



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

Departament de Química Analítica i Química Orgànica

**TÈCNIQUES DE PRECONCENTRACIÓ  
COMBINADES AMB L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR  
PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS  
 $\beta$ -LACTÀMICS**

**Dissertation presented by  
PATRICIA PUIG GUIRAL  
to receive the degree  
Doctor of the Rovira i Virgili University  
European PhD  
Tarragona, 2007**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



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

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

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

**CERTIFIQUEM:**

Que la present Tesi Doctoral, que porta per títol: "TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ELECTROFORESI CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS  $\beta$ -LACTÀMICS", presentada per PATRICIA PUIG GUIRAL per optar al grau de Doctor per la Universitat Rovira i Virgili amb menció europea, ha estat realitzada sota la nostra direcció, a l'Àrea de Química Analítica del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta universitat, i que tots els resultats presentats són fruit d'experiències realitzades per l'esmentada doctoranda.

I, per a que consti, expedim aquest certificat a Tarragona, 4 de juny de 2007.

Dra. Marta Calull i Blanch

Dra. Carme Aguilar i Anguera

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

*Un cop finalitzada la redacció de la Tesi Doctoral, m'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han contribuït i han fet possible la seva realització i especialment:*

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

*I would like to thank Professor Dr. Gerhardus J. de Jong and Dr. Govert W. Somsen from the University Utrecht for their kind attention during my stay in their laboratories and also their scientific advice and valuable help. I would also like to thank all the members of their research group for their guidance and, especially to Linda for her hospitality and Paul, Javi and Rawi for their friendship. You know that I will never forget you, dank jullie wel vor alles. I would like also to thank Xander for introducing me in the on-line SPE-CE "world", I could not do it alone! Thank you also for the interesting talks about science and life.*

*Gràcies al Dr. José Barbosa, la Dra. Victòria Sanz-Nebot, el Dr. Fernando Benavente i la Sra. Elena Hernández de la Universitat de Barcelona pel seu interès i ajuda en un dels treballs presentats en aquesta Tesi que ha estat realitzat amb la seva col·laboració.*

*Els meus agraïments a tots els components del meu grup d'investigació, els que m'han precedit i els darrers en arribar. Tots vosaltres heu estat de gran ajuda a l'hora de resoldre molts dels dubtes i problemes que he tingut en els anys de realització de la Tesi. Gràcies/Thank you/Gracias.*

*Pels bons moments científics i personals voldria agrair especialment a la Rosana, Núria, Lúdia, Ester, Sandra i Enric. M'heu demostrat que, apart de ser molt bons científics, també sou molt bons amics. M'heu recolzat quan els ànims han caigut i m'heu donat molts consells en l'àmbit professional. A l'Alba li voldria dedicar unes línies molt especials, agraint-li les nostres xerrades que sovint mesclaven la part electroforètica amb la personal.*

*També voldria tenir present a tots els meus companys del Grup Pintaluba per tota l'ajuda rebuda en els darrers mesos d'aquesta Tesi.*

*En aquest punt, voldria incloure a la meva família, especialment els meus pares. Tot i que hi són conscients, els hi he d'agrair públicament el seu suport incondicional i ànims al llarg d'aquests anys.*

*Finalment, i no menys important, està la persona que més ha patit i gaudit de les penes i alegries d'aquesta etapa. Manolo, gràcies per fer-me costat en tot moment. Gràcies per estar aquí.*

*A tots vosaltres, us ho agraeixo de tot cor.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

**ÍNDEx** |

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



<b>OBJECTIU / OBJECTIVE</b> .....	1
<b>1 INTRODUCCIÓ</b> .....	5
1.1 Antibiòtics .....	9
1.1.1 Definició i classificació.....	10
1.1.2 Aplicacions.....	11
1.1.3 Legislació .....	13
1.2 Antibiòtics $\beta$ -Lactàmics .....	15
1.2.1 Estructura i classificació.....	15
1.2.2 Determinació de penicil·lines per CE .....	19
1.2.3 Determinació de cefalosporines per CE .....	24
1.3 Estratègies per augmentar la sensibilitat en electroforesi capil·lar .....	28
1.3.1 Tècniques de preconcentració electroforètiques .....	29
1.3.2 Tècniques de preconcentració cromatogràfiques .....	39
1.4 <i>Recent advances in coupling between solid phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE)</i> .....	59
1.5 Bibliografia.....	93
<b>2 PART EXPERIMENTAL I RESULTATS / EXPERIMENTAL PART &amp; RESULTS</b> .....	105
2.1 Separació de $\beta$ -lactames i preconcentració electroforètica per cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica.....	111

2.1.1	<i>Sample stacking for the analysis of eight penicillin antibiotics by micellar electrokinetic capillary chromatography.....</i>	117
2.2	Separació de $\beta$ -lactames i preconcentració electroforètica per cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica..	133
2.2.1	<i>Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography.....</i>	141
2.2.2	<i>Strategies for analyzing cephalosporins by microemulsion electrokinetic chromatography.....</i>	161
2.3	Aplicació de l'extracció en fase sòlida a la determinació de $\beta$ -lactames .....	179
2.3.1	<i>CE analysis of cephalosporins in environmental waters.....</i>	185
2.4	Acoblament <i>in-line</i> de l'extracció en fase sòlida i l'electroforesi capil·lar per a la determinació de $\beta$ -lactames..	195
2.4.1	<i>Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques.....</i>	201
2.5	Acoblament <i>on-line</i> de l'extracció en fase sòlida i l'electroforesi capil·lar per a la determinació de $\beta$ -lactames..	219
2.5.1	<i>On-line coupling of solid-phase extraction and capillary electrophoresis for the determination of cefoperazone and ceftiofur in plasma.....</i>	225
2.6	Combinació de tècniques electroforètiques i cromatogràfiques de preconcentració per a la determinació de $\beta$ -lactames <i>per electroforesi capil·lar .....</i>	239

2.6.1 <i>Use of stacking principles in on-line solid-phase extraction—capillary electrophoresis for improved sensitivity</i> .....	245
<b>3 RESULTATS I DISCUSSIÓ / RESULTS AND DISCUSSION</b> .....	263
<b>4 CONCLUSIONS / CONCLUSIONS</b> .....	285
<b>ANNEXOS</b> .....	293
I. Estructura química i acrònim de les penicil·lines estudiades .....	295
II. Estructura química i acrònim de les cefalosporines estudiades....	297
III. Abreviacions .....	298
IV. Publicacions .....	300

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

**OBJECTIU**

***OBJECTIVE***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

La present Tesi Doctoral té com a objectiu principal el desenvolupament i aplicació de tècniques de preconcentració electroforètiques i cromatogràfiques amb la finalitat d'augmentar la sensibilitat en electroforesi capil·lar per a la determinació d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics. Dins d'aquest objectiu principal és important destacar la combinació de les tècniques de preconcentració electroforètiques i cromatogràfiques emprant fonamentalment acoblaments en línia de l'extracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar.

*The main aim of the present thesis is to develop and apply electrophoretic and chromatographic preconcentration techniques to make capillary electrophoresis more sensitive at determining  $\beta$ -lactam antibiotics. It is worth emphasizing that both these preconcentration techniques can be combined by using on-line coupling between solid phase extraction and capillary electrophoresis.*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



## 1. INTRODUCCIÓ



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

En els darrers anys, com a conseqüència de l'ús cada cop més extens dels antibiòtics, han aparegut alguns efectes perjudicials derivats de la seva àmplia utilització tant en medicina humana com en veterinària. La problemàtica radica en la presència d'aquests compostos en el medi ambient i en els aliments procedents dels animals tractats amb aquests fàrmacs.

Mentre que l'administració dels antibiòtics en medicina humana es destina a combatre malalties infeccioses, en la indústria alimentària dedicada a la producció animal, apart de la finalitat terapèutica, aquests fàrmacs també s'han emprat com a promotors del creixement.

