixture. Separations were performed with a simple sodium borate buffer at pH 9.3.

The recoveries for most of the sulfonates were >70% for the extraction from the spiked tap and river water. Very hydrophilic sulfonates cannot be extracted by this method. The detection limit of the combined method of SPE enrichment and CE analysis was approximately $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for 200-ml water samples. The performance of the method was checked with the analysis of river and contaminated seepage water. No special sample pretreatment was applied with the tap and river waters. However, prior to enriching the seepage water with LiChrolut EN, a clean-up step with RP-C18 material was performed to remove interfering unpolar compounds.

PESTICIDES

Several hundred pesticides of a diverse chemical nature are currently used throughout world for agricultural purposes. Many of these organic compounds are positional, geometrical and optical isomers, which have been successfully analysed by CE.

Stutz et al.¹²¹ used CZE-UV to determine the hydroxymetabolites of atrazine, one of the most extensively used herbicide in the world. They studied hydroxy-atrazine, desisopropylhydroxy-atrazine, desethylhydroxy-atrazine and ammeline and used an acetate-phosphate buffer for the separations. The method was applied to determine the herbicides in potable water using SPE with styrene-divinilbenzene and a methacrylate macroporous (Amberchrom resin) cartridge. The recoveries from fortified tap water at concentrations of $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ were: 95% for hydroxyatrazine, 70% for desethylhydroxyatrazine and 20% for desisopropylhydroxiatrazine. However, because of its high polarity, ammeline was only slightly retained on Amberchrom resins and could not therefore be preconcentrated with this material.

Carabias-Martínez ¹²² studied the determination of triazines herbicides at trace concentration levels ($\text{sub-}\mu\text{g l}^{-1}$) in natural waters after a preconcentration step using C_{18} and the divinylbenzene-vinylpyrrolidone Oasis HLB cartridges in combination with non-aqueous CZE (Figure. 8). They observed that in deionized water both sorbents were satisfactory for analysing triazine herbicides. However, Oasis HLB was the most suitable for separation by non-aqueous CZE of natural waters. The separation medium was acetonitrile-methanol, perchloric acid and SDS. Finally, when this preconcentration step was combined with electrokinetic injection detection limits were low (between 0.01 and $0.05 \mu\text{g l}^{-1}$, depending on the type of matrix analysed).

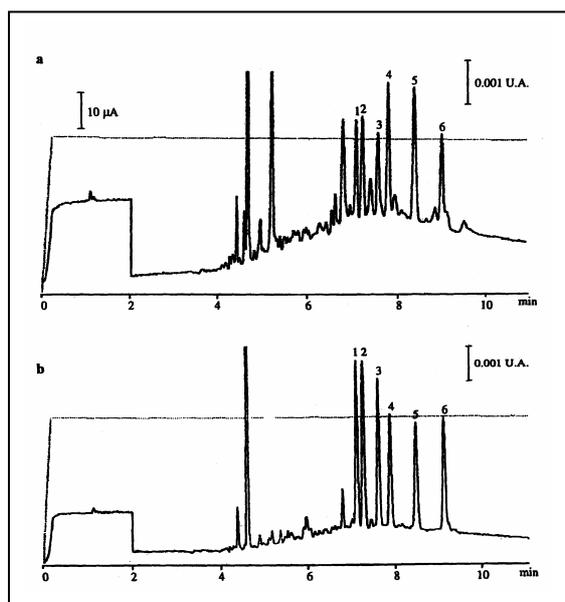


Figure 8

Electropherograms of a $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ triazine spiked neutral water samples of (a) River water (b) Drinking water, after SPE with an Oasis HLB cartridge. Peaks: (1) Ametryne, (2) Terbutryne, (3) Prometryne, (4) Simazine, (5) Atrazine, (6) Propazine. Buffer: MeOH-MeCN (50:50, v/v), 7.5 mM HClO_4 , 17 mM SDS . Reprinted with permission from Ref. 122.

Most of the compounds used in the agrochemical industry contain chiral centres, with biological activity generally being limited to only one of the enantiomers. In order to increase the selectivity separation in CE,

cyclodextrins (CD) are added to the buffer. Hsieh et al.¹²³ developed a CZE method with CDs (α -CD and β -CD) to separate seven chlorophenoxy acid herbicides and their enantiomers at pH 5.6. This separation was used to determine these compounds in lake water. The herbicides were first extracted by a C₁₈ disk and recoveries in the lake water ranged between 73% and 90%. The herbicide concentration increased 150 times when this preconcentration step was used and the detection limits in this sample were below 1 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Menne et al.¹²⁴ studied the determination of sulfonylureas in soils by CZE at pH 4.76. The compounds were extracted with phosphate buffer from soil samples and then they were cleaned-up and preconcentrated by SPE. The phosphate extract was first passed through a C₁₈ cartridge and the extract was passed through a second cartridge made of silica. Ethyl acetate containing 0.1% glacial acetic acid was used in both cases to elute the retained compounds with recoveries higher than 70% and standard deviations lower than 30% for most compounds. The authors observed that the method is not suitable for bensulfuron-methyl, probably because it is considerably adsorbed on the silica phase SPE cartridge.

Hickes and Watrous³² presented a method to determine 12 sulfonylurea herbicides in agricultural water. As in Krynitsky's study,³¹ the water was acidified with acetic acid and passed first through a RP-102 SPE cartridge and then through an alumina SPE cartridge to clean up the extract. In order to enhance the sensitivity of the method, an extended light path CE capillary and a high sensitivity optical Z-cell were used for residue analysis. The method was applied to three different water matrixes: reagent water, non chlorinated water and surface water. Analyte recoveries for all matrixes

varied from 55% to 121%. The detection limit of the method was $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ and the matrix contribution was minimal.

Dinelli et al. ¹²⁵ analysed the herbicides linuron, metalachlor, atrazine and metsulfuron using MEKC after a 1000-fold preconcentration step with a C_{18} SPE cartridge with recoveries about 87%. They determined these herbicides in tap water at the $\mu\text{g l}^{-1}$ level. Dinelli et al. ¹²⁶ have also used SPE enrichment combined with MEKC to determine three sulfonylurea herbicides – chlorsulfuron, chlorimuron and metsulfuron— in soil samples. They used a sodium hydrogencarbonate solution to extract the herbicides from the soil sample and a C_{18} SPE cartridge to obtain an enrichment factor of 150 for the level of $10 \mu\text{g l}^{-1}$, with recoveries of about 95%. More recently, Konda et al. ¹²⁷ presented a MEKC application to determine five phenylurea herbicides (monuron, linuron, diuron, isoproturon and monolinuron) in rain- and surface-water samples at pH 7.0. The preconcentration step was carried out using a C_{18} cartridge. The samples were preconcentrated 2000 times (Figure. 9) and the detection limit for all compounds was $0.04 \mu\text{g l}^{-1}$, except for diuron ($0.02 \mu\text{g l}^{-1}$).

Carabias-Martínez et al. ¹²⁸ used MEKC with a C_{18} SPE preconcentration step to analyse triazine herbicides of environmental interest (simazine, cyanazine, atrazine, ametryne, propazine, prometryne and terbutryne) in water samples. The recoveries were studied using samples of bottled and tap waters and the results ranged between 79% and 130% at concentration of 0.3 and $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$.

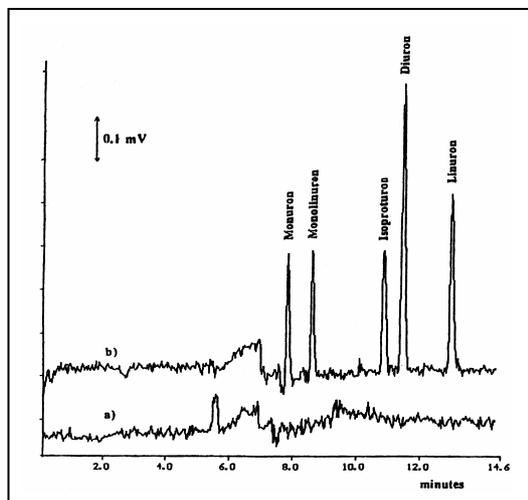


Figure 9 Comparison between the electropherograms of a) tap water concentrated 2000-fold and b) tap water spiked at $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ and concentrated 2000-fold. Experimental conditions: buffer, 4 mM sodium tetraborate, 12 mM KH_2PO_4 (pH 7), 30 mM SDS; voltage 30 kV, UV wavelength 244 nm. Reprinted with permission from Ref. 127.

Farran et al. ⁴¹ used MEKC to analyse different mixtures of pesticides (triazine, phenylurea, phenoxyalkyl acid, carbamate and organophosphorous pesticide). The results were best when n-alcohols were used as mobile phase modifiers in phosphate with an SDS buffer. The authors evaluated off-line SPE process using the graphitized carbon black Carbo-pack, and C_{18} cartridges. When C_{18} cartridges were used the pH of the water sample was adjusted to 2. Nevertheless, the Carbo-pack B cartridges simultaneously extracted acidic and neutral pesticides with good recoveries (90%-95% for phenylurea and phenoxyacid herbicides, at concentration of $0.4 \mu\text{g l}^{-1}$) for spiked real water samples.

Hexazinone (a triazine dione herbicide) and its metabolites were separated and quantified in groundwater by MEKC.⁴² These compounds were extracted from water using the graphitized non porous carbon material Superclean ENVI-Carb. UV detection and extended light path capillaries were used and the buffer was composed of phosphate, borate, SDS and methanol. In this paper, the authors studied the recoveries for the compounds of interest at different concentration levels (between 0.5 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$). The recoveries for hexazinone ranged from 79 to 100%. The method was applied to several groundwater samples and the results were compared with those obtained by HPLC. The authors concluded that, in the samples studied, there was good agreement between both techniques.

Loos and Niessner¹²⁹ investigated the determination of the *N*-dealkylated chloro and hydroxy metabolites of atrazine, terbutylazine herbicides by SPE and CE-UV. They studied the styrene-divinylbenzene sorbent LiChrolut EN for the extraction of the herbicides. They also evaluated the separation of these compounds using CZE and MEKC. Hydroxy metabolites with pK_a values of 4.5-5.2 are quite well suited for CZE separation. However, with an acetate buffer, the addition of methanol as organic modifier and the best pH conditions, separation was not complete. For this reason, they suggested that MEKC with a sodium borate-SDS buffer should be used to separate these compounds. The limit of detection of SPE enrichment combined with MEKC analysis for hydroxy metabolites was between 0.1 and 0.25 $\mu\text{g l}^{-1}$ and, with LiChrolut EN, the recoveries were better than when other conventional sorbent materials were used. The only exception was ameline which was not detected in the samples after SPE because it was not extracted with this sorbent material.

Carbamates are a type of pesticide that have become increasingly important in recent years because they are used as insecticides, fungicides, nematocides, miticides and molluscicides. Some of these compounds have been separated using MEKC.^{41,130,131} Rotilio and Rossi¹³⁰ analysed eleven compounds of the carbamate, thiocarbamate and dithiocarbamate classes of pesticides. They used MEKC with borate, SDS and a methanol buffer and an SPE step with a styrene-divinylbenzene cartridge to determine these compounds in tap water. The recovery values were between 50% and 92%, except for three compounds (thiophanate-methyl, thiram and cycloate) for which they were lower than 45%. Using this method the authors achieved detection limits at the $\mu\text{g l}^{-1}$ level.

Another example of carbamate pesticide determination using MEKC in environmental samples was presented by Molina et al.¹³¹, who developed a method for determining N-methylcarbamate pesticides and their hydrolytic metabolites. The buffer used was composed of phosphate and borate with SDS. The samples were first preconcentrated by an SPE step and, for this reason, the authors studied different sorbent materials to find which was most suitable. Six sorbents –activated carbon, RP-C₁₈, the polystyrene-divinylbenzene copolymer XAD-2, the magnesium silicate Florisil, the unpolar polystyrene-divinylbenzene resin Serdolit PAD I and the highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene sorbent LiChrolut EN)– were tested. LiChrolut EN showed the best sorption efficiency (close to 100%) using standard solutions at a concentration of 10 mg l^{-1} . The method was applied to determine the compounds in river water and pond water. Figure. 10 shows the electropherograms obtained for unspiked river water (A) and water spiked (B) with $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound. Recoveries ranged from 82% to 108% at this level of concentration.

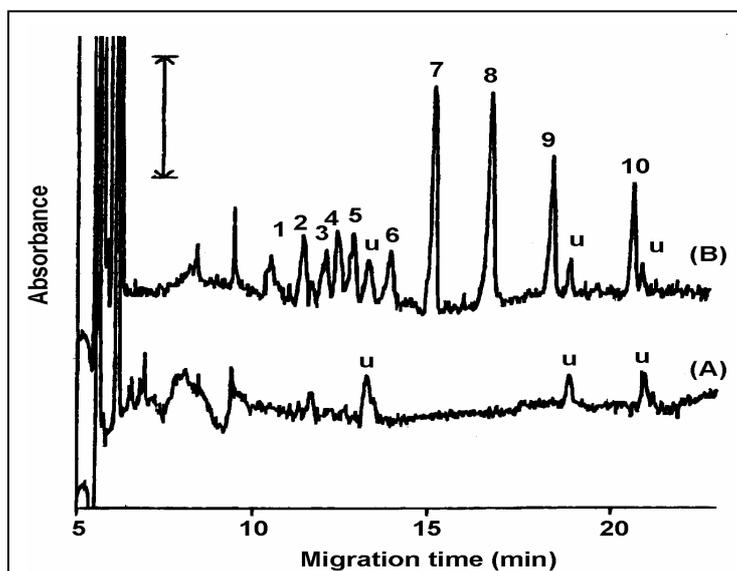


Figure 10 Electropherogram of a trace-enriched 250 ml water sample with a LiChrolut EN cartridge. A) Guadalquivir river water and B) sample spiked with 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Peaks: (1) 4-Dimethylamino-3-methyl phenol, (2) 2-Isoproxyphenol, (3) Propoxur, (4) 2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol, (5) Carbofuran, (6) Aminocarb, (7) 1-Naphthol, (8) Carbaryl, (9) 4-Methylthio-3,5-xylenol, (10) Methiocarb; "u" unknown peaks. Experimental conditions: buffer, 20 mM borate, 25 mM phosphate and 40 mM SDS (pH 8). Hydrodynamic injection: 0.5 psi for 10 s. Detection wavelength 202 nm for all compounds except 1-Naphthol and carbaryl (214 nm). Reprinted with permission from Ref. 131.

Organotin compounds are widely used in agriculture as insecticides, fungicides and biocides. Trojanowicz et al.¹³² studied the separation of some of these compounds by CE. They used various sorbents such as C₁₈, C₈, phenyl functionalized sorbent, and the polystyrene-divinylbenzene copolymers: Amberlite XAD-2 and Amberlite XAD-4 to preconcentrate two organotin compounds, tributyltin chloride and triphenyltin chloride. They concluded that Amberlite XAD-2 was the most appropriate sorbent for the compounds studied. The method was applied to determine these

compounds in various natural waters, and several inorganic salts were added to see how they affected the preconcentration step. The recovery values for these two organotin compounds were over 70% at $\mu\text{g l}^{-1}$ concentration levels.

Cyclodextrins have also been used in combination with MEKC to separate enantiomeric pesticides. Shea et al.¹³³ presented the separation of seven enantiomeric and isomeric pesticides using cyclodextrins with MEKC. The authors studied parameters such as the type of surfactant and cyclodextrin. They used SDS and sodium cholate and six different cyclodextrins to separate the pesticides. Finally, the method was applied to separate the compounds in lake water at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels using an SPE step. The samples were extracted using the divinylbenzene-vinyl pyrrolidone Oasis HLB cartridge and all the recoveries ranged between 45% and 89%.

To decrease the detection limits of pesticide analysis, some authors^{72,73,134} have suggested using an enrichment process in two steps, such as SPE and sample stacking, in MEKC or CEC techniques. Süsse and Müller⁷² proposed such a combination for analysing pesticides in drinking water by MEKC. The SPE preconcentration step used a C_{18} cartridge and the samples were stacked by first injecting a large volume of sample, then applying a high voltage with reverse polarity to remove the sample matrix and finally switching back the polarity to perform the separation. Under these enrichment conditions, the detection limits were lower than $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$. The same combination was used by He and Lee⁷³ to determine six organonitrogen pesticides (metribuzin, bromacil, terbacil, hexazinone, triadimefon and DEET) in drainage water by MEKC. The samples were stacked by injecting a large volume of sample dissolved in a buffer matrix that was less conductive than the one used in the MEKC separation. The

recovery of the pesticides was over 80% at concentration of $5 \mu\text{g l}^{-1}$ except for DEET, that which it was 41% and the limit of detection was $0.8 \mu\text{g l}^{-1}$.

El Rassi et al.¹³⁴ investigated how to improve the sensitivity of detection by combining an SPE step and an on-line enrichment process to determine pesticides prior to CEC separation. They used CEC and octadecyl-silica (ODS) capillary columns to separate nine important urea herbicides. Due to the relatively strong affinity of the compounds to the ODS stationary phase, they were determined at low concentrations by on-line prolonged injections. They also showed that if the prolonged injection is preceded by the injection of a plug of water, the detection limits decrease. This plug led to a greater accumulation of dilute samples in a narrow band at the inlet of the CEC column. The authors combined this on-column sample enrichment with an off-line SPE C_{18} cartridge and observed that this procedure detected pesticide concentrations of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Several attempts have been made to automate on-line preconcentrations of pesticides with CE.^{67,135} El Rassi et al.¹³⁵ studied fused capillaries with surface-bound octadecyl functions for on-line preconcentration of dilute triazine samples before CZE. They showed that this coupled configuration could detect concentrations 10 and 35 times lower than CZE alone. More recently, Hinsmann et al.⁶⁷ used an automatic SPE system coupled to CE. They used a C_{18} SPE mini-column to separate seven pesticides by MEKC in spiked river water samples. Pesticides mixtures at concentrations of $50 \mu\text{g l}^{-1}$ were detected. Under optimal extraction conditions, recoveries were between 90% and 114% for most of the pesticides studied.

PHENOLS

Even small amounts of phenolic compounds can have a significant detrimental effect on water quality. At concentrations of less than $1 \mu\text{g l}^{-1}$, the taste and odour of water are affected. The disinfection process with chloride aggravates odour and taste problems because of the formation of chlorinated phenolic compounds.

Phenols have been analysed by CZE or by MEKC^{9,22,136-138}. Martínez et al.¹³⁶ analysed the eleven priority EPA phenols using a borate solution. An SPE step enabled these compounds to be detected at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels. The off-line enrichment process was performed with a styrene-divinylbenzene ENVI-Chrom P copolymer. They applied the method to determine phenolic compounds in river water and industrial waste water and in the latter case, little matrix effect was observed (Figure. 11).

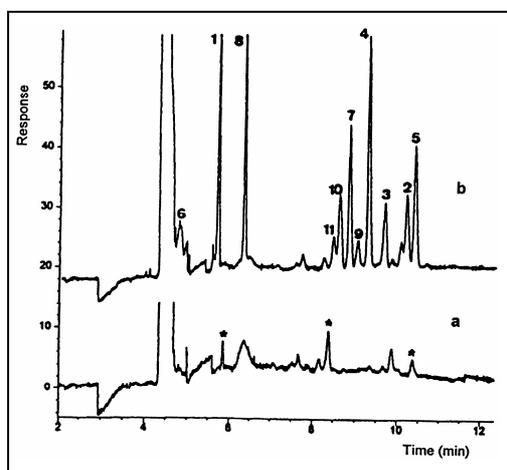


Figure 11 Electropherogram obtained after ion-pair SPE extraction with an ENVI-Chrom P cartridge of 500 ml: (a) Ebro river water and (b) Ebro river water spiked with phenolic compounds ($50 \mu\text{g l}^{-1}$). Peaks: (1) Phenol, (2) 4-Nitrophenol, (3) 2,4-Dimethylphenol, (4) 2-Chlorophenol, (5) 2-Nitrophenol, (6) 2,4-Dimethylphenol, (7) 2-Methyl-4,6-dinitrophenol, (8) 4-Chloro-3-methylphenol, (9) 2,4-Dinitrophenol, (10) 2,4,6-Trichlorophenol, (11) Pentachlorophenol. Experimental conditions: buffer, 20 mM sodium tetraborate (pH 9.9). Hydrodynamic injection: 50 mbar for 10 s. Detection wavelength 195 nm. Reprinted with permission from Ref. 22.

Other authors have combined on-column sample stacking techniques with SPE preconcentration to reduce the limits of detection of phenolic compounds. For example, Tunes et al.⁴⁰ combined sample stacking techniques (with and without sample matrix removal) with the use of extended light path capillaries and off-line SPE preconcentration and they used CZE to monitor pentachlorophenol in drinking water at the level of international regulations ($0.5 \mu\text{g l}^{-1}$). SPE was carried out with graphitized carbon black cartridges and the quantification limit was of 60 ng l^{-1} , which is suitable for monitoring drinking water. The recovery of pentachlorophenol from tap water was 95.8 % at concentrations of $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$. The authors also made similar studies of chloro and nitrophenols 138 and the SPE process used cross-linked polystyrene cartridges with recovery values between 75.8% and 104.7%. Using this method, concentrations levels of $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ were determined in spiked tap water samples.

Whang and Pawliszyn⁵² analysed the priority EPA phenols using an on-column SPME sampling technique with CE using a Polyacrylate (PA) fiber as the extraction coating. The water samples were acidified to pH 2 and saturated with NaCl before extraction because in these conditions the extraction efficiency for phenols was significantly improved. Extraction was performed for 20 min in a stirred water sample which contained the spiked analytes. After extraction, the fiber was transferred to the interface and potential was then applied to perform the CE analysis. Using SPME-CE with UV detection, the concentration limit for pentachlorophenol —that is the phenolic compound that has the highest affinity for the PA coating— was determined to be $2 \mu\text{g l}^{-1}$. However, the increase in sensitivity for other phenols was not as significant.

MEKC was also investigated for the separation of phenolic compounds 139-142. Van Bruijnsvoort et al.¹⁴⁰ showed that MEKC could be used to separate and detect chlorophenols. They investigated MEKC coupled with electrochemical detection and combined with an SPE step, using of a highly cross-linked polystyrene-divinylbenzene copolymer. Of the 20 compounds studied, 17 were baseline separated and the detection limits were lower than $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ in river water samples.

MISCELLANEOUS

SPE in combination with CE has been used to separate other types of environmental pollutants, such as haloacetic acids, metallo-cyanide complexes, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and chemical warfare agents (alkylphosphonic acids and their monoesters).

Haloacetic acids are disinfection water by-products and they can be found in high concentrations in water disinfected with chlorine. In order to determine these compounds at low concentration in tap water, Martínez et al.³⁸ studied four different commercial sorbents –quaternary ammonium anion exchanger, highly cross-linked styrene-divinylbenzene, graphitized carbon black and macroporous poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) copolymer— for SPE extraction before being determined by CZE using indirect UV detection. The electrolyte used was 2,6-naphthalene dicarboxylic acid with hexadecyltrimethylammonium bromide as electroosmotic flow modifier. Using the highly cross-linked styrene-divinylbenzene sorbent, the recoveries in tap water were high (above 80% for dichloroacetic acid and trichloroacetic acid which are two of the most habitual haloacetic acids in chlorinated waters) and the detection limits were at the $\mu\text{g l}^{-1}$ concentration level. However, a peak of the tap water matrix

interfered with one of the compounds studied (monochloroacetic acid) which mean that it was determined less precisely (Figure. 12).

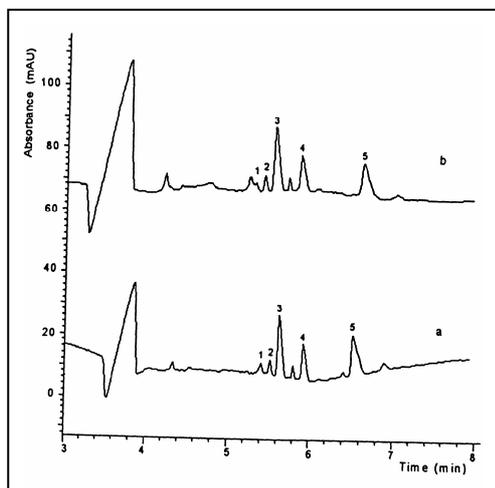


Figure 12 Electropherogram obtained by passing (a) 500 ml of a standard solution of $25 \mu\text{g l}^{-1}$ of haloacetic acids and (b) 500 ml of tap water spiked at $25 \mu\text{g l}^{-1}$ level, through LiChrolut EN cartridge. Peaks: 1) Monochloroacetic acid, 2) Monobromoacetic acid, 3) Dichloroacetic acid, 4) Dibromoacetic acid, 5) Trichloroacetic acid. Experimental conditions: 4 mM 2,6-naphthalenedicarboxylic acid and 0.5 mM hexadecyltrimethylammonium bromide, pH 7. Hydrodynamic injection: 40 mbar for 20 s. Indirect UV detection: 235 nm. Reprinted with permission from Ref. 38.

Cyanide is used in the metal processing industry for electroplating and it is likely to be present in the form of metallo-cyanide complexes in environmental samples at varying persistence and toxicology. Haddad et al.¹⁴³ studied the separation of these complexes by CZE. The electrolyte selected was phosphate-ethanolamine at pH: 8.5. For sensitivity to be sufficient determine these compounds in environmental applications, some metallo-cyanides can be preconcentrated using a Sep-Pak C18 SPE cartridge. In this study, experiments were carried out to determine the Au-cyano complex in leaching solutions from a gold mine. This procedure yielded a recovery of 103.6% for an aqueous standard containing 4 mg l^{-1} Au and a recovery of 83% for a real mine sample containing 1.3 mg l^{-1} Au. The authors explained the decrease in recovery by the fact that the real mine sample contained a relatively high concentration of anions, such as chloride and sulphate, which compete for the preconcentration sites on the Sep-Pak cartridge.

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) has been widely used to clean up radioactive and heavy metal wastes, and therefore it can be present at high levels at such waste sites. Several studies have shown that waste water treatment does not effectively remove EDTA from water and it is likely to be detectable in most water sources¹⁴⁴. Henion et al.¹⁴⁵ studied the determination of EDTA as the nickel chelate in environmental water by SPE and CE tandem mass spectrometry (MS). They developed an automated extraction procedure using an SPE disk. The procedure converts all free and chelate EDTA into the nickel chelate and then extracts it on strong anion exchange extraction disks. The extracted was analysed by CZE using an amine coated capillary column to separate anions and the electrolyte was formiate buffer, pH 3. To enhance the concentration detection limits of the method, a sample stacking technique was used. A small plug of water was injected into the CE capillary and then there was a large electrokinetic injection of the sample dissolved in water. The detection limits were $0.15 \mu\text{g l}^{-1}$ and the method was tested in a number of water samples from local sources. Finally, the authors concluded that the limits of detection of the method are at least five times lower than the best ones reported in the literature.

Chemical warfare agents are highly toxic and considerable effort has been made to identify, quantify, and neutralise them and their degradation products in a wide variety of matrixes^{146,147}. Nassar et al.¹⁴⁷ studied alkylphosphonic acids and their monoesters, which are nerve agents, in environmental samples using CZE with electrokinetic injection to improve the sensitivity. The electrolyte used to reverse the electroosmotic flow was borate (pH 4), phenylphosphonic acid, Triton X-100 and didodecyldimethylammonium hydroxyde (DDAOH). However, for electrokinetic injection enhancement for environmental samples to have

greatest effect, the samples have to be cleaned up previously with ion-exchange cartridges. This clean-up step used sequential cartridges to remove sulphate (barium cartridge), chloride (silver cartridge), and cations (H^+ cartridge). When samples were passed through this stacked cartridge clean-up the detectability dramatically improved and the detection limits for the compounds studied were $1-2 \mu g l^{-1}$ for water samples and $25-50 \mu g l^{-1}$ for aqueous leachates of soil samples.

NOMENCLATURE

ASPEC XL	Automated off-line SPE device
CD	Cyclodextrine
CE	Capillary electrophoresis
CEC	Capillary electrochromatography
CL	Capillary liquid chromatography
CZE	Capillary zone electrophoresis
GC	Gas chromatography
HAAs	Heterocyclic aromatic amines
HPLC	High performance liquid chromatography
ID	Inner diameter
ITP	Isotachophoresis
LAS	Linear alkylbenzenesulfonates
LIF detector	Laser-induced fluorescence detector
LLE	Liquid-liquid extraction
MEKC	Micellar electrokinetic capillary chromatography
MS	Mass spectrometry
ODS	Octadecyl-silica
PA	Polyacrylate
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
PDMS	Polydimethylsiloxane

SAX	Strong anion exchange cartridge
SCX	Strong cation exchange cartridge
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SFE	Supercritical fluid extraction
SPE	Solid-phase extraction
SPME	Solid-phase microextraction

REFERENCES

- 1 G. Dinelli, A. Vicari, P. Catizone, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 337.
- 2 W. C. Brumley, *J. Chromatogr. Sci.*, 33 (1995) 670.
- 3 J. Sherma *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1R.
- 4 C. Aguilar, F. Borrull, R.M. Marcé, *LC-GC*, 14 (1996) 1048.
- 5 M. Psathaki, E. Manoussaridou, E.G. Stephanou, *J. Chromatogr. A*, 667 (1994) 241.
- 6 I. Liska, E.K. Brouwer, A.G.L. Ostheimer, H. Lingeman, U.A. Th. Brinkman, R.B. Geerdink, W. H. Mulder, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 47 (1992) 267.
- 7 H. Bagheri, J. Slobodnik, R.M. Marcé, R.T. Ghijsen, U. A. Th. Brinkman, *Chromatographia*, 37 (1993) 159.
- 8 M.W.F. Nielen, *Trends Anal. Chem.*, 12 (1993) 345.
- 9 I.C. Chen, C.W. Whang, *J. Chin. Chem. Soc.*, 41(1994) 419.
- 10 Y.C. Chao, C.W. Whang, *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 229.
- 11 D. Kaniansky, F. Ivanyi, F.I. Onuska, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1817.
- 12 M. Berg, S.R. Mhler, R.P. Schwarzenbach, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1860.
- 13 R.S. Brown, J.H.T. Luang, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 287.

-
- 14 Ph. Schimtt, A.W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, 723 (1996) 169.
 - 15 L. Song, Z. Xu, J. Kang, J. Cheng *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 297.
 - 16 G.W. Sovocool, W.C. Brumley, J.R. Donnelly, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3297.
 - 17 K. Heinig, C. Vogt, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3311.
 - 18 A. Karcher, Z. El Rassi, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3280.
 - 19 E. Dabek-Zlotorzynska, in H. Shintany, J. Polonski (Editors), *Handbook of capillary Electrophoresis Applications*, Blackie academic & professional, London 1997, p. 639.
 - 20 W. C. Brumley, *LC-GC*, 13 (7) (1995) 556.
 - 21 E. Dabek-Zlotorzynska, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2453.
 - 22 D. Martínez, E. Pocerull, R.M. Marcé, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 43 (1996) 619.
 - 23 L. Puignou, J. Casal, F.J. Santos, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 769 (1997) 293.
 - 24 L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 249.
 - 25 K. Grob, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 265.
 - 26 L. Mondello, G. Dugo, K.D. Bartle, *J. Microcol. Sep.*, 8 (1996) 275.
 - 27 R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489.
 - 28 A. K. Li, S.F.Y. Li, *Analyst*, 120 (1995) 361.
 - 29 R. Saari-Nordhaus, J.M. Anderson, *J. Chromatogr. A*, 706 (1995) 563.
 - 30 W.C. Brumley, C.M. Brownrigg, *J. Chromatogr.*, 646 (1993) 377.
 - 31 A.J. Krynitsky, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 392.
 - 32 H. Hickes, M. Watrous, *J. AOAC Int.*, 82 (1999) 1523.
 - 33 I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 161.
 - 34 V. Pichon, M. Charpak, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 795 (1998) 83.

-
- 35 D. Puig, D. Barceló, *Chromatographia*, 40 (1995) 435.
 - 36 N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 771 (1997) 55.
 - 37 N. Masqué, M. Galia, R.M. Marcé, F. Borrull, *Analyst*, 122 (1997) 425.
 - 38 D. Martínez, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A*, 827 (1998) 105.
 - 39 J. Schulein, D. Martens, P. Spitzauer, A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352 (1995) 565.
 - 40 M.I. Tunes, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 395.
 - 41 A. Farran, S. Ruiz, C. Serra, M. Aguilar, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 109.
 - 42 D.T. Kubiľius, R.J. Bushway, *J. Chromatogr. A*, 793 (1998) 349.
 - 43 M. Peruzzi, G. Bartolucci, F. Cioni, *J. Chromatogr. A*, 867 (2000) 169.
 - 44 R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, J. Hernández-Mendez, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 451.
 - 45 J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH Inc., New York, 1997.
 - 46 C.L. Arthur, L. Killam, K. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1960.
 - 47 K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 137.
 - 48 H. Daimon, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 34 (1997) 365.
 - 49 R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 69 (1996) 3140.
 - 50 A.A. Boyd-Boland, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1521.
 - 51 S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1217.
 - 52 C. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 353.
 - 53 A.L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1726.

-
- 54 A.J. Tomlinson, L.M. Benson, N.A. Guzman, S. Naylor, J. Chromatogr. A, 744 (1996) 3.
- 55 A.J. Tomlinson, S. Naylor, J. Liq. Chromatogr., 18 (1995) 3591.
- 56 S. Naylor, A.J. Tomlinson, Biomedical Chromatogr., 10 (1996) 325.
- 57 M.E. Swartz, M. Merion, J. Chromatogr., 632 (1993) 209.
- 58 I. Morita, J.-I. Sawada, J. Chromatogr., 641 (1993) 375.
- 59 J.H. Beattie, R. Self, M.P. Richards, Electrophoresis, 16 (1995) 322.
- 60 M.A. Strausbauch, B.J. Madden, P.J. Wettstein, J.P. Landers, Electrophoresis, 16 (1995) 541.
- 61 D. Figeys, A. Ducret, R. Aebersold, J. Chromatogr. A, 793 (1997) 295.
- 62 M. Petersson, K.-G. Wahlund, S. Nilsson, J. Chromatogr. A, 841 (1999) 249.
- 63 A.J. Tomlinson, L.M. Benson, W.D. Braddock, R.P. Oda, S. Naylor, J. High Resolut. Chromatogr., 18 (1995) 381.
- 64 Q. Yang, A.J. Tomlinson, S. Naylor, Anal. Chem., 71 (1999) 183 A.
- 65 J.R. Veraart, C. Gooijer, H. Lingeman, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. B, 719 (1998) 199.
- 66 L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A, 791 (1997) 279.
- 67 P. Hinsmann, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A, 866 (2000) 137.
- 68 R.L. Chien, D.S. Burgi, Anal. Chem., 64 (1992) 489 A.
- 69 D. Martínez, F. Borrull, M. Calull, J. Chromatogr. A, 788 (1997) 185.
- 70 K. Li, S.F.Y. Li, Analyst, 120 (1995) 361.
- 71 J. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem., 70 (1998) 149H.
- 72 H. Süsse, H. Müller. J. Chromatogr. A, 730 (1996) 337.
- 73 Y. He, H.K. Lee, Electrophoresis, 18 (1997) 2036.
- 74 X. Song, W.L. Budde, J. Chromatogr. A, 829 (1998) 327.
- 75 T. Tegeler, Z. El Rassi, J. of AOAC int., 82 (1999) 1542.

-
- 76 S.A. Oehrle, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 383.
- 77 J. Farré, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 47 (1998) 630.
- 78 D. Kaniansky, F. Iványi, F.I. Onuska, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1817.
- 79 D. Kaniansky, I. Zelensky, A. Hybenova, F.I. Onuska, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4258.
- 80 L. Krivánková, P. Bocek, *J. Chromatogr. B*, 689 (1997) 13.
- 81 P. Blantný, F. Kvasnicka, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 297.
- 82 J.R. Veraart, C. Gooijer, H. Lingeman, N.H. Velthorst, U.A. Th. Brinkman, *Chromatographia*, 44 (1997) 581.
- 83 K. Heinig, C. Vogt, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3311.
- 84 C. Vogt, K. Heinig, *Tenside Surf. Det.*, 35 (1998) 470.
- 85 K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 281.
- 86 C. Vogt, K. Heinig, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 612.
- 87 J. de Ferrer, A. Moreno, M^a. T. Vaquero, L. Comellas, *Tenside Surf. Det.*, 34 (1997) 278.
- 88 H. Klotz, *F. am Main, Tenside Surf. Det.*, 35 (1998) 459.
- 89 C. Vogt, K. Heinig, B. Langer, J. Mattusch, G. Werner, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 352 (1995) 508.
- 90 S. Chen, D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, 56 (1993) 2770.
- 91 P.L. Desbene, C. Rony, B. Desmazieres, J.C. Jacquier, *J. Chromatogr.*, 608 (1992) 375.
- 92 K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Analyst*, 123 (1998) 349.
- 93 K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 281.
- 94 C. Kanz, M. Nölke, T. Fleischmann, H.-P. E. Kohler, W. Giger, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 913.
- 95 K. D. Altria, I. Gill, J.S. Howells, C.N. Luscombe, R.Z. Williams, *Chromatographia*, 40 (1995) 527.
- 96 E. Dabek-Zlotorzynska, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2453.

-
- 97 C.Akbay, S.A. Shamsi, I.M. Warner, *Electrophoresis*, 18 (1997) 253.
- 98 T.W. Moy, P.L. Ferguson, A.H. Grange, W.H. Matchett, V.A. Kelliher, W.C. Brumley, J. Glassman, J.W. Farley, *Electrophoresis*, 19 (1998) 2090.
- 99 O.H.J. Szolar, R.S. Brown, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3004.
- 100 U. Krismann, W. Kleiböhmer, *J. Chromatogr A*, 774 (1997) 193.
- 101 B. Jimenez, D.G. Patterson, J. Grainger, Z. Liu, M.J. Gonzalez, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 411.
- 102 A.L. Crego, J. Martinez, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 329.
- 103 R. Stol, W.T. Kok, H. Poppe, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 45.
- 104 R. Dadoo, R.N. Zare, C. Yan, D.S. Anex, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4787.
- 105 S. Nie, R. Dadoo, R.N. Zare, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3571.
- 106 R.S. Brown, J.T.H. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 287.
- 107 I. Schönsee, J. Riu, D. Barceló, *Química Analítica*, 16 (1997) S243.
- 108 J. Riu, I. Schönsee, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.*, 33 (1998) 653.
- 109 L. Farry, D.A. Oxspring, W. Franking Smyth, R. Marchant, *Anal. Chim. Acta*, 349 (1997) 221.
- 110 W.C. Brumley, C.M. Brownrigg, A.H. Grange, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 635.
- 111 P.L. Ferguson, A.H. Grange, W.C. Brumley, J.R. Donnelly, J.W. Farley, *Electrophoresis*, 19 (1998) 2252.
- 112 J.P. Alcantar-Licudine, N.L. Bui, M.K. Kawate, Q. X. Li, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998), 1015.
- 113 W.C. Matchett, W.C. Brumley, *J. Liquid Chrom. & Rel. Technol.*, 20 (1997) 79.

-
- 114 A. Cavallaro, V. Piangerelli, F. Nerini, S. Cavalli, C. Reschiotto, J. Chromatogr. A, 709 (1995) 361.
- 115 C. Mardones, L. Arce, A. Rios, M. Valcarcel, Chromatographia, 48 (1998) 700.
- 116 I. Rodriguez, HK. Lee, SFY Li, Electrophoresis, 20 (1999) 1862.
- 117 Y. Deng, X. Fan, A. Delgado, C. Nolan, K. Furton, Y. Zuo, R.D. Jones, J. Chromatogr. A, 817 (1998) 145.
- 118 S.J- Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, J. High Resolt. Chromatogr., 19 (1996) 99.
- 119 S.J- Kok, E.M: Kristenson, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A, 771 (1997) 331.
- 120 R. Loos, R. Niessner, J. Chromatogr., 822 (1998) 291.
- 121 H. Stutz, K. Pitterstschatscher, H. Malissa, Mikrochim. Acta, 128 (1998) 107.
- 122 R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, J. Hernández-Méndez, J. Chromatogr. A, 869 (2000) 451.
- 123 Y.-z. Hsieh, H.-Y. Huang, J. Chromatogr. A, 745 (1996) 217.
- 124 H.J. Menne, K. Janowitz, B.M. Berger, J. of AOAC Int., 82 (1999) 1534.
- 125 G. Dinelli, A. Bonetti, P. Catizone ans G.C. Galletti, J. Chromatogr. B, 656 (1994) 275.
- 126 G. Dinelli, A. Vicari, V. Brandolini, J. Chromatogr. A, 700 (1995) 201.
- 127 L.N. Konda, M.B. Barroso, G. Morovjan, J. High Resol. Chromatogr., 22 (1999) 171.
- 128 R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, A.I. Muñoz Domínguez Alvarez, J. Hernández Méndez, J. Chromatogr. A, 733 (1996) 349.
- 129 R. Loss, R. Niessner, J. Chromatogr. A, 835 (1999) 217.
- 130 M. Rossi, D. Rotilio, J. High Resol. Chromatogr., 20 (1997) 265.

- 131 M. Molina, D. Pérez-Bendito, M. Silva, *Electrophoresis*, 20 (1999) 3439.
- 132 M. Trojanowicz, E. Pobozy, B. Glöd, J. Kaniewska, *J. Chromatogr. A*, 718 (1995) 329.
- 133 D. Shea, K.V. Pentmetsa, R.B. Leidy, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1550.
- 134 Z. El Rassi, C. Yang, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2337.
- 135 Z. El Rassi, J. Cai *J. Liquid Chromatogr.*, 15 (1992) 1179.
- 136 D. Martínez, E. Pocurull, R.M. Marcé, M. Calull, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 734 (1996) 367.
- 137 D. Martínez, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A*, 788 (1997) 185.
- 138 I. Rodriguez, M.I. Turnes, M. Losada, M.H. Bollaín M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 279.
- 139 W.C. Brumley, W.J. Jones, *J. Chromatogr. A*, 680 (1994) 163.
- 140 M. Van Bruijnsvoort, S.K. Sanghi, H. Poppe, W.T. Kok, *J. Chromatogr. A*, 757 (1997) 203.
- 141 G.-E. Lin, W.-C. Lin, W.-C. Ciou, *J. Chromatogr. A*, 722 (1996) 333.
- 142 G. Li, D.C. Locke, *J. Chromatogr. A*, 734 (1996) 357.
- 143 P.R. Haddad, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 687 (1994) 343.
- 144 F.G. Kari, W. Giger, *Water Research*, 30 (1996) 122.
- 145 J. Henion, R.L. Sheppard, *Electrophoresis*, 18 (1997) 287.
- 146 A.-E.F. Nassar, S.V. Lucas, W.R. Jones, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1085.
- 147 A.-E.F. Nassar, S.V. Lucas, L.D. Hoffland, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 1285.

**II.7 REVISIÓ DELS MÈTODES ELECTROFORÈTICS APLICATS A LA
DETERMINACIÓ DE BENZENSULFONATS I
NAFTALENSULFONATS EN AIGÜES**

AN OVERVIEW OF ELECTROPHORETIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF BENZENE- AND NAPHTHALENESULFONATES IN WATER SAMPLES

ABSTRACT

This paper presents an overview of current analytical methodologies for the separation and determination of benzene- and naphthalenesulfonates. We pay particular attention to electrophoretic procedures and only briefly review chromatographic methods. We describe the enrichment procedures developed to date and discuss the advantages and drawbacks of off-line and on-line enrichment. Another aspect that we focus on is capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection and phosphorescence detection for determining sulfonated aromatic compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels and its recent combination with mass spectrometry to confirm the presence of these compounds in environmental samples. Finally, we review the applicability of the methods developed to environmental samples.

Keywords: Benzenesulfonates; Naphthalenesulfonates; Electrophoretic methods; Water samples

INTRODUCTION

Aromatic sulfonates (ASs) such as benzenesulfonates (BZSs) and naphthalenesulfonates (NSs) and their amino- and hydroxy- derivatives are widely used in a variety of industrial processes (Figure 1). BZSs are used as intermediates in the production of dyestuffs, tanning agents, catalysts, pesticides, pharmaceuticals and chemicals for organic synthesis. NSs are used as intermediates in the production of many products such as synthetic dyes, optical brighteners and fluorescent whitening agents. Furthermore, NSs are used in the form of formaldehyde polymers as plasticizers in concrete. In the textile, paper or metal industries, they are used in a wide variety of processes as wetting agents, solubilizers, catalysts or oxidants. The properties and uses of some BZS and NSs have recently been reviewed by Alonso and Barceló. ¹

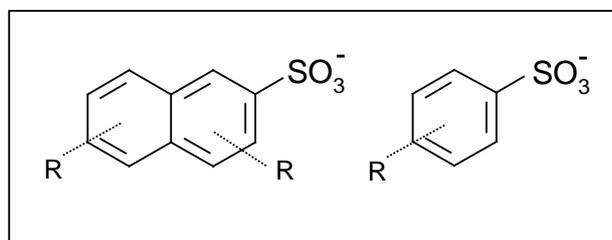


Figure 1 Structures of the NS and BZSs reported in the present study. These compounds may or may not contain substituents (R) such as: SO_3^- , NH_2 , OH , NO_2 .

Sulfonated aromatic compounds are highly soluble in water and, because of their small n-octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow} < 2.2$), they only have a slight tendency to adsorb on organic material. ² So, they are very mobile in the aquatic environment. Although their acute toxicity is very low and they have no genotoxic or carcinogenic effects, the microbiological

persistence of some BZS and NSs presents an ecotoxicological risk.² Apparently, not all Aromatic Sulfonates (AS) are persistent. Correspondingly, they are found in natural waters such as river, sea and surface waters^{1,3-5} as a consequence of industrial activity or leaching processes occurring in landfills.⁶ Because they do not completely degrade in waste water treatment plants, they have even been detected in tap water at concentrations ranging between 6 and 21 ng l⁻¹, and it is suspected that they may even be present in some samples of bottled water.^{3,7} Knowledge about the occurrence, the fate and the concentration of such compounds in natural waters is, therefore, of great importance.

SEPARATION STRATEGIES

BZSs and NSs are difficult to separate because of their polarity and the variety and similarity of their isomers. They are strong acids that are completely dissociated in aqueous-organic solutions over a broad pH range. The separation selectivity of these compounds depend on the number of sulfonate groups, on the character of the aromatic ring and on the nature, number and position of the substituents. They have been analysed by various chromatographic and electrophoretic techniques.

Chromatographic approaches

Sulfonated benzene and naphthalene isomers are non-volatile, so when they are analysed by gas chromatography (GC) they need to be derivatized to volatile compounds.^{3,8} The applicability of GC is limited because the derivatization procedures have only been effective on unsubstituted

naphthalenesulfonates, but their hydroxy-, nitro- and amino- derivatives cannot be detected successfully with these derivatizing procedures.^{3,8}

For this reason, liquid chromatography (LC) methods are preferred. Anion-exchange chromatography has occasionally been used to separate them,^{9,10} but this method is often not selective enough to separate isomeric compounds. The most widely-used approach is ion-pair chromatography.^{1,4,5} Common ion-pairing agents used for high-performance liquid chromatography (HPLC) are tetraalkylammonium salts. Recently, microcolumn HPLC has been introduced because of the advantages it has over HPLC.^{6,11} HPLC on microcolumns has the advantage that it consumes little mobile phase, so that expensive mobile phase additives such as cyclodextrins can be used without significantly increasing the cost of the analysis. Microcolumn LC does have the disadvantage that the optical pathlength is small.

Capillary electrophoresis (CE)

CE is increasingly seen as an alternative and a complement to chromatographic techniques for determining BZs and NSs. A number of applications have been reported. The advantage of CE is that it usually provides an analysis that is cheap, fast and easy. Hardly any organic solvents are consumed and separation efficiencies are high. The same CE instrument can be used in several separation modes based on different physical-chemical principles, simply by changing the composition of the running buffer and/or the capillary. Capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic chromatography (MEKC or MECC) and capillary electrochromatography (CEC) are well suited to the analysis of these anionic

compounds. While the ionic charge of these compounds makes them suitable for CZE separations, their aromaticity makes them hydrophobic or non-polar and, therefore, suitable for MEKC analysis.

CZE

CZE is a technique which separates charged analytes according to their charge-to-size-ratio in a narrow-bore fused silica capillary under the influence of an electric field. A fundamental factor in CZE is electroosmosis, which originates at the capillary wall and gives rise to the so called electroosmotic flow (EOF). In uncoated fused-silica capillaries, a CZE separation takes place in counterelectroosmotic mode. The anionic analytes migrate electrophoretically in the opposite direction but, since the EOF is usually higher than the electrophoretic mobilities of the analytes, they are driven towards the detection window.

Numerous studies have been performed to investigate the parameters that affect the CZE separation of BZSs and NSs. Most of them have been performed with different mixtures containing naphthalene mono- to tetrasulfonates and BZSs, as well as other sulfonated compounds. The electrophoretic procedures reported here are shown in Table 1.

Analytes	CE-mode	Running buffer	Detection	Enrichment procedure	LODs	Real Samples	Ref.
Mono- and di-NSs	EKC	2% DEAE-dextran in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)	UV (210 nm)	****	****	****	12
Amino/hydroxy-NSs	CEC	10 mM phosphate buffer, 1.25 mM TBA (pH 7.0)	UV	****	****	****	13
BZS and NSs	CZE	10 mM boric acid/borate buffer (pH 8.3)	MS	****	****	****	36
Amino-NSs	CEC	32 mM potassium phthalate, 400 µM CTAB (pH 7.0)	UV (240 nm)	****	****	****	31
Amino-NSs	CZE	20 mM boric acid/borate buffer, 600 mM fructose (pH 4.6)	UV (220 nm)	****	****	****	15
Amino-NSs	MEKC	20 mM boric acid/borate buffer, 5% Brij 35 (pH 9.2)	UV (220 nm)	****	****	****	20
Mono-NS, di-nSs and derivatives	CZE MEKC	50 mM boric acid/borate buffer, 100 mM SDS, or 15% acetonitrile (pH 8.7)	UV (230 nm)	Ion-pair SPE	20 µg l ⁻¹	River water samples (spiked)	16

Analytes	CE-mode	Running buffer	Detection	Enrichment procedure	LODs	Real Samples	Ref.
Mono-NS, di-nSs and derivatives	CZE	25 mM phosphate buffer, 10 mM β -cyclodextrin (pH 9.0)	UV (230 nm)	****	****	****	14
Di-NS	MEKC	20 mM boric acid/borate buffer, 2% Triton X-405 (pH 9.2)	UV (220 nm)	****	****	****	29
Mono-NS, di-nSs and derivatives	CZE MEKC	50 mM borate buffer (pH 8.75)	LIF	Ion-pair SPE	0.1-2 $\mu\text{g l}^{-1}$	River water samples	32
BZS, mono-NSs and derivatives	MEKC	20 mM borate buffer, 60 mM Brij 35 (pH 9.1)	UV (220 nm)	****	****	****	17
Mono-NS, di-nSs and derivatives	CZE	25 mM phosphate buffer, 10 mM β -cyclodextrin (pH 9.0)	UV (230 nm)	****	****	****	22
Mono-NS	CZE	H ₂ O and ² H ₂ O buffers, β -cyclodextrins (pH 10)	UV (226 nm)	****	****	****	26
Mono-NS, di-nSs and derivatives	CZE MEKC	50 mM borate buffer (pH 8.75)	LIF	Clean-up	0.75-8 $\mu\text{g l}^{-1}$	Waste water samples	33
BZSs and NSs	CZE	25 mM borate buffer	UV/FD	LiChrolut EN SPE	0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$	River and seepage water samples	18

Analytes	CE-mode	Running buffer	Detection	Enrichment procedure	LODs	Real Samples	Ref.
Di-NSs	EKC	10 mM HCl, 15 mM [14]aneN ₄ (pH 2.0)	UV (214 nm)	****	****	****	25
Mono-NS, di-nSs and derivatives	MEKC	25 mM phosphate buffer, 75 mM Brij 35 (pH 7.0)	UV (220 nm)	****	****	Industrial effluent	19
Mono- and di-NSs	MEKC	10 mM boric acid/borate buffer, 3% Brij 58 (pH 9.2)	UV (230 nm)	****	****	****	27
BZS, mono-NSs and derivatives	CZE	20 mM borate buffer, 0.0001% HDB or 0.03 mM CTAB, 25-23% 2-propanol (pH 9.2)	UV (220 nm)	****	****	****	21
BZS, mono-NSs and derivatives	MEKC	20 mM borate buffer, 6 mM CTAB, 16% 2-propanol (pH 9.2)	UV (220 nm)	****	****	****	28
NSs and derivatives	CZE	25 mM borate buffer, 20 mM biacetyl (pH 8.5)	Phosphorescence	****	****	****	34
BZS, NSs and derivatives	CZE	12 mM ammonium acetate buffer, (pH 10.5)	MS	LiChrolut EN SPE	0.02-5.4 µg l ⁻¹	WWTP water samples	37
BZS, NSs and derivatives	CZE	20 mM borate buffer (pH 9.2)	UV (210/230 nm)	****	0.1-0.2 mg l ⁻¹	****	23

Analytes	CE-mode	Running buffer	Detection	Enrichment procedure	LODs	Real Samples	Ref.
BZS, NSs and derivatives	CZE	12 mM borate buffer, (pH 9.3)	UV (214 nm)	LiChrolut EN/Isolute ENV + /HR-P/Oasis HLB SPE	0. 2 µg l ⁻¹	****	39
NSs and derivatives	CZE	25 mM borate buffer, 20 mM biacetyl (pH 9.0)	Phosphorescence	****	1-3 x 10 ⁻⁸ M	****	35
Mono- di-NSs and derivatives	CZE	20 mM borate buffer (pH 9.2)	UV (210/230 nm)	Stacking	5-7 µg l ⁻¹	Tap, river, surface and WTP water samples	41

When UV detectors are used in CE, the buffers are usually phosphate and borate.¹²⁻¹⁹ Most authors, however, prefer borate buffers for separating BZs and NSs.¹⁴⁻¹⁹ The influence of the tetraborate buffer concentration on the resolution of several NSs and on their mobilities was studied between 20 and 50 mM.¹⁷ In this study, a minimum concentration was recommended for buffering capacity to be adequate and the solute adsorption on the capillary wall to be minimised. Although high borate concentrations shortened the analysis time, changes in elution order and loss of resolution restricted the borate buffer concentrations to 20 mM.

Buffer pH plays an important role in the CZE separations of BZs and NSs. The advantage of using high buffer pH is that EOF increases. When borate buffers were used to separate mixtures of unsubstituted and substituted isomers, only pH values higher than 6 were used to prevent amino-substituted analytes from being present in their neutral form.^{16,17} Between pH 7.5 and 9.7, the amino- and/or hydroxy- derivatives had a strong influence on the electrophoretic mobilities. It should be noted that a difference in the pH of the buffer of only 0.1 unit caused significant changes in the migration order of some compounds.^{16,17} An attempt was made to separate a mixture of 10 amino-naphthalenesulfonic acids with pK_a between 2.2 and 4.8 by using saccharides to lower the pH of a borate buffer (pH 9.2) to the pK_a of the analytes.^{15,20} Separation of all the isomers was not complete, but lowering the pH was shown to have an influence on the resolution of the amino-derivatives.

Although it is well known that thermal conditions affect the separation efficiency in CE, little attention has been paid to capillary temperature.^{16,22,23} Of those researchers who have focused on this aspect, Kok et al.,¹⁶ investigated the influence of the temperature on the separation of a mixture

of 21 naphthalenesulfonates. An increase in the temperature from -6°C to 46°C shortened the total analysis time by 6 min. However, there was also a small but significant reduction in resolution. Thermostatting at low temperatures has some advantages, but thermostatting at ambient temperature is easier and the difference between making analyses at ambient temperature instead of -6°C is only slight.

As explained above, in uncoated fused-silica capillaries the EOF is in the direction of the cathode. Adsorption of cationic additives such as cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) or cationic polyelectrolytes such as hexadimetre bromide (HDB) from the buffer can substantially affect the inner capillary wall charges and, if the wall polarity changes to positive, the EOF is reversed; consequently, the EOF and the anionic analytes migrate in the same direction, towards the anodic end of the capillary. Under such conditions, CZE separation takes place in the coelectroosmotic mode and a reversed voltage has to be applied to cause the anionic compounds to migrate toward the cathode, where they are detected. Although coelectroosmotic separations are mainly used to shorten the analysis time, they can also be used to introduce additional interactions and thus modify the separation selectivity. Cugat et al.²¹ used an alkylammonium salt (CTAB) and a cationic polyelectrolyte (HDB) to reverse the EOF and investigated the subsequent effect on the separation selectivity of a mixture of twelve BZS and NSs. The results showed that coelectroosmotic CZE is a powerful technique that enables such compounds to be rapidly analysed as a result of migration of analytes in the same direction as the EOF.

The effects of adding organic solvents to the buffer have been frequently investigated.^{16,21,23} The type of organic modifier has a considerable influence on the separation conditions. (Figure 2). The addition of

acetonitrile to a borate buffer in counterelectrosmotic mode enabled some NSs to be separated in a complex mixture ¹⁶ but only the addition of 2-propanol enabled most compounds to be separated when coelectrosmotic CZE was performed. ²¹

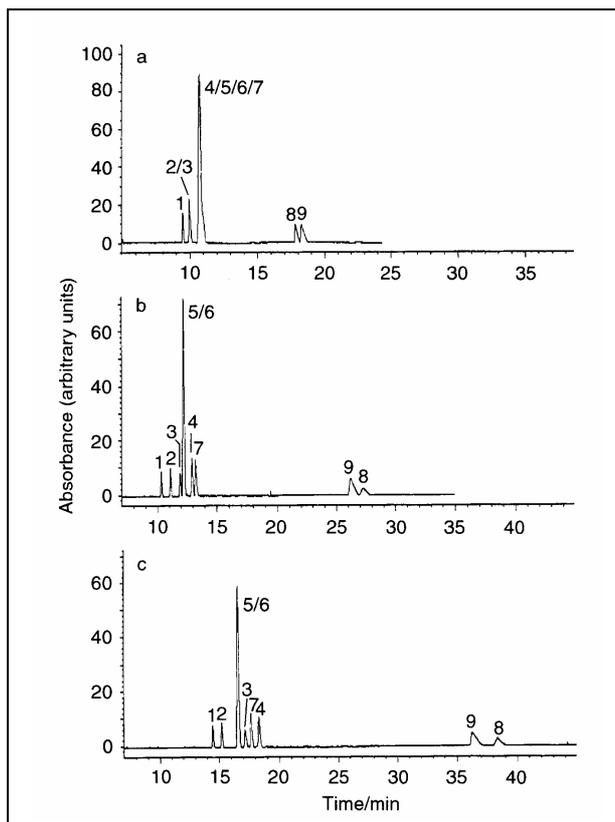


Figure 2 Separation of an NDS test mixture by CZE in a pure aqueous (a) 20 mM borate buffer (pH 9.1) and in a mixed organic-aqueous 20 mM borate buffer with (b) 12% v/v ethanol and (c) 12% v/v propan-2-ol. Peak identification: (1) 7-NH₂-1,3-NDS, (2) 3-NH₂-2,7-NDS, (3) 2-NH₂-1,5-NDS, (4) 1,5-NDS, (5) 2,6-NDS, (6) 2,7-NDS, (7) 2-OH-3,6-NDS, (8) 8-NH₂-1-OH-3,6-NDS, (9) 1-OH-3,6-NDS. Reproduced with permission from Ref. 23. This journal is © The Royal Society of Chemistry 2000.

Considerable effort has been made to improve the separation selectivity of several NS mixtures by using ion-pair complexing additives.^{12,24,25} In 1990, Terabe and Isemura¹² published a comprehensive discussion on the theory of ion-pair complexation applied to CZE. They showed that ionic analytes with very similar electrophoretic mobilities could be separated over a wide range of pH by introducing a chemical equilibrium, in which the ionic analyte participates to form a dynamic complex with a polymeric additive. They used the term ion-exchange electrokinetic chromatography (EKC) to describe the complexation between the positively charged polymeric buffer additives and the anionic analytes. In their fundamental investigation of ion-pair formation using CZE, they chose cationic polymers [PDDAC (Poly(diallyldimethylammonium chloride) and DEAD-dextran, (diethylamino)ethyl-dextran] as ion-pair agents to separate several organic acids including some unsubstituted NS and NDS isomers. These polymers, used in appropriate amounts, seem to have selective effects through the formation of ion-pairs with the mono- and the doubly charged organic acid solutes and this facilitates their isomeric resolution. Okada²⁴ reported that the addition of polyammonium ions to a running buffer for CZE was effective for the separation of naphthalenedisulfonates, although in some cases the separation was incomplete. He suggested that the polyammonium ions were capable of discriminating the distances between the sulfonate groups of the isomers. Takahashi et al²⁵ described how NS isomers could be separated by using macrocyclic polyamines such as [9]aneN₃ and [14]aneN₃. The addition of [14]aneN₃ to the running buffer gave good separation, not only between mono-NSs and di-NSs but also among their NS isomers (Figure 3).

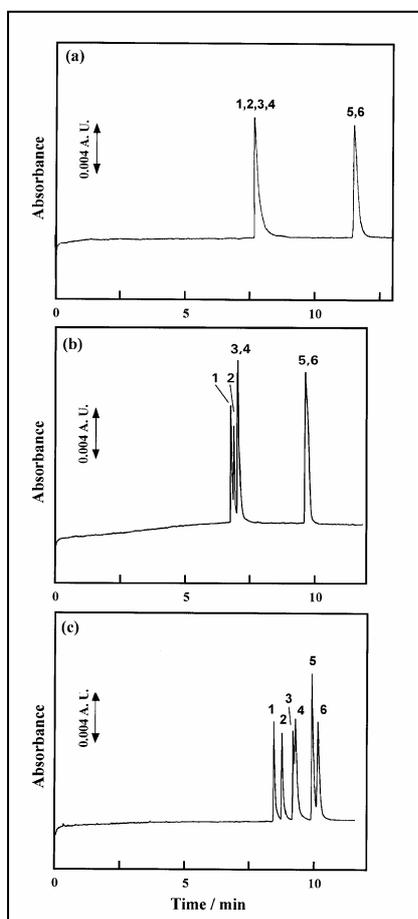


Figure 3 Electropherograms of NS isomers. Running solutions: (a) 0.01 M HCl solution, (b) HCl solution containing 15 mM [9]aneN₃ (pH 2.0), and (c) HCl solution containing 15 mM [14]aneN₄ (pH 2.0). Peak identification: (1) 2,6-NS, (2) 2,7-NDS, (3) 1,6-NDS, (4) 1,5-NDS, (5) 2-NS, (6) 1-NS. Reproduced with permission from Ref. 25. This journal is © The Royal Society of Chemistry 1998.

Cyclodextrins are often added to running buffers as chiral selectors to separate optical isomers. Because the ring-shaped molecules of their cavities have different accessibilities, the resolution of positional isomers can also be enhanced. Jandera et al.^{14,22} made an exhaustive study of the optimisation of the type and concentration of cyclodextrins in combination with electrolyte composition for resolving isomeric substituted and unsubstituted mono- to tetra-NSs (Figure 4). They showed that borate buffers provided better separations than phosphate buffers and that the size of the cavity in cyclodextrins significantly affects the separation. A borate buffer containing

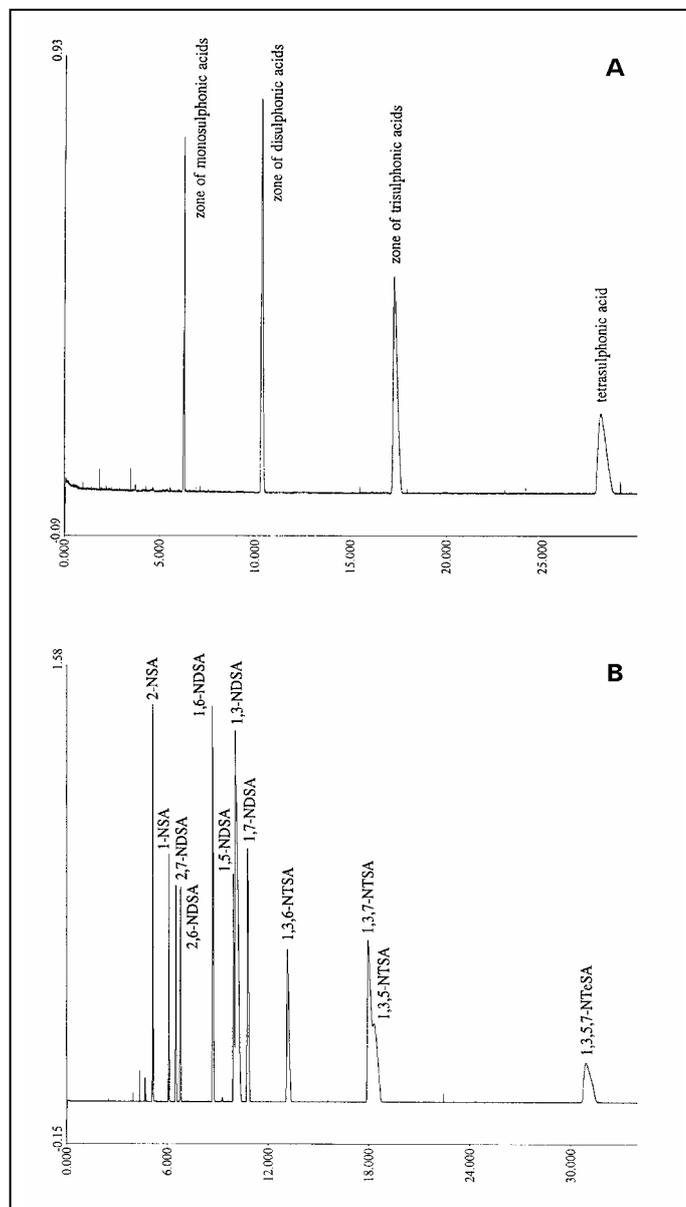


Figure 4 Separation of a mixture of naphthalenesulfonic acids using 25 mM borate buffer (a) without cyclodextrin and (b) with mixed β - and γ -cyclodextrin (5mM each). Reprinted from Ref. 22, Copyright (1997) with permission from Elsevier Science.

β -cyclodextrin managed to completely separate six di-NSs, but tri-NSs were better resolved with the addition of γ -cyclodextrin. The separation of isomeric mono- to tetra-NS acids was best with buffers containing a mixture of β - and γ -cyclodextrins. The addition of β -cyclodextrin was also necessary for the separation of the amino-NSs.

Hamai and Sakurai ²⁶ also reported the usefulness of adding β -cyclodextrin to separate the two 1- and 2-NS isomers. Furthermore, since the deuterium isotope of $^2\text{H}_2\text{O}$ may be used as a solvent modifier to improve the resolution in CE, they also investigated the effects of the $^2\text{H}_2\text{O}$ in the running buffer on the equilibrium constant for the formation of the inclusion complex between β -CD and 2-NS. ²⁶ They revealed that the substitution of $^2\text{H}_2\text{O}$ for H_2O in the running buffer seems to enhance the inclusional complexation of β -CD and 2-NS.

MEKC

A simple way to enhance the selectivity of CE separations is to add surfactants above their critical micelle concentration (CMC) to form micelles. This technique is called micellar electrokinetic chromatography (MEKC). If the selectivity is controlled, the resolution often improves also. MEKC separates both neutral and charged analytes. Separation in MEKC is based on the electrophoretic mobilities of the micelles in which the analytes are contained. The mechanism of the analyte-micelle interaction involves a combination of hydrophobic-hydrophilic and dipolar interactions. Of the four classes of surfactants (anionic, cationic, non-ionic and zwitterionic), the anionic surfactants, specially SDS, and non-ionic surfactants, specially Brij 35, have been the most frequently used to improve NS separations.

^{16,17,19,20,23,27-29} Other surfactants such as Triton X-405, polyethilenglycol (PEG), CTAB or bile salts, have also been tested. ^{23,28-30}

When separating a mixture of 21 mono- and disubstituted-NSs, Kok et al. ¹⁶ reported increased selectivity with SDS for the single-charged but not for the doubly-charged ones.

Most of the papers which compare the selectivity and the usefulness of SDS for separating NSs with other surfactants reveal that non-ionic surfactants are more selective and easier to handle. ^{17,19,20,23,30} Cugat et al. ^{17,23} reported that results were better with mono-NSs or di-NSs when Brij 35 was used instead of SDS. It was pointed out that Brij 35 avoids the Joule heating problems encountered with SDS at increasing concentration. This means that this surfactant can be added to the running buffer at high concentrations and high voltages can still be used. Angelino et al, ¹⁹ who also showed that Brij 35 is an ideal surfactant for successfully separating isomeric benzene and naphthalenesulfonates, studied the effect of adding an alkylamine (octylamine) to the micellar system. They suggested that the octylamine cannot form ion-pair octylammonium-sulfonates at the pH of the running buffer (pH > 8) but that it can vary the micellar environment, just enough to improve the separation.

In a recent study, three non-ionic surfactants with different hydrophobicities (Brij 35, Brij 58 and Brij 78) were compared to form micelles with several aromatic anions, including some unsubstituted NSs. The reactivity of the analytes was almost identical for all the surfactants, which suggested that it is the hydrophobicity of the polyethylene group in the surfactants that binds the analytes. ²⁷

When MEKC separations of BZSs and NSs were performed with CTAB as both EOF modifier and micellar agent, the separation efficiency and resolution were poor in pure aqueous systems.^{23,28} Nevertheless, organic solvents had to be added to the micellar buffer because they reduced the distribution of the compounds in the micelles. This resulted in marked selectivity differences and enabled the isomers to be separated.

Bile salts are another group of anionic surfactants that has been widely used for separating both neutral and ionic analytes. One of the most widely used bile salts, sodium cholate, was also successfully used to separate some BZS and NS.³⁰

CEC

CEC is a hybrid technique that combines the high speed and high efficiency of capillary electrophoresis with the selectivity of HPLC. As in CE, a high voltage is applied to create an electroosmotic flow that carries the solvent towards the cathode. But like chromatography, the solute is partitioned between a mobile phase and a stationary phase. CEC allows chromatographic-like separations to be performed with the high separation efficiencies of CE. Usually, CEC is performed using fused-silica capillaries packed with stationary phases. Although CEC appears to be a promising technique, up to now only two reports from the early 90s have used it to separate aromatic sulfonated compounds. Pferrer and Yeung¹³ separated a mixture of five substituted NS using an electrochromatographic technique which involved partitioning the analytes, with the aid of an ion-pairing agent, onto the surface of a reversed-phase open-tubular capillary liquid chromatographic (OTCLC) column. The inner surface of the OTCLC capillary was dynamically coated with the ion-pair agent tetrabutylammonium (TBA)

cation contained in the running buffer. They reported that the NSs were separated due to their differences in retention rather than differences in electrophoretic mobilities. Five substituted NS were successfully separated (Figure 5). Anion-exchange sites were added to reverse-phase coated capillary to study the selectivity of CEC for separating amino-NSs.³¹ This was done by adding the surface-active quaternary ammonium cation CTAB to the running buffer. The authors reported that the surface of the capillary can be manipulated by changing the concentration of the buffer ion, adding an organic modifier or changing the concentration of the ion-interaction reagent (CTAB) and that this can add selectivity to separations of compounds with similar mobilities like NS.

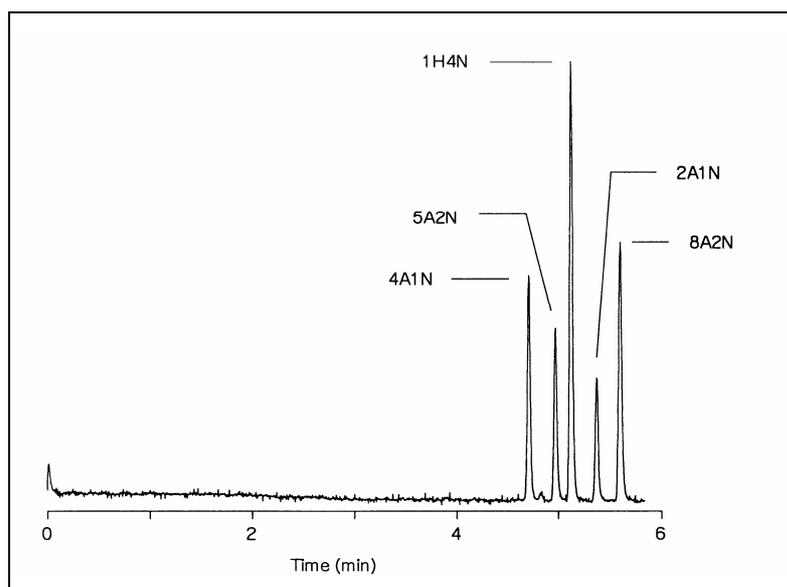


Figure 5 CEC electropherogram of a test sample containing five amino- and hydroxynaphthalenesulfonates, using a column coated with OV-17_v. Reprinted from Ref. 13, Copyright (1991) with permission from Elsevier Science.

MANIPULATING SENSITIVITY

Use of alternative detection techniques

On-column UV absorption detection is the technique that is most frequently used to monitor BZSs and NSs separations. Unfortunately, the sensitivity of absorption detection in CE is rather low because of the short optical path-length in on-column detection, which is equal to the internal diameter of the capillary used. The increasing applications of CE and CEC have led to a growing interest in detection methods that are more sensitive, selective and structurally informative. Nowadays, modern fluorescence detectors can give better detection limits than UV absorption detection. Laser-induced fluorescence (LIF) detection of native fluorescence compounds, such as NS, is worth mentioning because it provides information about their structure and determines them at sub- $\mu\text{g l}^{-1}$ levels.³²⁻³³ The emission characteristics of the amino- and hydroxy-substituted NS are strongly influenced by the nature and the position of the substituents.

The potential of phosphorescence detection in CE for determining NS has also been explored.³⁴⁻³⁵ The quenched phosphorescence mode is an attractive alternative for absorption detection, especially in the case of low analyte absorptivities like NS, because its sensitivity is not related to the analyte absorptivities. Excellent detection limits down to $10^{-8} \mu\text{g l}^{-1}$ have been reported for such compounds.³⁵

Off-line preconcentration by solid-phase extraction (SPE)

Trace enrichment of BZS and NS by SPE makes it possible to determine some of these compounds at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels by CE and it is also very important for the clean-up of complex samples.

Kok et al.^{16, 32} modified the SPE procedure developed for NS by Zerbinati et al.³⁸ so that it could be used in CE. They used a C₁₈ column loaded with the ion-pair reagent CTAB to trap the NS. However, due to the incompatibility of the ion-pair agent with CE, a clean up is required prior to NS analysis, which removes the ion-pair cations with a cation exchanger SPE column. The recoveries were between 50-100%, except for some amino/hydroxy- substituted compounds which showed a much lower (>5%) value.³²

Recently, highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene polymers (LiChrolut EN, Isolute ENV + and HR-P) and the new Oasis HLB - poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone)-copolymer have been proposed as alternatives to the ion-pair extraction procedures described above for the trace enrichment of these polar analytes (BZS and NSs)^{18,37,39}. The main advantages of these extraction procedures are their simplicity, speed and CE compatibility. However, they also have drawbacks: the recoveries, mainly for the multiple charged analytes (>50%), are lower than ion-pair extraction methods, and none of the sorbents tested were able to extract very hydrophilic aromatic sulfonates with more than one negative sulfonate group.³⁹ Of the four sorbents materials, the highest recoveries for most of the sulfonates were obtained with LiChrolut EN and HR-P. For some compounds, the Oasis HLB material even gave slightly higher recoveries than LiChrolut EN and HR-P. Another type of sorbents are the graphitized

carbon cartridges. As Henion ⁴⁰ has recently pointed out, recoveries are high when these cartridges are combined with LC. So far, however, the cartridges have not been combined with CE.

On-line preconcentration by stacking procedures

Another recently developed enrichment procedure for BZS and NSs is based on stacking procedures. Sample stacking occurs when the sample injected has a lower ionic strength than the running buffer. A large volume sample stacking (LVSS) procedure with sample matrix removal has been developed as a simple and effective way of decreasing the detection limits of BZS and NS isomers by CZE with on-column UV detection (Figure 6). ⁴¹ This procedure involves the hydrodynamic introduction of a large plug of sample into the capillary and reversing the field polarity after the introduction of the sample to push the sample matrix out of the capillary. Then, the field polarity is switched back and the separation takes place. The main advantages of this enrichment procedure are that it saves time, because it requires minimum handling of the sample, it requires no further special experimental device other than a basic CE setup and it enables even the most hydrophilic of compounds to be determined at low $\mu\text{g l}^{-1}$. Its main drawback is that for complex samples a clean-up step is recommended.

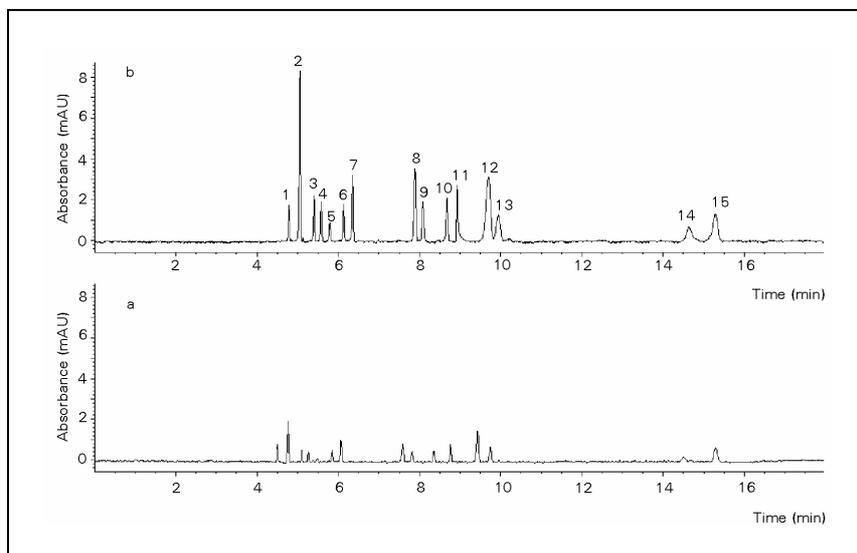


Figure 6 Electropherograms of standard solutions using (a) conventional hydrodynamic injection ($500 \mu\text{g l}^{-1}$ of NSs and $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ of BZs) and (b) LVSS enrichment procedure ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ of NSs and $100 \mu\text{g l}^{-1}$ of BZs). Running electrolyte 20 mM borate buffer, pH 9.2.

Applications of CE-mass spectrometry (MS)

An early application of CE with mass spectrometry (MS) for determining NSs was published in 1992 by Brumley,³⁶ who detected a mixture of BZs and NSs in water samples. Near ten years later, Loos et al.³⁷ developed and optimized a CZE-MS method for determining BZs and NSs. Separations were performed with a ammonium acetate buffer (pH 10) and the CE effluents were introduced into the MS through an electrospray (ESI) sheath flow interface, which was operated in the negative mode. The sensitivity of CE-MS with detection limits ranging between 0.1 and 0.4 mg l^{-1} , was slightly better than for CE-UV. Water samples of various waste water treatment plants (WWTPs) in Catalonia (Spain) were extracted by SPE with

LiChrolut EN and analysed by CE-MS. Some BZSs and NSs, in the $\mu\text{g l}^{-1}$ range, were found in influent and effluent water samples of the WWTPs, which confirmed the persistency of some of these compounds. CE/MS is the future in the analysis of real samples. It still poses various problems, but if the companies will supply better instruments, then CE/MS could solve its sensitivity problems. The low flows of CE are generally well suited to MS-detection. TOF-detection has the best sensitivity, today.

Applications to environmental analysis

In the literature there are still very few applications of CE to the analysis of real samples but the recent development of new enrichment, fluorescence and MS-detection techniques are encouraging. As reported before, most environmental applications include a previous SPE enrichment step. When industrial samples are analysed, a cleanup step is not required before separation,^{19,38} but if potential apolar interferences are to be removed, extraction with RP-C₁₈ material should carry out the necessary additional cleanup step.^{16,18,39}

When an industrial effluent containing several polar ASs together with other aromatic compounds was analyzed by MEKC, sample preconcentration was not necessary because of the high concentrations of the compounds. Three NSs (1-NS, 2-NS and 2-OH-NDS) were identified and quantified at g l^{-1} levels using a UV detection system (Figure 7).¹⁹ But aromatic sulfonate concentrations in other environmental samples are usually very low, and isomeric compounds cannot be separated with simple CZE buffers. So although UV detectors may make us suspect that similar aromatic sulfonates are present, confirmation that this is so is not possible without more selective detection procedures such as LIF or MS detection.¹⁸

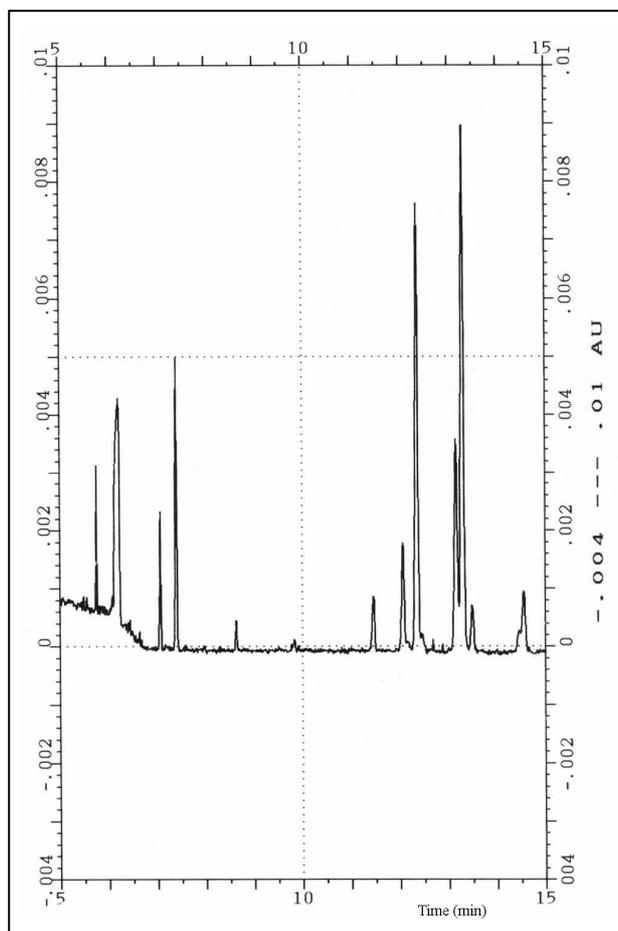


Figure 7 Analysis of industrial waste water, using a 25 mM borate buffer, pH 9.0, containing 75 mM Brij 35 and 5 mM octylamine. Reprinted from Ref. 19, Copyright (1999) with permission from Elsevier Science.