Quan una persona o animal pren un medicament, gran part del compost actiu no és completament metabolitzat i, conseqüentment, aquest s'excreta a través de l'orina i de la matèria fecal. És d'aquesta manera com poden arribar a les aigües residuals que van a parar a les plantes depuradores per a ser tractades. El problema és que generalment els tractaments existents en aquestes plantes no eliminen totalment els residus farmacològics. Això provoca una problemàtica en la reutilització de l'aigua ja que aquests residus acaben arribant a rius, llacs o mars i al final, encara que en quantitats molt petites, fins i tot poden acabar arribant a l'aigua d'aixeta. A més, en el cas dels animals, aquests residus també es poden trobar en els diferents teixits destinats al consum humà. Així doncs, arran d'aquestes dues vies a través de les quals aquests antibiòtics poden incorporar-se a la cadena d'alimentació sorgeix un risc potencial per a la salut humana. Aquest risc està associat principalment a l'hipersensibilitat d'alguns individus a aquests compostos i/o a altres metabòlits i en un increment de la resistència de certs bacteris patògens als antibiòtics. Per tot això, és molt important la vigilància d'aquests residus de medicaments i en aquest sentit, per tal de poder dur a terme el control sobre la presència d'antibiòtics en el medi ambient i sobre els productes animals destinats al consum humà és necessari el desenvolupament de metodologies analítiques apropiades.

Entre aquestes metodologies, les primeres que es van desenvolupar es van bassar en assaigs microbiològics. Les tres grans limitacions d'aquests són que normalment tenen un manca d'especificitat i sensibilitat que impossibilita la detecció dels residus a baixos nivells, que inhibidors del creixement dels microorganismes del cultiu no específics poden afectar al desenvolupament del mètode i al llarg temps d'anàlisi associat ja que sovint necessiten 24 o més hores d'incubació [1-4].

Les tècniques cromatogràfiques han estat les més emprades en l'anàlisi d'antibiòtics en tot tipus de mostres, essent la cromatografia de gasos i la de líquids les més utilitzades [5-18]. Respecte als mètodes basats en l'ús de la cromatografia de gasos, cal remarcar que presenten límits de detecció apropiats per a realitzar el control de residus però la seva aplicació de rutina no és fàcil en molts casos ja que és necessària una etapa de derivatització prèvia degut a les característiques polars d'aquests antibiòtics [6,14]. D'altra banda, la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) és la tècnica més emprada per a l'anàlisi d'aquests compostos en tot tipus de matrius [7,11,15-18].

Com a tècnica alternativa a la cromatografia, l'electroforesi capil·lar (CE) s'ha convertit en els darrers anys en una eina útil i àmpliament emprada per a la determinació d'antibiòtics en anàlisis farmacèutiques degut als avantatges que presenta respecte les tècniques cromatogràfiques com són l'elevada resolució i velocitat i petita quantitat de mostra requerida [14]. Entre els diferents modes d'operació, l'electroforesi capil·lar per zones (CZE) i la cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica (MEKC) han estat utilitzades àmpliament per la determinació de diferents famílies d'antibiòtics com sulfonamides, tetraciclins i  $\beta$ -lactams [19,20]. A més, recentment s'han introduït altres tècniques electroforètiques com la cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica, l'electroforesi d'afinitat, l'electroforesi capil·lar en medi no aquós i l'electrocromatografia capil·lar que també s'han aplicat a l'anàlisi d'antibiòtics [14,19-25]. La principal limitació de l'electroforesi capil·lar en l'anàlisi de fàrmacs és la baixa sensibilitat que

presenta respecte a les tècniques d'anàlisi cromatogràfiques degut a les reduïdes dimensions dels capil·lars que s'empren, generalment amb diàmetres interns entre 25 i 100  $\mu\text{m}$ . Aquest fet està relacionat amb la finestra de detecció UV que presenta un camí òptic molt limitat i també amb el volum de mostra injectat que és molt petit [26,27].

Per tal de minimitzar la problemàtica de la baixa sensibilitat de l'CE, s'han presentat diferents alternatives. D'entre aquestes es poden destacar l'augment de la quantitat d'analit introduïda en el capil·lar i la millora de la sensibilitat del detector. Pel que fa al sistema de detecció, existeixen diferents estratègies com són la utilització de capil·lars modificats de manera que la forma del capil·lar presenta un diàmetre intern més gran en la zona de la cel·la de detecció, o bé emprar altres sistemes de detecció com poden ser la fluorescència induïda per làser (LIF) i la detecció per espectrometria de masses. Per altra banda, l'augment de la quantitat d'analit present en el capil·lar es pot aconseguir utilitzant dos tipus de tècniques: electroforètiques i cromatogràfiques. Les tècniques electroforètiques es basen en la preconcentració dels analits com a conseqüència de les diferències de mobilitat d'aquests entre la matriu de la mostra i l'electrolit de separació [27-32]. Aquestes tècniques electroforètiques també es coneixen com a tècniques de preconcentració en el capil·lar, tècniques de preconcentració *on-column* o *in-capillary*. Les tècniques cromatogràfiques es basen, fonamentalment, en la retenció i posterior elució dels analits en un sorbent d'extracció en fase sòlida [33-36]. En els darrers anys, l'interès en la combinació de l'extracció en fase sòlida (SPE) com a tractament previ a l'CE s'ha dirigit cap a l'automatització dels diferents acoblaments presentats.

## 1.1. ANTIBIÒTICS

La utilització dels agents antimicrobians en la terapèutica de les malalties infeccioses ha constituït un esdeveniment sense precedents, ja que la curació i control de les infeccions va permetre modificar favorablement el panorama de la mortalitat en adults, tant humans com animals.

Una vista retrospectiva ens permet veure l'evolució d'aquests medicaments. A l'any 1877 es va reconèixer el potencial que tenien els microorganismes com agents terapèutics. Més tard, Paul Ehrlich va ser capaç d'establir les relacions químiques específiques entre els paràsits i els medicaments. Amb aquestes bases es va desenvolupar l'era moderna de la terapèutica antimicrobiana que començà l'any 1934. Set anys després va començar l'anomenada "Edat d'Or" dels antibiòtics amb la producció, a nivell industrial, de la penicil·lina [19]. Actualment es coneixen més de 5000 antibiòtics, no només d'origen natural, sinó també semisintètics i sintètics [37].

### 1.1.1. Definició i classificació

En principi, antibiòtic (del grec, anti , "contra", bios, "vida") és qualsevol substància produïda per un microorganisme que és capaç de destruir bacteris o inhibir la seva reproducció sense destruir les cèl·lules de l'organisme on es troben. Tots els antibiòtics tenen una propietat comuna, el que es coneix com toxicitat selectiva, és a dir, tenen efecte sobre els patògens invasors i són innocus per als éssers vius que han rebut l'atac bacteriològic.

Hi ha diferents formes de classificació d'aquests compostos en funció del criteri escollit.

- Segons el seu origen es poden classificar com a naturals si provenen directament de microorganismes, semisintètics si s'introdueix alguna modificació química als naturals i sintètics si són sintetitzats químicament.
- En funció de la seva estructura química els grups més importants són:  $\beta$ -lactames, aminoglicòsids, tetraciclins, macròlids, sulfonamides, quinolones i lincosamides.

- Si ens basem en l'efecte bacterià trobem els antibiòtics bacteriostàtics quan s'inhibeix la multiplicació del bacteri i els bactericides si tenen un efecte letal sobre els microorganismes.
- Pel que fa a l'espectre bacterià, els antibiòtics poden ser d'espectre ampli o l'espectre pot estar limitat a un tipus concret de bacteris.
- Si tenim en compte el mecanisme d'acció podem diferenciar aquells que tenen la capacitat d'actuar sobre la paret bacteriana del patogen, els que actuen sobre els ribosomes bacterians, els que ho fan sobre la membrana plasmàtica i els que inhibeixen la síntesi de l'àcid fòlic i dels àcids nuclèics [38].