Using LIF detection procedures, Kok et al.,^{32,33} identified and quantified, at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels, three NSs (7-NH₂-1,3-NDS, 1,3,6-NTS and 1,3,5-NTS) in river Elbe water samples taken at three different sites of Germany (Figure 8). An unsubstituted NS (2-NS) and an amino-naphthalenedisulfonate (7-NH₂-1,3-NDS) were also identified and quantified, at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels, in a

waste water sample (that had been subjected to clean-up without enrichment by off-line SPE) using a continuous wave 275.4-nm LIF detection system.³³ An unsubstituted NS (1-NS) and an aminonaphthalenesulfonate (5-NH₂-2-NS) were also identified and quantified, at low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels, in an influent water sample from a WWTP.⁴¹

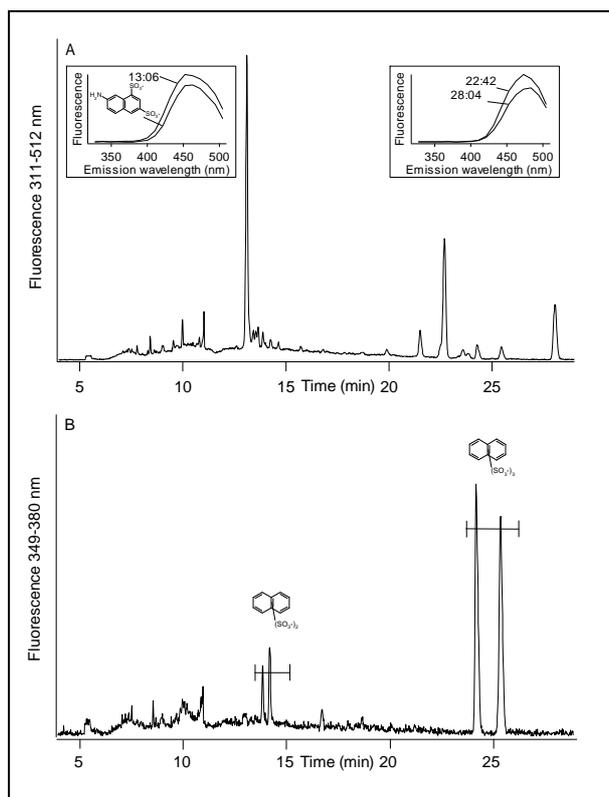


Figure 8 Electropherogram of a River Elbe sample, recorded using a borate buffer, after 30-fold preconcentration by means of off-line ion-pair SPE. Excitation: 280 nm; emission range: (a) 311-512 nm or (b) 349-380 nm. Reprinted from Ref. 32, Copyright (1997) with permission from Elsevier Science.

The first application of CE-MS to the analysis of environmental water samples containing aromatic acids was reported by Brumley.³⁶ Although several peaks were detected from a landfill leachate sample, only 4-chlorobenzenesulfonic acid was confirmed. Recently, some influent and effluent water samples from several WWTPs in Catalonia (Spain) were analyzed by CE-MS.³⁷ It was shown that some BZSs and NSs (1-NS, 2-NS, 4-CH₃-BZS and 4-Cl-BZS) are only slightly eliminated by the waste water treatment process. Therefore, they are quite persistence compounds (Figure 9).

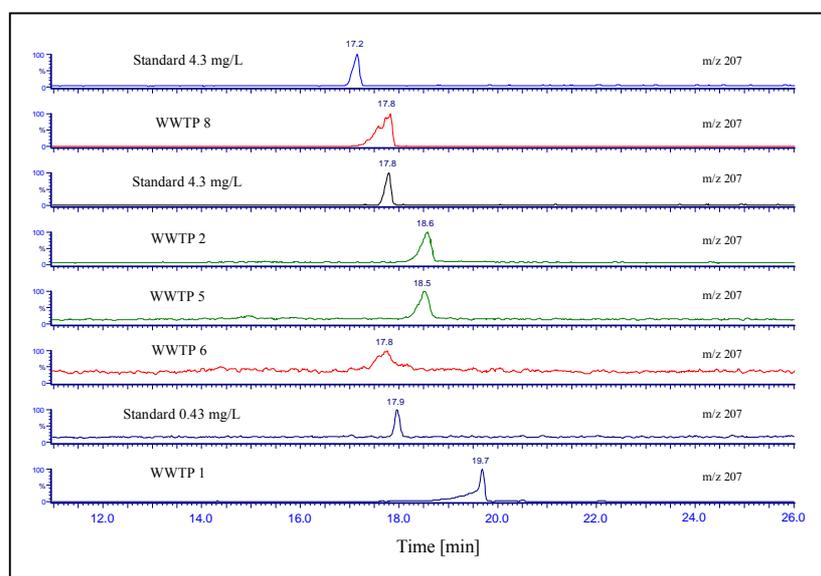


Figure 9 CE/MS electropherogram of waste water treatment plant waters in comparison with standards at 4.3 and 0.43 mg l⁻¹. SIM mass m/z 207, detection of 1-NS and 2-NS. Running electrolyte 5 mM ammonium acetate, pH 10.5. Reproduced with permission from Ref. 37. 2000 © John Wiley & Sons Limited.

CONCLUSIONS

The perspectives of CE for analysing BZSs and NSs are undoubtedly good. The various modifications of CE (including CEC) seem to be highly promising for separating complex mixtures. Because the CE methods are cheap and fast and have a different separation selectivity, they may become real alternatives to LC.

Nevertheless, to enable samples to be detected at low concentration levels and/or enable difficult samples to be analysed, new extraction sorbents, which can effectively trap the most hydrophilic compounds, and improved stacking procedures should be investigated. Finally, instrument manufacturers should facilitate the coupling of CE to enrichment techniques and detection methods other than UV.

REFERENCES

- 1 M.C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 400 (1999) 211.
- 2 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 3 O. Zerbinati, I. Diana, C. Baiocchi, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 74 (1999) 43.
- 4 C. Wolf, T. Storm, F.T. Lange, T. Reemtsma, H.-J. Brauch, S.H. Eberle, M. Jekel, *Anal Chem.*, 72 (2000) 5466.

-
- 5 E. Pocurull, C. Aguilar, M.C. Alonso, D. Barceló, F. Borrull, R.M. Marcé, J. Chromatogr. A, 854 (1999) 187.
 - 6 S. Riediker, M. J.-F. Suter, W. Giger, Wat. Res. 34 (2000) 2069.
 - 7 T.P. Knepper, F. Sacher, F.T. Lange, H.J. Brauch, F. Karrenbrock, O. Roeden, K. Lindner, Waste Managment 19 (1999) 77.
 - 8 L-K. Ng, M. Hupé, J. Chromatogr. 513 (1990) 61.
 - 9 R.H. Stehl, Anal. Chem. 42 (1970) 1802.
 - 10 I.S. Kim, F.I. Sasinos, D.K. Rishi, R.D. Stephens, M.A. Brown, J. Chromatogr. 559 (1991) 177.
 - 11 P. Jandera, S. Bunceková, J. Planeta, J. Chromatogr. A, 871 (2000) 139.
 - 12 S. Terabe, T. Isemura, Anal. Chem. 62 (1990) 650.
 - 13 W. D. Pfeffer, E.S. Yeung, J. Chromatogr. 557 (1991) 125.
 - 14 P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerova, P. Zvonicek, J. Chromatogr. A, 738 (1996) 201.
 - 15 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, Bunseki Kagaku, 44 (1995) 227.
 - 16 S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman. J. High Resol. Chromatogr. 19 (1996) 99.
 - 17 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, Chromatographia, 46 (1997) 204.
 - 18 R. Loos, R. Niessner, J. Chromatogr. A, 822 (1998) 291.
 - 19 S. Angelino, A. Bianco Prevot, M.C. Gennaro, E. Pramauro, J. Chromatogr. A, 845 (1999) 257.
 - 20 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, Bunseki Kagaku, 44 (1995) 627.
 - 21 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, Chromatographia, 49 (1999) 261.
 - 22 J. Fischer, P. Jandera, V. Stanek, J. Chromatogr. A, 772 (1997) 385.
 - 23 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, Analyst, 125 (2000) 2236.
 - 24 T. Okada, Anal. Chem. 68 (1996) 1158.
 - 25 K. Takahashi, T. Nakagawa, T. Imato, Anal. Comm. 35 (1998) 221.
 - 26 S. Hamai, H. Sakurai, J. Chromatogr. A, 800 (1998) 327.

- 27 T. Takayanagi, S. Motomizu, *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 55.
- 28 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 50 (1999) 229.
- 29 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 45 (1996) 181.
- 30 W. C. Brumley, C.M. Brownrigg, *J. Chromatogr.* 646 (1993) 377.
- 31 T.W Garner, E.S. Yeung, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 397.
- 32 S.J. Kok, E.M. Kristenson, C. Gooijer, N.H. Velhorst, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr., A*, 771 (1997) 331.
- 33 S.J. Kok, G.Ph. Hoornweg, T. De Ridder, U.A.Th. Brinkman, N.H. Velhorst, C. Gooijer, *J. Chromatogr., A*, 806 (1998) 355.
- 34 J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Anal. Chem* 71 (1999) 1384.
- 35 J. Kuijt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Electrophoresis* 21 (2000) 1305.
- 36 W. C. Brumley, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 267.
- 37 R. Loos, J. Riu, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1197.
- 38 O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 231.
- 39 R. Loos, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr.* 890 (2000) 225.
- 40 M.C. Henion; *J. Chrom. A*. 885 (2000) 73.
- 41 M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 126 (2000) 1312.

CAPÍTOL III

PART EXPERIMENTAL

Tenint en compte les consideracions fetes en els capítols anteriors, les tècniques electroforètiques representen una alternativa a les cromatogràfiques per separar barreges de compostos aromàtics sulfonats. A causa sobretot de la flexibilitat, és possible desenvolupar diferents mètodes electroforètics que permetin obtenir separacions selectives en funció de la composició de les barreges de compostos analitzades. Pel que fa a la determinació, actualment es disposa de sistemes de preconcentració, convencionals i específics, i de sistemes selectius de detecció que permeten determinar-los i identificar-los a baixos nivells en mostres aquoses. És per aquest motiu que en la present tesi s'han desenvolupat nous mètodes de separació i nous sistemes de preconcentració i detecció per determinar un grup de compostos aromàtics sulfonats mitjançant l'electroforesi capil·lar.

Tots els estudis realitzats s'han dut a terme emprant un instrument d'electroforesi capil·lar (^{3D}CE Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) equipat amb un detector de díodes en fila (DAD) i en el darrer dels treballs es va acoblar a un espectròmetre de masses (single quadrupole HP series 1100 MSD) mitjançant una interfície d'electrosprai (també de HP). Els analits seleccionats foren diversos benzensulfonats (BZS), naftalensulfonats (NS) monosulfonats i disulfonats, no substituïts o substituïts amb grups NH₂- i/o OH, ja que formen part dels compostos aromàtics sulfonats més trobats en aigües i presenten una problemàtica important tant en la determinació com en el comportament mediambiental.

En els estudis descrits en els quatre primers apartats d'aquest capítol s'han desenvolupat diversos mètodes electroforètics que presenten una selectivitat diferent per als compostos estudiats i permeten separar barreges isomèriques de BZS i NS. Els mètodes han consistit a modificar la selectivitat de l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) i la cromatografia

micel·lar electrocinètica (MEKC) per determinar aquests compostos. Els mètodes han estat avaluats i comparats entre sí per tal d'establir-ne les aplicacions, els avantatges i els desavantatges.

En el cinquè apartat s'aplica un sistema de preconcentració *on-capillary* en CZE per determinar BZS i NS en mostres aquoses. En aquest estudi es demostra la utilitat d'emprar un sistema de preconcentració basat en els procediments de *sample stacking*, concretament s'utilitza el sistema de *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra, per tal de millorar la sensibilitat de la tècnica en la determinació dels compostos d'interès. En aquest estudi també es posa de manifest la persistència d'alguns dels compostos d'interès comparant els resultats obtinguts en l'anàlisi d'afluents a l'entrada i a la sortida d'una planta de tractament d'aigües residuals.

Finalment, en el sisè apartat es desenvolupa una altra tècnica de preconcentració *on-capillary* i s'optimitza l'acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses per millorar la sensibilitat i la selectivitat del mètode. En aquest estudi es demostra la utilitat d'emprar un sistema de preconcentració basat en els procediments isotacoforètics, s'utilitza un procediment en què la preconcentració i la separació tenen lloc en un únic capil·lar. Per aplicar el procediment isotacoforètic a mostres reals es va requerir un sistema de *clean-up* de les mostres que va consistir en un procés d'extracció en fase sòlida. Per dur a terme el procés de *clean-up* es van seleccionar i comparar tres sorbents polimèrics amb l'objectiu d'obtenir recuperacions satisfactòries, evitant la utilització de parells iònics en el procés d'extracció que afectarien el procés de separació electroforètic. El mètode es va aplicar satisfactòriament a la determinació dels compostos d'interès en diverses mostres aquoses. Per altra banda, amb l'objectiu de

millorar la selectivitat de la tècnica es va desenvolupar un mètode que demostra la utilitat de l'acoblament CE-ESI-MS per identificar BZS i NS en aigües. En aquesta part de l'estudi s'optimitzen els paràmetres característics de l'acoblament entre ambdós sistemes i es demostra la seva influència tant en l'eficàcia de la separació com en la sensibilitat de la tècnica. L'acoblament CE-ESI-MS va permetre confirmar la presència del 2-NS en una mostra d'aigua de riu.

**III.1 ESTUDI COMPARATIU DE LA UTILITZACIÓ DE L'ELECTROFORESI
CAPIL·LAR PER ZONES I LA CROMATOGRÀFIA MICEL·LAR
ELECTROKINÈTICA PER A LA SEPARACIÓ DE DOTZE COMPOSTOS
AROMÀTICS SULFONATS**

Com ja s'ha comentat anteriorment la separació dels compostos en estudi no és senzilla, principalment quan es tenen barreges que contenen diversos isòmers posicionals. Alguns autors, per exemple, proposen dur a terme la separació d'una barreja d'aquestes característiques combinant dues anàlisis: alguns dels isòmers els separen per CZE mentre que d'altres els separen mitjançant la MEKC.¹ Davant el reduït nombre de publicacions existents, l'objectiu d'aquest treball va ser el desenvolupament d'un mètode electroforètic que permetés separar una barreja de diversos BZS i NS, substituïts i no substituïts, en una sola anàlisi.

Pel desenvolupament d'aquest treball es va seleccionar una barreja de 12 BZS i NS monosulfonats isomèrics (1-,2-NS; 1-OH-4-NS; 1-NH₂-5-NS, 2-NH₂-1-NS, 4-NH₂-1-NS, 5-NH₂-2-NS, 8-NH₂-2-NS; 1-NH₂-2-OH-4-NS, 6-NH₂-1-OH-3-NS, 6-NH₂-4-OH-2-NS, BZS). Aquests compostos es van seleccionar perquè alguns d'ells, com ara l'1- i el 2-NS, formen part dels compostos aromàtics sulfonats més freqüentment trobats en aigües i perquè el fet de tenir diversos isòmers d'un mateix compost en una barreja presenta una problemàtica important per a la seva separació. La separació es va dur a terme emprant un capil·lar de sílice fosa de 64.5 cm de longitud total (56 cm fins a la finestra de detecció), utilitzant com a electròlit una solució de borat sòdic. La detecció va tenir lloc a 220 nm, emprant un detector de díodes en fila (DAD). En el present treball la separació electroforètica es va dur a terme en mode contraelectroosmòtic. En mode contraelectroosmòtic, com ja s'ha comentat en el capítol I, els vectors de mobilitat electroforètic i electroosmòtic es mouen en sentits oposats degut a que les parets del capil·lar es troben carregades negativament. En aquesta configuració, l'EOF es mou en direcció al càtode mentre que els compostos aniònics es mouen en direcció a l'ànode.

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme l'optimització de diversos paràmetres que poden contribuir a la separació d'aquests compostos mitjançant l'electroforesi capil·lar per zones (CZE).² D'entre els diferents paràmetres, tipus i composició de l'electròlit (força iònica i pH) i voltatge de separació, es va observar que el pH de l'electròlit era el que tenia un paper més important.^{1,3}

L'increment tant de la força iònica de l'electròlit com del voltatge de separació va contribuir principalment a reduir els temps d'anàlisi; en ambdós casos el seu valor es veié limitat per l'efectiva dissipació de la calor produïda.

Mitjançant la CZE emprant un tampó electrolític senzill (solució de borat sòdic 20 mM, pH 8.7), es va aconseguir la resolució del benzensulfonat, de l'hidroxi-naftalensulfonat i dels amino-hidroxi-naftalensulfonats, però no la dels naftalensulfonats no substituïts ni la dels amino-naftalensulfonats. És per això que en la segona part de l'estudi es va optar per introduir un sistema micel·lar amb l'objectiu de manipular la selectivitat de la separació i aconseguir la resolució de tots els isòmers presents a la barreja. Per a la separació dels compostos mitjançant la cromatografia micel·lar electrocinètica (MEKC) es van seleccionar dos tensioactius, un d'aniònic (l'SDS) i, donat que els compostos estudiats són substàncies carregades, un de no iònic (el Brij 35),⁴ amb l'objectiu de comparar la selectivitat de dos sistemes micel·lars on les interaccions que tenen lloc entre les micel·les i els analits són diferents.

En l'optimització de la separació micel·lar, també es va dur a terme l'optimització de diversos paràmetres (tipus i concentració de tensioactiu, pH de l'electròlit, addició de metanol a l'electròlit, voltatge de separació i

temperatura) que contribueixen a modificar la distribució dels analits entre la fase aquosa i la fase micel·lar. Tots els paràmetres avaluats van tenir un paper molt important en la resolució dels analits, principalment el tipus i concentració de surfactant i el voltatge de separació. La millora de la selectivitat en ambdós sistemes micel·lars comparada amb l'obtinguda per CZE va ser molt significativa i, tal com s'esperava, el diferent ordre de migració dels compostos va posar de manifest que les interaccions que tenien lloc emprant ambdós tensioactius eren diferents.

Encara que amb el tensioactiu aniònic (SDS) es va aconseguir la separació de la majoria de compostos, es considera que els millors resultats es van obtenir en emprar el tensioactiu no iònic (Brij 35) que possibilita la separació de tots els analits. Degut a la càrrega neutra del Brij 35, la seva presència en l'electròlit no incrementava el corrent generat; en canvi, quan es treballava amb l'SDS, donat que la concentració necessària per tal d'obtenir una bona resolució dels analits era elevada, es produïen sovint caigudes de corrent. Quan es produïen aquestes caigudes de corrent, l'única manera de reproduir els resultats era netejant el capil·lar amb NaOH. Per tal de solventar aquesta problemàtica, en el condicionament del capil·lar entre anàlisis es va introduir una etapa en què es feia passar NaOH pel capil·lar quan es treballava amb l'SDS.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, s'han publicat a la revista *Chromatografia*, 46 (1997) 204-207.

BIBLIOGRAFIA

- 1 S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, O. Zerbinati, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
- 2 W.C. Brumley, *J. Chromatogr. A*, 19 (1992) 99.
- 3 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 227.
- 4 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 627.

**COMPARATIVE STUDY OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS AND
MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY FOR THE SEPARATION OF
TWELVE AROMATIC SULPHONATE COMPOUNDS**

SUMMARY

Two modes of capillary electrophoresis (CE), capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC), were investigated for the separation of 12 aromatic sulphonate compounds. In CZE, although the voltage applied, the buffer concentration and the pH were optimized for effective separation of the compounds studied, under the best conditions four of the five amino compounds coeluted, as did naphthalene-1-sulphonic acid and naphthalene-2-sulphonic. In MEKC, sodium dodecyl sulphate (SDS) and Brij 35 were chosen as the anionic and nonionic surfactants and the effect of the concentration of micelles was examined. The effect of adding methanol as the organic modifier was also investigated with each of these micellar systems. All the analytes, including the isomers, were completely separated by use of MEKC with Brij 35 but when SDS was used only 11 compounds were separated because two amino compounds coeluted.

Keywords: Capillary zone electrophoresis; Micellar electrokinetic chromatography; Aromatic sulphonate compounds.

INTRODUCTION

Aromatic naphthalene and benzene sulphonates and their hidroxy and/or amino derivatives are widely used in several industrial processes, particularly for the production of pharmaceutical compounds and dyes. Little is known about the possible effects of these substances on the environment or about their toxicity and biodegradation, although several studies show that some of the compounds cannot be totally removed in mechanical-biological wastewater treatment plants and are thus discharged to the aquatic environment.¹⁻⁴

Although several chromatographic methods have been developed for determination of these compounds, high performance liquid chromatography (HPLC) seems to be more appropriate than gas chromatography (GC)^{5,6} because of the complex derivatization process required by the latter (otherwise the amino and hidroxy groups react with the reagents used to halogenate the sulphonic acid group as part of the derivatization process). Ion-pair liquid chromatography (IPLC), with UV or fluorescence detection, is the technique most widely used for determining these compounds in water.^{1-4,7-9} Use of fluorescence detection results in less interference than with UV or diode-array detection. If substituted compounds are to be detected, however, two different injections must be made at different wavelengths to obtain good performance for different peaks.

Nowadays, capillary electrophoresis is used to analyse these and related compounds because of its high efficiency, speed and potential for automation. CZE has been used by several authors to study the separation of compounds, including some presented in this study,¹⁰ but MEKC is the technique most widely used for improving separation efficiency. Because the principle of separation in MEKC is based on the differential partitioning of the analytes

between the micelle and the surrounding aqueous phase, the choice of surfactants significantly affects MEKC selectivity. Several authors have used different surfactants (for example, sodium dodecyl sulphate (SDS), a widely used surfactant with an ionic grup and a lipophilic chain,¹¹⁻¹⁵ or Brij 35, a non ionic surfactant¹²) to change the selectivity and obtained better results than by use of CZE. Whereas borate solution is widely used as electrolyte by all authors, the pH and temperature, two of the most important parameters for improving the selectivity of these compounds, must always be carefully optimized.^{11, 16}

This paper studies the separation of twelve aromatic sulphonate compounds by CZE and MEKC using diode-array detection. In CZE the borate buffer concentration, the temperature and the pH were studied to obtain good resolution between peaks; in MEKC SDS and Brij 35 were examined as the anionic and nonionic surfactant, respectively, and their concentration and the addition of organic solvent were investigated to improve the resolution between the peaks.

EXPERIMENTAL

Equipment

Experiments were performed with an HP^{3D}CE capillary electrophoresis system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode-array detector. Data were collected with the HP Chemstation version A:04.01 chromatographic data system. The diode-array detector was operated at 220 nm and the spectra were recorded in the range 195-400 nm.

Separations were performed in uncoated fused-silica capillaries (Supelco, Bellefonte, USA) with an inner diameter of 75 μm and a total length of 65 cm. The polyimide coating was burned off 56.5 cm from the injection end of the capillary to create the detection window; the residue was removed by wiping with ethanol. The capillary was thermostatted at 25 °C. Samples were introduced by hydrodynamic injection (10 s at 50 mbar).

Reagents and Standards

The aromatic sulphonate compounds used in this study were: 1-amino-2-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid (1-NH₂-2-OH-4-NS; **1**), naphthalene-2-sulphonic acid (2-NS; **2**), 8-amino-2-naphthalenesulphonic acid (8-NH₂-2-NS; **3**), 2-amino-1-naphthalenesulphonic acid (2-NH₂-1-NS; **4**), naphthalene-1-sulphonic acid (1-NS; **5**), 5-amino-2-naphthalenesulphonic acid (5-NH₂-2-NS; **6**), 6-amino-1-hydroxy-3-naphthalenesulphonic acid (6-NH₂-1-OH-3-NS; **7**), 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulphonic acid (6-NH₂-4-OH-2-NS; **8**), 4-amino-1-naphthalenesulphonic acid (4-NH₂-1-NS; **9**), 1-amino-5-naphthalenesulphonic acid (1-NH₂-5-NS; **10**), 1-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid (1-OH-4-NS; **11**) and benzene sulphonic acid (BZS; **12**). They were purchased either as the free acids or as their soluble sodium or potassium salt from Aldrich (Beerse, Belgium) or Fluka (Buchs, Switzerland).

A stock standard solution (1000 mg L⁻¹) of each compound was prepared in water (several drops of sodium hydroxide were usually added to enhance solubility) in a dark-glass flask; this was stored at 4 °C under refrigeration and warmed to room temperature before use. Working standard solutions were prepared weekly or daily by diluting the stock standard solutions with water. Water was Milli-Q quality (Millipore, Bedford, MA, USA).

The electrolyte solutions were prepared using Milli-Q water, sodium tetraborate (Fluka), sodium dodecyl sulphate (SDS, Sigma) and polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35, Fluka). The pH of the electrolyte was adjusted with 0.1 M sodium hydroxide (Probus, Barcelona, Spain). Before use, all the micellar solutions were filtered through a 45 μm cellulose acetate syringe filter supplied by Corning Glass Works (Corning, NY, USA) and degassed by ultrasonication. HPLC-grade methanol supplied by Scharlau (Barcelona, Spain) was used as organic modifier.

Conditions used for Electrophoresis

The CZE running buffer was 20 mM sodium tetraborate (pH 8.7 ± 0.1); that used for MEKC was 20 mM sodium tetraborate containing either 100 mM SDS or 60 mM Brij 35. The surfactant (SDS or Brij 35) was dissolved in the buffer by sonication.

When a new capillary was used, it was rinsed with a 0.1 M sodium hydroxide solution continuously for approximately 60 min and then successively with Milli-Q water and the separation buffer for the same time. The capillary was washed for 10 min daily, or when the composition of the electrolyte was changed, with each of 0.1 M NaOH, Milli-Q water and running buffer. In CZE, between runs, the capillary was equilibrated for 2 min with the running buffer with an applied potential of 15 kV. In MECK with Brij 35 equilibration with the running buffer was at an applied potential of 20 KV. When SDS micelles were used, as a preconditioning step to avoid adsorption, the capillary was washed between runs with 0.1 M NaOH for 2 min and with water and running buffer for 2 min each; after each run, as a postconditioning step, the capillary was rinsed for at least 2 min with water. Overnight the capillary was left full of water for the next day's use.

The separation voltage applied was 20 kV for the CZE and 15 kV for MEKC; the capillary was thermostatted at 25 °C. The sample was introduced by pressure injection for 10 s at 50 mbar.

A diode-array detector operated at 220 nm supported by a data handling system enabled us to identify the compounds studied by comparing their UV spectra and peak purity with the spectra of reference substances (in the range 195-400 nm) stored in a library of spectra of aromatic sulphonates. Owing to the large number of possible positional isomers of the compounds, migration time alone was not sufficient for qualitative analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

The twelve compounds studied can be divided into five groups: the first comprises 1-NS and 2-NS, the second BZS, and the other three according to whether their substituents are hydroxy, amino or hydroxyamino; the compounds are listed in Table I.

The first study was performed using CZE. Borate was chosen as the electrolyte, in accordance with the literature,^{11,16} and the borate buffer concentration, pH and separation potential were optimized to obtain good separation of the compounds.

Table I.

Relative standard deviations for the analysis of the twelve compounds by MEKC.

Group	Compound	R.S.D (%) ^a	R.S.D (%) ^b
I	1-NS	2.6	2.2
	2-NS	1.3	2.9
II	BZS	1.1	1.8
III	1-OH-4-NS	2.0	2.8
IV	1-NH ₂ -5-NS	*	1.9
	2-NH ₂ -1-NS	3.2	2.2
	4-NH ₂ -1-NS	*	1.9
	5-NH ₂ -2-NS	3.0	1.4
	8-NH ₂ -2-NS	2.7	2.2
V	1-NH ₂ -2-OH-4-NS	4.9	13.2
	6-NH ₂ -1-OH-3-NS	4.6	4.0
	6-NH ₂ -4-OH-2-NS	1.5	2.9

* indicates co-eluting compounds.

^a With SDS as surfactant.

^b With Brij 35 as surfactant.

Optimization of the Buffer Concentration

It is well known that when buffer concentration decreases the electroosmotic flow increases, so making the analysis time shorter. A certain minimum buffer concentration is, however, necessary for adequate buffering capacity and to minimize solute adsorption on the capillary wall. Increasing the

buffer concentration is, however, limited by Joule heating.

The influence of borate buffer concentration on the resolution of the sulphonate compounds and on their mobilities was studied in the range between 20 and 50 mM. The other analytical conditions were fixed at a pH of 8.7 (by use of NaOH solution), a separation potential of 20 kV and injection of a 10 mg L⁻¹ standard solution at 50 mbar for 10 seconds. The results obtained show that the migration times of the compounds studied increased when the buffer concentrations increased; at the same time changes in the order of elution and loss of resolution were observed for the group V compounds. 20 mM borate buffer electrolyte was, therefore, used for optimum separation.

Optimization of the Applied Voltage

Although the use of higher voltage gives more theoretical plates which improves separation efficiency and shortens the analysis time, this benefit is limited by dissipation of the heat generated during the electrophoretic process, owing to the Joule effect.

In this study, three different voltages (15, 20 and 25 kV) were used to separate a standard mixture of the compounds with the same conditions as in the previous study. No improvement in resolution was observed when the highest voltage was applied. A compromise was made between poorer resolution without excessive band broadening and a short analysis time (less than 14 min) with no complications arising from Joule heating; deviation from Ohm's law was observed at 25 KV. For these reasons, we fixed the voltage at 20 kV for further experiments.

Optimization of Buffer pH

Buffer pH plays an important role in CZE because it affects both the overall charge of the analyte and the electroosmotic flow. To study the influence of pH between 6 and 10 a standard solution was analyzed in the same way as in previous experiments. In the pH range from 8.7 to 9.7 the pH had a strong influence on the electrophoretic mobilities of the hydroxyamino compounds. As is apparent from Figure 1, over this pH range the order of migration of these compounds can change if the pH is adjusted by as little as 0.1 unit.

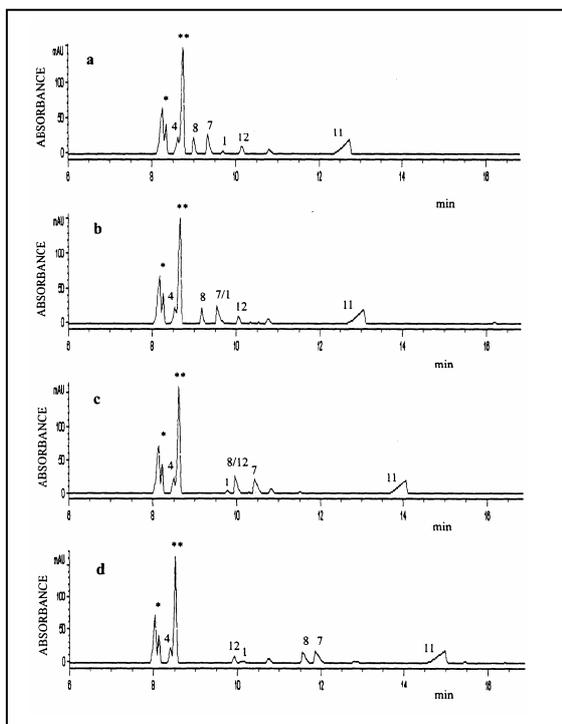


Figure 1

CZE of a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulphonate compounds. Electrolyte, 20 mM borate buffer adjusted with 0.1 M NaOH to pH (a) 8.7, (b) 8.8, (c) 9.1, (d) 9.5. Separation voltage, 20 kV; injection, 50 mbar for 10 s; UV detection at 220 nm; temperature, 25 °C. Peak assignment: 1, 1-NH₂-2-OH-4-NS; 2, 2-NS; 3, 8-NH₂-2-NS; 4, 2-NH₂-1-NS; 5, 1-NS; 6, 5-NH₂-2-NS; 7, 6-NH₂-1-OH-3-NS; 8, 6-NH₂-4-OH-2-NS; 9, 4-NH₂-1-NS; 10, 1-NH₂-5-NS; 11, 1-OH-4-NS; 12, BZS; * indicates co-elution of compounds 3,6,9 and 10 and ** indicates co-elution of compounds 2 and 5.

To summarize, the best results were obtained when 20 mM sodium tetraborate at pH 8.7 was used as the background electrolyte, the applied voltage was 20 kV and the capillary temperature was kept constant at 25 °C. Under these conditions, however, the isomers of the compounds in groups I and IV could not be separated by CZE, and so additives had to be added to improve the resolution of these compounds. Figure 2a shows the electropherogram obtained from a standard solution of these compounds under optimum conditions.

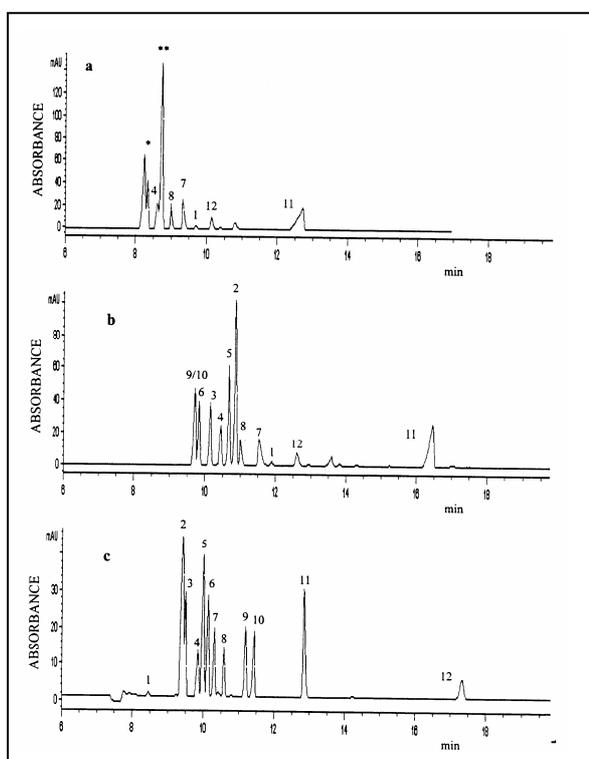


Figure 2

Electropherograms obtained under optimum conditions for a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulphonate compounds by: (a) CZE, (b) SDS-MEKC, (c) Brij 35-MEKC. For other conditions and peak assignment, see Figure 1 and experimental section.

Occasionally the selectivity of CE can also be improved by adding micelles, i.e. by performing micellar electrokinetic chromatography (MEKC). Of the four common classes of surfactant (anionic, cationic, non-ionic and zwitterionic), anionic surfactants, especially SDS, have been the most frequently used in MEKC. The usefulness of SDS is, however, limited by its charge – high concentration of SDS induce significant Joule heating, which consequently degrades separation efficiency. On the other hand, non-ionic surfactants do not have many of these limitations and can be used at high concentrations with no change in operating currents at constant voltage. For this reason, we chose SDS as the anionic surfactant and Brij 35 as the non-ionic surfactant for our experiments.

As the first variable to be optimized in MEKC, the concentrations of SDS and Brij 35 were studied between 25 and 100 mM. The experiment was performed on a 10 mg L⁻¹ standard solution and with 20 mM sodium tetraborate solution as background electrolyte. The pH of the solution without adjustment was 9.0 or 8.9 for SDS and Brij 35, respectively. When the pH was increased by only 0.1 by adding 0.1 M NaOH there was a sharp loss of resolution. The same effect was observed when the temperature was increased by 5 °C.

After several experiments, a concentration of 100 mM SDS, Figure 2b, and 60 mM Brij 35, Figure 2c, with a separation voltage of 20 kV (SDS) or 15 kV (Brij 35), were found to give good resolution in a short analysis time. In both cases, analysis times were similar, less than 18 min and slightly longer for CZE. A separation voltage of 15 kV was chosen when Brij 35 was used because at 20 kV the analytes were poorly resolved. Although the affinity of the charged naphthalene sulphonates for the micelles is relatively low, selectivity was higher for the singly charged analytes. In the presence of 100

mM SDS, baseline separation was achieved for the two analytes in group I (see Table I) and almost all the analytes in group IV, except for compounds **9** and **10**. These two groups were not separated by CZE. The relative mobility of the doubly charged compounds (group V) was not obviously significantly changed, as can be seen by comparing Figures 2b and 2c, with Figure 2a, the separation obtained by CZE under optimum conditions.

As expected, frequent drops in the current were observed when SDS was used. In order to avoid these problems the wash time in the preconditioning step was increased, as has been described above. Because non-ionic surfactants do not have these drawbacks the use of sodium hydroxide was omitted from the preconditioning step.

Baseline separation of all the analytes could not be achieved with either SDS or Brij 35. Better peak symmetry was, however, observed when the non-ionic surfactant was used - all twelve compounds studied were then separated. Furthermore, when SDS was used two of the aminonaphthalene sulphonates (1-NH₂-5-NS and 4-NH₂-1-NS) co-eluted. As can be observed by comparison of Figures 2b and 2c, the order of elution of the analytes with SDS is clearly different from that with Brij 35. Table I shows the repeatability values obtained from ten analyses of a standard solution using both techniques.

Adding organic solvents to the CE buffer affects both the electrophoretic mobility and the electroosmotic flow. In this work, we investigated the effect of methanol on the MEKC separation of the compounds studied. It was added to the electrolyte at levels below 20% to enhance the separation conditions without breaking down the micelles. With both buffers increasing the amount of methanol led to increased migration times. When methanol was added to the SDS buffer, there was a slight improvement in the baseline separation but

it was impossible to separate the co-eluting compounds and there was also a considerable loss of repeatability. Addition of methanol to the Brij 35 buffer, even in very small amounts, resulted in considerable loss of resolution.

CONCLUSIONS

CZE and MEKC with UV detection were investigated for the separation of 12 aromatic (naphthalene and benzene) sulphonate compounds. In CZE, the pH and the electrolyte concentration were critical parameters and should be carefully optimized. Even under optimum conditions (20 mM borate buffer, pH 8.7) the isomers in groups I and IV could not be separated. In MEKC, two surfactants were examined, SDS and Brij 35. Complete separation of all the analytes in less than 18 min was only achieved when Brij 35 was used; when SDS was used, two of the five aminonaphthalene sulphonates could not be separated. Although the order of elution was different when SDS and Brij 35 were used, it seems that the mechanism of separation is similar. No improvement in separation was observed when methanol was added.

REFERENCES

- 1 B. Altenbach, W. Giger, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2325.
- 2 F. Th. Lange, M. Wenz, H-J. Brauch, *J. High Resol. Chromatogr.* 18 (1995) 243.
- 3 S. Fichtner, F.Th. Lange, W. Schmidt, H-J. Brauch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 57 (1995) 353.
- 4 S. J. Williams, D. M. Goodall, *J. Chromatogr.* 629 (1993) 379.
- 5 H. Kataoka, T. Okazaki, M. Makita, *J. Chromatogr.* 473 (1989) 276.

- 6 M.L. Trehy, W.E. Gledhill, R.G. Orth, *Anal. Chem.* 62 (1996) 2581.
- 7 C. Vogt, K. Heinig , B. Langer, J. Mattusch, G. Werner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 352 (1995) 508.
- 8 H-P. Nirmaier, E. Fisher, A. Meyer, G. Henze, *J. Chromatogr. A*, 730 (1996) 169.
- 9 O. Zerbinati, G. Ostacoli, D. Gastaldi, V. Zelano, *J. Chromatogr.* 640 (1993) 231.
- 10 W. C. Brumley, *J. Chromatogr.* 603 (1992) 267.
- 11 S. J. Kok, E. H. M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A.Th. Brinkman, *J. High Resol. Chromatogr.* 19 (1996) 99.
- 12 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 627.
- 13 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 45 (1996) 181.
- 14 P. L. Desbene, C. Rony, B. Desmazieres, *J. Chromatogr.* 608 (1992) 375.
- 15 P. L. Desbene, C. Rony, *J. Chromatogr. A*, 689 (1995) 107.
- 16 M. Zenki, M. Irizawa, H. Yukutake, *Bunseki Kagaku*, 44 (1995) 227.

**III.2 AVALUACIÓ DE L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR PER ZONES EN MODE
COELECTROSMÒTIC PER A L'ANÀLISI RÀPIDA DE DOTZE
COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS**

El propòsit d'aquest segon treball va ser aprofitar la flexibilitat de la tècnica electroforètica i modificar el mode de treball amb l'objectiu de manipular la selectivitat de la separació electroforètica i obtenir la resolució de diferents compostos isomèrics mitjançant la CZE en mode coelectroosmòtic. ¹ En mode coelectroosmòtic, com ja s'ha comentat en el capítol I, els vectors de mobilitat electroforètic i electroosmòtic es mouen en el mateix sentit degut a que les parets del capil·lar es troben carregades positivament. En aquesta configuració, tant l'EOF com els compostos aniònics es mouen en direcció al càtode.

Per tant, pel desenvolupament d'aquest nou mètode es va considerar la modificació de la càrrega de la paret del capil·lar amb un doble objectiu: invertir la direcció del flux electroosmòtic per tal de reduir el temps d'anàlisi i introduir interaccions addicionals amb l'objectiu de manipular la selectivitat de la separació. Per tal de poder comparar els resultats obtinguts en mode coelectroosmòtic amb els obtinguts en mode contraelectroosmòtic, es va seleccionar la mateixa barreja de compostos que es va emprar en el treball anterior. El capil·lar i les condicions de detecció emprats en aquest estudi també va ser les del treball anterior.

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme la separació electroforètica dels analits en mode coelectroosmòtic. Per modificar la càrrega de la paret del capil·lar s'hi va fer passar un electròlit (20 mM borat, pH 8.7) que contenia un modificador de flux electroosmòtic. Es van seleccionar dos modificadors de característiques molt diferents, un tensioactiu catiònic (CTAB) i un polielectròlit catiònic (HDB). ² Donat que el CTAB és un tensioactiu catiònic, es va addicionar a l'electròlit en concentracions per sota de la seva concentració micel·lar crítica (CMC) per tal d'evitar la formació de micel·les. ³ La primera diferència observada entre

ambdós modificadors va ser la concentració necessària de cadascun d'ells per obtenir una inversió del flux electroosmòtic satisfactòria i estable. La concentració necessària d'HDB per invertir el flux va ser molt més petita que la de CTAB. A més a més, quan es treballava amb HDB, a diferència de quan es feia amb CTAB, la modificació de la càrrega de la paret del capil·lar era estable per a diverses anàlisis sense necessitat d'addicionar-lo a l'electròlit de separació.

Degut a les fortes interaccions hidrofòbiques establertes entre els analits i el nucli alifàtic del CTAB, així com a les interaccions electrostàtiques que provoquen la retenció dels compostos i per tant l'eixamplament dels pics, cap dels analits estudiats es va poder separar quan es va fer servir aquest modificador en medi aquós. En canvi, els resultats van millorar considerablement quan es va emprar l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic, obtenint-se la separació del benzensulfonat, de l'hidroxinaftalensulfonat i dels amino-hidroxinaftalensulfonats; malauradament, es va produir la coelució dels naftalensulfonats no substituïts i també la dels amino-naftalensulfonats isomèrics. Encara que mitjançant la CZE en mode coelectroosmòtic es van separar els mateixos compostos que mitjançant la CZE en mode contraelectroosmòtic, el temps d'anàlisi en mode coelectroosmòtic (5 min) va ser considerablement més curt que en mode contraelectroosmòtic (13 min).

El fet que no s'aconseguís la separació de diversos dels isòmers estudiats emprant sistemes aquosos per CZE en mode coelectroosmòtic va motivar que en la segona part de l'estudi s'addicionés un modificador orgànic a l'electròlit per tal de millorar la selectivitat de la separació.^{2,3} En aquesta part del treball es va dur a terme un estudi exhaustiu, comparant l'efecte que produïa l'addició de diferents solvents orgànics a l'electròlit. Amb

aquest objectiu, es va avaluar la influència que tenien en la separació dels analits d'interès, tant el tipus de solvent orgànic (alifàtic o apròtic) com la longitud de la cadena i la posició de l'alcohol en els solvents pròtics. Els solvents orgànics seleccionats per aquest estudi van ser: l'acetonitril com a solvent apròtic i el metanol, l'etanol, l'1- i el 2-propanol i l'1- i el 2-butanol com a solvents pròtics.

En ambdós sistemes de treball (CTAB i HDB), es va observar que la selectivitat de la separació anava fortament lligada tant al tipus de solvent orgànic com a la seva concentració. De manera general es pot dir que els millors resultats es van obtenir amb l'addició dels solvents pròtics de cadena més llarga (propanol i butanol) que tenien l'alcohol en la posició secundària.

En el sistema en què es feia servir CTAB com a modificador del flux electroosmòtic, ni l'addició d'acetonitril ni l'addició del solvent alifàtic de cadena més curta (metanol) va produir canvis significatius en la resolució. En canvi, l'addició d'alcohols alifàtics de cadena més llarga sí que va introduir importants millores en la separació dels compostos estudiats, permetent la resolució de la majoria d'isòmers presents en la barreja. Els millors resultats es van obtenir en addicionar un 23% (v/v) de 2-propanol, ja que en aquestes condicions es va aconseguir la resolució del benzensulfonat, de l'hidroxi-naftalensulfonat, dels amino-hidroxi-naftalensulfonats isomèrics i dels dos naftalensulfonats no substituïts, encara que malauradament es va produir la coelució de l'1-NS amb el 2-NH₂-1-NS; pel que fa a la resolució dels amino-naftalensulfonats isomèrics, només es van poder separar aquells isòmers que tenien els grups sulfonat en posicions diferents (per exemple: el 4-NH₂-1-NS i el 5-NH₂-2-NS).

Pel que fa al sistema en què es feia servir l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic, també es va observar una millora considerable en la separació dels compostos coeluits en addicionar els solvents orgànics. La millor separació, força semblant a l'obtinguda amb el CTAB, també es va obtenir amb l'addició del 2-propanol. Amb l'addició del 2-butanol es va aconseguir la resolució dels dos naftalensulfonats no substituïts i del 2-NH₂-1-NS, però es va produir la coelució dels altres quatre amino-naftalensulfonats; per la resta de compostos la separació obtinguda va ser semblant a l'obtinguda amb el 2-propanol.

Encara que els resultats obtinguts en les millors condicions de separació d'ambdós sistemes coelectroosmòtics van ser força semblants, es recomana la utilització de l'HDB perquè a més a més de que es requereixen concentracions més baixes per invertir i mantenir estable el flux electroosmòtic, s'evita la possible formació de parells insolubles entre el modificador de flux i alguns electròlits o components de la mostra que poden arribar a obstruir el capil·lar.

Comparant les separacions obtingudes per CZE en ambdós modes de treball, contraelectroosmòtic i coelectroosmòtic, es pot concloure que malgrat que no es va aconseguir en cap cas la separació dels 12 compostos estudiats, en mode coelectroosmòtic es va observar una millora tant en temps d'anàlisi com en número de compostos resolts.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, s'han publicat a la revista *Chromatografia*, 49 (1999) 261-267.

BIBLIOGRAFIA

- 1 P. Jandik, G. Bonn, *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions*, VCH, New York, 1993.
- 2 S.M. Masselter, A.J. Zeeman, O. Bobleter, *Electrophoresis*, 14 (1993) 36.
- 3 D.T. Nguyen, H. Lerch, A.J. Zeeman, G. Bonn, *Chromatographia*, 46 (1997) 113.

EVALUATION OF COELECTROSMOTIC CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS FOR THE RAPID ANALYSIS OF TWELVE AROMATIC SULPHONATE COMPOUNDS

SUMMARY

Coelectroosmotic capillary zone electrophoresis (CZE) has been investigated as a means of rapid analysis of twelve aromatic sulphonate compounds. The main factors affecting reversal of electroosmotic flow (EOF) – type of osmotic modifier and concentration – were studied. Two types of osmotic modifier, an alkylammonium salt (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) and a cationic polyelectrolyte (hexadimetrine bromide, HDB) were investigated. The composition of the running buffers was optimized according to the characteristics of each osmotic modifier. A concentration of HDB, as low as 0.0001 % (w/v) was used successfully to provide a stable and reversed EOF.

Keywords: Capillary electrophoresis; Coelectroosmotic flow; Osmotic modifiers; Aromatic sulphonate compounds; Organic solvents

INTRODUCTION

Aromatic naphthalene and benzene sulphonates and their hydroxy and amino derivatives are widely used in several industrial processes, particularly as intermediates in the production of dyes and pharmaceutical compounds. They are surface active and can be modified by microorganisms. Although little is known about their environmental and toxicological effects, several studies show that some remain in the aquatic environment because they cannot be totally removed by traditional treatment methods. The compounds are, therefore, of growing interest.

Although gas chromatography (GC), ¹ ion-pair liquid chromatography (IPLC) ^{2,3} and ion-interaction chromatography (IIC) ⁴ are well-established techniques for the analysis of the positional isomers of compounds, capillary electrophoresis (CE) ⁵⁻⁷ is emerging as an alternative technique that overcomes some of the drawbacks of the other methods (e.g. complex derivatization processes in GC). It also has the advantages of providing fast and high-resolution separations of a considerable number of compounds while using a small volume of sample and small amounts of chemicals.

When an uncoated fused-silica capillary is used in traditional CE, including capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC), the electroosmotic flow (EOF) is toward the cathode and anionic compounds migrate in the opposite direction. This principle is known as counterelectroosmotic flow. ⁸ Under these conditions, only anionic compounds with lower electrophoretic mobilities than the electroosmotic mobility of the buffer electrolyte can be detected. But even for these compounds, run times are relatively long because of the counterelectroosmotic migration of the analytes and analyte-micelle adducts.

Higher voltages, which can reduce the analysis time, also lead to an increase in Joule heating and consequent peak-zone broadening.

The analysis time can also be reduced by reversing the EOF, a principle known as coelectroosmotic CE;⁸ this has been used successfully for the analysis of anionic compounds such as inorganic anions,⁹⁻¹² low-molecular-mass organic anions,¹³⁻¹⁶ phenolic compounds,¹⁷⁻²⁰ carboxylic acids^{21,22} and carbohydrates.²³ Under such conditions a negative power supply causes anionic compounds to migrate in the same direction as the EOF, i.e., toward the anode, where they are detected.

Different mechanisms contribute to the reversal of the EOF. Adding cationic surfactants such as hydrophobic quaternary alkylammonium ions, at concentrations below the critical micelle concentration (CMC), to the carrier electrolyte reverses the EOF by dynamically coating the inner capillary wall. This dynamic coating is not stable under alkaline conditions, so electrolytes containing cationic surfactants must be used as running buffers.¹⁹

Some authors have investigated the use of a single surfactant in the buffer solutions; thus alkylammonium ions such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB),²⁴⁻²⁹ tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB)¹¹⁻¹⁶ or dodecyltrimethylammonium bromide (DTAB),^{14,30} and mixtures of some of these^{14,31} have been reported. Several studies have evaluated the influence of surfactant chain length on the reversal of the EOF.^{11,12,16,32} The results revealed that CTAB, which has the longest chain length, produces stronger interactions and reverses the EOF at smaller concentrations, thus avoiding an undesirable increase in the medium viscosity and generating lower current. This means that there is less Joule heating to be dissipated.

According to the literature, HDB has some advantages over CTAB as osmotic flow modifier. Firstly, even when used at very low concentration, HDB produces a positively charged capillary wall coating which is stable for several runs.¹⁹ The stability of the coating depends on the pH and on the amount of organic solvent in the background electrolyte. Secondly, undesired interactions between hydrophobic analytes and the EOF can be significantly reduced when using HDB, rather than hemimicelle-forming surfactants such as CTAB.

The aim of this study was to evaluate the suitability of both types of osmotic modifier (CTAB, HDB) and to develop a method for the rapid analysis of the compounds of interest by means of the coelectroosmotic flow principle. We also evaluated the addition of several organic solvents, such as aliphatic alcohols (e.g., methanol, ethanol, propanol and butanol) and acetonitrile to the buffer electrolyte to improve selectivity and separation efficiency by reducing the interaction of some compounds with the EOF modifiers.

EXPERIMENTAL

Apparatus and Operating Conditions

CE was performed with a Hewlett-Packard (HP; USA)^{3D} CE capillary electrophoresis system. A diode-array detector was used to detect the individual compounds at their optimum wavelengths and to identify them by comparing their UV spectra with those of the reference compounds. Automated capillary rinsing, sample introduction and electrophoretic runs

were controlled by means of an HP personal computer. Data were collected with the HP Chemstation version A:04:01 Chromatographic data system.

The operation conditions used in this paper are listed in Table I, where the working procedures for the CTAB and HDB systems are also described.

Table I. The conditions used for capillary electrophoresis.

Parameter	Conditions
Capillary	Uncoated fused silica (Supelco,USA); 56 cm effective length x 75 µm i.d.; total length 64.5cm
Preconditioning buffer	<i>CTAB system</i> 20 mM sodium tetraborate (pH 8.7) and 0.03 or 0.1 mM CTAB <i>HDB system</i> 20 mM sodium tetraborate (pH 8.7) and 0.0001% (w/v) HDB
Running Buffer	<i>CTAB system</i> 20 mM sodium tetraborate (pH 8.7) and 0.03 or 0.1 mM CTAB <i>HDB system</i> 20 mM sodium tetraborate (pH 8.7)
Neutral marker	Formamide
Detection	On-column UV detection at 220 nm
Injection	Electrokinetic
Voltage	30 kV (negative power supply)
Temperature	Thermostatted at 25 °C or 30 °C (Peltier system)

At the beginning of each session, the capillary was conditioned by flushing with 0.1 M NaOH (5 min), Milli-Q water (8 min), and preconditioning buffer -CTAB or HDB system- (20 min). At the end of each session, and when the buffer was changed, the capillaries were flushed with Milli-Q water (2 min), then 0.1 M NaOH (10 min) and finally Milli-Q water (20 min). Between runs with the CTAB-aqueous system and the HDB system, the capillary was flushed with running buffer only (3 min) but with the CTAB-organic system a purging sequence of buffer with no organic

content (1 min) then buffer with organic content (3 min) was used. The conditioning of the capillaries and the purging between runs were essential if reproducible results were to be obtained.

Reagents and Standards

The aromatic sulphonate compounds used in this study were purchased either as free acids or as their soluble sodium or potassium salts from Aldrich (Belgium) or Fluka (Switzerland). They were: **(1)** 1-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid (1-OH-4-NS), **(2)** benzene sulphonic acid (BZS), **(3)** 6-amino-1-hydroxy-3-naphthalenesulphonic acid (6-NH₂-1-OH-3-NS), **(4)** 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulphonic acid (6-NH₂-4-OH-2-NS), **(5)** 1-amino-2-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid (1-NH₂-2-OH-4-NS), **(6)** naphthalene-1-sulphonic acid (1-NS), **(7)** 2-amino-1-naphthalenesulphonic acid (2-NH₂-1-NS), **(8)** naphthalene-2-sulphonic acid (2-NS), **(9)** 1-amino-5-naphthalenesulphonic acid (1-NH₂-5-NS), **(10)** 4-amino-1-naphthalenesulphonic acid (4-NH₂-1-NS), **(11)** 8-amino-2-naphthalenesulphonic acid (8-NH₂-2-NS) and **(12)** 5-amino-2-naphthalenesulphonic acid (5-NH₂-2-NS).

A stock standard solution (1000 mg.L⁻¹) of each compound was prepared in water (several drops of sodium hydroxide were usually added to enhance the solubility of most of the compounds) and stored under refrigeration in a dark-glass flask. Working standard solutions containing 10 mg L⁻¹ of each compound were prepared daily by diluting the stock standard solutions with water.

The buffer solutions were also prepared daily from Milli-Q water, sodium tetraborate (Fluka), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, Sigma, USA) and hexadimetrine bromide (HDB, Sigma). Stock aqueous solutions of CTAB

and HDB were prepared weekly at 20 mM and 0.5 % (w/v) respectively. All buffer solutions were 20 mM sodium tetraborate, pH 8.7 ⁷ and the appropriate amounts of CTAB or HDB and organic solvent. Before use, buffer solutions were sonicated and filtered through a 45- μ m nylon syringe-filter (Corning, USA). The organic solvents, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), 1-propanol (1-PrOH), 2-propanol (2-PrOH), 1-butanol (1-BuOH) and acetonitrile (ACN), were of HPLC grade and 2-butanol (2-BuOH) was of analytical grade (Merck, Germany). Formamide (Fluka) was used as neutral EOF marker.

RESULTS AND DISCUSSION

The twelve compounds studied can be divided into five groups; the first comprises 1-NS and 2-NS, the second BZS, and the other three according to whether their substituents are hydroxy, amino or hydroxyamino. The compounds are listed in Figure 1.

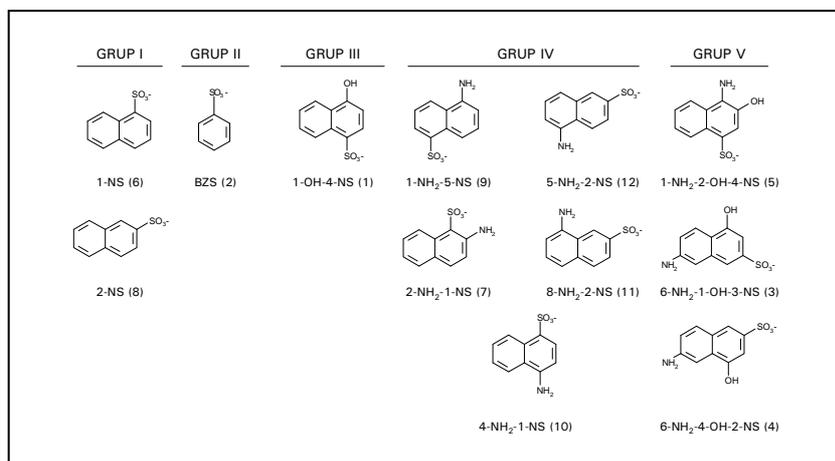


Figure 1 The structures of the compounds studied, and peak assignments.

Effect of Type and Concentration of Osmotic Modifier

The modifiers studied in our experiments were an alkylammonium salt (CTAB) and a cationic polyelectrolyte (HDB). Their effect on the separation of the compounds of interest at different concentrations was studied at constant running buffer concentration, pH, and applied potential (20 mM sodium tetraborate, pH 8.7, 25 kV). The concentration range of each EOF modifier was selected according to the literature to optimize the results for our analytes.

CTAB system.

Several papers describe the effect of CTAB concentration on the separation of different compounds. High concentrations of CTAB (e.g. 0.5-0.7 mM) have sometimes been used successfully,^{9,17,18} whereas in others considerably lower concentrations (0.1 mM or lower) were preferred.^{10-12, 24-}

29

The compounds could not be separated when CTAB was used as EOF modifier in an aqueous system at concentrations between 0.03 and 0.7 mM. This is because of the strong hydrophobic interactions of the analytes with the aliphatic core of CTAB and because electrostatic effects cause retention of the sulphonates and broadening of the peak zones. Electrostatic effects include interactions of analytes with the CTAB-hemimicelles in solution and with the positively charged capillary inner surface. It was found that increasing the CTAB concentration increases those interactions, and results in a dramatic broadening of the peak zones. Therefore, the lowest concentration of CTAB in the running buffer was chosen for subsequent experiments (see Figure 2a).

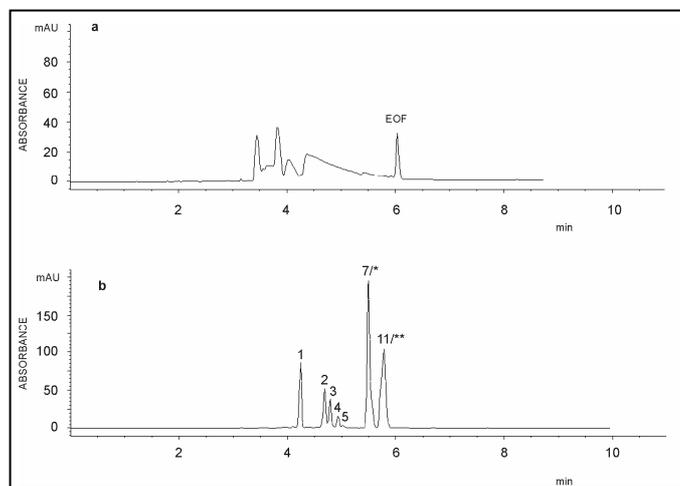


Figure 2 Coelectroosmotic capillary electrophoretic separation of a standard solution containing 10 mg L^{-1} of 12 aromatic sulphonate compounds with no organic solvents added to the running buffer. (a) 0.03 mM CTAB (b) 0.0001% (w/v) HDB. $V = -25 \text{ kV}$ ($I = 74 \text{ } \mu\text{A}$ and $61 \text{ } \mu\text{A}$, respectively). Peak assignments: 1, 1-OH-4-NS; 2, BZS; 3, 6-NH₂-1-OH-3-NS; 4, 6-NH₂-4-OH-2-NS; 5, 1-NH₂-2-OH-4-NS; 6, 1-NS; 7, 2-NH₂-1-NS; 8, 2-NS; 9, 1-NH₂-5-NS; 10, 4-NH₂-1-NS; 11, 8-NH₂-2-NS, 12, 5-NH₂-2-NS. *Coelution of compounds 6 and 8. **Coelution of compounds 9, 10 and 12.

HDB system.

The situation was improved by use of HDB as EOF modifier. Because of the strong adsorption of HDB on the capillary inner surface, simply flushing the capillary with 20 mM of sodium tetraborate solution containing HDB before each session resulted in a stable, reversed EOF. Variations in the concentration of HDB within the range 0.0001 %-0.01 % (w/v) did not affect the separation of the analytes and only minor changes in migration times were observed. Because of this, its concentration in the preconditioning buffer was fixed at 0.0001 % (w/v) for later experiments.

Because the structure of HDB and the lower concentrations used, led to fewer hydrophobic interactions,¹⁸ although the isomeric compounds from groups I and IV coeluted under these conditions, high resolution was obtained in the separation of compounds from groups II, III and V. Figure 2b shows the electropherogram obtained from a standard solution of these compounds under optimum conditions.

The analysis time is considerably shorter when coelectroosmotic CZE (Figure 2b) is used instead of counterelectroosmotic CZE.⁷ The analysis time varies from 6 minutes for coelectroosmotic CZE to 14 minutes for counterelectroosmotic CZE.

To overcome the negative effect of the interactions between some of the compounds and the EOF modifiers, various organic solvents were added to the buffer electrolyte.

Effect of Various Organic Solvents

Because addition of organic solvents to the running buffers changes the zeta potential, viscosity, dielectric constant and permittivity, and can improve the selectivity, resolution and peak symmetry,^{33,34} several were used to optimize the separation of isomeric compounds which were not resolved by use of the coelectroosmotic aqueous systems.^{10,18,19,23}

The effect of organic solvents on the separation was studied at constant running buffer concentration, pH, temperature and applied voltage (20 mM sodium tetraborate, pH 8.7, 25 °C for all alcohols except 1- and 2-butanol, for which the temperature used was 30°C, and 30 kV, negative power supply). They were added within the range 10 to 35 % (v/v), except for 1-

butanol and 2-butanol where concentrations were limited by precipitation of the buffer salts to 6 and 14 % (v/v), respectively, for the CTAB system and to 8 and 19 % (v/v), respectively, for the HDB system.

CTAB system.

When organic solvents were added to the CTAB aqueous buffer, the CTAB concentration had to be increased to 0.1 mM to obtain a stable, reversed EOF.

Under these conditions no improvements in the separation resulted from use of aliphatic alcohol with the shortest chain. But despite a slight increase in analysis time, the separation obtained from the CTAB-aqueous system was considerably improved by addition of other aliphatic alcohols with longer aliphatic chains. The direct influence of the organic modifier on the separation, is apparent when the electropherograms in Figure 2 are compared with those in Figure 4. The peak zones were wide and closer together when an aqueous buffer was used (Figure 2a). With the mixed aqueous-organic buffer (23 % (v/v) 2-propanol), the resolution of the peak zones improves, and nearly all the isomeric compounds are separated (Figure 4a).

The addition of ethanol, 1-propanol and 2-propanol had the same effect on the separation of the compounds of groups I, II, III and V -increasing the concentration of organic solvent increased the resolution. At optimum concentrations, approximately 20 % (v/v), the compounds in those groups became completely separated. The effect on the isomeric compounds of group IV differed for each organic solvent.

With ethanol, only one of the five amino compounds was separated from the others. Addition of 1- and 2-propanol enhanced the resolution of these compounds and there was a significant relationship between the resolution and the type of alcohol added. Results were different with these organic solvents for the other four amino compounds. Whereas with the primary alcohol, pairs of compounds coeluted, with the secondary alcohol (Figure 4a), 2-NS was separated from the pair of amino compounds which coeluted with the primary alcohol and the other pair of amino compounds was also separated. Although they could not be baseline separated, they were positively identified by comparing their UV spectra.

With 1-BuOH, there were no improvements in the separation. But with 2-BuOH results were similar to those with 2-propanol. Under these conditions some changes in migration order were also observed. Figure 3 shows how the resolution of the compounds depended on the concentration of 2-butanol. In general, concentrations of organic solvents below or above the optimum led, respectively, to worse resolutions or increased analysis time without improved resolution.

If acetonitrile is added as the aprotic organic modifier, resolution was not significantly better than that for some of the aliphatic alcohols studied.

HDB system

As usual, use of HDB enabled the use of a great variety of organic solvents, addition of which led to increased migration times for all the peaks. In general, addition of organic solvent under optimum conditions caused the BZS peak to migrate from the fourth position to the second and the separation obtained from the aqueous systems was usually significantly improved.

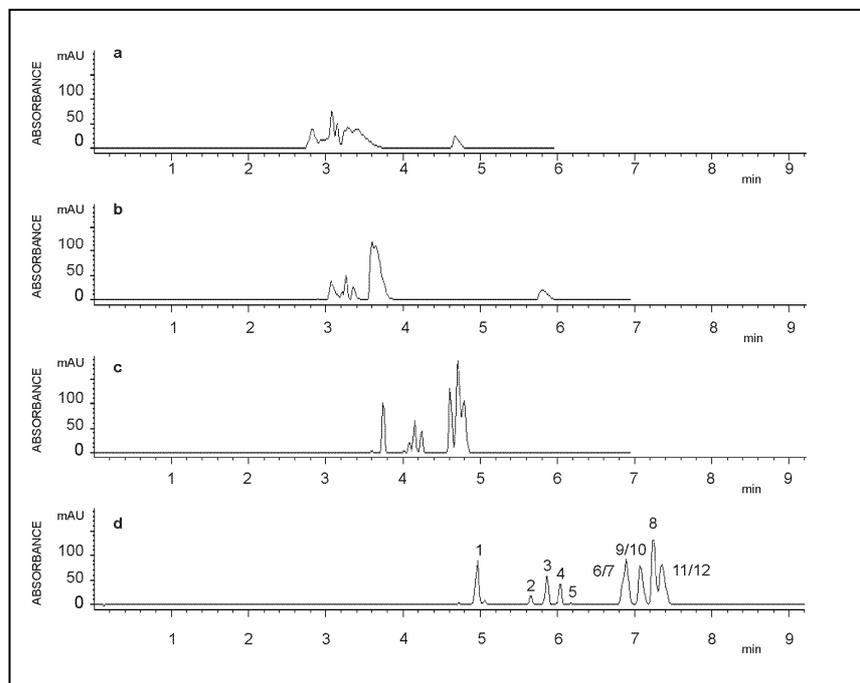


Figure 3 Coelectroosmotic capillary electrophoretic separation of a standard solution containing 10 mg L^{-1} of 12 aromatic sulphonate compounds with 0.1 mM CTAB as osmotic modifier and 2-butanol (a, 8 %; b, 10 %; c, 12 %; d, 14 % (v/v)) as organic solvent. Peak assignments as for Figure 2.

Adding methanol improved the shapes of the peaks only whereas addition of ethanol, 1-propanol and 2-propanol also affected the selectivity of the separation of the isomeric compounds of groups I and IV. Although 1-NS was always separated from 2-NS, 2-NH₂-1-NS could not be prevented from coeluting with at least one these. For the other four amino compounds of group IV, the results varied according to the aliphatic alcohol used in a similar way to the behaviour of the CTAB system (Figure 4b). The effective electrophoretic mobilities were highly dependent on the chain length of the alcohols.

In general the order of migration remained unchanged as the organic solvent content of the running buffer was increased. The analyte migration times also increased as the concentration of organic solvent was increased, with the exception of 2-butanol for which little effect was observed when the concentration was increased beyond 10 % (v/v). For the other organic solvents even a minor change in concentration above or below the optimum had a considerable effect on both resolution and analysis time. The positive effects of organic solvents are attributed to a reduction of the interactions between the analytes and the aliphatic chains of the osmotic modifiers.

As with the CTAB system there were no significant improvements in the separation when 1-butanol was added as organic solvent and there were significant changes in migration order and separation selectivity when higher concentrations of 2-butanol were added. The addition of 17 % (v/v) of this organic solvent enabled 1-NS, 2-NS and 2-NH₂-1-NS to be separated from each other. Results were not satisfactory for the other four amino compounds, which coeluted as one peak.

Because of its aprotic character acetonitrile had less influence on the separation of the amino compounds than did some of the aliphatic alcohols studied.

Under the same optimum conditions established for the other parameters, the resolution and the analysis time were studied as a function of the applied voltage between 20 and 30 kV (negative power supply). Lower voltages resulted in lower mobilities which resulted in longer analysis times without improving the resolution of the peaks; 30 kV (negative power supply) was confirmed as the optimum.

Figure 4 shows the electropherogram obtained under optimal conditions using 2-propanol as organic solvent and CTAB (Figure 4a) or HDB (Figure 4b) as EOF modifiers. It is apparent that the optimum conditions were similar for CTAB and HDB except for the concentration needed to reverse the EOF. With HDB good results were obtained from concentrations as low as 0.0001 % (*w/v*). This might be beneficial for routine analysis because the formation of insoluble pairs between the EOF modifier and some electrolytes or sample components can be avoided. Resolution between the analytes was also similar. With both, addition of organic solvents was necessary to overcome the interactions between the analytes and the EOF modifiers. The results showed the influence of alkyl chain length and, when primary alcohols were compared with secondary alcohols, the resolution was significantly dependent on the position of the alcohol. In both cases (propanol and butanol), secondary alcohols resulted in better resolution of the compounds studied.

The repeatability was determined for five replicate injections of 10 mg L⁻¹ of each compound. Relative standard deviations (RSD) of peak area were in the range 1.2 to 2.4 % for the resolved peaks with the optimum HDB-system. RSD of migration times, 1.5 to 2.8 %, were also good. As expected, results were slightly worse for the CTAB system.

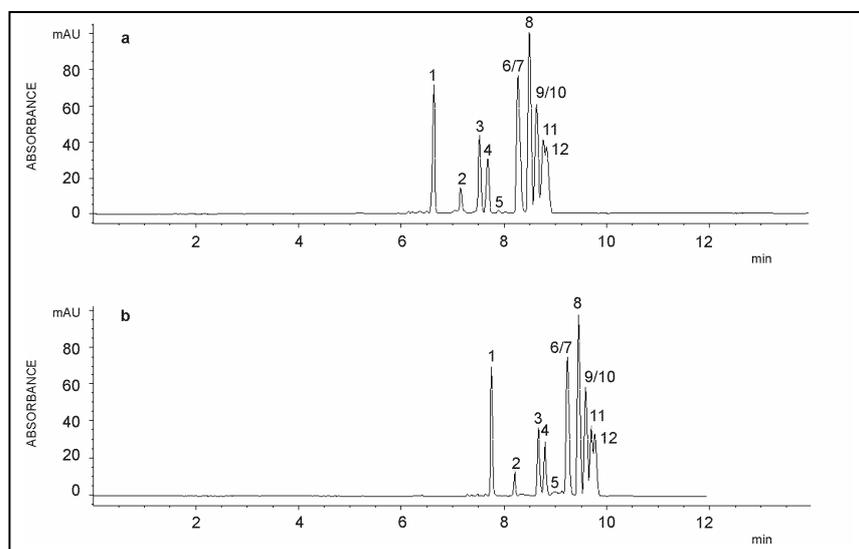


Figure 4 Coelectroosmotic CZE electropherogram obtained under optimum conditions for a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulphonate compounds, using 2-propanol as organic solvent: (a) 23% (v/v) 2-propanol and 0.1 mM CTAB as EOF modifier; (b) 25% (v/v) 2-propanol and 0.0001% (w/v) HDB as EOF modifiers. $V=30 \text{ kV}$ ($I= 36$ and $37 \text{ }\mu\text{A}$, respectively). Peak assignments as for Figure 2.

CONCLUSIONS

The optimum conditions for CTAB and HDB were similar except for the concentration needed to reverse the EOF. With HDB as osmotic modifier results were good at concentrations as low as 0.0001 % (w/v). This is particularly useful for the analysis of this type of compound, because the coelectroosmotic separation of these compounds can be achieved using non-HDB-containing running buffers, thus avoiding the strong hydrophobic and electrostatic interactions between the alkylammonium salts and the analytes. So, this osmotic modifier was chosen instead of CTAB for further investigations. The addition of organic solvents as modifiers to the running

buffers significantly improved peak shapes and enabled the separation of most of the positional isomers of the compounds studied.

The results show that coelectroosmotic CZE is a powerful technique that enables rapid analysis of aromatic sulphonate compounds as a result of migration of the analytes in the same direction as the EOF. The main problem is that some isomeric compounds were not separated even under optimum conditions

An interesting area for future development would be to improve the separation of these compounds using the coelectroosmotic mode. In this way, separation of similar compounds can often be achieved with mixtures of organic solvents when separation is difficult with single solvents. Likewise, coelectroosmotic MEKC has also proved a rapid and effective technique for the separation of compounds which have similar chemical structures.

REFERENCES

- 1 M. L. Trehy, W. E. Gledhill, R. G. Orth, *Anal. Chem.*, 62 (1996) 2581.
- 2 B. Altenbach, W. Gieger, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2325.
- 3 F. Th. Lange, M. Wenz, H-J. Brauch, *J. High Resol. Chromatogr.*, 18 (1995) 243.
- 4 C. Sarzanini, M. C. Bruzzoniti, G. Sacchero, E. Mentasti. *J. Chromatogr. A*, 739 (1996) 63.
- 5 S. J. Kok, E. H. M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Brinkman, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.

-
- 6 P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 201.
 - 7 M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 204.
 - 8 P. Jandik, G. Bonn, *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and ions*. V. C.H. Publishers: New York (1993).
 - 9 P. Jandik, W. R. Jones, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 431.
 - 10 W. R. Jones , P. Jandik, *J. Chromatogr.*, 546 (1991) 445.
 - 11 G. Bondoux, P. Jandik, W. R. Jones, *J. Chromatogr.*, 602 (1992) 79.
 - 12 M. T. Galceran, L. Puignou, M. Diez, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 167.
 - 13 A. Röder, K. Bächman, *J. Chromatogr. A*, 689 (1995) 305.
 - 14 P. R. Haddad, A. H. Harakuwe, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 706 (1995) 571.
 - 15 K. D. Altria, K. H. Assi, S. M. Bryant, B. Clark, *Chromatographia*, 44 (1997) 367.
 - 16 C. W. Klampfl, W. Buchberger, *Trends Anal. Chem.*, 16 (1997) 221.
 - 17 S. M. Masselter, A. J. Zemann, O. Bobleter, *J. Chromatogr. A*, 693 (1995) 359.
 - 18 S. M. Masselter, A. J. Zemann, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1047.
 - 19 S. M. Masselter, A. J. Zemann, O. Bobleter, *Electrophoresis*, 14 (1993) 36.
 - 20 A. J. Zemann, D. Volgger, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3243.
 - 21 D. T. Volgger, A. J. Zemann, G. K. Bonn, M. J. Antal, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 171.
 - 22 X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon, R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 766.
 - 23 T. Nguyen, H. Lerch, A. J. Zemann, G. Bonn, *Chromatographia*, 46 (1997) 113.
 - 24 P. Wang, S. F. Y. Li, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 353.

- 25 A. Göttlein, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349 (1994) 776.
- 26 M. Jimidar, D. L. Massart, *Analytica Chimica Acta*, 294 (1994) 165.
- 27 K. Li, S. Y. Li, *J. Liquid Chromatogr.*, 17 (1994) 3889.
- 28 F. Guan, H. Wu, Yi Luo, *J. Chromatogr. A*, 719 (1996) 421.
- 29 N. J. Benz, J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 437.
- 30 A. Harakuwe, P. R. Haddad, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, 685 (1994) 161.
- 31 M. F.M. Tavares, R. Colombara, S. Massaro, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 172.
- 32 C. Stathakis, R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 2110.
- 33 C. Shwer, E. Kenndler, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1801.
- 34 G. M. Mc Laughlin, J. A. Nolan, J. L. Lindahl, R. Li. Palmieri, K. W. Anderson, S. C. Morris, J. A. Morrison, T. J. Bronzert. *J. Liquid Chromatogr.*, 16 (1992) 961.

**III.3 SEPARACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS PER
CROMATOGRÀFIA MICEL·LAR ELECTROKINÈTICA EN MODE
COELECTROOSMÒTIC**

Els resultats obtinguts en els treballs anteriors, on s'havia observat una millora significativa de la selectivitat en la separació de compostos isomèrics posicionals tant quan es du a terme la separació per CZE en mode coelectroosmòtic com quan es du a terme per MEKC en mode contraelectroosmòtic, van motivar que en el present treball s'estudiés la separació d'una barreja de BZS i NS per cromatografia micel·lar electrocinètica en mode coelectroosmòtic com a tècnica alternativa a les anteriors i on es combinen els avantatges d'ambdós sistemes.

Per a l'optimització de la selectivitat de la separació micel·lar es van avaluar dos tensioactius, ¹ un tensioactiu catiònic (CTAB) i un tensioactiu no iònic (Brij 35); per a la inversió del flux electroosmòtic també es van avaluar dos modificadors, un tensioactiu catiònic (CTAB) i un polielectrolit catiònic (HDB). ² També es va estudiar la composició de l'electròlit i les condicions de separació. Els resultats obtinguts en el present treball es comparen amb els obtinguts anteriorment mitjançant la CZE en mode coelectroosmòtic i la MEKC en mode contraelectroosmòtic.

Els compostos escollits per avaluar l'eficàcia de la MEKC en mode coelectroosmòtic van ser els mateixos que s'havien utilitzat en els treballs anteriors. En aquest treball també es va emprar com a electròlit base una solució de borat sòdic (20 mM, pH 8.7).

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme la separació micel·lar dels analits emprant l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic i ambdós tensioactius (CTAB i Brij 35) per a la formació de les micel·les. L'optimització de les separacions es va dur a terme estudiant la influència de la composició de l'electròlit (concentració del tensioactiu i del modificador de

flux electroosmòtic i addició d'un solvent orgànic) i les condicions de separació (voltatge aplicat i temperatura).

Comparant els resultats obtinguts en el present estudi, utilitzant el Brij 35 per formar les micel·les i l'HDB per invertir el flux, amb els obtinguts en el primer treball on la separació tenia lloc sense la inversió del flux electroosmòtic, ³ s'observa que la reducció del temps d'anàlisi característica de les separacions en mode coelectroosmòtic porta associada una significativa pèrdua de resolució dels compostos. Els resultats obtinguts suggereixen que l'adsorció de les micel·les a la paret modificada del capil·lar provoca aquesta pèrdua d'eficàcia de separació per l'augment de les interaccions entre els soluts i la paret del capil·lar. La separació obtinguda en aquestes condicions també va ser pitjor que l'aconseguida mitjançant la CZE en mode coelectroosmòtic. ⁴

Els resultats obtinguts quan es va fer servir el CTAB per a la formació de la fase micel·lar tampoc van ser gaire satisfactoris. Per tant, quan s'empra la MEKC en mode coelectroosmòtic per a la separació de compostos aromàtics sulfonats no es recomana la utilització de l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic.

En la segona part de l'estudi es va avaluar la utilització de l'amina hidrofòbica (CTAB) com a modificador del flux electroosmòtic. En aquest estudi, igual que en l'anterior, l'optimització de les separacions es va dur a terme estudiant la influència de la composició de l'electròlit (concentració del tensioactiu/modificador del flux electroosmòtic i addició d'un solvent orgànic) i de les condicions de separació (voltatge aplicat i temperatura).

Els resultats obtinguts emprant el Brij 35 per formar la fase micel·lar amb el CTAB com a modificador del flux electroosmòtic van ser significativament millors als obtinguts anteriorment emprant l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic.

Comparant els resultats obtinguts en mode coelectroosmòtic sense l'addició de solvents orgànics i mitjançant la CZE emprant l'HDB com a modificador del flux electroosmòtic ⁴ amb els obtinguts mitjançant Brij 35-MEKC emprant CTAB com a modificador del flux electroosmòtic, s'observa que són força semblants; en ambdós casos s'obté la separació del benzensulfonat, de l'hidroxi-naftalensulfonat i dels amino-hidroxi-naftalensulfonats en aproximadament 5 min d'anàlisi. Això posa de manifest que, en la selectivitat de la separació dels analits, la modificació de la paret del capil·lar té un efecte predominant sobre la formació de les micel·les.

Els resultats obtinguts en mode coelectroosmòtic amb l'addició de solvents orgànics, per CZE emprant l'HDB o el CTAB com a modificador del flux electroosmòtic ⁴ i per Brij 35-MEKC, també són força semblants. La principal diferència entre ambdues tècniques és que amb la introducció del sistema micel·lar s'estableixen interaccions addicionals analit-micel·la que milloren lleugerament la resolució dels compostos coel·luïts; així, per exemple, s'obté la separació de l'1-NS i el 2-NH₂-1-NS.

Quan la separació micel·lar es du a terme emprant el tensioactiu catiònic (CTAB), la composició de l'electròlit és més senzilla ja que, en addicionar-lo en concentracions per sobre de la seva concentració micel·lar crítica, fa les dues funcions: inverteix el flux electroosmòtic i forma la fase micel·lar. En aquesta part de l'estudi, també es van optimitzar les condicions de separació (voltatge aplicat i temperatura) i la composició de l'electròlit (concentració

de CTAB i addició d'un solvent orgànic). D'igual manera que es va observar per CZE en mode coelectrosmòtic emprant el CTAB com a modificador del flux electrosmòtic, ⁴ mitjançant la CTAB-MEKC no es va obtenir la separació de cap analit sense l'addició de solvents orgànics. En canvi, amb l'addició d'isopropanol la separació va millorar de manera molt considerable. Els resultats obtinguts emprant aquest sistema van ser els millors que es van obtenir treballant en mode coelectrosmòtic (CZE i Brij 35-MEKC), ja que van permetre la resolució en 13 min de tots els compostos estudiats, excepte el 2-NS que va coeluir amb el 2-NH₂-1-NS.