### 1.1.2. Aplicacions

La utilització dels antibiòtics en medicina humana té dues finalitats principals: profilàctica i terapèutica. En altres paraules, això significa que estan destinats a evitar atacs infecciosos en l'organisme dels pacients susceptibles. És per aquesta raó que se solen subministrar en tractaments pre- i post-operatoris. Per altra banda, terapèuticament parlant, tenen l'objectiu de combatre les infeccions en pacients que ja han desenvolupat aquesta patologia. La utilització dels antibiòtics en medicina veterinària va començar poc després de la seva aplicació en medicina humana. Els antibiòtics, en els animals, apart de ser emprats amb els mateixos objectius que en humans, també s'han utilitzat com a promotors del creixement per tal de disminuir el cost de les produccions, tot i que, en l'actualitat no es permet l'administració de fàrmacs amb propòsits no medicinals.

Els mecanismes mitjançant els quals els antibiòtics acceleren el creixement i afavoreixen un augment de pes no es coneixen bé. Es creu que la forma en la que promouen el creixement es deu a l'eliminació d'organismes causants d'infeccions subclíniques, a la reducció de substàncies tòxiques, com l'amoniac, que retarden el creixement, i a la menor destrucció i competència

per nutrients en el tracte gastrointestinal per part dels microorganismes. Com a conseqüència, existeix una major capacitat d'adaptació dels animals als canvis d'alimentació i una disminució de les malalties causades pel transport i els canvis d'ambient, amb el que s'obtenen guanys de pes més grans, amb menor quantitat d'aliment consumit, en períodes menors de temps. Segons Miller *et al.* [39] la utilització d'antibiòtics amb un ús subterapèutic pot augmentar fins un 9% els beneficis dels ramaders.

Malgrat els beneficis associats amb la utilització dels antibiòtics, el seu ús generalitzat en medicaments veterinaris i humans i la seva utilització, de vegades inadequada, han derivat en una problemàtica sanitària de rellevant importància.

Així doncs, en els darrers anys, s'ha detectat la presència d'antibiòtics en el medi ambient com a conseqüència de que una part dels fàrmacs utilitzats no són completament metabolitzats pel pacient o animal i s'eliminen de l'organisme mitjançant excrecions fecals o orina. D'aquesta manera arriben a les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) on sovint la seva eliminació no és completa i van a parar al medi ambient aquàtic podent arribar a aigües destinades a consum humà.

Els antibiòtics també poden arribar a l'espècie humana a través de la cadena d'alimentació a través de la ingestió de productes com ous, llet, múscul i fetge d'entre altres, que provenen d'animals als que s'han subministrat aquests fàrmacs.

La presència dels antibiòtics en l'individu humà ha contribuït al desenvolupament de resistències dels patògens a aquests compostos. Aquesta resistència és un problema que s'ha anat agreujant, sobretot en les darreres dècades a mesura que s'han anat sintetitzant nous antimicrobians. La resistència bacteriana és un mecanisme pel qual una soca microbiana perd la sensibilitat a un determinat antibiòtic que abans era eficaç contra



ella. Això es deu a que el bacteri canvia el seu material genètic induint una modificació que el fa resistent als antibiòtics.

Per altra banda existeix el problema dels residus d'aquests medicaments tant en aigües com en productes finals dels animals destinats al consum humà. Així doncs, quan una persona és sensible a un determinat antibiòtic, la ingestió de begudes, carn o productes làctics amb residus d'antibiòtics pot ocasionar-li al·lèrgia a aquest medicament.

### 1.1.3. Legislació

La legislació vigent en diferents països respecte als residus d'antibiòtics procedents tant de la seva utilització per a medicina humana com veterinària està centrada, exclusivament, en establir limitacions en la presència d'aquests compostos en productes destinats al consum humà. En l'actualitat, s'està estudiant la seva presència en el medi ambient però aquesta encara no està regulada per cap organisme oficial.

Amb l'objectiu d'evitar problemes d'inducció de resistències o de residus en els aliments, els organismes que tenen competència en matèria de salut pública, com la Unió Europea i la *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) han establert llistes de límits màxims de residus d'antibiòtics en aliments per a consum humà [40]. També s'han regulat els antibiòtics que poden ser utilitzats com additius en l'alimentació animal [25, 26] tot i que, a partir del 2006, aquests només poden ser afegits al pinso per raons de medicina veterinària, excloent la seva utilització com a promotors del creixement.

El Reglament 90/2377/EEC del Consell Europeu, del 26 de juny de 1990, defineix el límit màxim de residus (MRL) com el contingut màxim de residus legalment autoritzat per la Unió Europea que es pot trobar en un producte alimentari [40]. Els MRL es fixen per a cada espècie animal i dintre d'aquestes, per a cada teixit. D'aquesta manera, el valor del MRL de tota

substància farmacològicament activa quedarà fixat com una parella composta per un residu marcador i el teixit diana corresponent per a cada espècie animal productora d'aliments. Per a garantir que la concentració residual dels antibiòtics no sigui superior al corresponent MRL, és necessari establir un temps d'espera. Aquest temps és el període de temps que ha de transcórrer des de l'últim tractament farmacològic fins el sacrifici dels animals per a poder consumir la seva carn o comercialitzar els seus productes (llet, ous) [41]. Cal destacar que els MRLs proposats per la JECFA són valors recomanats, mentre que els proposats per la Unió Europea tenen un caràcter legislatiu [37].

La Directriu del Consell 96/23/EEC relativa a les mesures de control aplicables a determinades substàncies i els seus residus en els animals i els seus productes obliga als estats membres a elaborar un Pla Nacional d'Investigació de Residus. A Espanya aquesta Directriu s'ha adoptat a través del Real Decret 1749/1998 del 31 de juliol. Aquest pla té per objecte detectar la utilització de substàncies o productes prohibits en els animals. També controla la utilització de substàncies o productes autoritzats per a fins diferents a les establertes en la seva autorització o en diferents condicions. Un altre objectiu és comprovar que els residus dels medicaments veterinaris compleixen amb els límits màxims de residus fixats reglamentàriament.

En altres països que no pertanyen a la Unió Europea també es controla la presència dels residus en aquest tipus de productes. Per exemple, als Estats Units la responsabilitat d'aquests afers recau en tres agències governamentals, la *US Food and Drug Administration* (FDA), el *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) del Departament d'Agricultura i la *US Environmental Protection Agency* (USEPA).

En vista de la legislació vigent referent a la matèria de seguretat alimentària i de l'interés en la presència d'aquests antibiòtics en el medi ambient, cal desenvolupar metodologies analítiques que permetin determinar residus

d'antibiòtics en un ampli ventall de matrius en molts casos a baixos nivells de concentració.

## 1.2. ANTIBIÒTICS $\beta$ -LACTÀMICS

Els antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, que actuen inhibint l'última etapa de la síntesi de la paret bacteriana, constitueixen la família més nombrosa d'antimicrobians, i la més emprada en la pràctica clínica. Es tracta de compostos d'acció bactericida lenta, relativament independents de la concentració plasmàtica, que presenten escassa toxicitat i tenen un ampli marge terapèutic.

### 1.2.1. Estructura i classificació

Químicament, es caracteritzen per tenir en la seva estructura un anell  $\beta$ -lactàmic que està format per tres àtoms de carboni i un àtom de nitrogen (veure Figura 1.1). Dintre d'aquesta família hi ha diferents grups: penicil·lines i cefalosporines, que són les més importants; inhibidors de les  $\beta$ -lactamases; i carbapenems i monobactames que són considerats com noves  $\beta$ -lactames [42,43]. La present Tesi Doctoral s'ha centrat en l'estudi de les dues famílies més importants de  $\beta$ -lactames, les penicil·lines i les cefalosporines.