Fent un recull dels resultats obtinguts en els tres treballs presentats, es podria concloure que la cromatografia micel·lar electrocinètica és la tècnica més adequada per a la separació de barreges complexes de BZS i NS que contenen diversos compostos isomèrics com ara els naftalensulfonats no substituïts o els amino-naftalensulfonats. Dels diferents mètodes micel·lars proposats, tant el desenvolupat en mode contraelectrosmòtic, emprant el Brij 35 com a tensioactiu, com el desenvolupat en mode coelectrosmòtic, emprant el CTAB com a tensioactiu i modificador del flux electrosmòtic, es consideren adequats per a la separació dels compostos d'interès. Es considera convenient destacar, però, que el sistema Brij 35-MEKC en mode contraelectrosmòtic és més recomanable des del punt de vista de la senzillesa de procediment de treball; per aquesta raó, tot i obtenir separacions molt semblants, es considera més adequat emprar el tensioactiu no iònic (Brij 35) que l'aniònic (SDS) en les separacions mitjançant la MEKC en mode contraelectrosmòtic.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, s'han publicat a la revista *Chromatografia*, 50 (1999) 229-234.

BIBLIOGRAFIA

- 1 S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman Instruments, 1992.
- 2 S.M. Masselter, A.J. Zeeman, O. Bobleter, *Electrophoresis*, 14 (1993) 36.
- 3 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 204.
- 4 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 49 (1999) 261.

**SEPARATION OF AROMATIC SULPHONATE COMPOUNDS BY
COELECTROSMOTIC MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY**

SUMMARY

Coelectroosmotic micellar electrokinetic chromatography (coelectroosmotic MEKC) has been investigated for the separation of twelve aromatic sulphonate compounds. The advantage of this method is that it combines the efficient separation characteristic of MEKC and the short analysis time of the coelectroosmotic mode. MEKC was performed with either cethyltrimethylammonium bromide (CTAB) or polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35) surfactants as pseudostationary phases and 2-propanol as organic modifier. The electroosmotic flow (EOF) was reversed by adding two types of EOF modifier, an alkylammonium salt (cethyltrimethylammonium bromide, CTAB) or a cationic polyelectrolyte (hexadimetrine bromide, HDB). The surfactant concentration, applied voltage and temperature were optimized, the influence of 2-propanol on the MEKC resolution of the compounds was studied. The effect of the osmotic modifier on the separation was also investigated.

Keywords: Micellar electrokinetic chromatography; Coelectroosmotic flow; Aromatic sulfonate compounds; Surfactants

INTRODUCTION

In recent years capillary electrophoresis (CE) has been shown to be an effective technique for analysis of different mixtures of compounds. The development of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has added another dimension of selectivity to electrophoretic separations. Since initial work by Terabe and coworkers,^{1,2} MEKC has developed into a routine separation technique for improving separation efficiency not only for uncharged compounds but also for many ionic compounds. Some ionic analytes not successfully separated by capillary zone electrophoresis (CZE) can be separated by MEKC.^{3,4}

MEKC separations are based on the differential distribution of the analytes between the micellar pseudostationary phase and the surrounding aqueous phase. Its main advantage is its flexibility.

For many applications it is desirable to be able to manipulate the distribution of the analytes between the phases to optimize the separation performance. Several factors influence resolution and selectivity. The effects of the operating conditions such as surfactant concentration, pH, voltage and temperature have been studied.⁴⁻⁹

For ionic analytes, hydrophobicity and charge affect the distribution coefficient, and so the choice of surfactants significantly affects MEKC selectivity. The separation characteristics of a micellar phase can, therefore, also be manipulated by changing the surfactant. Several types of surfactants have been employed in MEKC, including anionic surfactants such as SDS,¹⁰⁻¹³ cationic surfactants such as CTAB,^{7,12-14} non-ionic surfactants such as the Brij or the Tween series of surfactants¹⁵⁻¹⁸ and

zwitterionic surfactants.¹⁷ The micellar phase can also be modified by adding a second surfactant to form a mixed micellar system,^{5,8,11,19} or by selecting a different counterion.²⁰

Additives are also very effective for modification of the aqueous phase. The separation selectivity of closely related compounds can be improved by adding organic solvents to the running buffer.^{6-8,10,15} This has several consequences²¹ and is limited to concentrations up to 20-30%, because higher concentrations can destroy micellar structure. Usually they are used to increase solute distribution in the aqueous phase, so reducing their interaction with the micelles. Ion-pair reagents²² and cyclodextrins²³ or urea²⁴ have also been used for this purpose. More recently, Hong *et al.*²⁵ have introduced the use of spontaneous vesicles, prepared from oppositely charged surfactants, as an alternative pseudostationary phase in MEKC.

When MEKC, manipulated as described above, is performed in counterelectroosmotic mode, analytes migrate against the direction of the EOF, widening the migration window. This effect usually improves MEKC separations but at the expense of a considerable increase in analysis time. To reduce the separation time for anionic analytes, higher separation voltages or shorter capillaries are required. The application of higher voltages, which can reduce the analysis time is, however, often counteracted by a loss of separation efficiency because of an increase in Joule heating.

Another way of reducing the analysis time is to increase the observed mobility of the anionic analytes by reversing the EOF. This can be achieved by dynamically coating the inner surface of the silica capillary with a positive charged layer, by use of alkylammonium salts (e.g. CTAB or DTAB)

²⁶ or cationic polyelectrolites (e.g. HDB). ²⁷ By this means, analytes migrate in the same direction as the EOF, thus shortening the analysis time. This mode of electrophoresis is known as coelectroosmotic mode. ²⁸

For the analysis of aromatic sulfonate compounds, coelectroosmotic CZE ²⁹ has proved to be a powerful technique that enables rapid analysis of these compounds as a result of migration of the analytes in the same direction of EOF. Its main drawback is that some isomeric compounds are not separated even under optimum conditions. In counterelectroosmotic flow MEKC must also be used for achieve complete separation of the studied compounds because some could not be separated by CZE. ⁴

These results suggest that coelectroosmotic flow used together with MEKC separation mode may be useful for separating compounds completely and rapidly. This study was undertaken to examine the usefulness of coelectroosmotic MEKC ^{14,28} for analysis of aromatic sulfonate compounds. The results have been compared with those from counterelectroosmotic MEKC and their advantages and limitations are discussed. Experiments were performed with two types of surfactants–non-ionic (Brij 35) and cationic (CTAB). The effect of the capillary coating was also studied by comparing two EOF modifiers (HDB and CTAB). The characteristics of both (EOF modifiers and surfactants) employed in these studies are summarized in Table I. The effects of variables such as surfactant concentration, applied voltage, temperature and the addition of 2-propanol were also examined.

Table I. EOF modifiers and surfactants compared in this study of co- and counterelectroosmotic MEKC separations of aromatic sulphonate compounds.

	CMC ^b (mM) in water, 25°C	AN ^b	Structure	M (g/mol)
<i>EOF modifier^a</i>				
HDB	–	–	$[-N(CH_3)_2-(CH_2)_6-N(CH_3)_2-(CH_2)_3-]_n^c$	–
CTAB	0.92	61	$C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3Br^-$	364.46
<i>Surfactant</i>				
SDS (anionic)	8.1	62	$C_{12}H_{25}OSO_3^-Na^+$	288.38
Brij 35 (non-ionic)	0.1	40	$RCH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nH$	1199.57
CTAB (cationic)	0.92	61	$C_{16}H_{33}N^+(CH_3)_3Br^-$	364.46

^aHDB, hexadimetrine bromide; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; SDS, sodium dodecyl sulphate; Brij 35, polyethylene glycol dodecyl ether.

^bCritical micelle concentration (CMC) and aggregation number (AN).

^c $n = 20-40$.

EXPERIMENTAL

Equipment

Experiments were performed with an HP ^{3D}CE capillary electrophoresis system (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a diode-array detector. Data were collected with an HP Chemstation, version A:04:02, chromatographic data system. Separations were performed in uncoated fused silica capillary tubing (64.5 cm total length, 56 cm length to detector, 75 μm i.d.) from Supelco (Bellefonte, USA). The capillary was thermostatted at selected temperatures by means of a Peltier system.

Reagents and Standards

The aromatic sulphonate compounds were purchased in the highest grade possible, either as the free acids or as their soluble sodium or potassium salts, from Aldrich (Beerse, Belgium) or Fluka (Buch, Switzerland).

The compounds studied are listed in Table II, where they are divided into five groups according to whether their substituents are hydroxy, amino, hydroxyamino or whether they have any additional substituent. Sample solutions containing 10 mg L⁻¹ of each compound were prepared daily by diluting the stock standard solutions with purified water. Details of the preparation of stock standard solutions can be found elsewhere.⁴ Water was purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Table II. The aromatic sulfonate compounds studied.

Group	Compound	Abbreviation	Peak assignment
I	naphthalene-1-sulphonic acid	1-NS	7
	naphthalene-2-sulphonic acid	2-NS	10
II	benzene sulphonic acid	BZS	2
III	1-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid	1-OH-4-NS	1
IV	1-amino-5-naphthalenesulphonic acid	1-NH ₂ -5-NS	5
	2-amino-1-naphthalenesulphonic acid	2-NH ₂ -1-NS	8
	4-amino-1-naphthalenesulphonic acid	4-NH ₂ -1-NS	6
	5-amino-2-naphthalenesulphonic acid	5-NH ₂ -2-NS	9
	8-amino-2-naphthalenesulphonic acid	8-NH ₂ -2-NS	11
V	1-amino-2-hydroxy-4-naphthalenesulphonic acid	1-NH ₂ -2-OH-4-NS	12
	6-amino-1-hydroxy-3-naphthalenesulphonic acid	6-NH ₂ -1-OH-3-NS	3
	6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulphonic acid	6-NH ₂ -4-OH-2-NS	4

Buffer solutions were prepared daily in purified water from sodium tetraborate (Fluka), with hexadimetrine bromide (HDB; Sigma) or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB; Sigma) as EOF modifiers and polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35; Fluka) or cetyltrimethylammonium bromide (CTAB; Sigma) as non-ionic and cationic surfactants respectively; 2-propanol (LiChrosolv grade, Merck) was added as osmotic modifier. All reagents were used as received.

Running Buffers

Running buffers were prepared from 20 mM sodium tetraborate, the appropriate amounts of surfactants (Brij 35 or CTAB) and organic solvent (2-propanol). The concentration of Brij 35 was from 10 to 60 mM, or from 0.1 to 1.3 mM when HDB or CTAB were used as EOF modifiers. Micellar CTAB solutions were prepared at concentrations from 1 to 10 mM for both EOF modifiers. 2-propanol was added at concentrations of up to 20% (v/v). Before use all micellar running buffers were degassed by ultrasonication and filtered through a 0.45- μ m nylon syringe filter (Corning, USA).

Procedure

The capillary was conditioned before use, and at the end of each session, according to the procedure described elsewhere,²⁹ where the procedure for dynamically coating the inner capillary wall with CTAB and HDB is also described. Between runs, the capillary was systematically rinsed with running buffer (3 min); when HDB was used as EOF modifier the capillary was also previously rinsed with an electrolyte solution containing the EOF modifier (2 min). Conditioning of the capillaries and purging between runs were essential if reproducible results were to be obtained.

Separations were performed at thermostatted temperature (30 or 35 °C) and high voltage was applied in the range 25 to 30 kV. Because of the reversed EOF, the high-voltage power supply unit was operated in negative mode. Samples were injected electrokinetically, by applying -7 kV for 10 s. Compounds were detected at 220 nm. Other conditions are specified in the text or figures.

RESULTS AND DISCUSSION

The suitability of coelectroosmotic MEKC for the separation of aromatic sulfonate compounds has been studied. The main operating conditions of the MEKC separations (osmotic modifier, buffer composition, temperature and voltage) were optimized. Because the micelles used in MEKC result in different selectivities for the separation of charged compounds,^{30,31} two types of surfactants were examined—Brij 35 as non-ionic surfactant and CTAB as cationic surfactant. Brij 35 was selected because previous studies⁴ showed it to be a highly effective pseudostationary phase for analysing the compounds of interest; and CTAB was selected as the most widely used cationic surfactant.

The effect of the concentration of the surfactants and of adding 2-propanol as organic modifier were investigated to improve the selectivity of the separation. 2-propanol, selected because of results obtained in previous experiments,²⁹ was added to the running buffer to modify the distribution coefficient of the most hydrophobic compounds between the surrounding aqueous phase and the pseudostationary phase. The effects of two types of EOF modifiers, HDB and CTAB, on the separation were also studied.

Coelectroosmotic MEKC with HDB as EOF Modifier

Because of literature reports¹⁴ and results from previous experiments,²⁹ HDB was selected as the first EOF modifier to be evaluated. Dynamically coating of the inner capillary wall with 0.0001% (w/v) HDB is described elsewhere.²⁹ Because the concentration of the micelle affects resolution and selectivity in MEKC, we first studied the influence of the micellar agents on the separation, with constant background electrolyte composition (20 mM

tetraborate buffer). The effect of the concentration of Brij 35 on the separation of the analytes was studied over the range 10 to 60 mM. For the CTAB system, the concentration of CTAB studied was between 1 and 10 mM. We then studied how the addition of 2-propanol (5 and 20% *v/v*) influenced the resolution of the analysis. Because an increase in temperature reduces migration time, because of reductions in the viscosity and distribution coefficient of each analyte, it can also affect selectivity. The effects of temperatures between 25 and 35°C were also investigated. After optimization, experiments were performed at 25 kV (negative power supply) and 35 °C for the Brij 35 system and at 30 kV (negative power supply) and 30 °C for the CTAB system.

We also tested the effect of increasing the HDB concentration from 0.0001 to 0.001% (*w/v*). There was no advantage in using higher concentrations of osmotic modifier.

When Brij 35 was used as the micellar pseudophase, the results were unexpected. We had assumed that, as in counterelectroosmotic MEKC, ⁴ the separation of the compounds would be better because of the different distribution in the micellar phase. We also expected a reduction in analysis time because of the reversal of the EOF. Instead, the selectivity of the coelectroosmotic MEKC system was considerably lower than that of the counterelectroosmotic system. Even when 2-propanol was added results were unsatisfactory and coelution of several pairs of compounds could not be avoided.

Figure 1 shows the electropherograms obtained by use of 40 mM Brij 35 as the micellar pseudophase with (Figure 1b) or without (Figure 1a) addition of 2-propanol to the running buffer.

Worse results were obtained when CTAB was used as the micellar pseudophase.

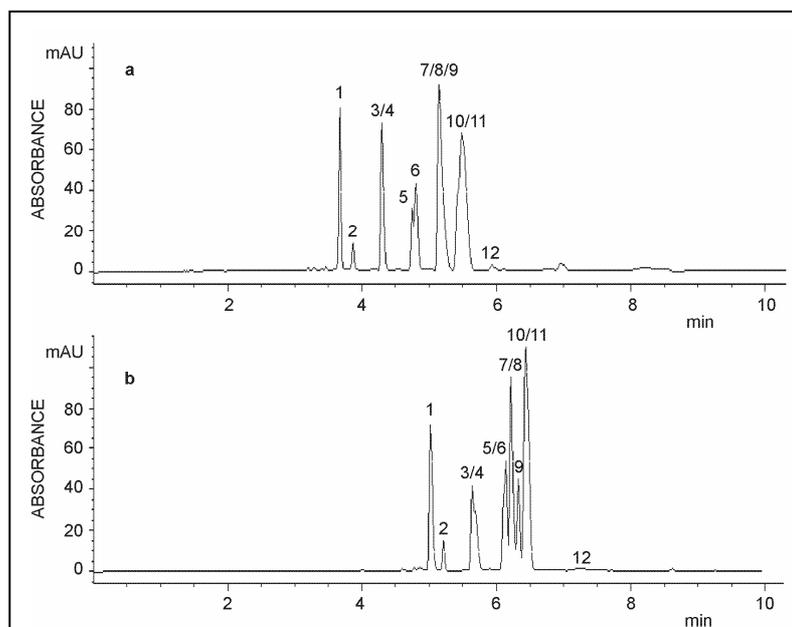


Figure 1.

Separation of a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulfonate compounds by Brij 35-MEKC with HDB as EOF modifier and 20 mM borate as background electrolyte: (a) 40 mM Brij 35 without 2-propanol, (b) 40 mM Brij 35 containing 16% (v/v) 2-propanol. Peak identities: 1, 1-OH-4-NS; 2, BZS; 3, 6-NH₂-1-OH-3-NS; 4, 6-NH₂-4-OH-2-NS; 5, 1-NH₂-5-NS; 6, 4-NH₂-1-NS; 7, 1-NS; 8, 2-NH₂-1-NS; 9, 5-NH₂-2-NS; 10, 2-NS; 11, 8-NH₂-2-NS; 12, 1-NH₂-2-OH-4-NS.

It seems from these experiments that HDB can not be recommended as EOF modifier for coelectroosmotic MEKC of aromatic sulphonate compounds. The results suggest that the adsorption of micelles by the inner wall of the capillary causes a serious loss in efficiency by increasing solute-wall interactions.

To overcome problems associated with the use of HDB as EOF modifier,

CTAB was then tested. The presence of the hydrophobic amine in the running buffer seems to reduce solute-wall interactions⁸ and so increases efficiency.

Coelectroosmotic MEKC with CTAB as EOF modifier

The composition of the background electrolyte was 20 mM sodium tetraborate solution, containing 0.1 mM CTAB as EOF modifier for the Brij 35 system. MEKC separations were performed with different concentrations of the micellar agents—0.1–1.3 mM for the Brij 35 system and 1–10 mM for the CTAB system. For both systems the addition of 2-propanol was studied within the range 8–20% (v/v). Different voltages (25 to 30 kV, negative power supply) and different temperatures (25 to 35°C) were also evaluated.

After several experiments, 1 mM Brij 35 and 6 mM CTAB at 30°C and 30 kV (Brij 35) or 27 kV (CTAB) were found to give the best separations in short analysis times. Lower voltages resulted in longer analysis times without improved resolution. Alteration of the temperature, however, resulted in some improvement in the separation. The concentration of the surfactant and the amount of alcohol added were optimized at the optimum temperature. The presence of 2-propanol in the running buffer also resulted in higher distribution of the most hydrophobic analytes in the aqueous phase than in the micellar phase; this helped to improve the selectivity of the separation. As the organic modifier was added, all peaks moved to later migration times. Results were best with 18% (v/v) and 16% (v/v) 2-propanol in the Brij 35 and CTAB systems, respectively.

In an attempt to improve the resolution of Brij 35 MEKC further, the effect of increasing the concentration of CTAB from 0.1 mM to 0.5 mM

was also investigated. A standard solution was analyzed in the same manner as in previous experiments, under optimum conditions, except for the CTAB concentration. When the concentration of CTAB was increased to 0.5 mM, all the peaks moved to earlier migration times; resolution of all the compounds decreased and the order of migration changed for the compounds of groups I and IV. These effects were attributed to the formation of mixed micelles. Because study of mixed micellar systems was beyond the scope of this investigation no further experiments were performed.

Coelectroosmotic Brij 35 MEKC

The concentration of Brij 35 had a greater effect on the resolution of some of the compounds studied. Consequently, experiments with the coelectroosmotic Brij 35 MEKC system, with no organic modifier, resulted in a satisfactory and rapid separation (less than 5 min) of the isomeric compounds in groups II, III and V. Separation of the more hydrophobic compounds was, however, unsatisfactory and they eluted as a poorly resolved signal (Figure 2a). Moreover, as the micellar concentration was increased, the concentration of solutes in the micelles also increased. This resulted in lower mobilities.

Addition of 2-propanol to the running buffer had a different effect on the different compounds studied. It was observed that the migration times and resolution of the compounds in groups II, III and V increased as the amount of 2-propanol was increased. When the concentration of alcohol was greater than 14% BZS migrated to a position in front of 7-NH₂-4-OH-2-NS. When the amount of 2-propanol was increased to 18% (v/v), migration times, resolution and the separation selectivity of the compounds in groups I and

IV improved considerably. These results confirmed that addition of 2-propanol increased the distribution of these compounds in the aqueous phase, so enhancing their separation. They were, nevertheless, still not completely resolved and coelution of the two amino compounds could not be avoided. Results were best when 18% (v/v) 2-propanol was added to the micellar running buffer (see Figure 2b).

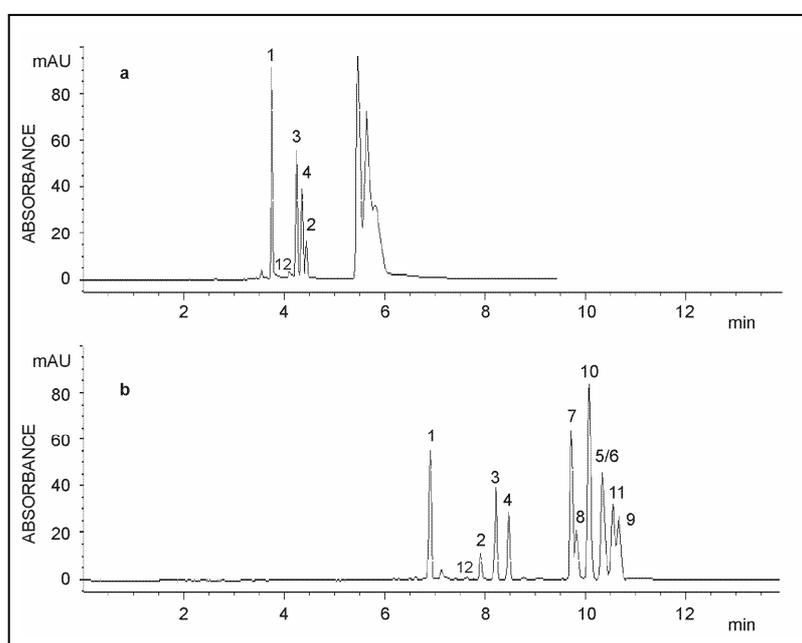


Figure 2. Brij 35-MEKC electropherograms of a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulfonate compounds with CTAB as EOF modifier and 20 mM borate as background electrolyte: (a) 1 mM Brij 35 without 2-propanol, (b) 1 mM Brij 35 containing 18% (v/v) 2-propanol. Peak assignment as in Figure. 1.

Under these conditions, the mechanism of separation might involve hydrogen-bonding between the Brij 35 and the analytes and selective distribution in the hydrophobic core of micelles. We must also bear in mind that adding organic solvents to the running buffers affects the distribution

ratio between the two phases. The enhancement in the efficiency when small percentages of 2-propanol were added to the running buffer might be attributed to a change in the distribution ratio in favour of the aqueous phase.

Coelectroosmotic CTAB MEKC

When MEKC was performed with CTAB both as EOF modifier and as micellar pseudophase, separation efficiency and resolution were poor in the completely aqueous system. The mechanism of separation in CTAB-MEKC involves hydrophobic and electrostatic interactions between analytes and micelles because of their opposite charges. Occasionally electrostatic interactions can counteract hydrophobic interactions, resulting in highly selective separations; in other systems, including that used in this work, organic solvents must be added to ensure high separation efficiencies.

It was found that adding small concentrations of 2-propanol did not improve the separation of the most retained analytes (strongly distributed into micelles). When the concentration was increased to 16% (v/v), see Figure 3, resolution was good with almost complete baseline separation of all the compounds studied. Baseline resolution was obtained for two more peaks than was possible with the Brij 35 system. Under these conditions the compounds 2-NS and 2-NH₂-1-NS could not be resolved but it was possible to analyse these compounds qualitatively if UV detection was also used at 342 nm, at which wavelength only 2-NH₂-1-NS is detected.

Coelectroosmotic MEKC is potentially very useful because of its high resolution and short analysis time. If the electropherogram in Figure 3 is compared with that in Figure 2b (which corresponds to the Brij 35 system),

some advantages of the CTAB system become apparent. The distribution of the peaks throughout the migration window is more uniform and resolution between peaks is higher. The order of migration also changes. This is because of the different mechanism of separation for non-ionic and cationic surfactants. When, furthermore, CTAB is used both as EOF modifier and as micellar agent, the composition of the running buffer is pure. This avoids additional interactions between different types of surfactant.

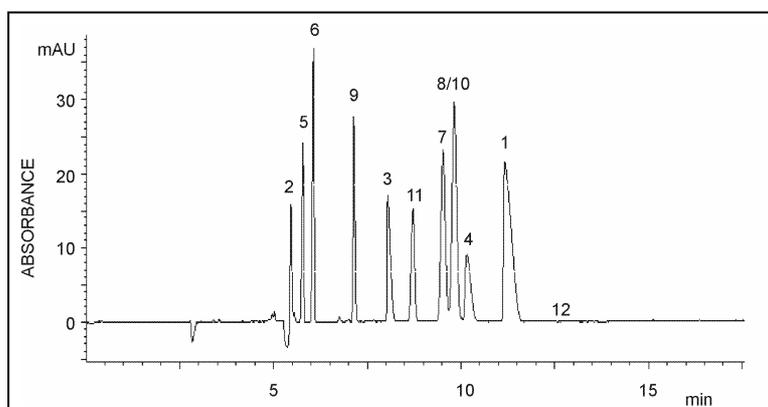


Figure 3. CTAB-MEKC electropherogram of a standard solution (10 mg L^{-1}) of 12 aromatic sulphonate compounds. Separation in 6 mM CTAB, 20 mM borate and 16% (v/v) 2-propanol at -30 kV ($-38 \text{ }\mu\text{A}$). Peak assignment as in Figure 1.

For comparison of the results obtained in counterelectroosmotic MEKC⁴ with those obtained in this study by coelectroosmotic MEKC, several sets of experimental conditions were used. Table III lists the currents resulting from applied voltages for each surfactant system and the analysis times and the coeluted compounds. These results indicate that:

(i) The range of surfactant concentrations appropriate for coelectroosmotic MEKC is extremely small; this results in a running buffer of

lower ionic strength. The resultant current is, therefore, lower for higher applied voltages.

(ii) Because of the codirectional movement of the analytes and the EOF, and the higher applied voltages, analysis time is shorter for the coelectroosmotic system.

(iii) Although complete separation of all the compounds studied was achieved only with the counterelectroosmotic Brij 35 MEKC system, when coelectroosmotic MEKC was performed, the distribution of the peaks throughout the migration window was more uniform and resolution between peaks was higher. All the compounds can, furthermore, also be identified if DAD data are collected at two wavelengths.

(iv) Because the total analysis time can be kept below 15 min, including capillary rinsing, the method is suitable for screening.

Table III. Effect of the type of surfactant on separation current and analysis time at specified applied voltages.

Surfactant ^a	Conc (mM)	Osmotic modifier	Amount of 2-propanol (%)	Voltage (kV)	Current (μA)	No. of coeluting compounds	Analysis time (min)
SDS ^b	100	—	—	20	9	2	17
Brij 35 ^b	60	—	—	15	31	—	18
Brij 35 ^c	1	CTAB	18	-30	-40	2	11
CTAB ^c	6	CTAB	16	-30	-38	2	12

^aBackground electrolyte: 20 mM borate buffer, pH 8.7.

^bCounterelectroosmotic flow, ⁴.

^cCoelectroosmotic flow.

CONCLUSIONS

The objective of this study was not so much to improve the separation of the compounds studied but to show that MEKC performed with coelectroosmotic flow might be useful for analyzing hydrophobic compounds such as our analytes. Coelectroosmotic MEKC is potentially very useful because of its short analysis time. Because the time of the total process, including the capillary rinsing, can be kept below 15 min, the method is suitable for screening.

Use of CTAB as both EOF modifier and micellar agent has several advantages over the other systems studied– the distribution of the peaks throughout the migration window is more uniform and resolution between peaks is higher. The composition of the running buffer is, furthermore, pure avoiding additional interactions between different types of surfactant, and so all the compounds can be identified. This makes CTAB the most appropriate surfactant for the coelectroosmotic MEKC separation of the compounds studied.

REFERENCES

- 1 S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchia, T. Ando, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 111.
- 2 S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 834.
- 3 M.J. Hilhorst, G.W. Somsen, G.J. Jong, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16 (1998) 1251.
- 4 M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 204.
- 5 E.L. Little, J.P. Foley, *J. Microcol. Sep.*, 4 (1992) 145.

- 6 P. L. Desbène, C. M. Rony, *J. Chromatogr. A*, 689 (1995) 107.
- 7 C. Bjerregaard, S. Michaelsen, K. Mortensen, H. Sorensen, *J. Chromatogr. A*, 652 (1993) 477.
- 8 S. P. D. Lalljie, P. Sandra, *Chromatographia*, 40 (1995) 513.
- 9 R. Carabias, E. Rodríguez, A.I. Muñoz, J. Domínguez, J. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 733 (1996) 349.
- 10 A. Farran, S. Ruiz, *Anal. Chim. Acta*, 317 (1995) 181.
- 11 W. Thormann, S. Lienhard, P. Wernly, *J. Chromatogr.*, 636 (1993) 137.
- 12 S.D. Harvey, *J. Chromatogr. A*, 736 (1996) 333.
- 13 A. Fürtös-Matei, J. Li, K.C. Waldron, *J. Chromatogr. B*, 695 (1997) 39.
- 14 A. Zemann, D. Volgger, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3243.
- 15 M. Gilges, M. Hadley, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2944.
- 16 M. Thorsteinsdóttir, I. Beijersten, D. Westerlund, *Electrophoresis*, 16 (1995) 564.
- 17 J. Collet, C. Tribet, P. Gareil, *Electrophoresis*, 17 (1996) 1202.
- 18 R.J. Xu, C. Vidal-Madjar, B. Sébille, *J. Chromatogr. B*, 706 (1998) 3.
- 19 E.S. Ahuja, E.L. Little, K.R. Nielsen, J.P. Foley, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 26.
- 20 E.S. Ahuja, J.P. Foley, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2315.
- 21 A.T. Balchunas, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1466.
- 22 H. Nishi, N. Tsumagari, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2434.
- 23 S. Terabe, *Trends Anal. Chem.*, 8 (1989) 129.
- 24 U. Bütehorn, U. Pyell, *J. Chromatogr. A*, 79 (1997) 157.
- 25 M. Hong, B.S. Weekley, S.J. Grieb, J.P. Foley, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1394.
- 26 N. J. Benz, J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A*, 671(1994) 437.
- 27 S. M. Masselter, A. J. Zemann, O. Bobleter, *Electrophoresis*, 14 (1993) 36.
- 28 P. Jandik, G. Bonn, *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and*

- ions. V. C.H. Publishers: New York (1993).
- 29 M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 49 (1999) 261.
- 30 S. Terabe, *Micellar Electrokinetic Chromatography*, Beckman Instruments, Inc. (1992)
- 31 P.G. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *Chromatographia*, 45 (1997) 433.

**III.4. ESTUDI COMPARATIU DE LA UTILITZACIÓ DE L'ELECTROFORESI
CAPIL·LAR PER ZONES I LA CROMATOGRÀFIA MICEL·LAR
ELECTROCINÈTICA PER A LA SEPARACIÓ D'ISÒMERS
NAFTALENDISULFONATS**

Els resultats satisfactoris obtinguts en els treballs anteriors on s'estudiava la separació d'una barreja complexa de benzensulfonats i naftalenmonosulfonats per CZE i MEKC, emprant diferents sistemes de treball, van originar el plantejament del present estudi. L'objectiu d'aquest treball era aplicar l'experiència obtinguda en els treballs anteriors per a obtenir la separació d'una barreja complexa de naftalendisulfonats en una única anàlisi mitjançant ambdues tècniques i així poder establir quina és la més adequada per a aquests compostos.

Pel desenvolupament d'aquest treball es va seleccionar una barreja de 9 naftalendisulfonats (1,5-, 2,6-, 2,7-NDS; 1-OH-3,6-NDS, 2-OH-3,6-NDS; 2-NH₂-1,5-NDS, 3-NH₂-2,7-NDS, 7-NH₂-1,3-NDS; 8-NH₂-1-OH-3,6-NDS). Els compostos es van seleccionar tenint en compte, principalment, quins són els més freqüentment trobats en aigües. La separació es va dur a terme emprant un capil·lar de sílice fosa de 64.5 cm de longitud (56 cm fins a la finestra de detecció) i 75 µm de diàmetre intern, utilitzant com a electròlit una solució de borat sòdic. La detecció va tenir lloc a 230 nm, emprant un detector de díodes en fila (DAD).

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme l'optimització dels diferents paràmetres, composició de l'electròlit i condicions de separació, que podien contribuir a millorar la separació dels compostos en estudi per CZE. Mitjançant aquesta tècnica i emprant com a electròlit una solució de borat sòdic (20 mM, pH 9.1) només es va aconseguir la resolució de tres compostos, dos amino-hidroxi-naftalendisulfonats i un amino-naftalendisulfonats.

Tot seguit es va provar de millorar la selectivitat de la separació mitjançant l'addició de solvents orgànics a l'electròlit. Per dur a terme

aquest estudi, es va seleccionar un solvent apròtic (acetonitril) i diversos solvents pròtics (metanol, etanol i isopropanol) i es van afegir a l'electròlit en concentracions de fins al 20% (v/v). Els millors resultats es van obtenir en addicionar els solvents pròtics (etanol i isopropanol) en concentracions al voltant del 15% (v/v). Emprant aquests electròlits i augmentant la temperatura fins a 45°C per reduir el temps d'anàlisi, es va aconseguir la separació de tots els compostos estudiats, excepte dos dels naftalendisulfonats no substituïts (el 2,6- i el 2,7-NDS) que van coeluir. Amb l'addició de l'isopropanol es va obtenir una millor resolució dels pics però va portar associat un increment del temps d'anàlisi d'uns deu minuts respecte a la separació obtinguda amb l'etanol.

Malgrat que l'addició de solvents orgànics (etanol, isopropanol) va permetre la resolució de gairebé tots els compostos, no es recomana aquest procediment de treball perquè les condicions de separació necessàries (30 kV i 45°C) per tal de reduir el temps d'anàlisi, que tot i amb això va ser de 30-40 min, va empitjorar la repetitivitat a causa de la inestabilitat del corrent desenvolupat. Aquests resultats van motivar que en la segona part de l'estudi es considerés la introducció d'un sistema micel·lar per tal d'obtenir una separació satisfactòria dels analits en un temps d'anàlisi més curt i amb una millor repetitivitat.

Per a l'optimització de la selectivitat de la separació micel·lar es van avaluar els tres tensioactius prèviament emprats per a la separació de compostos aromàtics monosulfonats: l'SDS com a tensioactiu aniònic, el CTAB com a tensioactiu catiònic i el Brij 35 com a tensioactiu no iònic. De la mateixa manera que en els estudis anteriors, l'optimització de la composició de l'electròlit (concentració de tensioactiu i addició de solvents orgànics) i de les condicions de treball (voltatge aplicat i temperatura) van

ser fonamentals per a la resolució dels diferents isòmers en un temps d'anàlisi al més curt possible.

Quan es va fer servir l'SDS, l'addició d'un solvent orgànic a l'electròlit (acetonitril), la reducció del voltatge (19 kV) per controlar el corrent desenvolupat i, sobretot, l'increment de la temperatura (40°C) van ser fonamentals per obtenir una separació satisfactòria dels analits. La separació obtinguda en aquestes condicions va ser la mateixa que l'obtinguda anteriorment per CZE amb addició de solvents orgànics; les condicions de separació, però, no van ser gaire millors i el temps d'anàlisi encara es va incrementar més (50 min) perquè va ser necessària l'addició de solvents orgànics.

Quan es va fer servir el Brij 35, es va obtenir la mateixa separació que en els casos anteriors però sense l'addició de solvents orgànics i amb un temps d'anàlisi força més curt (22 min), treballant a 20 kV i 25°C. En aquestes condicions la repetitivitat va millorar considerablement. Tot i amb això, tampoc es va aconseguir la resolució de dos dels naftalendisulfonats no substituïts (2,5- i 2,6-NDS).

Per acabar, es va considerar la possibilitat d'estudiar la separació dels tres naftalendisulfonats no substituïts emprant un tensioactiu catiònic, el CTAB. Tal com s'havia observat anteriorment quan es treballava en mode coelectroosmòtic emprant CTAB,^{2,3} l'addició de solvents orgànics (isopropanol) va ser fonamental per aconseguir la separació dels tres isòmers en un temps d'anàlisi relativament curt (13 min). Encara que la separació dels analits es va obtenir addicionant el tensioactiu catiònic a una concentració per sobre de la seva CMC, donat que la concentració d'isopropanol addicionat a l'electròlit per tal d'aconseguir la resolució dels

analítics va ser força elevada (34%) es considera que la separació va tenir lloc per interaccions de parell-iònic i no per un mecanisme micel·lar.

Tal com s'havia observat en estudis anteriors ¹ i també com ho havien posat de manifest d'altres autors, ⁴ la Brij 35-MEKC és la tècnica més adequada per a la separació de barreges complexes de BZS i NS.

Un cop optimitzat el sistema de separació es va considerar convenient fer la validació del mètode, estudiant l'interval de linealitat, establint els límits de detecció i avaluant-ne la precisió entre anàlisis i entre dies. La linealitat del mètode, entre 0.5 i 25 mg/l, va ser satisfactòria per a tots els compostos, obtenint-se límits de detecció de l'ordre de 0.2 mg/l. La repetitivitat (%RSD, n=5) va ser, com a molt, de 0.3 i 4.3 per a temps de migració i àrees corregides, respectivament.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, s'han publicat a la revista *Analyst*, 125 (2000) 2236-2240.

BIBLIOGRAFIA

- 1 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatografia*, 46 (1997) 204.
- 2 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatografia*, 49 (1999) 261.
- 3 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatografia*, 50 (1999) 229.
- 4 S. Angelino, A.B. Prevot, M. Gennaro, E. Prematuro, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 257.

**COMPARATIVE STUDY OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS AND
MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY FOR THE
SEPARATION OF NAPHTHALENEDISULFONATE ISOMERS**

SUMMARY

We investigated the separation of a test mixture of nine substituted and unsubstituted naphthalenedisulfonate isomers by capillary electrophoresis with a UV diode array detector. In particular, we focused on how the composition of the running buffer affected the separation selectivity. When capillary zone electrophoresis was carried out, the best results were obtained when organic solvents such as ethanol or propan-2-ol were added. Eight peaks were baseline separated but in no case were all the unsubstituted isomers separated. Therefore, capillary electrophoretic separation of the compounds was examined in the presence of micellar agents, such as sodium dodecyl sulphate, polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35) and cetyltrimethylammonium bromide. All the substituted isomers and two of the unsubstituted isomers were well resolved within 20 minutes by micellar electrokinetic capillary chromatography when Brij 35 was used as micellar agent. Separations were reproducible, in terms of peak area and migration time, under these conditions.

INTRODUCTION

Naphthalenesulfonate isomers are used in many industrial processes, particularly in the production of plasticizers for concrete, tanning agents and dyes. These substances are surface-active and can be modified by microorganisms.^{1,2} Little is known about their possible effects on the environment or about their toxicity and biodegradation.³

Measurements in industrial sewage and several European river waters have demonstrated that these compounds occur in the aquatic environment and cannot be totally removed in mechanical-biological waste water treatment plants. They remain in the water owing to their high polarity.⁴⁻⁶ Some of them have even been detected in drinking waters,^{6,7} which means that they are potentially hazardous for surface and groundwater and are of concern with regard to drinking water quality.

Many analytical methods have been proposed for separating and determining naphthalenesulfonate isomers. Gas chromatography (GC) has been used, although it requires a tedious derivatization step and several problems occur in the derivatization of isomers which also contain amino and hydroxy groups.^{7,8} High performance liquid chromatography (HPLC)^{7,9,10} and ion pair chromatography (IPC)¹¹⁻¹³ are certainly the most commonly used techniques. Nowadays, capillary electrophoresis (CE) is a rapidly growing, powerful technique that is preferred in many applications to conventional chromatographic techniques because it is efficient, flexible, cheap to operate and has short analysis times.

Although CE seems a promising technique for the determination of naphthalenesulfonate isomers, few reports have been published so far. It has

been used to separate 21 naphthalenemono- and -disulfonate isomers in two runs and some factors affecting resolution have been studied.¹⁴ More recently, a comparison between capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) showed that MEKC gave better selectivity in the separation of 11 naphthalenemonosulfonates.¹⁵ Because of their polarity and the considerable variety of isomers, naphthalenesulfonates are difficult to determine and several workers have attempted to separate test mixtures by adding additives such as surfactants¹⁶ or cyclodextrins.¹⁷ In spite of this, the separation was still incomplete in some cases. Some reports indicate that HPLC, IPC and CE are suitable and complementary techniques for the determination of naphthalenesulfonate isomers.¹⁷⁻¹⁹

In this paper, we describe and compare several CE separation strategies for the resolution of an isomeric naphthalenedisulfonate (NDS) test mixture. On the basis of previous results, we studied the use of different types of additives such as organic modifiers and surfactants to improve the separation further. We also discuss the influence of the separation conditions.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

All separations were performed with a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA)^{3D} CE system equipped with a UV diode array detector. Uncoated fused silica capillaries (Supelco, Bellefonte, PA, USA), and 64.5 x 75 µm i.d.,

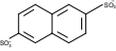
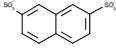
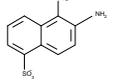
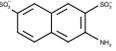
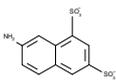
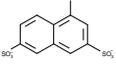
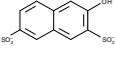
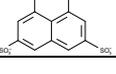
were used throughout. A window was created 8.5 cm from the end of the capillary and 230 nm was selected as the absorbing wavelength. The capillary was thermostatted using a Peltier system at the temperatures described in the text. Hydrodynamic injections were made at 50 mbar for 10 s, except for the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) micellar system, where electrokinetic injection was made by applying -4 kV for 10 s. The system was used in either positive polarity or reversed polarity (CTAB micellar system). Electropherograms were analysed using an HP Chemstation chromatographic data system (version A:04:02).