#### *Penicil·lines*

Estructuralment parlant, les penicil·lines consten generalment de dues parts: per una banda l'àcid 6-aminopenicil·lànic, que resulta de la unió d'un anell de tiazolidina i un anell  $\beta$ -lactama, i per una altra banda una cadena lateral, unida al carboni en posició 6 situat a l'anell  $\beta$ -lactàmic [43]. En la Figura 1.1 es pot veure l'estructura general de les penicil·lines i en l'Annex I es troben representades les estructures de les penicil·lines regulades per la Unió Europea.

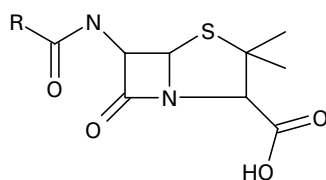


Figura 1.1. Estructura general de les penicil·lines

L'activitat biològica es centra en l'anell  $\beta$ -lactàmic de manera que si aquest anell és destruït per les  $\beta$ -lactamases, el producte resultant no presenta activitat antibacteriana.

Respecte al mecanisme d'acció de les penicil·lines, aquestes actuen interferint en la síntesi de la paret bacteriana. En les dosis adequades són bactericides però també poden actuar com antibiòtics bacteriostàtics a dosis inferiors.

Segons l'espectre d'activitat antimicrobià, les penicil·lines es poden classificar en diferents grups: grup penicil·lina G, grup d'espectre ampliat i resistents a les  $\beta$ -lactamases.

### *Cefalosporines*

Estan produïdes principalment per dos fongs, el *Cephalosporium acremonium* i el *Cephalosporium Salmosynematum*. Aquests fongs sintetitzen les anomenades cefalosporines naturals que són la cefalosporina P, la N i la C i d'aquestes es deriven les semisintètiques que s'utilitzen en terapèutica. En general, les cefalosporines tenen un major espectre d'activitat que les penicil·lines ja que són actives contra els microorganismes gramnegatius i són més resistents a les  $\beta$ -lactamases. No obstant, les cefalosporines tenen més efectes tòxics i un major cost econòmic.

El nucli actiu de les cefalosporines és l'àcid 7-aminocefalosporànic, l'estructura química del qual és similar a l'àcid 6-aminopenicil·lànic. Tenen un anell  $\beta$ -lactàmic, i en lloc de l'anell pentagonal de la tiazolidona de les penicil·lines, tenen un anell hexagonal de dihidrotiazina. En el cas de modificacions en l'anell  $\beta$ -lactàmic, s'altera l'activitat antibacteriana i en el cas de modificar l'anell de dihidrotiazina es realitzen canvis en el metabolisme i en les propietats farmacocinètiques de les drogues [44]. En la Figura 1.2 es mostra l'estructura general de les cefalosporines i en l'Annex II es troben les estructures químiques de les cefalosporines estudiades en la present Tesi Doctoral regulades per la Unió Europea.

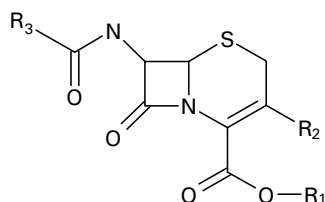


Figura 1.2. Estructura general de les cefalosporines

Les cefalosporines són antibiòtics bactericides d'àmpli espectre i el mecanisme d'acció és molt similar al de les penicil·lines, interfereixen en la síntesi i unió dels peptidoglicans, components essencials de la paret bacteriana. És un grup molt heterogeni i la seva classificació en generacions, basada en les propietats estructurals, microbiològiques i desenvolupament històric, és la més utilitzada i pràctica [45,46]. Mentre que la primera de les quatre generacions presenta una activitat satisfactòria contra els bacteris grampositius i moderada contra els gramnegatius, la segona té una cobertura més àmplia contra els gramnegatius però l'activitat contra els positius és més baixa. La principal característica de la tercera generació és l'àmpli espectre que presenten contra els bacteris gramnegatius (excepte la cefoperazona) i la seva capacitat per arribar al sistema nerviós central. La

quarta i última generació es caracteritza per evitar l'atac de les  $\beta$ -lactamases que inactiven les cefalosporines de tercera generació.

### *Determinació de $\beta$ -lactames*

Per a la determinació de  $\beta$ -lactames la tècnica més emprada ha estat la cromatografia de líquids, si bé també s'han utilitzat en gran mesura les tècniques electroforètiques i també hi ha mètodes basats en la cromatografia de gasos.

Respecte a la cromatografia de gasos, la seva utilització en la determinació de fàrmacs, i concretament per  $\beta$ -lactames, està poc estesa degut a la necessitat de procediments de derivatització previs a l'anàlisi per GC per a augmentar la volatilitat dels analits [6,14,47].

Pel que fa a la cromatografia de líquids, s'han descrit molts mètodes que empren aquesta tècnica per a la determinació d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics en diferents matrius. En aquests mètodes, tot i que s'ha utilitzat àmpliament la detecció UV [48-56], en l'actualitat la tendència habitual pels nombrosos avantatges que ofereix és l'ús de l'espectrometria de masses com a sistema de detecció [56-64].

D'altra banda, tenint en compte les característiques àcides i bàsiques d'aquests tipus de compostos, la utilització de l'electroforesi capil·lar per a la determinació d'aquests fàrmacs esdevé una alternativa interessant a les tècniques cromatogràfiques. Tots aquests antibiòtics tenen una part àcida (amb un grup carboxílic) i alguns d'ells una part bàsica (amb un grup amina), cosa que fa possible la protonació o desprotonació del compost i la seva separació electroforètica.

### 1.2.2. Determinació de penicil·lines per CE

En general, les diferències estructurals existents entre els compostos que pertanyen a la família de les penicil·lines són mínimes i això fa que, electroforèticament, tinguin un comportament molt semblant. Així doncs, el mode electroforètic més habitual per a dur a terme la seva separació és la cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica (MEKC) encara que també es troben referències en que es realitza la separació per electroforesi capil·lar per zones (CZE), electroforesi capil·lar en mode no aquós (NACE) i cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica (MEEKC).

En el cas dels mètodes basats en l'CZE amb detecció UV, els electròlits de treball més emprats han estat amortidors com el borat sòdic [22,65,66] o el fosfat sòdic [67,68], majoritàriament a pH bàsic (al voltant de 8-9), tot i que també s'han emprat per a treballar en condicions de supressió del flux electroosmòtic a pH àcid [69]. Quan la detecció s'ha realitzat per espectrometria de masses, s'ha emprat l'acetat amònic per les seves característiques que el fan molt idoni per aquest sistema de detecció doncs cal emprar tampons volàtils per a que no hi hagi obstrucció de la interfície [21,70,71]. En alguns d'aquests estudis i degut al fet de l'elevada similitud entre les penicil·lines, ha estat necessària l'addició de modificadors, com ciclodextrines o solvents orgànics [21,68] a l'electròlit de treball.