Reagents and chemicals

The NDS isomers used in this study (see Table I) were purchased from Fluka (Buch, Switzerland), except 2,7-NDS and 7-NH₂-1,3-NDS, which were from Acros Organics (Geel, Belgium) and Aldrich (Beerse, Belgium), respectively. A stock standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in water (several drops of NaOH were usually added to enhance solubility) and stored in a dark-glass flask at 4 °C. Working standard solutions containing 5 mg l⁻¹ of each compound were prepared daily by diluting the stock standard solutions with purified water.

Sodium tetraborate and polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35) were obtained from Fluka. Sodium dodecyl sulphate (SDS) and CTAB were supplied by Sigma (St Louis, MO, USA). Methanol, ethanol, propan-2-ol, and acetonitrile were of HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany). Background electrolytes (BGEs) were prepared daily, de-gassed by ultrasonication and filtered through 0.45 µm nylon syringe filters (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) prior to use. All standards and BGEs were prepared using Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA).

Table 1 Naphthalenedisulfonate isomers studied with their abbreviations and peak assignments

Compound	Abbreviation	Structures	Peak assignment
1,5-naphthalenedisulfonate	1,5-NDS		4
2,6-naphthalenedisulfonate	2,6-NDS		5
2,7-naphthalenedisulfonate	2,7-NDS		6
2-amino-1,5-naphthalenedisulfonate	2-NH ₂ -1,5-NDS		3
3-amino-2,7-naphthalenedisulfonate	3-NH ₂ -2,7-NDS		2
7-amino-1,3-naphthalenedisulfonate	7-NH ₂ -1,3-NDS		1
1-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	1-OH-3,6-NDS		9
2-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	2-OH-3,6-NDS		7
8-amino-1-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	8-NH ₂ -1-OH-3,6-NDS		8

For the SDS micellar system, the capillary had to be conditioned between runs by flushing 0.1 M NaOH for 1 min, followed by water for 2 min and running buffer for 3 min. Using this method it was found that the run-to-run reproducibility was maintained. For the other systems, the capillary was conditioned between runs by flushing it only with the BGE for 3 min. Each surfactant was studied using a new capillary. Capillaries were stored in water when not in use.

RESULTS AND DISCUSSION

CZE method development

Although naphthalenesulfonates are strong acids, completely dissociated in aqueous or aqueous-organic solutions over a broad pH range, aminonaphthalenesulfonates are not and their acid-base properties are similar to those of carboxylic acids. Therefore, compounds carrying an amino group are expected to be strongly influenced by pH. The running buffers were 20 mM borate buffers at different pH values. After several experiments, pH 9.1 was selected as the optimum pH value for the separation of the NDS isomers in a relatively short time. At pH > 9.5 the resolution improved slightly but it also had a negative effect on migration time and peak shapes.

The influence of the buffer concentration on the migration time and resolution of nine NDS compounds was investigated from 10 to 30 mM sodium borate buffer at pH 9.1. At 30 mM borate buffer, all substituted NDS isomers were resolved but the migration time also increased undesirably owing to the increase in ionic strength. Therefore, 20 mM [Figure. 1(a)] was chosen as the concentration which struck the best compromise between resolution and migration time. The three isomeric unsubstituted NDS were not resolved at any borate concentration.

In principle, the ideal separation is obtained by applying the highest voltage possible because the plate number in CE is proportional to the voltage.²⁰ However, the maximum voltage is limited by the Joule heat generated during the separation process, which broadens the peaks and decreases the separation efficiency. At 30 kV, the analysis time was shorter

and the currents non excessive, so this voltage was selected as the optimum run voltage.

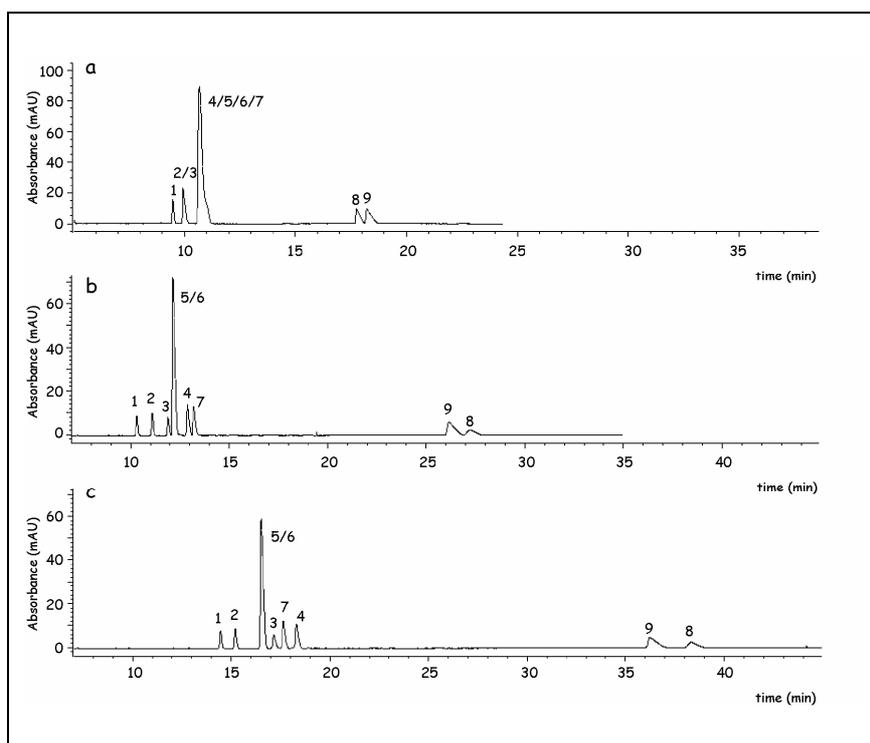


Figure 1 Separation of a NDS test mixture by CZE in a pure aqueous (a) 20 mM borate buffer (pH 9.1) at 30 kV and 25 °C and in a mixed organic-aqueous 20 mM borate buffer at 30 kV and 45 °C with (b) 12% v/v ethanol and (c) 15% v/v propan-2-ol. Peak identification as in Table I.

Organic modifiers can also be added to tune an electrophoretic separation. They can influence both the electroosmotic (EOF) flow and the electrophoretic mobilities. The decrease in EOF flow is mainly due to an increase in viscosity. The electrophoretic mobilities of the analytes are affected by the changes in both the charge and the hydrodynamic volume, and also by the type and percentage of organic modifier.²¹

We studied how adding various organic solvents (methanol, ethanol, propan-2-ol and acetonitrile) at various concentrations (up to 20% v/v) to the running buffer affected the electrophoretic behaviour of a test mixture of NDS. The migration time of the NDS increased as the content of organic solvents in the buffer was increased.

Since protic solvents (ethanol, propanol, *etc.*) are more efficient than aprotic solvents (acetonitrile) at increasing the viscosity and reducing the dielectric constant of the electrolyte, the former had a greater effect on migration times than the latter. The increased electrophoretic mobilities towards the injection end led to longer separation times and larger differences in mobilities and therefore to better peak resolution. However, the temperature had to be raised to 45 °C to shorten the analysis time when ethanol and propan-2-ol were used.

The electropherogram in Figure. 1(a) shows that most of the NDS studied could not be resolved by the buffer alone. No significant improvements were observed when methanol (results not shown) was added. However, using ethanol (12% v/v) or propan-2-ol (15% v/v), baseline separation was almost complete: only two isomeric unsubstituted NDS (peaks 5 and 6) co-eluted [Figure. 2(b) and (c)]. When propan-2-ol was used, the peak resolution was better but the analysis time increased significantly [Figure. 2(c)]. When 15% v/v acetonitrile (results not shown) was added, the results for the first group of eluted compounds were similar to those obtained with ethanol. The analysis time was shorter but peak 8 moved directly under peak 9. Selectivity was also affected by the nature of the organic solvent, and the migration order of some compounds was reversed.

Although CZE gave almost complete separation when organic modifiers (ethanol, propan-2-ol) were added to the borate buffer, this approach cannot be recommended because the separation conditions (30 kV and 45 °C) required to shorten the analysis time worsened the repeatability between runs because the Joule heat was greater.

MEKC method development

Sometimes the selectivity of a CE separation can also be improved by adding micellar agents, *i.e.*, by performing MEKC. Since the selectivity is influenced considerably by the type and concentration of the micellar agents, several types of surfactants were investigated.²² Adding organic modifiers to such systems was also evaluated.

SDS is an anionic surfactant which has a relatively strong hydrogen-bond-donating character; this means that it tends to incorporate analytes which accept hydrogen bonds, so the selectivity for such compounds can be increased. Varying the concentration of the surfactant between 25 and 100 mM primarily causes a considerable increase in the migration time. This is due to the fact that anionic micelles are electrostatically attracted towards the anode but, because of the prevalent velocity of the EOF, they slowly migrate towards the cathode, *i.e.*, in the direction of the detector. Consequently, SDS micelles selectively decrease the migration time of the analytes which they interact with by partitioning mechanisms between the aqueous phase and the micellar phase.

As shown in Figure. 2 (a), addition of SDS to the 20 mM borate buffer at 25°C did not improve the resolution of NDS because of the strong interactions between the analytes and the SDS micelles. The thermal effects

on the separation efficiency in MEKC are well-known. An increase in temperature will decrease the concentration of the free micelles because the critical micellar concentration (c.m.c.) increases. This affects the partition coefficient and can either improve or impair MEKC separations.²³ The influence of the temperature is illustrated in Figure. 2. Increasing the temperature from 25 °C [Figure. 2 (a)] to 40 °C [Figure. 2 (b)] resulted in different electrophoretic mobilities of the analytes, which significantly improved the resolution. It also decreased the total analysis time from 48 to 33 min. Unfortunately, the three isomeric unsubstituted NDS could not be resolved.

Finally, we studied the possibility of further improving the separation by simultaneously adding SDS and organic modifiers (ethanol, propan-2-ol and acetonitrile) to the running buffer. Of the organic modifiers studied, only acetonitrile enhanced the resolution of the test mixture. As shown in Figure. 2(c), adding 5% v/v acetonitrile to the micellar buffer made it possible to separate 1,5-NDS (peak 4), but the separation of 2,6- and 2,7-NDS (peaks 5 and 6) was still not satisfactory. The migration times of the compounds that eluted last were also unacceptably long, even when 30 kV was applied at 40 °C across the capillary during the analysis.

Brij 35 is a non-ionic surfactant which is a strong hydrogen-bond base and a weak hydrogen-bond acid, and it has a great capacity for attraction interactions between ion-pairs. On the basis of previous results which showed the usefulness of adding Brij 35 to separate naphthalenemonosulfonates,¹⁵ we used a similar buffer for the present mixture of NDS.

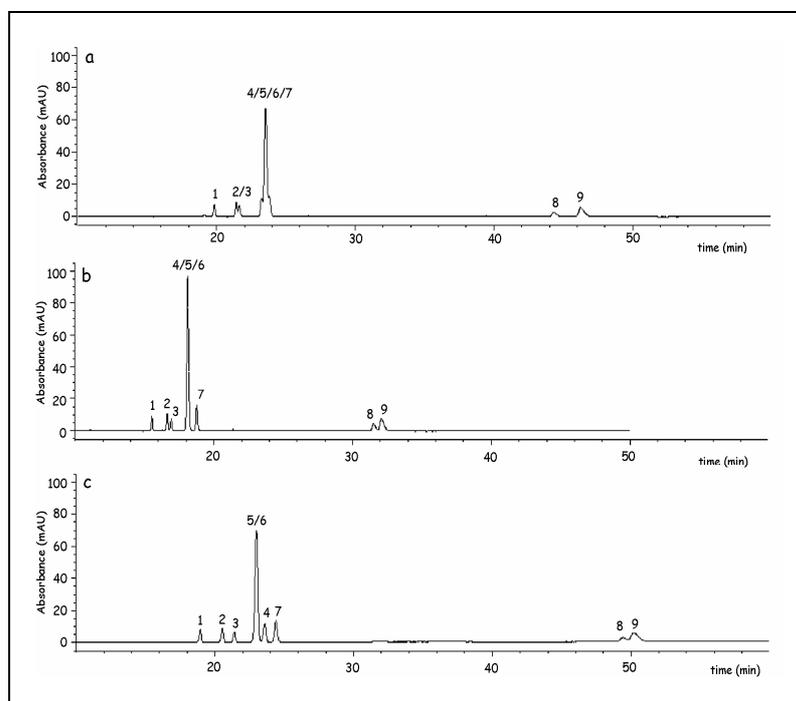


Figure 2 Separation of a NDS test mixture by MEKC using 20 mM borate buffer and 75 mM SDS at 19 kV and (a) 25 °C, (b) 40 °C and (c) with 5% v/v acetonitrile at 40 °C. Peak identification as in Table I.

The influence of the Brij 35 concentration on the electrophoretic behaviour of the selected NDS was investigated between 10 mM and 60 mM. The results indicate that eight NDS isomers can be well resolved within 22 min when a 20 mM borate buffer containing 25 mM Brij 35 is used (Figure. 3). Brij 35 is also more attractive than SDS because separation can be optimum at ambient temperature (25 °C), thus preventing Joule heat effects, and because the capillary does not need to be flushed with NaOH between runs for separations to be reproducible. Despite these good results, the separation of 2,6- and 2,7-NDS (peaks 5 and 6) was still not satisfactory. When Brij 35 was used as the surfactant, then, the addition of organic modifiers only lead to increased migration times.

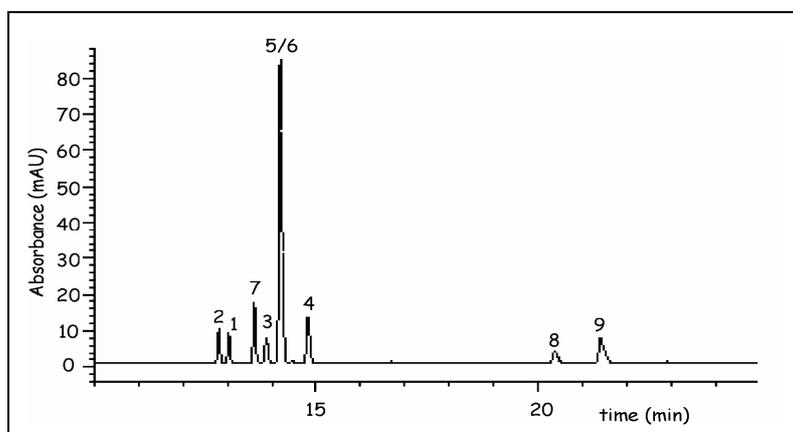


Figure 3 Separation of a NDS test mixture by MEKC using 20 mM borate buffer and 25 mM Brij 35 at 20 kV and 25 °C. Peak identification as in Table I.

Taking into account that cationic surfactants such as CTAB are potentially very useful because electrostatic interactions between anionic analytes and cationic micelles lead to high separation selectivities, the separation of the three unsubstituted isomers was finally evaluated using CTAB as micellar agent. When a BGE containing CTAB at high enough concentrations is used, the charge of the capillary wall is reversed, which in turn reverses the EOF.²⁴ When this happens, the EOF migrates towards the anodic end of the capillary and the polarity of the power supply must be reversed to let the anionic compounds reach the detection window.

The concentration of CTAB in the BGE was increased from 2 to 10 mM, but when no organic modifiers were added to the BGE, only closely eluting, broad peaks were obtained. As can be seen from Figure. 4, the three unsubstituted isomers (peaks 4, 5 and 6), which could not be resolved in either free solution or in SDS- or Brij 35 MEKC systems, were successfully resolved by adding 7 mM CTAB and 34% v/v of propan-2-ol to the borate buffer. Although CTAB is used above its c.m.c. it does not form micelles,

because a high content of propan-2-ol was added to the buffer. Because of this, resolution was improved by additional ion-pair interactions.

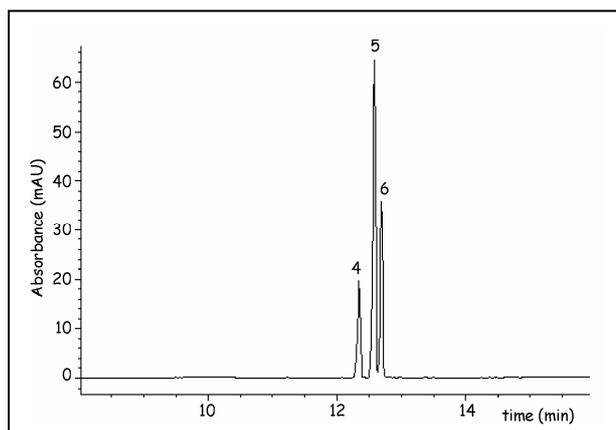


Figure 4 Separation of unsubstituted NDS using 20 mM borate, 7 mM CTAB and 34% v/v propan-2-ol, 30 kV (negative power supply) and 25°C. Peak identification as in Table I.

In conclusion, MEKC can be considered to be a promising technique for an essentially complete separation of even unsubstituted NDS. Except for the inability to resolve two of the three unsubstituted NDS included in this study, Brij 35 MEKC is an efficient, fast and easy to handle method for separating complex mixtures of NDS isomers.

Validation of the method

To test the performance of the Brij 35 MEKC method, we studied the linearity and precision with standard solution mixtures under the optimum conditions described above. Calibration graphs (five points) were constructed for standard solutions between 0.5 and 25 mg l⁻¹; the linearity

was good ($r^2 > 0.997$) for all the compounds. Limits of quantification (LOQ) and limits of detection (LOD) based on a signal-to-noise ratio of 10 and 3 respectively were determined from five repetitions for standard solutions (Table II). The precision of the method was evaluated by determining its repeatability and reproducibility. The repeatability values obtained for five successive injections of standard solution containing 0.2 mg l^{-1} of each NDS varied between 0.18 and 0.51% for migration times and 1.06 and 4.28 for normalized peak areas (Table II). Reproducibility values were determined in the same way as repeatability data but on different days. It was observed that the day-to-day precision values were similar to the within-day precision values.

Table 2 LOQ, LOD and repeatability data (RSD) for NDS isomers separated by Brij 35 MEKC.

Compound	LOD/ (mg l^{-1})	LOQ/ (mg l^{-1})	RSD (%) ^a	
			Migration times	Normalized peak areas
7-NH ₂ -1,3-NDS	0.2	0.5	0.2	1.1
3-NH ₂ -2,7-NDS	0.2	0.5	0.2	2.2
2-NH ₂ -1,5-NDS	0.2	0.5	0.2	1.1
1,5-NDS	0.1	0.5	0.5	1.3
2,6-NDS	0.1	0.5	0.2	2.7
2-OH-3,6-NDS	0.15	0.5	0.3	2.3
8-NH ₂ -1-OH-3,6-NDS	0.15	0.5	0.3	3.1
1-OH-3,6-NDS	0.15	0.5	0.3	4.3

^a RSD was determined from five replicates.

REFERENCES

- 1 A. Stolz, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 23 (1999) 391.
- 2 B. Altenbach, W. Giger, *Anal. Chem*, 67 (1995) 2325.
- 3 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.P. Gelbke, H.J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 4 C. Redin, F.T. Lange H.J. Brauch, S.H. Eberle, *Acta Hydrochim. Hydrobiol*, 27 (1999) 136.
- 5 M.C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim Acta*, 400 (1999) 211.
- 6 T.P. Knepper, F. Sacher, F. T. Lange, H.J. Brauch, F. Karrenbrock, O. Roerden, K. Lindner, *Waste Manage.*, 19 (1999) 77.
- 7 O. Zerbini, I. Diana, C. Baiocchi, *Int. J. Environm. Anal. Chem*, 74 (1999) 43.
- 8 M.L. Trehy, W.E. Gledhill, R.G. Orth, *Anal. Chem*, 62 (1996) 2581.
- 9 M. J-F. Suter, S. Riediker, W. Giger, *Anal. Chem*, 71 (1999) 897.
- 10 M. Castillo, D. Barceló, *Anal. Chem*, 71 (1999) 3769.
- 11 E. Pocurull, C. Aguilar, M.C. Alonso, D. Barcelo, F. Borrull, R.M. Marce, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 187.
- 12 T. Storm, T. Reemtsma, M. Jekel, *J. Chromatogr. A*, 854 (1999) 175.
- 13 B. Bastian, T.P. Knepper, P. Hoffmann, H.M. Ortner, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 674.
- 14 S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman. *J. High Resolut. Chromatogr*, 19 (1996) 99.
- 15 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 204.
- 16 J. Fischer, P. Jandera, V. Stanek, *J. Chromatogr. A*, 772 (1997) 385.
- 17 M. Zenki, H. Yukutake, M. Irizawa, *Bunseki Kagaku*, 45 (1996)181.

- 18 P. Jandera, J. Fischer, V. Stanek, M. Kucerová, P. Zvoníček, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 201.
- 19 S. Angelino, A.B. Prevot, M. Gennaro, E. Prematuro, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 257.
- 20 K. Glowniak, G. Zgoraka, M. Kozyra, *J. Chromatogr. A*, 730 (1996) 25.
- 21 K. Sarmini, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 3.
- 22 S. K. Poole, C. F. Poole, *Analyst*, 122 (1997) 267.
- 23 R. Kuhn, S. Hoffstetter-khun. *Capillary Electrophoresis: Principles and Practice*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1993.
- 24 M.G. Khaledi, *J. Chromatogr. A*, 780 (1997) 3.

**III.5 DETERMINACIÓ DE NAFTALENSULFONATS I BENZENSULFONATS
EN AIGÜES PER ELECTROFORESI CAPIL·LAR PER ZONES AMB EL
SISTEMA DE *SAMPLE STACKING* MITJANÇANT LA INJECCIÓ DE
GRANS VOLUMS DE MOSTRA COM A TÈCNICA DE
PRECONCENTRACIÓ**

En els estudis anteriors s'han utilitzat la CZE i la MEKC amb l'objectiu de desenvolupar diversos mètodes que permetin la resolució de diferents compostos aromàtics mono- i disulfonats en una sola anàlisi. Malauradament, la sensibilitat d'aquests mètodes no permet la determinació de BZS i NS a baixos nivells.¹ En la bibliografia poden trobar-se diversos treballs on es determinen BZS i NS en aigües utilitzant sistemes d'extracció en fase sòlida *off-line* per a la preconcentració prèvia dels analits.^{2,3} El fet que aquests sistemes de preconcentració presentin diversos desavantatges com són la incompatibilitat de l'extracció sense parells iònics dels compostos més polars o la necessitat d'introduir una altra etapa d'extracció per tal d'eliminar el parell iònic abans de la separació electroforètica, ja que la presència del parell iònic pot afectar l'eficàcia de la separació, van originar el plantejament del present estudi. L'objectiu d'aquest treball va consistir en el desenvolupament d'un sistema de preconcentració *on-capillary* que permetés rebaixar els límits de detecció de la tècnica per tal de determinar BZS i NS a baixos nivells de concentració en mostres aquoses.

Donat que l'objectiu d'aquest treball era rebaixar la sensibilitat del mètode es va considerar convenient simplificar el procés de separació, per la qual cosa es va seleccionar una barreja de compostos que es poguessin separar per CZE emprant un electròlit senzill (borat sòdic 20 mM, pH 9.1) i que alhora continguessin alguns dels compostos més freqüentment trobats en mostres aquoses. La barreja seleccionada contenia 15 compostos, BZS i NS mono- i disulfonats: 1-NS; 5-NH₂-2-NS; 4-OH-1-NS; 6-NH₂-4-OH-2-NS, 6-NH₂-1-OH-3-NS; BZS; 3-NH₂-BZS, 2-NH₂-BZS; 4-OH-BZS; 1,5-NDS; 3-NH₂-2,7-NDS, 7-NH₂-1,3-NDS; 1-OH-3,6-NDS, 2-OH-3,6-NDS; 8-NH₂-1-OH-3,6-NDS. La separació es va dur a terme emprant capil·lars de sílice fosa de 64.5 cm de longitud (56 cm fins la finestra de detecció) i 75 o 100 µm de diàmetre intern i emprant un capil·lar de bombolla de la mateixa longitud

però de 50 µm de diàmetre intern amb un pas de llum ampliat a 150 µm. La detecció va tenir lloc a 225 nm emprant un detector de díodes en fila (DAD), excepte quan es van analitzar les mostres aquoses en què, per tal de millorar la sensibilitat del mètode, es va monitoritzar la longitud d'ona per aconseguir la màxima sensibilitat: l'1-NS, el 5-NH₂-2-NS, el 3-NH₂-BZS, el 2-NH₂-BZS i el BZS es van enregistrar a 210 nm i el 6-NH₂-4-OH-2-NS i el 6-NH₂-1-OH-3-NS es van enregistrar a 230 nm.

El sistema de preconcentració *on-capillary* emprat en aquest treball es basa en els diversos procediments d'*stacking* desenvolupats per *R.L. Chien et al.*⁴ i es coneix com *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra (LVSS). Els resultats obtinguts quan es va emprar aquest sistema de preconcentració es van comparar amb els obtinguts per injecció hidrodinàmica convencional de la mostra.

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme la selecció del capil·lar i l'optimització del procés de LVSS. Per a la selecció del capil·lar es va avaluar la influència del seu diàmetre intern en el senyal analític i en la resolució dels analits. En base als resultats obtinguts es va seleccionar el capil·lar de bombolla per dur a terme l'optimització del procés de LVSS, que va consistir en l'optimització del volum màxim de mostra que es pot injectar i de les condicions de preconcentració per obtenir la màxima sensibilitat sense pèrdua d'eficàcia de separació. Un cop optimitzat el sistema es validà el mètode, establint els intervals de linealitat, els límits de detecció i la precisió del mètode.

El procediment de preconcentració emprat en aquest treball (LVSS) consta de tres etapes (*figura III.1*): en la primera etapa s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra; en la segona etapa s'aplica un

potencial negatiu (invertint la polaritat de la font) per invertir el sentit del flux electroosmòtic amb l'objectiu de preconcentrar els analits i eliminar possibles substàncies interferents presents en la matriu de la mostra; en acabar aquesta etapa de preconcentració es torna a invertir la polaritat de la font i té lloc la separació electroforètica dels analits.

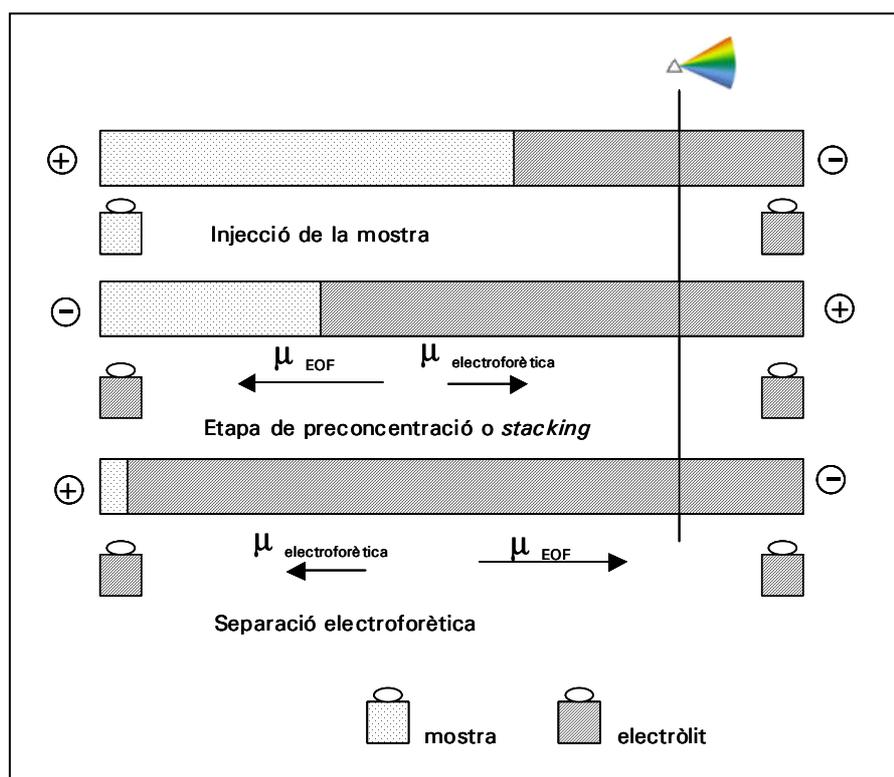


Figura III. 1 Esquema del procés de preconcentració i separació que té lloc en LVSS-CZE.

El volum màxim de mostra que es va poder injectar sense perdre eficàcia de separació va ser de 300 nl (un volum 20 vegades més gran que l'injectat per injecció hidrodinàmica) i es va establir que el moment per donar per acabat el procés de preconcentració corresponia a aquell en què el corrent desenvolupat en aplicar el potencial negatiu era el 95% del desenvolupat

quan es tenia el capil·lar ple d'electròlit i s'aplicava el mateix potencial. Els límits de detecció obtinguts mitjançant aquest sistema de preconcentració van ser de l'ordre de 5-10 µg/l. Mitjançant el LVSS es va obtenir un increment de la sensibilitat d'unes 40 vegades respecte la injecció hidrodinàmica convencional.

En la segona part de l'estudi es va aplicar el mètode desenvolupat a la determinació de BZS i NS en diverses mostres aquoses. Per dur a terme aquest estudi es van seleccionar 7 compostos: l'1-NS, el 5-NH₂-2-NS, el 3-NH₂-BZS, el 2-NH₂-BZS, el BZS, el 6-NH₂-4-OH-2-NS i el 6-NH₂-1-OH-3-NS. En l'anàlisi de mostres reals, la presència de substàncies que augmenten la conductivitat de la matriu pot interferir en el procés d'*stacking*. Després d'estudiar com afectaven les matrius de les diferents mostres analitzades i d'adaptar en conseqüència el sistema de preconcentració, es va estudiar la linealitat, els límits de detecció i la precisió de mètode en aigües de xarxa i de riu, en les quals no es va detectar la presència de cap dels analits d'interès. El límit de detecció obtingut per a aquestes mostres va ser de 20 µg/l.

Finalment, es van analitzar mostres aquoses amb un contingut més elevat de matèria orgànica: una mostra d'aigua superficial recollida a prop d'una indústria química i les mostres dels afluents d'entrada i sortida d'una planta de tractament d'aigües residuals. En la primera mostra d'aigua es va poder determinar la presència del 5-NH₂-2-NS en una concentració de 104 µg/l; en les mostres de l'afluent d'entrada a la planta de tractament d'aigües residuals es va determinar la presència del naftalensulfonat no substituït en una concentració de 166 µg/l i de diversos compostos aromàtics sulfonats amb grups amino- i/o hidroxí, que no van poder ser quantificats perquè es trobaven en concentracions per sota del límit de quantificació del mètode.

La comparació dels resultats obtinguts en analitzar els afluents a l'entrada i a la sortida de la planta de tractament d'aigües residuals va permetre confirmar la persistència d'alguns compostos aromàtics sulfonats.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, s'han publicat a la revista *Analyst*, 126 (2001) 1312-1317.

REFERÈNCIES

- 1 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 125 (2000) 2236.
- 2 S.J. Kok, E.H.M. Koster, C. Gooijer, N.H. Velthorst, U.A.Th. Brinkman, O. Zerbinati, *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
- 3 R. Loos, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 890 (2000) 225.
- 4 R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489A.

LARGE-VOLUME SAMPLE STACKING FOR ON-CAPILLARY SAMPLE ENRICHMENT IN THE DETERMINATION OF NAPHTHALENE- AND BENZENESULFONATES IN REAL WATER SAMPLES BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

SUMMARY

We investigated the on-line preconcentration of a test mixture of 15 substituted and unsubstituted naphthalene- (NSs) and benzenesulfonates (BZSs) by large-volume sample stacking (LVSS). Analyses were carried out by capillary zone electrophoresis (CZE) with on-column UV detection. In particular, we focused on how experimental variables such as the inside diameter of the capillary, the volume of sample introduced and polarity switching influenced the enrichment procedure. The best results were obtained when 300 nl were injected and stacked using a bubble cell capillary. Under these conditions, LVSS increased the detector response of conventional hydrodynamic injection by a factor of 40. The limits of detection of the method were between 5 and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$. Determinations were reproducible, in terms of peak area and migration time, under such conditions. The performance of the method was examined by determining NS and BZS in real samples, such as tap, river, and surface waters and inflow/outflow waters from a water treatment plant. Real samples were injected directly into the CZE column with little or no preparation.

INTRODUCTION

Benzene- and naphthalenesulfonate isomers are xenobiotic, highly water soluble compounds that are used in the production of many consumer products and in various industrial applications. They are introduced into the environment mainly by industrial or municipal waste water which may or may not have been treated. Most of them have only a slight tendency to adsorb on organic material. Because of this, they are considered to be very mobile in the aquatic environment. Although they are not very toxic and have no genotoxic or carcinogenic effects, the microbiological persistence of some compounds is a potential environmental risk. ¹ The occurrence and fate of these compounds in the aquatic environment at concentrations which range from a few $\mu\text{g l}^{-1}$ to several mg l^{-1} have been reported by several groups. ²⁻⁴

Capillary electrophoresis (CE) is a highly efficient technique for separating benzene- and naphthalenesulfonate isomers. ⁵⁻⁸ However, it has two major limitations: the sample injection volume is low and the optical path-length for on-capillary UV detection is short. It usually provides detection limits in the low mg l^{-1} range, ⁷ but these are not sufficient to determine aromatic sulfonates, which in some cases are in the low $\mu\text{g l}^{-1}$ range, in real samples.

Some designs have been developed to increase the on-capillary detection window, *i.e.*, extended path-length capillaries, high-sensitivity detection cells, *etc.* These designs can increase the sensitivity of most common UV detectors by up to 10-fold. ⁹⁻¹⁰ Nowadays, modern fluorescence detectors can give better detection limits than UV absorption detection. Laser-induced fluorescence (LIF) detection is highly appropriate for the compounds studied because they show native fluorescence. However, expensive UV lasers have

to be used because the absorption wavelengths of naphthalenesulfonates are relatively short.¹¹⁻¹²

The sensitivity can also be improved by preconcentrating the sample before the CE separation. Sample preconcentration can be performed either off-line, by solid phase extraction (SPE), or on-line (or on-capillary), directly in the CE column.¹³

Some groups have described the use of SPE for preconcentrating aromatic sulfonates with CE. Kok *et al.*¹⁴ used a three-step SPE procedure to clean up and preconcentrate spiked river water samples. They used ion-pair SPE with C₁₈ material to concentrate some naphthalenesulfonates. Recently, Loos *et al.*^{15,16} showed that polymeric sorbents such as LiChrolut EN and Isolute ENV+ or more recently developed sorbents such as HR-P and Oasis HLB can also be used to enrich aromatic sulfonate isomers.

A more straightforward way of preconcentrating samples is to use an on-line enrichment procedure. In conventional CE, separation efficiency can only be maintained if the injected sample plug is short enough for the separation to be performed in diffusion-controlled zones. However, several approaches have been designed by which the volume of sample injected into the capillary can be increased, thus improving the detection sensitivity without losing separation efficiency.^{17,18}

In 1992, Chien and Burgi^{19,20} performed several in-depth studies on the injection of large sample volumes. Since then, numerous techniques based on sample stacking procedures have shown that these enrichment procedures can significantly improve the detector response, thus reducing sample handling and cost.^{17,21,22}

Pollutants in water samples are often preconcentrated by extraction techniques.²³ Very few studies have been reported on the suitability of stacking procedures for preconcentrating organic pollutants in real samples, and up to now these procedures have not been applied to aromatic sulfonates.

When the volume of sample introduced into the capillary is greater than the optimum in the conventional injection mode, the sample matrix must be pumped out from the capillary if the separation efficiency is to be preserved.¹⁹ This sample stacking mode is known as large volume sample stacking (LVSS). There are two main factors that can affect the analyte detection: the narrowing of the analyte bands in the column and the amount of sample that can be loaded into the column.

The main aim of this study was to develop a method for determining aromatic sulfonates [benzene- (BZS) and naphthalenesulfonates (NSs)] in water samples using an on-line preconcentration technique. We used a stacking procedure (LVSS) as the on-capillary enriching step to lower the limits of detection of a BZS-NS test mixture. The experimental conditions for LVSS were optimised and the results obtained were compared with those obtained when conventional hydrodynamic injection was used. The method was applied to real water samples. The method developed is particularly useful because it provides concentration factors that are sufficient for analysing some real samples and it reduces the sample handling and analysis time.

EXPERIMENTAL

Instrumentation

All separations were performed with a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA, USA) ^{3D}CE capillary zone electrophoresis (CZE) system equipped with a UV diode array detector. Unless indicated otherwise, 225 nm was selected as the absorption wavelength.

Two conventional straight uncoated fused-silica capillaries of 75 μm id (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and 100 μm id (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) were used. Also, a 50 μm id uncoated fused-silica capillary with an extended path-length of 150 μm (50- μm BF3, Hewlett-Packard) was used. This will be referred to as the bubble cell capillary. The total length of all capillaries was 64.5 cm and the effective length was 56 cm. Alignment interfaces containing optical slits matched to each capillary id were used. The capillaries were thermostatted using a Peltier system at 30 or 35 °C. Electrophoretic separations were performed at 30 kV. Electropherograms were analysed using the HP Chemstation chromatographic data system (version A:04:02).

Reagents and chemicals

The BZSs and NSs used in this study were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium), Aldrich (Beerse, Belgium) and Fluka (Buchs, Switzerland). The abbreviations, the peak assignments and the wavelenghts of the compounds at the maximum in the UV spectra (λ_{max}) are given in Table 1. The way in which stock standard solutions were prepared was described in

a previous paper.⁷ Working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with water [Milli-Q, tap, river, water treatment plant (WTP) water]. Sodium tetraborate was obtained from Fluka. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The background electrolyte (BGE) was prepared daily, de-gassed by ultrasonication and filtered through a 0.45 µm nylon syringe filter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) before use.

Table 1 Benzene- and naphthalenesulfonate compounds

Compound	Abbreviation	Peak No.	$\lambda_{\max}/\text{nm}^a$ (experimental)
5-amino-2-naphthalenesulfonate	5-NH ₂ -2-NS	1	213
1-naphthalenesulfonate	1-NS	2	224
3-amino-benzenesulfonate	3-NH ₂ -BZS	3	203
2-amino-benzenesulfonate	2-NH ₂ -BZS	4	203
Benzenesulfonate	BZS	5	213
6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate	6-NH ₂ -4-OH-2-NS	6	252
6-amino-1-hydroxy-3-naphthalenesulfonate	6-NH ₂ -1-OH-3-NS	7	230
4-hydroxy-1-naphthalenesulfonate	4-OH-1-NS	8	220
4-hydroxy-benzenesulfonate	4-OH-BZS	9	197
7-amino-1,3-naphthalenedisulfonate	7-NH ₂ -1,3-NDS	10	247
3-amino-2,7-naphthalenedisulfonate	3-NH ₂ -2,7-NDS	11	247
1,5-naphthalenedisulfonate	1,5-NDS	12	225
2-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	2-OH-3,6-NDS	13	237
8-amino-1-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	8-NH ₂ -1-OH-3,6-NDS	14	235
1-hydroxy-3,6-naphthalenedisulfonate	1-OH-3,6-NDS	15	219

^a UV Spectrum 190-400 nm.

Samples and sample pre-treatment

Tap water samples were collected from the local water supply (Tarragona, Spain). River water samples were taken from the river Ebro (Tortosa, Spain). Surface water was collected near a chemical plant in Tarragona (Spain) that sometimes uses aromatic sulfonates and other dye intermediates in its production processes. The inflow/outflow waters were obtained from the water treatment plant (WTP) of Vilanova del Camí (Barcelona, Spain), which collects both urban and industrial waste with a significant proportion of tannery effluents.

Samples were collected in dark glass bottles, which were stored at 4 °C. Real samples (tap, river and surface waters) were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, UK) before analysis. WTP waters were previously ultracentrifuged and filtered before being injected into the CE system. No further sample preparation was carried out because the tested matrices were compatible with sample stacking, which made direct injection possible and prevented further sample handling.

Operating procedure

Before each session, the capillary was conditioned by flushing for 10 min each with 0.1 M NaOH and water, and then with BGE for 15 min. In order to remove material adsorbed on the capillary walls when surface and WTP waters were analysed, the capillary had to be conditioned between runs by flushing for 3 min each with 0.1 M NaOH and water, and then with BGE for 5 min. Using this procedure, it was found that the run-to-run reproducibility

was maintained. For the other samples and the standards, the capillary was conditioned between runs by flushing it only with the BGE for 3 min.

When using conventional hydrodynamic injection, samples were injected by pressure (50 mbar) and the injection times were adjusted for an identical injection volume (15 nl) for all the capillaries. The proper choice of injection time and injection volume was optimised. For a 50 μm id capillary, the injection plug length should not be greater than 15 nl. Sample overloading leads to poor peak shape, low separation efficiency and poor precision. This effect was also observed by other workers.²⁴

When using LVSS as a previous enrichment step, samples were also injected by pressure. First, a large volume of sample was injected into the capillary. Second, a reversed voltage of 30 kV was applied to focus the zones and remove the sample matrix. When anionic compounds had been focused and most of the sample matrix removed, the voltage was stopped and the polarity reversed. This occurred when the observed current reached about 95% of the current when the capillary was filled with borate buffer. Third, a voltage of 30 kV was applied for CZE separation.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrophoretic separation

CZE separation of the 15 aromatic sulfonates (Table 1) was optimized in accordance with previous studies,⁵ and the optimum conditions are described in the Experimental section.

First, two straight capillaries of 75 μm and 100 μm id and a bubble cell capillary (50- μm BF3) were tested in order to evaluate how they influence the analytical signal and the resolution of the analytes.

The amount of sample injected depends on the pressure applied, the injection time, the capillary length, the inside diameter and the sample viscosity. To find out how the inside diameter affects the analytical signal, a standard solution (15 nl of 0.5 mg l^{-1} NSs and 1 mg l^{-1} BZSs) was hydrodynamically injected into each capillary. For the straight capillaries, the analytes response increased in proportion to the increase in the id, but the heating effects of Joule heat also increased the current and negatively affected the precision of the method. The experimental variables were modified to compensate for the heating effects but this was detrimental to separation. Therefore, to improve the method sensitivity further, a bubble cell capillary was used. The analytical signal was nearly twice as large as when the 75 μm id capillary was used. The separation, however, was largely unchanged and the current generated fell from 80 to 35 μA . Figure 1(a) shows the electropherogram obtained by hydrodynamically injecting 15 nl of the test mixture into a bubble cell capillary.

To determine the linearity of the response, 15 nl of standard solutions were injected hydrodynamically. The linearity was good between 0.5 and 25 mg l^{-1} for the NSs and between 1 and 50 mg l^{-1} for the BZSs, with determination coefficients higher than 0.998. The limits of detection (LODs), the repeatability and the reproducibility were also studied. The LODs, based on a signal-to-noise ratio of 3, were between 0.30 and 0.15 mg l^{-1} . The precision of the method was evaluated by determining its repeatability and reproducibility. The repeatability values (RSD) obtained for five successive injections of standard solution containing 5 mg l^{-1} of each compound were

< 0.5% and < 5% for migration times and normalised peak areas, respectively. Reproducibility values were determined in the same way as repeatability but on different days. It was observed that the day-to-day precision values were only slightly higher than the within-day precision values.

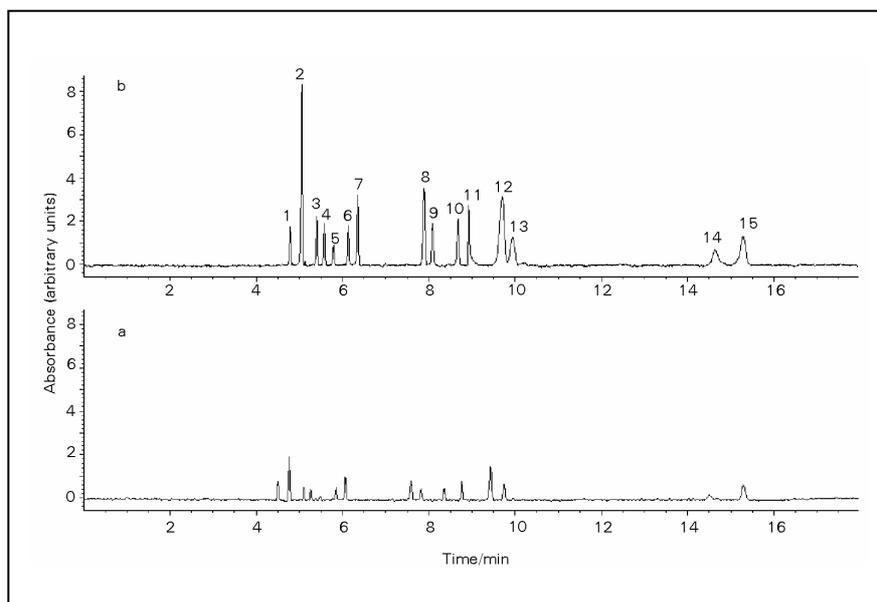


Figure 1 Electropherograms of standard solutions using (a) conventional hydrodynamic injection ($500 \mu\text{g l}^{-1}$ of NSs and $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ of BZSs) and (b) the LVSS enrichment procedure ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ of NS and $100 \mu\text{g l}^{-1}$ of BZS). Separations were performed using 20 mM borate buffer at 30 kV and 30°C. Detection at 225 nm. Peak identification as in Table 1.

Optimization of LVSS

Aromatic sulfonates have been determined by CE at low mg l^{-1} levels.⁷ But, as explained above, they are present at very low concentration levels in environmental waters. Therefore, a previous enrichment step is usually

needed which, up to now, has been carried out by SPE. Unfortunately, the efficiency of ion-pair extraction or more recently-developed polymeric sorbents is limited for very hydrophilic compounds (substituted amino- and hydroxy- isomers) or for compounds with more than one sulfonate group.¹⁴⁻¹⁶ This limitation encouraged us to use a sample stacking procedure (LVSS) because it enables all compounds present in a sample to be preconcentrated. For the determination of aromatic sulfonates, this is important because it enables those compounds that cannot be recovered by SPE to be preconcentrated. Furthermore, LVSS enables the sample to be on-line enriched and handling is minimized.

The capillary selected for the optimization of the LVSS procedure was the bubble cell capillary since it improved the detector response two-fold for conventional hydrodynamic injection and lower current intensities. The main parameters that can affect the LVSS procedure, sample injection volume and polarity switching, were optimized. Standard solutions containing 50 µg l⁻¹ of NSs and 100 µg l⁻¹ of BZSs in Milli-Q water were used to evaluate the effect of these parameters.

The sample injection volume was studied by monitoring the analyte response as a function of injection time. The pressure was 50 mbar and the standard solution was injected for times which ranged from 30 to 230 s. The stacking percentage was set at 95% of the original current. The maximum sample injection volume that could be injected without separation efficiency being lost was *ca.* 300 nl (50 mbar for 200 s). When a higher volume of sample was injected 1,5-NDS and 2-OH-3,6-NDS (peaks 12 and 13) tended to overlap and the compounds eluted last tended to broaden.

The polarity switching was the next parameter to be optimised. The effect of the amount of sample matrix pumped out from the capillary was studied by monitoring the observed current during the stacking process until it reached 90-98% of the original current (current observed when the capillary is filled with borate buffer only). The results obtained show that the peak area of the analytes increases when this percentage increases until the observed current is 95% of the original current. If the volume of matrix pumped out from the capillary is increased, the analytes become more focused. However, at levels above 95% of the original current there is a decrease in the peak area of the compounds eluted first, and above 98% they were almost completely lost.

The electropherogram in Figure 1(b) shows the analyte response with LVSS. It was 40 times better than when conventional hydrodynamic injection was used [Figure 1(a)].

Once the parameters had been optimized, the method was checked by analysing 300 nl of Milli-Q water samples spiked with the compounds studied. The linearity of the response in Milli-Q water was checked between 15 and 250 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the NSs and between 30 and 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the BZS, with determination coefficients higher than 0.997. The LODs were between 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$. The repeatability values (RSD) obtained for five successive injections of standard solution containing 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound were < 5% and < 10% for migration times and normalised peak areas, respectively. Reproducibility values were determined in the same way as repeatability but on different days. They were between 7 and 17% for normalised peak areas.

Analysis of real samples

The performance of the method was tested with some real water samples. For these studies seven compounds, 5-NH₂-2-NS (**1**), 1-NS (**2**), 3-NH₂-BZS (**3**), 2-NH₂-BZS (**4**), BZS (**5**), 6-NH₂-4-OH-2-NS (**6**) and 6-NH₂-1-OH-3-NS (**7**), were chosen. UV detection for real samples was monitored by using time-scheduled selected wavelengths: 210 nm for compounds **1-5**, and 230 nm for compounds **6** and **7**. The background signals of the matrix compounds were recorded at 230 nm. The identities of the peaks appearing in the real samples were studied by comparing migration times and UV spectra and by further spiking the samples with the reference compounds.

When dealing with real samples, a sample preparation step (*e.g.*, dilution or extraction) is often performed before injection. This is sometimes necessary because real samples often contain substances that increase the conductivity of the matrix, which may interfere with the stacking process. Previous experiments with diluted samples showed that the compounds of interest could be efficiently separated, thus allowing sample stacking with direct injection. Instead of diluting the real samples, we chose to inject lower sample volumes. We decided to inject a sample injection volume of 100 nl for tap and river waters, 60 nl for surface water and 40 nl for WTP waters because for these volumes the analyte response was maximum with no decrease in separation efficiency.

The linearity of the method was checked with tap and Ebro river water samples. Analytical data were calculated in the same way as for Milli-Q water. The linearity of the response was checked in the range between 50 and 250 µg l⁻¹ with determination coefficients higher than 0.994. The LODs was 20 µg l⁻¹. The repeatability and reproducibility of the method were

similar to those for Milli-Q water. Figure 2 shows the electropherograms obtained when unspiked Ebro river water and Ebro river water spiked with $50 \mu\text{g l}^{-1}$ of each compound were analyzed. No NS or BZS peaks were observed in tap and Ebro river water electropherograms and the peak that appeared could not be identified by the UV spectra database.

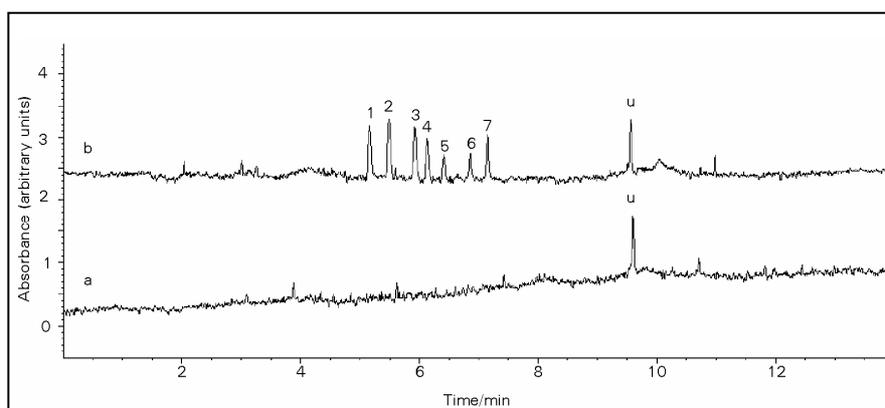


Figure 2 Electropherograms of a river Ebro water sample, (a) unspiked and (b) spiked at $50 \mu\text{g l}^{-1}$ with the seven target compounds after LVSS enrichment procedure. Separations were performed using 20 mM borate buffer at 30 kV and 35 °C. Time-scheduled selected wavelengths. Peak identification: (1) 5-NH₂-2-NS; (2) 1-NS; (3) 3-NH₂-BZS; (4) 2-NH₂-BZS; (5) BZS; (6) 6-NH₂-4-OH-2-NS; (7) 6-NH₂-1-OH-3-NS.

Once the method had been validated, it was tested by analysing real samples with a high content of organic matter: a surface water sample collected near a chemical plant and inflow/outflow water samples from a WTP.

Figure 3 (a) shows the unspiked surface water electropherogram. Two peaks appeared at the migration times for 5-NH₂-2-NS (1) and 1-NS (2), but only the spectrum of the first peak confirmed that it corresponded to 5-NH₂-2-NS. The other peaks that appear in the electropherogram could not be

identified. These results were also confirmed by spiking the surface water sample with $250 \mu\text{g l}^{-1}$ of 5-NH₂-2-NS and 1-NS [Figure 3 (b)]. The response of the 5-NH₂-2-NS was calibrated. This compound was found at a concentration of $104 \mu\text{g l}^{-1}$.

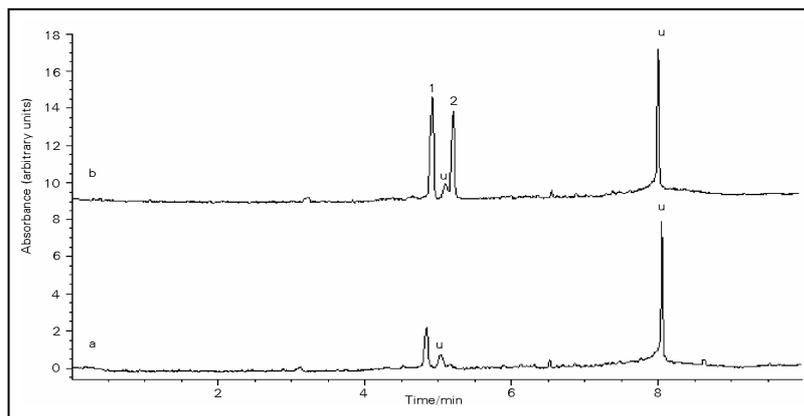


Figure 3 Electropherograms of a surface water sample (a) unspiked, (b) spiked at 0.25 mg l^{-1} with 5-NH₂-2-NS and 1-NS after the LVSS enrichment procedure. Separation conditions and peak identification as in Figure 2.

The method was also applied to evaluate the possible persistence of these compounds in water samples from the inflow and the outflow of a WTP. Figure 4 (a) shows the blank of the inflow WTP water electropherogram overlaid with the spiked sample. Various peaks appeared at the same migration time as the compounds studied. Some of these peaks (A-F) were tentatively identified as aromatic sulfonates by their migration times and by further spiking the samples with the standards. Peaks A and B were tentatively identified as isomeric amino-naphthalenesulfonate (like compound **1**) and isomeric unsubstituted naphthalenesulfonates (like compound **2**), because isomeric naphthalenesulfonates cannot be separated with a simple borate buffer. Peaks C and D were assigned to isomeric amino-benzenesulfonates (like compounds **3** and **4**) and the small peaks E

and F were assigned to isomeric aminohydroxynaphthalenesulfonate (like compounds **6** and **7**). The other peaks that appeared in the electropherogram could not be identified. The response of the unsubstituted naphthalenesulfonate isomer was calibrated. This compound was found at a concentration of $166 \mu\text{g l}^{-1}$. The other peaks could not be quantified because their concentrations were between the detection limit and the quantification limit of the method.

When the outflow WTP waters were analyzed, three of the peaks (C, D and E) which appeared in the inflow WTP water were found. This confirms the persistence of these compounds. Figure 4 (b) shows the blank of the outflow WTP water electropherogram overlaid with the spiked sample. Most peaks appeared in the outflow WTP water at low concentrations and so could not be identified by the UV spectra database. The availability of more selective detection systems such as an UV LIF detector or a MS detector would have enabled the compounds to be confirmed. In order to verify the persistence of these compounds, we compared the peak areas of the compounds tentatively found in the outflow WTP water with those in the inflow WTP water. The peaks were integrated and their normalized peak areas were compared. The normalized peak areas were similar for both samples. The above results are in line with other studies which showed the persistence of some aromatic sulfonate isomers in several real samples.

2,11,16

In conclusion, this paper has described how an on-line preconcentration technique (LVSS) can be used to determine NSs and BZS by CZE. Stacking can give concentration factors that increase the sensitivity of the method to low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels, which is sufficient for some real sample analyses. The combination of stacking, bubble cell capillaries or sensitive cells and

sensitive detectors such as UV LIF detector makes this technique a very promising procedure for on-line sample determination of organic pollutants in real waters at low levels.

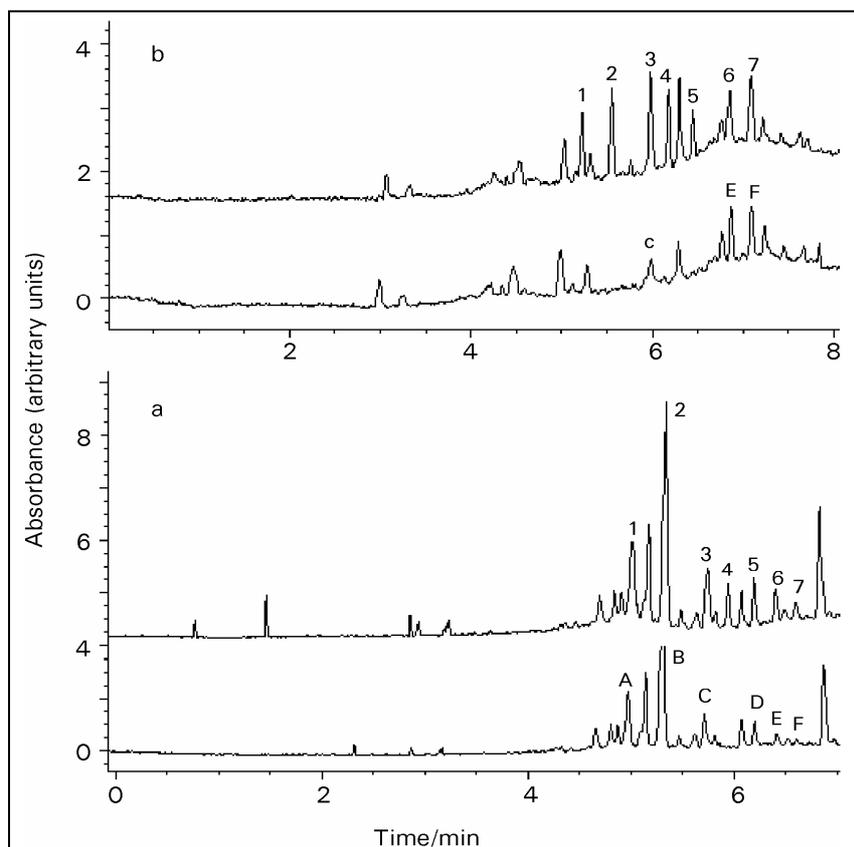


Figure 4 Electropherograms of: (a) blank of the inflow WTP water overlaid with the spiked sample and (b) blank of the outflow WTP water overlaid with the spiked sample. Separation conditions and peak identification as in Figure 2.

REFERENCES

- 1 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.P. Gelbke, H.J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 2 S. Fichtner, F. Th. Lange, W. Schmidt, H.J. Brauch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353 (1995) 57.
- 3 M. C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 400 (1999) SI: 211.
- 4 S. Rieddiker, M.J.-F. Suter, W. Giger, *Wat. Res.* 34 (2000) 2069.
- 5 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Chromatographia*, 46 (1997) 204.
- 6 S. Angelino, A.B. Prevot, M.C. Gennaro, E. Pramaturò, *J. Chromatogr. A*, 845 (1999) 257.
- 7 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 125 (1999) 2236.
- 8 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 487.
- 9 M. Albin, P.D. Grossman, S.E. Morning, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 489A.
- 10 Technical notes, 12-5965-5984E and 12-5965-6512E, Hewlett-Packard, Avondale, PA, 1997 and 1996
- 11 S. J. Kok, G. Ph. Hoornweg, T. De Ridder, U. A. Th. Brinkman, N. H. Velthorst, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 355.
- 12 S. J. Kok, E. M. Kristenson, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 109.
- 13 D. Martínez, M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 63.
- 14 S. J. Kok, E. H, M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 19 (1996) 99.
- 15 R. Loos, R. Niessner, *J. Chromatogr. A*, 882 (1998) 291.

- 16 R. Loss, M. C. Alonso, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 890 (2000) 225.
- 17 M. W. F. Nielen, *Trends Anal. Chem.*, 12 (1993) 345.
- 18 G. Hempel, *Electrophoresis*, 21 (2000) 691.
- 19 R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1046.
- 20 R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489A.
- 21 D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2768.
- 22 W. Liu, H. K. Lee, *Electrophoresis*, 20 (1999) 2475.
- 23 M. C. Bruzzoniti, C. Sazarnini, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 289.
- 24 Z. K. Shihabi, M. E. Hinsdale, *Electrophoresis*, 16 (1995) 2159.

**III.6 PRECONCENTRACIÓ ISOTACOFORÈTICA I DETECCIÓ PER
ESPECTROMETRIA DE MASSES COM A EINES PER MILLORAR LA
DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS AROMÀTICS SULFONATS**

Tal com s'ha comentat més amunt, les principals limitacions de l'electroforesi capil·lar quan s'utilitzen els detectors d'absorbància UV-visible són l'escassa sensibilitat i l'ambigua identificació de la presència dels analits en mostres aquoses complexes. En l'estudi anterior es va utilitzar satisfactòriament un sistema de preconcentració *on-capillary* previ a la separació electroforètica per tal de rebaixar els límits de detecció de la tècnica i poder determinar BZS i NS a baixos nivells de concentració en mostres aquoses; malauradament, alguns dels compostos només es van poder identificar per fortificació de les mostres amb els estàndards corresponents ja que als nivells en que es trobaven els analits la identificació dels compostos amb el detector de díodes en fila (DAD) no va ser possible.¹ Això va motivar el desenvolupament d'aquest treball amb un doble objectiu: l'aplicació d'un altre sistema de preconcentració *on-capillary* per tal de millorar els límits de detecció i l'acoblament de la CE a un detector d'espectrometria de masses per tal de millorar la selectivitat de la tècnica.

En aquest treball, igual que en l'anterior, es va seleccionar una barreja de compostos que es poguessin separar per CZE emprant un tampó electrolític senzill. La barreja seleccionada conté els compostos: 2-NS; 5-NH₂-2-NS; 6-NH₂-4-OH-2-NS; 3-NH₂-BZS. La separació es va dur a terme emprant capil·lars de sílice fosa convencionals de 100 o 64.5 cm de longitud (56 cm fins la finestra de detecció) i 75 µm de diàmetre intern, en funció de què l'equip d'electroforesi capil·lar estigués connectat o no al detector d'espectrometria de masses. Els compostos van ser enregistrats a 213 nm (2-NS; 5-NH₂-2-NS; 3-NH₂-BZS) i a 252 nm (6-NH₂-4-OH-2-NS) en el detector de díodes en fila (DAD); quan es va fer servir l'espectròmetre de masses, les masses enregistrades corresponents als fragments [M-H]⁻ van ser 222, 207, 172 i 238 pel 5-NH₂-2-NS, el 2-NS, el 3-NH₂-BZS i el 6-NH₂-4-OH-2-NS, respectivament.

El sistema de preconcentració *on-capillary* emprat en aquest treball es coneix com isotacoforesi (ITP) i dels diferents procediments que es poden trobar a la bibliografia, el que es va adaptar per aquest estudi està basat en els procediments descrits per *N.J. Reinhoud et al.* ² Ambdós processos, preconcentració i separació, es van dur a terme emprant un únic capil·lar i un sistema electrolític discontinu format per un electròlit capdavanter (LE) i un electròlit terminal (TE).

En la primera part d'aquest estudi es va dur a terme la selecció dels electròlits capdavanter (LE) i terminal (TE) així com l'optimització del procés d'ITP. L'acetat amònic (10 mM, pH 9.7) es va emprar com a LE i com a electròlit de separació i la β -alanina (10 mM, pH 9.7) es va emprar com a TE. L'optimització del procediment d'ITP (descriu a continuació) va consistir en l'estudi del volum màxim de mostra que es podia injectar sense perdre eficàcia de separació i del temps òptim per preconcentrar isotacoforèticament els analits.

El procediment d'ITP emprat consta de cinc etapes (*figura III.2*): en la primera s'omple el capil·lar amb el LE; en la segona s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra i un volum significativament més petit de TE; en la tercera, mantenint el vial que conté el TE a l'extrem d'entrada del capil·lar, es du a terme el procés de preconcentració aplicant un potencial negatiu (invertint la polaritat de la font) alhora que s'aplica una contrapressió per evitar la pèrdua dels analits; en la quarta etapa s'aplica un potencial negatiu, sense aplicar contrapressió, amb el vial de LE a l'extrem d'entrada del capil·lar per eliminar del capil·lar tant el TE com possibles substàncies interferents presents en la matriu de la mostra; en la cinquena i última etapa es torna a invertir la polaritat de la font i té lloc la separació electroforètica dels analits.

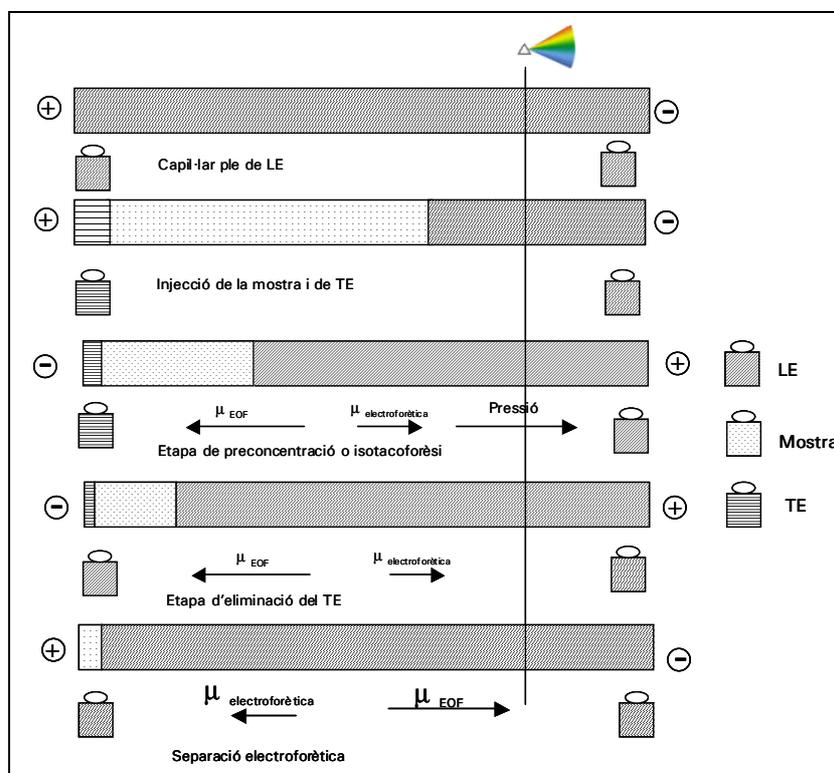


Figura III.2 Esquema del procés de preconcetració i separació que té lloc en ITP-CZE.

En les condicions òptimes de preconcetració (2 ml de mostra injectats i 2.5 min de preconcetració) els límits de detecció van ser de l'ordre de 3-5 $\mu\text{g/l}$, el que va suposar un increment de la sensibilitat d'unes 100 vegades respecte la injecció hidrodinàmica convencional.

En aplicar el procés d'ITP a diverses mostres aquoses –aigua de l'aixeta, aigua de riu i aigües procedents de diverses plantes de tractament d'aigües residuals– va ser necessari introduir una etapa de *clean-up* de la mostra per tal reduir la presència de substàncies iòniques en la matriu de la mostra que interferien en el procés de preconcetració. L'etapa de *clean-up* va consistir

en una extracció en fase sòlida de la mostra emprant un sorbent polimèric altament entrecreuat per tal d'evitar la utilització de parells iònics que poguessin interferir en el procés de separació. Les recuperacions obtingudes van ser superiors al 70% per tots els compostos excepte pel 3-NH₂-BZS que no es va poder recuperar. Encara que el tractament previ de la mostra va millorar significativament el procés d'ITP, es van haver d'adaptar les condicions de preconcentració per cadascuna de les mostres analitzades, augmentant el temps de preconcentració a 7, 10, i 12 min per l'aigua de l'aixeta, de la planta de tractament i del riu, respectivament.

El mètode també es va validar satisfactòriament per a les mostres aquoses analitzades; obtenint-se límits de detecció de l'ordre de 5-15 µg/l. En una de les mostres analitzades procedent d'una planta de tractament d'aigües residuals es va determinar la presència del 2-NS en una concentració de 55 µg/l. En la mostra d'aigua de riu també va aparèixer un pic al mateix temps de migració d'aquest compost, malauradament la coelució d'una substància desconeguda amb l'analit d'interès va impedir la seva identificació amb el DAD.

En la segona part de l'estudi es van optimitzar els paràmetres característics de l'acoblament CE-ESI-MS i es va validar el mètode desenvolupat establint els intervals de linealitat, els límits de detecció i la repetitivitat.

L'espectròmetre de masses es va connectar a la sortida de l'equip d'electroforesi capil·lar emprant una interfície d'electroesprai (ESI) ortogonal per CE-MS (*figura III.2*), treballant en mode negatiu.

injecció de la mostra, es van aplicar 10 p.s.i. durant la separació CZE-DAD i 20 p.s.i. durant la separació CZE-ESI-MS; això va permetre obtenir resultats repetitius amb una bona eficàcia de separació i temps d'anàlisi més curts. El flux de gas assecant, després d'estudiar el seu efecte, es va fixar a 10 l/min.

Un altre paràmetre que va esdevenir molt important en l'optimització del procés va ser la composició i el flux del líquid auxiliar. El que va donar abundàncies més elevades va ser una barreja d'isopropanol-aigua (80:20, v/v) amb un 0.1% d'hidròxid amònic per afavorir el contacte elèctric i va ser subministrat a un flux de 4 µl/min.

Es va intentar reduir el temps d'anàlisi manipulant la pressió, però, tot i obtenir els resultats desitjats es va descartar aquesta possibilitat pels efectes negatius que l'acompanyaven, pèrdua de resolució, de simetria dels pics i de repetitivitat.

El mètode es va validar estudiant l'interval de linealitat, establint els límits de detecció i avaluant-ne la precisió, utilitzant el 2-NS com a compost model. La linealitat del mètode, entre 0.25 i 5 mg/l, va ser satisfactòria, obtenint-se un límit de detecció de 0.1 mg/l.

Posteriorment es va aplicar a l'anàlisi d'una mostra real. En la primera part d'aquest estudi (ITP-CZE) es va sospitar la presència del 2-NS en la mostra de riu analitzada; en la segona part es va tornar a analitzar aquesta mostra emprant el sistema CZE-ESI-MS, la qual cosa va permetre no només confirmar la presència d'aquest compost en la mostra, sinó també poder-lo quantificar (SIM mode) en una concentració de 2.1 mg/l.

Els estudis realitzats en aquest treball, dels quals s'adjunta una còpia a continuació, han estat enviats a la revista *Electrophoresis* per a la seva publicació.

BIBLIOGRAFIA

- 1 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 126 (2001) 1312.
- 2 N.J. Reinhoud, U.J. Tijarden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr. A*, 653 (1993) 303.

ISOTACHOPHORETIC FOCUSING AND MASS SPECTROMETRY DETECTION AS TOOLS FOR IMPROVING THE DETERMINATION OF AROMATIC SULFONATES IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

We explored isotachopheresis–capillary zone electrophoresis with diode array detection on a single capillary to find out how to increase the injection volume and decrease the detection limits of aromatic sulfonates in capillary zone electrophoresis. The isotachopheretic focusing was performed by applying a negative voltage in conjunction with hydrodynamic backpressure programming, and the terminating buffer was removed before the capillary zone electrophoresis separation, which resulted in highly sensitive determinations. The isotachopheretic focusing increased the signal response of conventional hydrodynamic injection by a factor of 100, whereas the separation efficiency was unaffected. The limits of detection of the method were between 3 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$. The method was successfully used to determine these compounds in water samples. Experimental conditions for capillary electrophoresis–mass spectrometry were optimised and applied to determine aromatic sulfonates in water samples. These techniques enables the 2-naphthalenesulfonate to be determined in water samples.

Keywords: Aromatic sulfonates; Isotachopheretic focusing; Electrospray ionization-mass spectrometry; Water samples.

INTRODUCTION

The importance of capillary electrophoresis (CE) as an analytical tool has increased significantly over the last decade. Nowadays, the major challenges of using CE separations to analyse environmental samples are to obtain suitable determination limits and to unambiguously identify pollutants in complex matrices.

Although sensitivity is still one of the main limitations of CE, there are several means of solving this problem.^{1,2} One is to use laser induced fluorescence or phosphorescence detection methods.^{3,4} This approach, however, requires analytes to have certain characteristics for detection.

Another approach is to preconcentrate the sample before the CE separation using conventional off-line sample preconcentration procedures such as solid phase extraction (SPE).² A third approach is to increase the sample loadability by on-line electrophoretic concentration.⁵⁻¹³ The electrophoretic concentration methods increase the sample loadability without losing separation efficiency and can be performed using continuous (stacking procedures) or discontinuous (isotachophoretic procedures) electrolytes. Although there are significant differences between these procedures, one common feature is that the analytes are concentrated at the boundary between the sample and the buffer/s over which there is a difference in the electrical field strength when a voltage is applied.⁵⁻¹³

There are two different configurations for performing isotachophoresis-capillary zone electrophoresis (ITP-CZE): the single-capillary (one column) or dual-capillary (two columns coupled together) mode.⁷⁻¹³ The main

advantage of the latter configuration is that ITP can be used for sample cleanup and only the zones of interest are then analysed by CZE. The main advantage of the single mode is that it is easily automated and the instrumentation required is simple. In single ITP–CZE, the sample is inserted between a leading electrolyte (LE) whose ionic mobility was higher than that of the sample and a terminating electrolyte (TE) whose ionic mobility was lower. All analytes with ionic mobilities between the LE and the TE are then focused into discrete zones and migrate isotachophoretically to the border of the LE.^{7,8} After ITP focusing, the CZE separation takes place.

The combination of CE with mass spectrometry (MS) provides highly selective detection of compounds in various complex mixtures.¹⁴⁻¹⁶ Of the different types of CE-MS interfaces that have been described in the literature since CE-MS coupling was first reported by Olivares et al.,¹⁷ electrospray ionization (ESI) has become the most popular method for coupling CE with MS.¹⁸ ESI is a soft ionization technique that sprays and ionizes analytes directly from the solution phase to the gas phase. However, CE-ESI-MS is still not considered to be a fully developed technique, mainly due to current technical and chemical limitations. While the outlet of an HPLC system can be connected quite easily to the electrospray inlet, CZE-ESI interfacing has other drawbacks: the high voltage of the separation capillary, the high voltage of the MS instrument and the low flow rates. Moreover, while volatile buffers in HPLC are well established and compatible with MS, most of the buffers in CE are chosen for their separation selectivity and are non volatile. Not only do non volatile high-saline buffers run the risk of significantly decreasing the ion intensity (through ion-pairing effects or the prevention of ion evaporation during the electrospray process), but salt crystals can also contaminate or even plug the MS entrance.

Aromatic sulfonate (AS) isomers like benzene- (BZS) and naphthalenesulfonates (NS) are widely used in industrial and domestic processes.¹⁹⁻²² Although they are not very toxic and have no genotoxic or carcinogenic effects, the microbiological persistence of some compounds is a potential environmental risk. They are usually present at low levels in environmental samples so sensitive and selective electrophoretic methods are required if they are to be detected.^{3,4,6,14,19,22}

As far as we know, ITP-CZE has not been used to determine AS in water samples and CE-MS has scarcely been used for identifying such compounds in water samples.¹⁴ Therefore, the aim of the present paper was twofold: to overcome not only the lack of sensitivity of absorbance detection by applying an on-capillary isotachophoretic enrichment procedure but also the difficulty in unambiguously identifying AS in water samples by coupling CE to ESI-MS. Four aromatic sulfonates (5-amino-2-naphthalenesulfonate, 5-NH₂-2-NS; 2-naphthalenesulfonate, 2-NS; 3-amino-benzenesulfonate, 3-NH₂-2-BZS and 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonate, 6-NH₂-4-OH-2-NS) were selected as model compounds for performing ITP-CZE and CE-ESI-MS.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and standards

Standards of the four aromatic sulfonates were purchased from Aldrich (Beerse, Belgium) and Fluka (Buchs, Switzerland). A stock standard solution of 1000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in water (several drops of NaOH were usually added to enhance solubility) and stored in a dark-glass flask at 4 °C. Working solutions were prepared daily by diluting the standard

solutions with water (Milli-Q or water samples). β -alanine was purchased from Sigma (St. Louis, USA) and ammonium acetate was purchased from Aldrich. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, USA). The leading/background electrolyte was 10 mM ammonium acetate and the terminating electrolyte was 10 mM β -alanine. They were both adjusted to pH 9.7 with ammonia. The leading and the terminating electrolytes were prepared daily, de-gassed by ultrasonication and filtered through a 0.20 μm nylon syringe filter (Tracer, Barcelona, Spain) before use. The sheath liquid was also filtered through a 0.45 μm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, England) and de-gassed by ultrasonication before use.

Equipment

A Hewlett Packard (Palo Alto, USA) $^{3\text{D}}$ CE system equipped with a UV diode array detector was used. On-capillary absorbance detection took place at 56 cm from the anodic end. The compounds were recorded at 213 nm (5-NH₂-2-NS, 2-NS and 3-NH₂-BZS) and 252 nm (6-NH₂-4-OH-2-NS). Electropherograms were recorded using the HP Chemstation chromatographic data system.

A mass spectrometer was connected to the exit to the CE-DAD system through an electrospray ionisation (ESI) interface. The CE column inlet was placed at the same height as the CE-ESI-MS probe to prevent siphoning. The ESI-MS measurements were carried out in the negative ionization mode and performed in a single quadrupole HP series 1100 MSD (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA).

Procedures

Before each session, the capillary was conditioned by flushing for 5 min with 0.1 M NaOH and for 15 min each with water and leading electrolyte. At high sensitivity determinations, precautions were taken to prevent carry over effects. This means that the capillary was flushed between runs, that the electrolytes were refreshed after each analysis and that blank analyses were made between series of analyses. Using this procedure, it was found that the run-to-run reproducibility was maintained.

The ITP-CZE and the CZE-MS experiments were carried out in 64.5-100 cm \times 75 μ m I.D. fused silica capillaries (eCAP™ Capillary Tubing, Beckman, USA), respectively. To maintain a stable electrospray, a 20-mm portion of the polyimide coating was removed from the outlet end of the capillary. This procedure improved the reproducibility characteristics at the probe tip. The capillaries were thermostatted using a Peltier system at 25°C and the power supply was operated in the constant voltage mode at 30 kV or 25 kV for ITP-CZE and CZE-MS experiments, respectively.

The mass spectrometer was operated in negative ion mode by applying a voltage of 3500 V to the capillary. The gas temperature was set at 200°C and the fragmentor parameter was set at 100 V. Nitrogen was used as the drying gas with a flow-rate of 10 l min⁻¹ and as the nebulizer gas with a pressure of 20 p.s.i. Coaxial sheath liquid, consisting of isopropanol-water (80:20, v/v) in the presence of 0.1% ammonia, was delivered at 4 μ l/min by a Hewlett-Packard 1100 Series binary pump equipped with a 1:100 flow splitter. Mass spectra in full-scan mode were collected by scanning in the range 70-270 *m/z*. In selected ion monitoring (SIM) acquisition, the most abundant ions in each compound were monitored. The main ions obtained

for each compound, corresponding to the fragments $[M - H]^-$, were 222, 207, 172 and 238 for 5-NH₂-2-NS, 2-NS, 3-NH₂-BZS and 6-NH₂-4-OH-2-NS, respectively.

The ITP-CZE procedure was performed as follows: (i) The capillary was rinsed with LE using the flush mode (at a pressure of 1000 mbar approx.); (ii) The injection took place hydrodynamically at a pressure of 50 mbar, and then a small plug of TE (1% of the injected sample volume) was also hydrodynamically injected at the same pressure; (iii) The analyte focusing was carried out by applying a voltage (-30 kV) in conjunction with a hydrodynamic backpressure (50 mbar) with the TE vial at the inlet (anodic) capillary end and the LE vial at the outlet capillary end. The focusing step lasted between 0.8-2.5 min or 7-12 min, for standards and water samples respectively, depending on the injected zone length and the sample matrix composition, (iv) For the terminating buffer zone to be removed from the capillary by ITP, the TE vial is replaced by a vial containing the LE and a voltage of -30 kV was applied without hydrodynamic pressure. The current was monitored so that the moment to switch from the ITP to the CZE mode could be precisely timed. When the voltage was constant the current increased as long as the terminating zone length decreased. The CZE equipment was programmed so that the voltage stopped at a defined current threshold (about 95% of the current generated when the capillary is completely filled with LE). This step usually took less than 1 min; (v) When the sample zone was approaching the capillary inlet the CZE run started.

Sample preparation

Tap water, river water and water from several waste water treatment plants (WWTP) were analysed.

Samples were collected in dark glass bottles and stored at 4°C. They were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter (Whatman, Maidstone, England) before use. Tap, river and WWTP water samples were also passed through an Oasis HLB solid-phase extraction (SPE) cartridge for sample clean-up. The clean-up step was carried out using a solid-phase extraction manifold connected to a vacuum pump (Teknokroma, Barcelona, Spain). The Oasis HLB SPE cartridges were preconditioned with 7 ml of methanol followed by 3 ml of Milli-Q water (pH 3). The sample (20 ml) was passed through the cartridge and the aromatic sulfonates were eluted with 3 ml of methanol and 1 ml of Milli-Q water.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimisation of the ITP-CZE-DAD method

We selected the appropriate leading and terminating electrolytes on the basis of data from the literature [7,8,10,13] and after we had carried out several experiments using sodium tetraborate, sodium phosphate and ammonium acetate as LE and β-alanine and cacodylic acid as TE. We selected ammonium acetate as LE and background electrolyte (BGE) because of its volatile characteristics and the satisfying separations when it was used as buffer with CZE. The LE/BGE pH value was set at 9.7 for an optimum CZE separation. β-alanine was selected as TE, and its pH was set at the same value as that of the LE in order to avoid pH gradient contributions. The mobility difference between ammonium acetate and β-alanine at that pH was large enough to form an isotachophoretic window where all compounds undergo focusing.

In order to determine low levels of AS in water samples, we studied how to lower the detection limits with an isotachopheretic focusing procedure. The injection volume and the focusing step of this procedure were optimised and the moment at which ITP was switched to CZE was adjusted.