En el cas de que les mobilitats dels compostos a analitzar siguin prou diferents o quan només es determina un antibiòtic es prefereix utilitzar la CZE per la seva simplicitat i menor temps d'anàlisi. Així doncs, en la determinació d'amoxicil·lina en plasma porcí [14,22], es va preferir aquest mode a la MEKC ja que malgrat que per les dues tècniques es va observar una eficàcia adequada, la no presència d'interferències i una sensibilitat similar; quan s'emprava MEKC el temps d'anàlisi era lleugerament superior. En l'anàlisi de mostres de plasma, degut a la complexitat de la matriu de la mostra, es va emprar una etapa de pretractament basada en l'SPE amb un sorbent de tipus C<sub>18</sub>. La sensibilitat del mètode es va millorar amb l'addició

d'una tècnica de preconcentració electroforètica, fet que va permetre assolir un límit de detecció de  $280 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Per altra banda, l'CZE també s'ha utilitzat per a la determinació de penicil·lina G en preparats farmacèutics que contenen més d'un compost. Així, es va realitzar la determinació i quantificació simultània de procaïna, dihidroestreptomocina i penicil·lina G en fàrmacs comercials amb límits de detecció (LODs) entre 2 i  $3.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [65]. En un altre mètode [66], es van determinar la penicil·lina G i algun dels seus subproductes resultants de la síntesi de penicil·lines semisintètiques a partir d'aquest antibiòtic. La monitorització per CZE de la degradació enzimàtica de la penicil·lina G en afegir amidases a un medi bàsic va presentar avantatges respecte al basat en HPLC com ara millor resolució, menor temps d'anàlisi i absència de solvents orgànics. Una altra penicil·lina que es va determinar juntament amb altres antibiòtics (carbapenems i cefalosporines) per CZE va ser la piperacil·lina [67]. El mètode, que va presentar un límit de detecció per aquesta penicil·lina de 208 fmol, es va utilitzar per a monitoritzar la degradació de carbapenems en presència de penicil·lines i cefalosporines.

Altres compostos penicil·línics que s'han determinat per CZE han estat tres isoxizolilpenicil·lines: l'oxacil·lina, la cloxacil·lina i la dicloxacil·lina [68], les quals presenten estructures químiques molt similars i només difereixen en la presència d'un i dos clors respectivament en l'estructura d'oxacil·lina. Aquesta similitud els provoca un comportament electroforètic molt semblant i això fa que la seva resolució sigui baixa. La separació d'aquests compostos es va millorar afegint ciclodextrines a l'electròlit de treball. Entre les diferents ciclodextrines es van observar diferents comportaments i d'entre elles es va trobar la 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) com a la més efectiva respecte a la resolució dels analits. La sensibilitat del mètode es va millorar emprant la tècnica de preconcentració electroforètica anomenada *Large Volume Sample Stacking using Electroosmotic Flow Pump* (LVSEP), que va permetre uns límits de detecció de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per a les tres penicil·lines. Per tal d'aplicar el mètode a l'anàlisi de mostres de llet, les penicil·lines es



van extreure amb acetat d'etil presentant unes recuperacions entre 85 i 71%.

També s'utilitza CZE en estudis en què la detecció es realitza per espectroscòpia de masses (MS) ja que els autors prefereixen evitar la utilització de sistemes micel·lars quan s'empra aquest sistema de detecció ja que en aquest mode electroforètic hi ha la presència de surfactants i aquests poden provocar un efecte negatiu sobre la ionització [72]. Així doncs, es va estudiar l'aplicabilitat de l'acoblament de l'CZE amb l'MS per a la determinació de penicil·lina V juntament amb altres drogues farmacèutiques [70]. En aquest cas, i comparant amb l'acoblament d'HPLC a MS, es va veure que els límits de detecció obtinguts emprant l'electroforesi capil·lar eren més alts que en el cas de la cromatografia de líquids, 59 i  $0.85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivament. El mètode es va aplicar a l'anàlisi de mostres d'aigua de riu amb un pretractament que va consistir en una extracció líquid-líquid amb una mescla d'hexà i metil-*tert*-butil éter i una posterior extracció en fase sòlida. Tot i que els altres fàrmacs estudiats van presentar recuperacions entre 63 i 80%, el pretractament utilitzat no va ser útil per a extreure la penicil·lina V quantitativament.

En un altre sistema, es va estudiar el potencial de l'acoblament entre l'CE i l'MS amb una interfície d'electrosprai en mode *sheathless* i un analitzador de temps de vol per a la determinació de diferents pèptids i una penicil·lina, la bacampicil·lina, emprant l'ampicil·lina com a patró intern [71]. Es va avaluar la influència de l'addició de diferents concentracions de solvents orgànics (acetonitril, metanol i 2-propanol) en la resolució i temps d'anàlisi. Es va veure que emprant un percentatge menor al 20% de 2-propanol en l'electròlit de treball el sistema presentava millor estabilitat i resolució. Comparant els resultats obtinguts amb els prèviament descrits a la bibliografia per una detecció amb una interfície d'electrosprai i un analitzador de quadrupol, es va observar que la sensibilitat obtinguda en tots dos casos per a la bacampicil·lina va ser del mateix ordre ( $1 \mu\text{M}$ ).

En el cas de la detecció per MS, una altra tècnica electroforètica emprada ha estat l'electroforesi capil·lar en medi no aquós (NACE) que es basa en la separació dels analits en un medi electrolític que conté un elevat percentatge de solvent orgànic. Així, es va utilitzar la combinació NACE amb MS per a la determinació de penicil·lina V i les seves impureses i subproductes derivats del procés de biosíntesi [21]. El mètode resultant es va comparar amb un altre basat en CZE. En el medi aquós es va invertir el flux electrosmòtic amb bromur d'hexadimetrín, fet que va reduir considerablement el temps d'anàlisi i va augmentar la reproductibilitat del temps de migració. Respecte al medi no aquós es va observar que la selectivitat de la separació electroforètica era diferent en funció del solvent utilitzat [21]. Es va realitzar una aplicació dels dos mètodes, tant el basat en CZE com el basat en NACE, a una mescla representativa de brou de fermentació real. Es va concloure que el mètode aquós era preferible per la selectivitat presentada i l'elevada estabilitat del sistema en front al medi no aquós.

Respecte a la determinació d'antibiòtics penicil·línics mitjançant MEKC, el surfactant més utilitzat ha estat el sulfat de dodecil sòdic (SDS) que s'ha emprat majoritàriament amb solucions de fosfat sòdic i borat sòdic com a amortidors [20]. S'han desenvolupat mètodes per a la separació d'aquests antibiòtics dels seus derivats en estàndards i preparats farmacèutics comercials per a la penicil·lina G [69,73], la penicil·lina V [74,75], l'amoxicil·lina [76] i l'ampicil·lina [77,78] amb uns límits de detecció d'entre 0.2 i 4 mg·L<sup>-1</sup>.

La tècnica MEKC s'ha utilitzat també per a separar penicil·lines d'uns compostos anomenats inhibidors de  $\beta$ -lactamases [79,80]. Aquests inhibidors de  $\beta$ -lactamases s'utilitzen freqüentment en combinació amb les penicil·lines en diversos preparats farmacèutics. La seva funció és evitar l'atac enzimàtic de les  $\beta$ -lactamases que destrueixen l'estructura de l'antibiòtic de manera que aquest perd la seva capacitat antimicrobiana. Així, es troben preparats farmacèutics com l'Augmentin que conté àcid clavulànic

i amoxicil·lina, l'Unasyn que conté sulbactam i ampil·lina i el Tazocin que conté tazobactam i piperacil·lina. En l'anàlisi dels preparats farmacèutics s'obtenen uns LODs de 0.3, 0.7 i 10 mg·L<sup>-1</sup> per a l'amoxicil·lina, l'ampil·lina i la piperacil·lina, respectivament.

Per una altra banda, s'han realitzat estudis per investigar la influència de diferents paràmetres en la separació de penicil·lines per MEKC [81-84]. L'electròlit de separació òptim per a tots els mètodes va consistir en tetraborat sòdic com amortidor i SDS com a surfactant a pH bàsic (8-8.5). Els mètodes resultants es van aplicar a la determinació d'alguns dels compostos en mostres farmacèutiques comercials com són l'Orbenin (GlaxoSmithkline, S. A.), Britapen (Reig Jofré, S. A.) i Veterin-Micipen (Intervet Laboratory, S. A.) [84] o en mostres mediambientals com aigua procedent d'una granja de porcs [83]. La sensibilitat dels mètodes va permetre la detecció dels compostos a partir de concentracions de 0.2 mg·L<sup>-1</sup>. En cap dels casos es va emprar una etapa de pretractament de la mostra, tret d'un dels mètodes en què es va millorar la sensibilitat amb l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica dintre del capil·lar aconseguint uns límits de detecció de l'ordre de baixos µg·L<sup>-1</sup> [82].