The injection volume was optimised with a standard solution of $50 \mu\text{g l}^{-1}$ of each aromatic sulfonate. The relationship between peak area and injection volume was linear with injection volumes between 0.5 and 2.0 μl (15-70% of the total capillary volume). Figure 1 shows how injection volume affects the analysis of a standard solution and also that the capillary can be filled to 70% without band broadening. When larger volumes were injected into the capillary, the peak shapes of the four AS became asymmetric, as has already been observed and attributed to capillary overloading and the mismatch of mobilities between the analytes and coions.^{10,11}

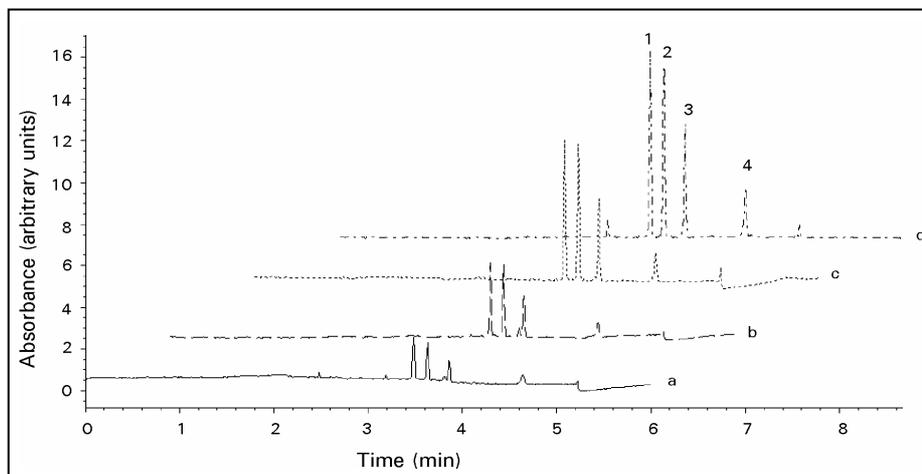


Figure 1 Effect of the injection volume on the isotachopherograms of a standard AS mixture of $50 \mu\text{g l}^{-1}$. Injected volume: 15% (a), 25% (b), 50% (c), and 70% of the total capillary volume (d). CZE conditions: running buffer 10 mM ammonium acetate, pH 9.7; applied voltage, 30 kV; temperature 25°C. Peak identification: 5-NH₂-2-NS (1), 2-NS (2), 3-NH₂-BZS (3) and 6-NH₂-2-NS (4).

During the focusing step (step (iii) in 2.3 procedures), the negative voltage (30 kV) led to an electroosmotic flow in the direction of the capillary inlet, so a hydrodynamic backpressure (50 mbar) was applied to prevent the analytes from migrating out of the capillary.¹⁰ The focusing step was considered to be complete when all ions moved isotachophoretically under steady state conditions.²³ In agreement with other authors,^{10,24} we found that the focussing step depended on the volume of the sample injected. At larger injection volumes longer focusing times were necessary. The focusing time for a standard solution containing 50 µg l⁻¹ of each compounds increased from 0.8 min for an injection volume of 0.5 µl to 2.5 min for 2.0 µl. The effect of focusing time on performance in ITP-CZE is important because shorter times decrease the signal because focusing is incomplete and this could affect the resolution of the separation.

The current was monitored so that the moment for automatically switching from ITP to CZE could be determined. It was adjusted to prevent the analytes from leaving the capillary and to minimise the TE plug remaining in the capillary, the purpose of which was to prevent the homogeneity of the electrical field from being disturbed. Without it the efficiency and migration times of the CZE run could be affected. The CZE equipment was programmed so that at a defined threshold of current the ITP automatically switched to CZE. A compromise was reached between the effects at lower and higher values and this point was set at 95% of the current generated when the capillary is completely full of LE. When the current at the moment of the switching zone is lower than 93% broadening occurs, and when it is higher than 97% there is a slight but significant decrease in the response of the compounds eluted first.

The analysis for the ITP-CZE run (2.0 μl injection volume) took only 8 min. This included a flush of 1.5 min with leading buffer. Flushing between analyses was necessary for migration times to be reproducible. The analyte responses obtained by ITP-CZE were 100 times greater than those obtained by conventional CZE.

Validation of the ITP-CZE-DAD method

Once the loadability had been optimized, we studied the linearity and reproducibility of the ITP-CZE method in the range 10-1250 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the four aromatic sulfonates. All correlation coefficients were higher than 0.999. The detection limits, based on a signal-to-noise ratio of 3, were 3 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 5-NH₂-NS, 2-NS, and 3-NH₂-BZS, and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ for 6-NH₂-4-OH-2-NS.

The reproducibility between days in ITP-CZE was studied for a standard solution containing 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ of each compound. The relative standard deviations (RSD, n=5) were lower than 1.2% and 3.5% for migration times and corrected peak areas, respectively.

The performance of the method was then checked with some water samples such as tap water, river water and WWTP water samples. The presence of high concentrations of matrix constituents in the sample can prevent the ITP steady state from being reached.²⁵ One way of overcoming the incompatibility of the sample matrix with the ITP conditions is to pretreat the sample by removing most of ionic matrix constituents. An additional sample pretreatment usually improves reproducibility, selectivity and ITP focusing time of ITP-CZE.¹⁰

After several experiments which confirmed the incompatibility of our sample matrices with the ITP conditions, a clean-up step was carried out before the ITP-CZE procedure. Because of the difficulty of retaining highly polar analytes such as AS, several highly crosslinked polystyrene-divinylbenzene polymeric SPE cartridges, LiChrolut EN, Isolute Env +, and Oasis HLB were tested. There were no significant differences between the recoveries obtained with the tested polymeric sorbents for most of the AS. Oasis HLB was selected for performing the clean-up step because it gave slightly higher recoveries for the amino-hydroxy derivative. Unfortunately, the amino-benzene compound was nearly lost because of its high solubility in water, which reduces its retention in all the SPE cartridges tested. The breakthrough volumes of the AS were determined by extracting different sample volumes (10 and 50 ml) of Milli-Q water. The samples were spiked at different concentrations to obtain the same theoretical final amount. 20 ml was selected because at higher volumes recoveries decreased. When 20 ml of Milli-Q water spiked with 0.2 mg l⁻¹ of each compound were extracted, recoveries were higher than 70% and RSD values (n=3) were between 7-12%. The recoveries for tap and WWTP water samples were similar to those specified for Milli-Q water.

Although the clean-up step improved the performance of ITP-CZE —as reported in the literature ¹⁰— the ITP focusing time had to be adjusted for each sample. The times were 7 min, 10 min and 12 min for tap water, WWTP water and river water sample, respectively.

When a tap water sample was analysed, no significant peak eluted at the same migration time as the analytes being studied. When tap water samples spiked with different levels of analytes were analysed by ITP-CZE, linearity was good between 30 and 1000 µg l⁻¹. The correlation coefficients were

between 0.991 and 0.998 for 6-NH₂-4-OH-2-NS and 5-NH₂-2-NS, respectively. The detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ), calculated as three times and ten times the signal-to-noise ratio, were 5 and 15 µg l⁻¹ for 5-NH₂-2-NS and 2-NS, and 10 and 30 µg l⁻¹ for 6-NH₂-4-OH-2-NS, respectively. Comparing ITP-CZE to conventional CZE for tap water samples, the increases in areas were similar to those with Milli-Q water samples. Figure 2 shows the electropherograms (with and without SPE clean-up) and the isotachopherogram obtained when a 1 mg l⁻¹ spiked tap water sample was injected into the capillary. The repeatability of the ITP-CZE method was determined for a tap water sample spiked with 100 µg l⁻¹ of each compound. The RSDs (n=3) were lower than 3% and 7% for migration times and peak areas, respectively. For reproducibility between days (n=3) values were lower than 5% and 10%, respectively.

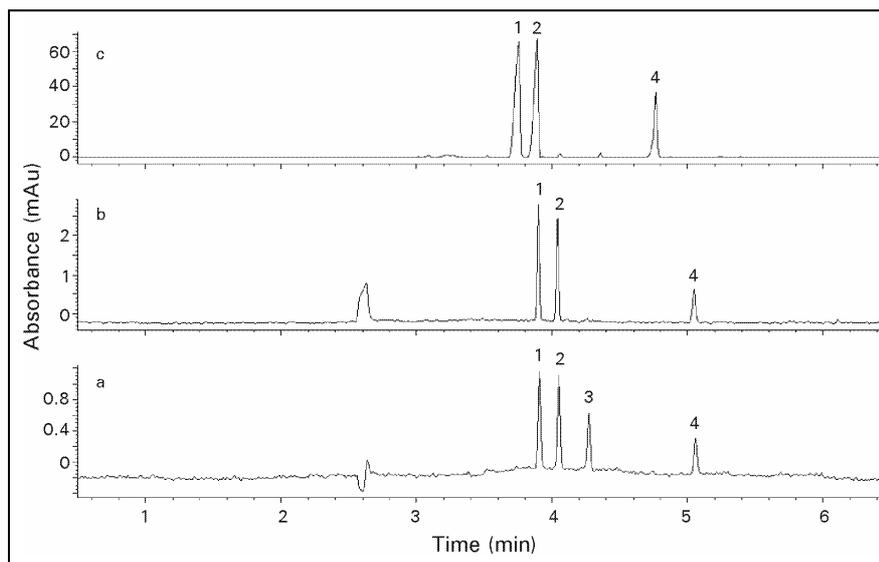


Figure 2 Electropherograms obtained when a tap-water sample spiked with 1 mg l⁻¹ of each AS was hydrodynamically injected (a) without the SPE clean-up; (b) with the SPE clean-up using an Oasis HLB cartridge; and (c) with the SPE clean-up and then isotachophoretically focused. The CZE conditions are the same as those reported in Fig.1. Peak identification as in Figure 1.

Several WWTP water samples from different sites were analysed. The recoveries and the linearity for these samples were similar to those specified above for tap water. 1-NS and 2-NS cannot be separated by CZE nor identified by MS. Therefore, we shall refer to 2-NS in the text because 2-NS is the one that is most frequently found in environmental waters. Figure 3 shows that in one of the samples a peak appeared at the same time as the isomeric compound 2-NS. It was tentatively identified as 2-NS by comparing its spectra with that of the standard with a match factor of 996. It was quantified at $55 \mu\text{g l}^{-1}$ level.

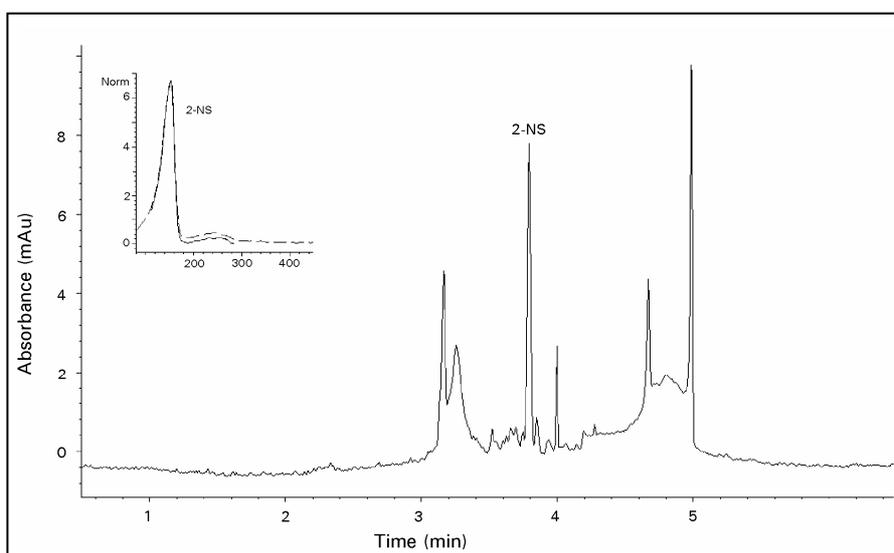


Figure 3 ITP-CZE-DAD electropherogram of a river water sample. The insert shows the overlay of the spectra of the peak and that of the standard (2-NS). The CZE conditions are the same as those reported in Figure 1.

When analysing a river water sample, also appeared a peak at the same migration time as 2-NS. The presence of such compounds in the sample was suspected by the comparison between the spectra of the peak and that of the standard (match factor lower than 990); and the study of the peak

purity spectra revealed the coelution of some unknown substance with the analyte of interest.

Currently, the most efficient way of overcoming the ambiguous identification of these analytes when they are analysed by CE is to use more selective detectors such as mass spectrometry.

CZE-ESI-MS

In order to test the capacity of mass spectrometry as a detection system for capillary electrophoresis, the experimental parameters were optimised first. The criteria for evaluating the optimum parameters were the shape and response of the peak, the migration times and the intensities of the electrophoretic and electrospray current.

ESI parameters were optimized in the full scan mode (scanning from m/z 70 to 270) by infusing 50 mg l^{-1} of a standard solution of AS through the CE capillary at a pressure of 50 mbar. The probe voltage was set at 3500 V. The fragmentor was optimised between 50-200 V. It was set at 100 V as a compromise between sensitivity and fragmentation. In these conditions the most abundant ion for all the compounds is $[M - H]^-$.

A temperature of 200°C was suitable for water desolvation. It was noted that migration times, sensitivity and peak broadening were significantly affected by the nebulizing pressure. Therefore, after several experiments, the nebulizing pressure was operated by using a time-scheduled table. It was set at 0 p.s.i. during the hydrodynamic injection, at 10 p.s.i. for the CZE-DAD separation and at 20 p.s.i. for the CZE-ESI-MS separation. In agreement with other authors we did not set the nebulizing pressure during

the hydrodynamic injection because it negatively affected both the response and the migration time of the peaks.¹⁵ The drying gas flow rate was set at 10 l min⁻¹.

It has been reported that the sheath liquid is critical to the performance of the CZE-ESI interface. Therefore, we optimised its composition by varying the type (methanol, isopropanol and acetonitrile) and the percentage (20-90%) of organic solvent. Because the negative mode was used, ammonia was added to the sheath liquid to facilitate the electric contact. We tested values between 0.1 and 0.5% of ammonia and since we found no significant differences, we selected 0.1%. 2-NS was used as the reference compound. Figure 4 shows that an isopropanol–water mixture (80:20, v/v) in the presence of 0.1% ammonia results in the highest ion abundance signal.

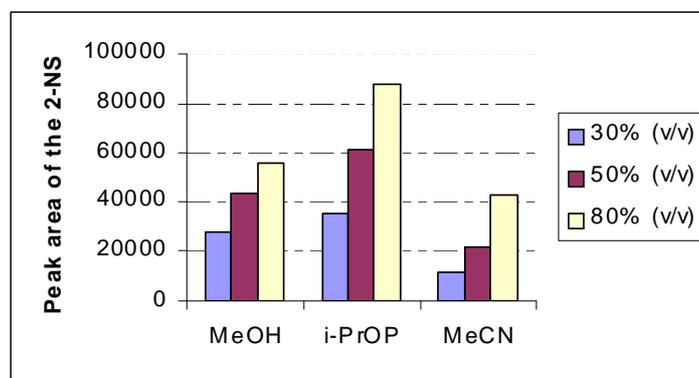


Figure 4 Effect of the type and the percentage of organic solvent in the composition of the sheath liquid. Studies were performed in the presence of 0.1% (v/v) ammonia.

The sheath flow was expected to dilute the CE sample zone as it passed concentrically around the CE column effluent and mixed with it. This effect

was investigated by varying the sheath flow rate and measuring the signal in the TIC, as the 2-NS ion ($m/z = 207$) eluted. Because only sheath flow rate values of 2-8 $\mu\text{l}/\text{min}$ produced a stable electrospray and no significant differences were observed over the range studied, 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ was selected as optimum in terms of signal response and stability.

In the CZE-ESI-MS experiments, the DAD detector was used to check the migration time of the analytes, and thus determine the absence of critical retroelution. We also examined the effect of applying an additional slight overpressure to reduce the analysis time or a back pressure to compensate for the effect of retroelution produced by the nebulizing pressure. Although we observed the expected effects in both cases, the resolution, peak shape and reproducibility of the separation was worse. Applying pressure might be used to an advantage in some situations,¹⁵ but it did not improve the quality of the separation in this case.

Figure 5 shows the total ion current (TIC) and the extracted ion current (EIC) electropherograms of a 50 mg l^{-1} AS standard solution. In order to evaluate the sensitivity of the method, an AS standard solution was injected into the CE capillary in varying amounts while the mass spectrometer was operated in the selected ion monitoring (SIM) mode. In SIM acquisition, the most abundant ion of each compound ($[\text{M}-\text{H}]^+$) was monitored. Using 2-NS as the model compound, the method was found to be linear throughout the 0.25–5 mg l^{-1} concentration range, with a correlation coefficient of 0.997. The limit of detection for 2-NS under the SIM mode was 0.1 mg l^{-1} . The detection sensitivity of CE-MS (SIM) was similar to that of CE-DAD. The repeatabilities, expressed as RSD ($n=3$), of the migration time and peak area were found to be about 3.5% and 10% respectively.

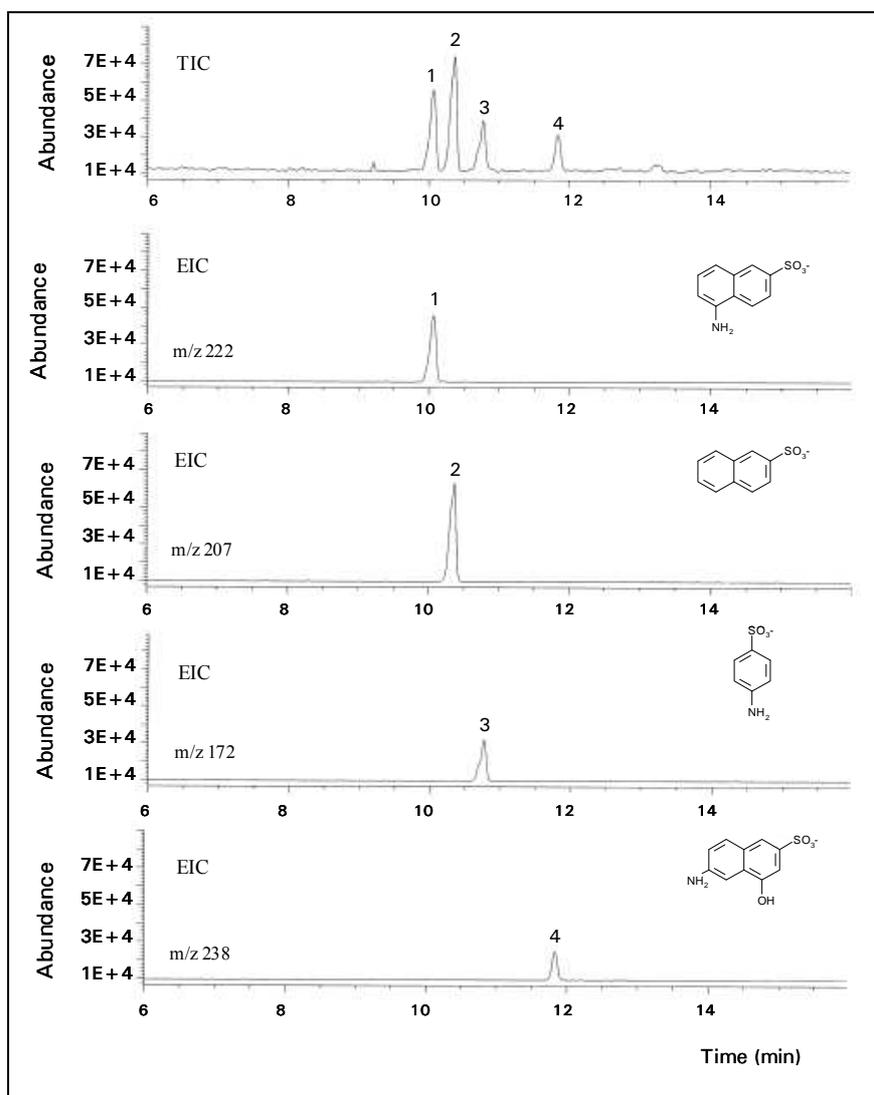


Figure 5 CE-ESI-MS total ion current (TIC) and extracted ion current (EIC) profiles for the base peak of the aromatic sulfonates ($50 \mu\text{g l}^{-1}$). Peak identification as in Figure 1. For conditions, see text.

When the river water sample was analysed using the DAD detector, we suspected the presence of 2-NS (Figure 6a) so we analysed it again using the MS detector. The analysis by CZE-ESI-MS produced a total ion current (TIC) electropherogram with two peaks (Figure 6b).

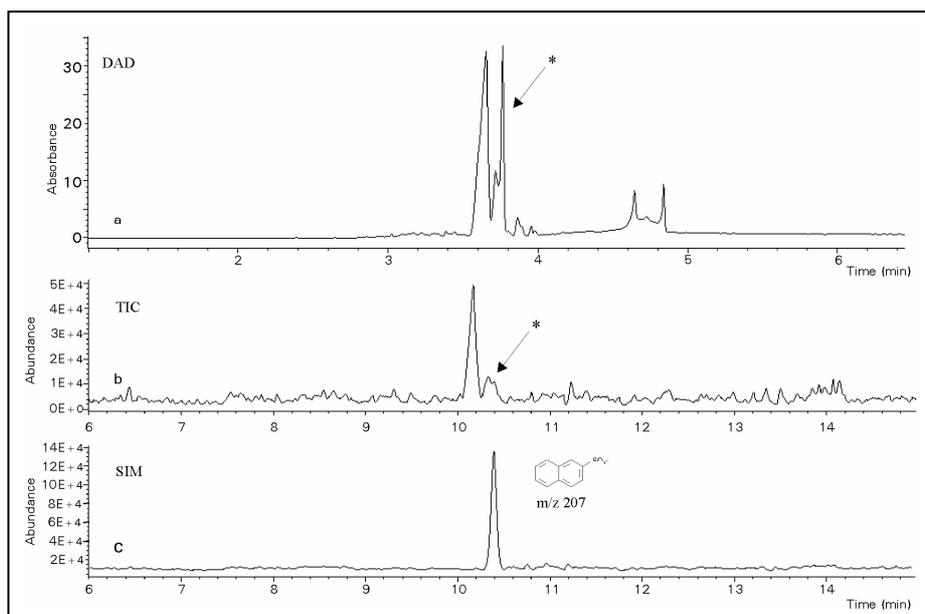


Figure 6 ITP-CZE-DAD electropherogram (a) and full scan total ion current, TIC, (b) and selected ion monitoring, SIM, (c) CZE-ESI-MS electropherograms of a river water sample containing 2-NS. For conditions, see text.

The spectra from those peaks were examined and appeared to contain the expected molecular ion of 207 m/z characteristic of 2-NS. The extracted ion current (EIC) electropherogram at 207 m/z gave a single peak at 10.5 minutes corresponding to this compound. The peak was also quantified in SIM acquisition (Figure 6c). The concentration was 2.1 mg l^{-1} with a standard deviation value of 15% ($n=3$). CE-MS cannot distinguish between the isomeric sulfonates 1-NS and 2-NS, because they cannot be separated by CZE and they have the same main ion (207 m/z). The other peaks that

appeared in the electropherogram could not be identified. When lower level concentrations of aromatic sulfonates are present in water samples, an enrichment procedure such as an isotachophoretic preconcentration should be used to lower the detection limits.

CONCLUSIONS

The results of the present paper clearly show for the first time that ITP focusing in a single-capillary mode is a suitable on-line enrichment procedure for aromatic sulfonates. The results also show that ITP-CZE can be applied to determine aromatic sulfonates in water samples. When water samples were analysed a SPE clean-up step was performed before the analysis to eliminate undesirable compounds from the sample matrix. The ITP method described is fully automated, reproducible and linear at low concentrations. A CZE-ESI-MS method was optimised, which enabled aromatic sulfonates to be identified and quantified in water samples. Mass spectrometry detection increases confidence in the identification of the compounds in water samples.

REFERENCES

- 1 D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis*, 21 (2000) 2768.
- 2 D. Martínez, M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65.
- 3 S.J. Kok, G.Ph. Hoornweg, T. De Ridder, U.A.Th. Brinkman, N.H. Velhorst, C. Gooijer, *J. Chromatogr. A*, 806 (1998) 355.

-
- 4 J. Kujt, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, *Electrophoresis*, 21 (2000) 1305.
 - 5 R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489A.
 - 6 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Analyst*, 126 (2001) 1312.
 - 7 N. J. Reinhoud, *Bioanalytical Capillary Electrophoresis*, PhD Thesis 1995.
 - 8 L. Krivankova, P. Bocek, *Capillary Isothacophoresis*, in: *High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques and Applications*. Ed. M. G. Khaledi. John Wiley & Sons, INC. 1998, USA, 251.
 - 9 F. Kvasnicka, M. Jaros, B. Gas, *J. Chromatogr. A*, 916 (2001) 131-142.
 - 10 N.J. Reinhoud, U.R. Tjarden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr. A*, 653 (1993) 303.
 - 11 S. Chen, S.W. Graves, M.L. Lee, *J. Microcolumn Separations*, 11 (1999) 341.
 - 12 S. Chen, M.L. Lee, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 816.
 - 13 P. Gerbauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 21 (2000) 3898.
 - 14 R. Loos, J. Riu, M.C. Alonso, D. Barceló, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1197.
 - 15 A. Martin Girardeau, M-F. Renou-Gonnord, *J. Chromatogr. B*, 742 (2000) 163.
 - 16 T. Soga, D.N. Heiger, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1236.
 - 17 J.A. Olivares N.T. Nguyen, C.R. Yonker, R.D. Smith, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1230.
 - 18 R.D. Smith, *International J. Mass Spectrom.* (2000) 509.
 - 19 S. Angelino, A. Bianco Prevot, M.C. Gennaro, E. Pramauro, *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 257-271.

- 20 H. Greim, J. Ahlers, R. Bias, B. Broecker, H. Hollander, H.-P. Gelbke, H.-J. Klimisch, I. Mangelsdorf, A. Paetz, N. Schön, G. Stropp, R. Vogel, C. Weber, K. Ziegler-Skylakakis, E. Bayer, *Chemosphere*, 28 (1994) 2203.
- 21 M.C. Alonso, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta*, 400 (1999) 211.
- 22 M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 487.
- 23 F.M. Everaerts, J.L. Beckers, T.P. Verheggen, *Isotachopheresis: Theory, Instrumentation and Practice*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
- 24 B. Thoussaint, Ph. Hubert, U.R. Tjarden, J. van der Greef, J. Crommen, *J. Chromatogr. A*, 871 (2000) 173.
- 25 N.J. Reinhoud, U.R. Tjarden, J. Van der Greef, *J. Chromatogr. A*. 673 (1994) 239.

CAPÍTOL IV

PERSPECTIVES FUTURES

Pel que fa als compostos en estudi, tal com s'ha exposat en el recull bibliogràfic sobre la seva determinació (capítol II, secció II.2) i en la part experimental (capítol III) de la present tesi, hi ha diversos mètodes que poden ser satisfactòriament emprats per separar-los mitjançant tècniques electroforètiques amb unes condicions d'anàlisi senzilles i una eficàcia de separació elevada.

El fet que aquests compostos no estiguin sotmesos a cap regulació, que hi hagi una gran varietat d'isòmers amb mobilitats electroforètiques molt semblants i que els autors utilitzin diferents barreges de compostos per fer els estudis, dificulta que es pugui recomanar una única tècnica electroforètica. Gairebé tots el mètodes descrits a la bibliografia donen bons resultats per separar barreges que continguin diferents compostos (no substituïts i substituïts amb diferents grups) amb sistemes electrolítics senzills. Però, quan en una barreja es tenen diferents isòmers d'un mateix compost, es fa necessari introduir de sistemes micel·lars o afegir ciclodextrines per tal d'aconseguir-ne la separació.

En aquest sentit, encara que són molt escasses les publicacions disponibles a la bibliografia i que per tant és difícil treure'n conclusions clares, tal vegada el desenvolupament de l'electrocromatografia capil·lar permeti resoldre barreges complexes d'aquests compostos ja que combina els avantatges de l'electroforesi capil·lar amb els de la cromatografia de líquids.

Una altra possibilitat és aprofundir en el desenvolupament de nous sistemes de separació, emprant, per exemple, tensioactius més específics, que siguin fàcils de manipular com ara els tensioactius no iònics i que es puguin utilitzar en concentracions més baixes.

Generalment en la determinació d'aquests compostos per CE es fan servir detectors poc selectius com els d'absorbància UV-visible de longitud d'ona fixa o de díodes en fila, i en alguns casos s'empren els detectors de fluorescència que, malgrat que són més selectius, no permeten identificar els compostos d'interès a baixes concentracions. Actualment per resoldre aquest problema es duen a terme nombrosos estudis: alguns autors estan desenvolupant nous sistemes de detecció per fluorescència induïda per làser i de fosforescència amb el doble objectiu de millorar la selectivitat i la sensibilitat de la tècnica en la determinació de compostos aromàtics sulfonats i de simplificar-ne l'ús i rebaixar el cost perquè puguin estar a l'abast de qualsevol laboratori. D'altres autors comencen a utilitzar l'acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses per tal de millorar la selectivitat de la tècnica.

Per tal de millorar la sensibilitat, en la majoria de treballs disponibles a la bibliografia s'utilitza l'extracció en fase sòlida com a sistema de pretractament i/o preconcentració de les mostres; malauradament té una aplicabilitat limitada a causa de la polaritat dels compostos aromàtics sulfonats. Actualment, l'extracció en fase sòlida amb addició de parells iònics continua sent la que dóna millors recuperacions per a la majoria de compostos aromàtics sulfonats. Aquest sistema d'extracció, però, no és adequat per treballar amb l'electroforesi capil·lar ja que els parells iònics poden modificar l'eficàcia de la separació, això fa que quan es treballa amb aquests sistemes sigui necessari introduir una etapa d'eliminació del parell iònic abans que tingui lloc la separació electroforètica. Per altra banda, l'extracció amb els sorbents polimèrics de darrera generació que poden ser utilitzats per a l'extracció dels compostos d'interès sense l'addició de parells iònics no permet extreure els compostos més polars, amb la qual cosa l'ús és limitat. Per tant, el desenvolupament de nous sorbents més selectius per

aquests tipus de compostos contribuiria a millorar la sensibilitat de l'electroforesi capil·lar i acostar-ne l'ús al de la cromatografia de líquids.

Recentment, diversos autors s'han interessat en l'aplicació de tècniques de preconcentració *on-capillary* per determinar a baixos nivells de concentració compostos aromàtics sulfonats per CE. Aquests sistemes encara no estan totalment desenvolupats per a aquests compostos i presenten certes limitacions, però els resultats obtinguts són prometedors i ofereixen, respecte a l'extracció en fase sòlida, l'important avantatge de permetre la preconcentració de qualsevol compost aromàtic sulfonat, independentment de la presència de determinats grups en la seva estructura. Conseqüentment, tant l'aprofundiment en l'ús d'aquest tipus de procediments, com d'altres (utilització de capil·lars de preconcentració acoblats als de separació, etc.) que s'han aplicat satisfactòriament en altres camps per millorar la sensibilitat de l'electroforesi capil·lar constitueixen un clar camí en l'aplicació d'aquesta tècnica en l'anàlisi mediambiental dels compostos d'interès.

CAPÍTOL V

CONCLUSIONS

Les conclusions derivades del treball realitzat en la present tesi doctoral són les següents:

1. L'electroforesi capil·lar és una tècnica que presenta un gran potencial de separació, com s'ha demostrat en el desenvolupament de diferents mètodes per separar diverses barreges de benzensulfonats i naftalensulfonats.
2. L'electroforesi capil·lar per zones en mode contraelectroosmòtic permet separar barreges complexes de BZS i NS monosulfonats i disulfonats que contenen diversos compostos no substituïts i substituïts amb diferents grups.
3. En aquest tipus de separacions, l'addició de solvents orgànics com l'etanol o l'isopropanol pot contribuir a millorar significativament la separació. Tot i amb això, l'addició d'aquests modificadors provoca un increment força significatiu del temps d'anàlisi que no es pot reduir modificant les condicions de separació (augmentant el voltatge i la temperatura).
4. L'electroforesi capil·lar per zones en mode coelectroosmòtic addicionant a l'electròlit modificadors de flux electroosmòtic com ara l'HDB, permet separar diversos compostos en un temps d'anàlisi significativament més curt.
5. L'electroforesi capil·lar per zones en mode coelectroosmòtic addicionant a l'electròlit modificadors de flux electroosmòtic (HDB o CTAB) i solvents orgànics, possibilita la separació de barreges de BZS i NS amb diversos isòmers d'un mateix compost.

6. La cromatografia micel·lar electrocinètica en mode contraelectroosmòtic amb tensioactius aniònics (SDS) o no iònics (Brij 35) també permet separar barreges de BZS i NS que contenen diversos isòmers d'un mateix compost. Dels diferents tensioactius examinats, el no iònic (Brij 35) és el que dona les millors separacions en temps d'anàlisi més curts.
7. La cromatografia micel·lar electrocinètica en mode coelectroosmòtic amb tensioactius catiònics com ara el CTAB no només contribueix a invertir el flux electroosmòtic sinó que introdueix interaccions addicionals que possibiliten separar isòmers, com ara els naftalendisulfonats no substituïts, que no es poden resoldre mitjançant cap altra de les tècniques electroforètiques aplicades.
8. S'ha demostrat la utilitat del *sample stacking* mitjançant la injecció de grans volums de mostra (LVSS) com a tècnica de preconcentració *on-capillary* per reduir els límits de detecció dels compostos en estudi. L'aplicació va permetre de reduir els límits de detecció d'entre 0.15 i 0.3 mg/l (corresponents a la injecció hidrodinàmica convencional) a 5 i 10 µg/l.
9. També se n'ha demostrat l'aplicabilitat en l'anàlisi de diverses mostres aquoses (d'aixeta, de riu, d'aigua superficial i dels afluents d'entrada i sortida d'una planta de tractament d'aigües residuals). El mètode també va ser validat per algunes d'aquestes mostres (aixeta i riu), amb les quals es van assolir uns límits de detecció lleugerament superiors als obtinguts en aigua Milli-Q, de 20 µg/l, a causa de la influència de la matriu de la mostra en el procés de

preconcentració. Es va identificar i quantificar el 5-NH₂-2-NS (aigua superficial) i el 2-NS (afluent d'entrada a la planta depuradora) en concentracions de 104 µg/l i 166 µg/l, respectivament.

10. L'ús de la isotacoforesi (ITP) com a tècnica de preconcentració *on-capillary* acoblada a la CZE també va permetre millorar considerablement la sensibilitat de l'electroforesi capil·lar, ja que va incrementar en 100 vegades el senyal del detector obtingut mitjançant la injecció hidrodinàmica convencional i assolir límits de detecció d'entre 3 i 5 mg/l.
11. Els diferents sorbents polimèrics altament entrecreuats disponibles comercialment que s'han emprat com a sistema de *clean-up* de les mostres analitzades mitjançant la ITP-CZE, han donat recuperacions superiors al 70% per a diversos naftalensulfonats; malauradament l'amino-benzensulfonat no es va poder recuperar amb cap dels sorbents.
12. La ITP-CZE també ha estat satisfactòriament aplicada a la determinació a baixos nivells de concentració dels compostos en estudi en mostres reals, ja que s'han obtingut uns límits de detecció lleugerament superiors als aconseguits en aigua Milli-Q, d'entre 5 i 10 µg/l, a causa de la influència de la matriu de la mostra en el procés de preconcentració. Es va identificar i quantificar el 2-NS en una concentració de 55 µg/l en un afluent d'una planta de tractament d'aigües residuals.

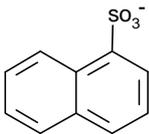
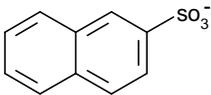
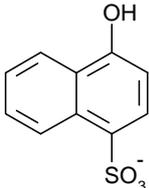
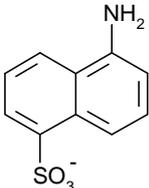
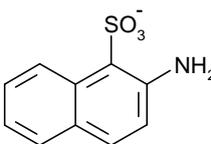
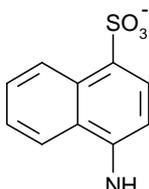
13. S'ha demostrat la possibilitat d'acoblar la l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses mitjançant una interfície d'electrosprai per determinar de BZS i NS. També s'ha demostrat la importància de l'optimització de diversos paràmetres experimentals com ara el fragmentor, la pressió del nebulitzador o la composició del líquid auxiliar per a l'acoblament CE-ESI-MS.

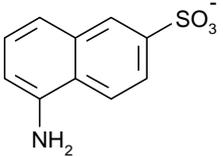
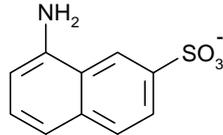
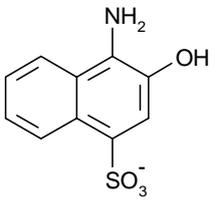
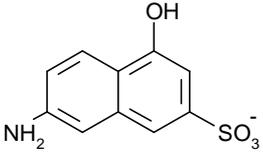
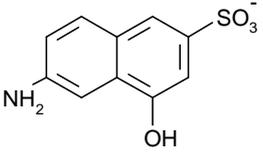
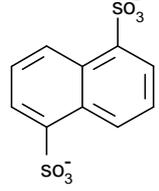
14. L'aplicació de la CZE-ESI-MS va permetre confirmar la presència del 2-NS en una mostra d'aigua de riu què prèviament havia estat analitzada per CZE-DAD sense poder-ne confirmar la presència per l'elució del compost d'interès amb un d'interferent. La CZE-ESI-MS no només va possibilitar identificar aquest compost sinó quantificar-lo en 2.1 mg/l.

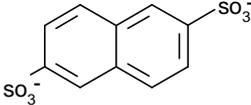
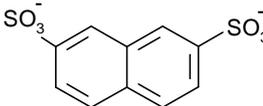
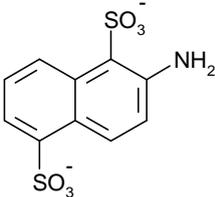
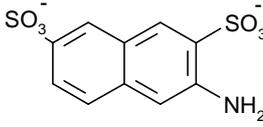
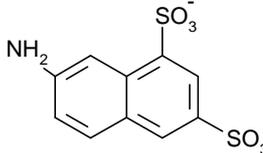
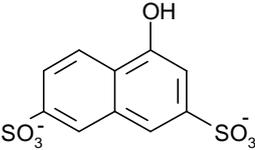
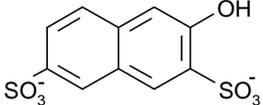
ANNEXOS

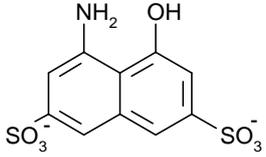
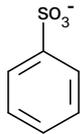
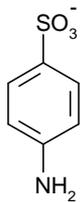
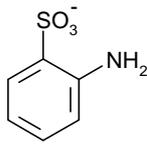
Annex I

Estructura dels compostos estudiats.

Compost	Abreviatura	Estructura
1-naftalensulfonat	1-NS	
2-naftalensulfonat	2-NS	
1-hidroxi-4- naftalensulfonat	1-OH-4-NS	
1-amino-5- naftalensulfonat	1-NH2-5-NS	
2-amino-1- naftalensulfonat	2-NH2-1-NS	
4-amino-1- naftalensulfonat	4-NH2-1-NS	

5-amino-2- naftalensulfonat	5-NH ₂ -2-NS	
8-amino-2- naftalensulfonat	8-NH ₂ -2-NS	
1-amino-2-OH-4- naftalensulfonat	1-NH ₂ -2-OH-4-NS	
6-amino-1-OH-3- naftalensulfonat	6-NH ₂ -1-OH-3-NS	
6-amino-4-OH-2- naftalensulfonat	6-NH ₂ -4-OH-2-NS	
1,5- naftalendisulfonat	1,5-NDS	

2,6- naftalendisulfonat	2,6-NDS	
2,7- naftalendisulfonat	2,7-NDS	
2-amino-1,5- naftalendisulfonat	2-NH2-1,5-NDS	
3-amino-2,7- naftalendisulfonat	3-NH2-2,7-NDS	
7-amino-1,3- naftalendisulfonat	7-NH2-1,3-NDS	
1-hidroxi-3,6- naftalendisulfonat	1-OH-3,6-NDS	
2-hidroxi-3,6- naftalendisulfonat	2-OH-3,6-NDS	

8-amino-1-hidroxi-3,6- naftalendisulfonat	8-NH ₂ -1-OH-3,6-NDS	
benzensulfonat	BZS	
3-amino- benzensulfonat	3-NH ₂ - BZS	
2-amino- benzensulfonat	2-NH ₂ - BZS	
4-hidroxi- benzensulfonat	4-OH- BZS	

Annex II.

Els treballs sorgits de la present tesi, inclosos en els capítols II i III, s'han publicat o estan pendents de publicació en les següents revistes:

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *An overview of electrophoretic methods for the determination of benzene- and naphthalenesulfonates in water samples*, Trends Anal. Chem., 20 (2001) 487-499.

D. Martinez, M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Solid-phase extraction coupling to capillary electrophoresis with emphasis on environmental analysis*, J. Chromatogr. A, 902 (2000) 65-69.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Comparative study of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography applied to the separation of twelve aromatic sulphonate compounds*, Chromatographia, 46 (1997) 204-208.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Evaluation of coelectroosmotic capillary zone electrophoresis for the rapid analysis of twelve aromatic sulphonate compounds*, Chromatographia, 49 (1999) 261-267.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Separation of aromatic sulphonate compounds by means of coelectroosmotic micellar electrokinetic chromatography*, Chromatographia, 50 (1999) 229-234.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Comparative study of capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic capillary chromatography for the separation of naphthalenedisulfonate isomers*, *Analyst*, 125 (2000) 2236-2240.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Large-volume sample stacking used as on-capillary sample enrichment to analyse naphthalene- and benzenesulfonates in real water samples by capillary zone electrophoresis*, *Analyst*, 126 (2001) 1312-1317.

M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *Isotachophoretic focusing and mass spectrometry detection as tools of aromatic sulfonates in capillary electrophoresis for improving the determination*, *Electrophoresis*, pendent d'acceptació.