Pel que fa a la cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica (MEEKC), s'ha utilitzat per la determinació d'un ampli ventall de compostos entre els que es troben les penicil·lines. Aquesta tècnica es basa en la formació de gotes de microemulsió generalment per la mescla d'un oli immiscible com *n*-octà o *n*-heptà amb aigua i s'ha utilitzat per l'anàlisi de penicil·lina G i penicil·lina V entre altres fàrmacs [85] amb un electròlit de separació format per *n*-octà, 1-butanol, SDS i tetraborat sòdic. En un altre estudi, aquest sistema es va modificar per a la separació de vuit penicil·lines [30]. En aquest cas, l'oli utilitzat va ser acetat d'etil que va permetre disminuir la tensió superficial de la gota amb la fase aquosa i es va utilitzar un surfactant zwitteriònic com el polioxietilè lauril éter (Brij 35). Amb l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica anomenada

*Large Volume Sample Stacking* (LVSS) es va millorar 40 vegades la sensibilitat del mètode i els LODs presentats van estar entre 10 i 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### 1.2.3. Determinació de cefalosporines per CE

De la mateixa manera que en el cas de les penicil·lines, per a la determinació de cefalosporines per electroforesi capil·lar s'han emprat diferents tècniques com són la CZE, la MEKC i la MEEKC.

Quan l'anàlisi es realitza per CZE, encara que generalment s'utilitzen electròlits de treball basats en fosfat sòdic a pH bàsic [23,86-89], també es troben mètodes que utilitzen altres amortidors com el citrat sòdic [88,90] o el MES (2-(N-morfolin)etasulfonat) [88].

Per exemple, Lin *et al.* [88] van estudiar l'efecte del pH, de la concentració i del tipus d'amortidor en el comportament de migració i separació de dotze cefalosporines en estàndards. Els amortidors escollits van ser fosfat sòdic, citrat sòdic i MES. Amb tots tres es va aconseguir la separació de les 12 cefalosporines tot i que es van considerar més adequats el citrat sòdic i el MES ja que la separació era millor en un menor temps d'anàlisi.

En un altre estudi, es va utilitzar l'CZE per a separar i estudiar l'estabilitat a diferents temperatures de 14 cefalosporines a nivells de concentració superiors a 0.42  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [23]. El mateix mètode es va aplicar a estudis farmacocinètics de la cefazolina en fluids biològics (sèrum, líquids de drenatge i fluid cerebrospinal) [86]. En aquest cas, per tal d'analitzar les mostres biològiques per CZE, aquestes van ser prèviament centrifugades, congelades i, finalment, filtrades. La concentració mínima detectada va ser de 0.3  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Es van realitzar dos estudis per a determinar diferents cefalosporines per CZE en fluids biològics com plasma, orina i bilis amb uns límits de detecció d'entre 2 i 6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  [87,90]. Els valors relativament elevats de concentració

mínima detectada van ser deguts al sistema de tractament de la mostra emprat, que va consistir simplement en la dilució de les mostres inicials amb aigua ultrapura.

En un altre estudi en el que es pretenia dur a terme la separació d'enantiòmers de cefoperazona per CZE va ser necessària l'addició de ciclodextrines com a modificador per tal d'obtenir una separació òptima entre els diferents analits [89]. D'entre els diferents tipus i concentracions de ciclodextrines estudiades, els millors resultats es van obtenir quan es va afegir a l'electròlit de separació una concentració 0.04 mM de  $\beta$ -ciclodextrina amb un límit de detecció per als dos isòmers de  $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en estàndards. Finalment, el mètode es va aplicar a mostres de preparats farmacèutics i orina.

Quan la separació electroforètica de les cefalosporines es realitza per MEKC, generalment s'utilitzen electròlits basats en amortidors com el fosfat sòdic [91,92], borat sòdic [93-95] o una mescla de tots dos [24,96]. Altres amortidors utilitzats han estat l'acetat sòdic [91] o el tris(hidroximetil) aminometà (també anomenat Tris) [97,98]. Pel que fa al surfactant, el més emprat ha estat el SDS [24,91-98] tot i que de vegades s'han emprat altres surfactants com el polioxietilè lauril éter (conegut amb el nom de Brij 35) [24,93].

A la bibliografia es troben diferents mètodes basats en MEKC per tal de separar cefalosporines dels seus derivats o impureses en preparats farmacèutics. Així, es va determinar la cefradina en un preparat farmacèutic en presència de la seva principal impuresa (cefalexina) amb SDS com a principal surfactant i una petita proporció de Brij 35 per evitar interaccions entre l'SDS i els components de la matriu de la mostra [24]. Altres cefalosporines que també s'han separat de les seves impureses per MEKC emprant SDS com a surfactant són la cefalexina [91,93] i la ceftazidima [94,95]. L'interval de concentració mínim detectable va variar entre  $0.2$  i  $2.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En un estudi encaminat a l'optimització de la separació de cinc cefalosporines (cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, cefoperazona i ceftazidima) es van avaluar comparativament les separacions obtingudes per CZE i MEKC [96]. Malgrat que es va trobar que amb MEKC la resolució entre els diferents compostos era millor, la utilització d'un sol surfactant en la separació per MEKC no va ser suficient i va ser necessària l'addició d'un formador de micel·les secundari, l'àcid pentasulfònic.

Quan es tracten mostres biològiques, com sèrum o plasma, existeix la possibilitat de reduir o eliminar l'etapa de pretractament de la mostra si s'utilitza MEKC amb SDS com a surfactant ja que el SDS solubilitza les proteïnes presents a la mostra i aquestes migren a la mateixa velocitat que la micel·la. Les cefalosporines, que inicialment poden estar unides a les proteïnes, queden alliberades i migren amb una mobilitat aparent pròpia [92]. Així, es van investigar aspectes quantitius per a la determinació de cefotaxima i un metabòlit en plasma humà per CZE i MEKC [92]. En el cas de la determinació per CZE va ser necessari un pretractament del plasma consistent en una desproteïnitació amb acetonitril. Es va concloure que tant el mètode basat en CZE amb desproteïnitació amb acetonitril com el mètode de MEKC amb dilució de la mostra eren aptes per a la monitorització de la cefotaxima i el seu metabòlit en plasma a nivells terapèutics. Tot i que la precisió dels temps de migració i la linealitat de les respostes eren bones per tots dos mètodes, la precisió en el cas de MEKC va ser superior degut a la menor manipulació de la mostra i al fet de que el mètode no va incloure la utilització de solvents orgànics. El límit de detecció de la cefotaxima va ser de 1 i 2 mg·L<sup>-1</sup> per MEKC i CZE, respectivament.

A la bibliografia també s'han desenvolupat mètodes per a determinar diferents cefalosporines en fluids biològics per MEKC amb un pretractament de la mostra consistent únicament en una centrifugació. Així, es va desenvolupar un mètode per a la determinació de cefuroxima en sèrum humà per MEKC [99]. El mètode, que també separava cefuroxima d'altres cefalosporines com la ceftazidina, cefoperazona, cefradina, cefalexina i

cefexitina, va presentar un límit de detecció de  $0.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Comparant-lo amb el mètode cromatogràfic emprat per a la seva determinació, es va trobar que mitjançant MEKC es va millorar l'eficàcia de separació, la selectivitat, la sensibilitat, i el tractament de la mostra va resultar més simple.

Altres cefalosporines com la cefepima i la ceftazidima, es van poder determinar per MEKC en fluids biològics (plasma i fluid cerebrospinal) amb injecció directa sense cap tipus de pretractament. Els mètodes van presentar unes concentracions mínimes detectables de  $0.2$  i  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivament [97,98].

Tot i les avantatges que ofereixen els sistemes micel·lars per la possibilitat de realitzar una injecció directa de la mostra o la utilització de sistemes de pretractament tan senzills com la filtració, la dilució o la centrifugació, de vegades és necessària una etapa prèvia de pretractament més exhaustiva. Així, en un treball en el que l'objectiu era determinar cefpiroma en plasma i mostres de microdiàlisi [100] es va emprar l'ultrafiltració i en la determinació de diverses cefalosporines en mostres de secrecions bronquials es va utilitzar la liofilització [101]. En tots els casos els límits de detecció obtinguts van estar entre  $0.2$  i  $0.84 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Una altra tècnica electroforètica emprada per a la determinació de cefalosporines és la MEEKC. Per exemple, es pot destacar un estudi en el que es determinaven cinc cefalosporines emprant un electròlit format per *n*-octà, 1-butanol, SDS i tetraborat sòdic [85]. A la bibliografia també hi ha altres mètodes basats en MEEKC en què s'empren microemulsions que contenen altres olis com l'acetat d'etil amb l'objectiu de disminuir el temps d'anàlisi. Concretament, en un estudi es van desenvolupar dos mètodes per a determinar tres cefalosporines, un basat en l'ús d'acetat d'etil a pH àcid i l'altre emprant el mateix oli a pH bàsic [102]. La sensibilitat de tots dos mètodes es va millorar en un factor de 20 amb la utilització de tècniques de preconcentració electroforètiques per als dos sistemes, REPSM i SRMP,

respectivament. D'aquesta manera, la concentració mínima detectada per tots dos mètodes va ser de 30 i 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , per a les tres cefalosporines en estudi.

En un altre sistema emprant MEEKC, que es va caracteritzar per no utilitzar co-surfactant, es va estudiar la separació de 7 antibiòtics entre els que es trobava la cefapirina [103]. El mètode va ser comparat amb l'anàlisi per MEKC i per CZE i es va concloure que, en el cas de la cefapirina, no existia una interacció significativa ni amb la gota de microemulsió ni amb la micel·la d'SDS, ja que els temps de migració tant per CZE, com per MEKC i MEEKC eren molt similars.

Per a la determinació d'estereoisòmers de cefalosporines s'ha utilitzat l'electrocromatografia capil·lar que és considerada com un híbrid entre la cromatografia líquida d'alta resolució i l'electroforesi capil·lar. Així doncs, s'han realitzat estudis per a separacions quirals per cefadroxil [25] i per cefuroxima [104,105]. En el primer cas va ser necessària l'addició de  $\beta$ -ciclodextrina a l'electròlit de separació per tal d'obtenir una correcta separació dels isòmers. Pel que fa a la cefuroxima, no va ser necessària la utilització de cap modificador quiral de manera que l'electròlit de separació estava format només per fosfat sòdic i acetonitril com a modificador orgànic.

### **1.3. ESTRATÈGIES PER AUGMENTAR LA SENSIBILITAT EN ELECTROFORESI CAPIL·LAR**

L'electroforesi capil·lar és una tècnica de separació eficient per una àmplia varietat de compostos en diferents tipus de matrius. Tot i això, la sensibilitat de la tècnica generalment és més baixa que l'obtinguda per cromatografia de líquids i insuficient per a moltes aplicacions. Això es deu fonamentalment a dos factors: el petit volum de mostra injectat en el capil·lar i el curt camí òptic que es correspon amb el petit diàmetre del capil·lar de separació en el cas de la detecció espectroscòpica amb detector UV. En els darrers anys,



s'ha intentat solucionar aquesta limitació des de diferents fronts com són la utilització de sistemes de detecció amb elevada sensibilitat i la introducció en el capil·lar d'elevats volums de mostra. Dins de la primera opció cal destacar la possibilitat d'augmentar el camí òptic del sistema amb la utilització de capil·lars en forma de bombolla [106,107] o amb forma de Z [27,108]. No obstant, l'ús d'ambdós tipus de capil·lars no s'ha generalitzat ja que, encara que l'augment de sensibilitat que s'obté és apreciable, la resolució i l'eficàcia dels pics poden resultar afectades de manera important. Una altra alternativa és la utilització de detectors més sensibles que l'UV com poden ser el detector de fluorescència induïda per làser [109,110], l'electroquímic [111-113] o l'espectròmetre de masses [21,114]. Pel que fa a l'augment del volum de mostra introduït en el sistema, aquest permet incrementar la quantitat total d'analit en el sistema d'CE. En aquest cas, per tal de preservar l'eficàcia de la separació electroforètica s'han d'aplicar tècniques de preconcentració. Aquestes es poden classificar en dos grans grups. En primer lloc aquelles que estan basades en fenòmens electroforètics i en segon lloc les que empren mecanismes de preconcentració cromatogràfica [115-117].

### 1.3.1. Tècniques de preconcentració electroforètiques

Les tècniques de preconcentració electroforètiques es basen en la diferència de mobilitat dels ions entre la zona on es troba la matriu de la mostra i la zona on es troba l'electròlit de separació. Existeixen un ampli ventall de tècniques dins d'aquest grup, encara que en la present Tesi Doctoral ens centrarem en les anomenades tècniques de *sample stacking* en què la diferència de mobilitat dels analits es basa en la diferència de conductivitat existent entre les dues zones. Així, si en un capil·lar de separació hi ha present una zona amb elevada conductivitat (electròlit de treball (BGE)) i una altra zona amb baixa conductivitat (mostra), quan s'aplica un voltatge, la regió de baixa conductivitat experimenta un camp elèctric més gran respecte de la regió de conductivitat més gran. Conseqüentment, els ions es mouen molt més ràpidament a la regió de la mostra que a la de l'BGE de manera

que els analits es preconcentren en aquesta zona. Tot i que el terme *stacking* es pot traduir al català com acumulació o apilament de la mostra, al llarg de la present Tesi Doctoral, s'ha preferit utilitzar el terme en anglès per evitar possibles confusions.

Hi ha dos paràmetres fonamentals per tal de classificar aquest tipus de tècniques: el mode d'injecció de la mostra (hidrodinàmic i/o electrocinètic) i el paper que juga el EOF en la separació electroforètica (amb presència o amb inversió o supressió del EOF). En aquesta classificació, les tècniques reben diferent nom en funció del mode electroforètic de separació. La Taula 1.1 recull les diferents tècniques que s'estudiaran en la present Tesi Doctoral.

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

	Injecció hidrodinàmica			Injecció electrocinètica		
	CZE	MEKC	MEEKC	CZE	MEKC	MEEKC
<b>Presència de EOF</b>	LVSS	REPSM	REPSM	FASI	FESI	FESI
<b>Inversió/supressió de EOF</b>	LVSEP	SRMM SRW	SRMP SRW	FAEP	FESI-RMM	FESI-RMP
Injecció hidrodinàmica + injecció electrocinètica						
	CZE		MEKC	MEEKC		
<b>Supressió de EOF</b>	LVSEP-ASEI		SRMM-ASEI	—		

Per tal de simplificar l'explicació de les diferents tècniques de preconcentració electroforètiques, d'aquí en endavant, ens centrarem en el fonament d'aquestes emprant com analits model anions, és a dir, compostos carregats negativament. Les diferents tècniques de *sample stacking* presentades a la Taula 1.1 impliquen que el volum de mostra introduït dintre del capil·lar és superior al generalment emprat en una anàlisi per CE (de l'ordre de baixos nL). Així doncs, és necessari eliminar la matriu de la mostra del capil·lar per tal de preservar l'eficàcia de la separació. En el cas de la

separació d'anions, aquesta eliminació se sol realitzar amb el flux electroomòtic que té un sentit oposat a la mobilitat electroforètica dels analits a analitzar. Es poden diferenciar dues situacions model: un sistema electroforètic amb presència de EOF i un altre amb inversió o supressió del EOF.

### Sample stacking amb presència de EOF

Es considera una separació electroforètica amb presència de EOF aquella en la que el EOF és molt més gran que la mobilitat electroforètica dels analits, de manera que els ions migren en la mateixa direcció que el EOF. En aquest cas, si la introducció de la mostra es realitza amb una injecció hidrodinàmica i el mode de separació és CZE, la tècnica de preconcentració s'anomena *Large Volume Sample Stacking* (LVSS) (veure Figura 1.3). En aquesta, després de condicionar el capil·lar de separació (A), s'introdueix hidrodinàmicament un gran volum de mostra (B) i s'aplica un potencial

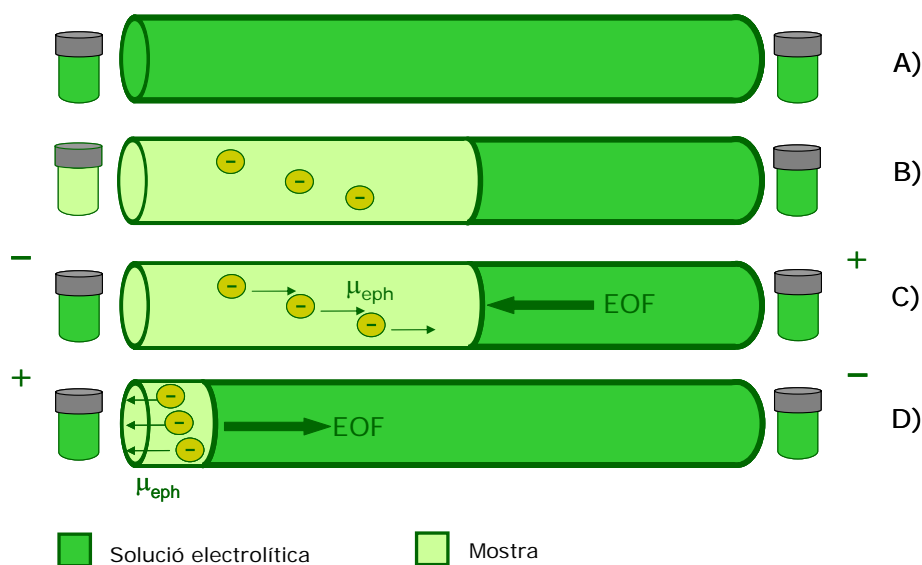


Figura 1.3. Representació esquemàtica de la tècnica *Large Volume Sample Stacking* (LVSS) en CZE per a l'anàlisi d'anions.

negatiu anomenat potencial d'*stacking* (C). El resultat és que el EOF empeny la mostra cap a l'extrem on s'ha introduït la mostra (*inlet*) mentre els analits aniònics es mouen cap a l'extrem de detecció (*outlet*) i s'acumulen a la interfície entre la matriu de la mostra i l'BGE. El corrent del sistema va augmentant en valor absolut ja que el capil·lar es va omplint d'BGE procedent de l'*outlet* i la matriu de la mostra es va eliminant per l'*inlet*. Quan el corrent arriba al 95-99% del valor original inicial, s'atura l'aplicació de potencial negatiu i s'aplica un potencial positiu per tal de començar la separació electroforètica (D) [26,115,118,119].

Des de la seva introducció per Chien i Burgi [28], la tècnica LVSS s'ha utilitzat àmpliament per la determinació de diferents tipus de compostos, com per exemple àcids arsènics [120], pèptids [121], àcid metacrílic [122], clorofenols i clorofenoxiàcids [123], antibiòtics [106,124], antioxidants [125] i derivats de 6-mercaptapurina [126] amb uns valors de factors de preconcentració de 2 a 300. Les matrius analitzades inclouen des de materials polimèrics per pròtesis dentals fins mostres biològiques com plasma o múscul de porc entre d'altres.

En el cas de que la separació electroforètica es porti a terme en el mode MEKC o MEEKC, la tècnica de *sample stacking* rep el nom de *Reversed Electrode Polarity Stacking Mode* (REPSM) [29-31,82,127]. S'ha avaluat el potencial d'aquesta tècnica per a la preconcentració d'antibiòtics com per exemple penicil·lines i cefalosporines [30,82,102], NSAIDs [29], esteròids anabòlics [128] i en la determinació de diverses triazines en aigües de consum humà [129] i d'hidrocarburs aromàtics policíclics en partícules d'aire [130].

Quan en les tècniques de *sample stacking* es du a terme la injecció en mode electrocinètic, es presenten algunes limitacions associades a aquest tipus d'injecció ja que la introducció de la mostra no és tan precisa, és altament depenent de la matriu i discrimina els analits en funció de la seva mobilitat

electroforètica [26]. Tot i això, la injecció electrocinètica és molt útil per a la determinació de compostos amb una elevada mobilitat electroforètica.

En general, quan s'injecta la mostra electrocinèticament, sovint s'introdueix prèviament un *solvent plug* amb una conductivitat menor que la de la matriu de la mostra. Aquest, s'introdueix entre la zona de l'electròlit i la de la mostra de manera que, en aplicar el potencial de separació, el camp elèctric resultant en aquesta zona és més gran i els analits es mouen més ràpidament de manera que queden acumulats [118]. Alguns dels solvents que s'han utilitzat com a *solvent plug* són aigua [131] i mescles d'aigua amb metanol [132,133] i acetonitril [134]. En el cas d'emprar l'aigua, també se sol anomenar com a *water plug*.

Quan s'utilitza la injecció electrocinètica en presència de EOF, les tècniques de *sample stacking* reben els següents noms: *FASI (Field Amplified Sample Injection)* per CZE i *FESI (Field Enhanced Sample Injection)* per MEKC i MEEKC [135].

A la Figura 1.4 es pot veure una representació esquemàtica de la tècnica de preconcentració *FASI*. Més en detall, després de condicionar el capil·lar de separació amb l'electròlit de treball (A), s'injecta hidrodinàmicament un *solvent plug* (B) i tot seguit, s'injecta electrocinèticament la mostra aplicant un potencial negatiu (C). D'aquesta manera els anions es dirigeixen cap a la zona on es troba el *solvent plug* gràcies a la seva mobilitat electroforètica mentre el EOF va empenyent tant el *solvent plug* com la matriu de la mostra cap a l'extrem d'injecció. Una vegada s'ha injectat tota la mostra, es canvia el vial de mostra pel d'electròlit de manera que es produeix la preconcentració o *stacking* (D) i quan s'arriba al 95% del corrent original, s'atura el potencial negatiu. En aquest punt, en aplicar potencial positiu entre els dos vials amb electròlit (E) té lloc la separació electroforètica.

Tant en *FASI* com en *FESI*, la baixa conductivitat de la mostra assegura un elevat camp elèctric en aquesta zona de manera que els ions migren

ràpidament dintre del capil·lar i s'acumulen a la banda que limita les zones de la mostra i de l'electròlit de separació. De la mateixa manera que en LVSS i REPSM, el fet d'injectar un volum tan gran de mostra, fa que la matriu s'hagi d'eliminar amb l'aplicació d'un potencial negatiu prèviament a l'etapa de separació [115]. S'ha de tenir en compte que els factors de preconcentració que s'obtenen amb la injecció electrocinètica, de l'ordre de 1000, són més grans que en el cas de la injecció hidrodinàmica ja que la quantitat d'analit injectada no està limitada pel volum de la mostra introduït en el capil·lar [118].

Alguns dels estudis que utilitzen FASI i FESI per augmentar la sensibilitat s'han centrat en la determinació de compostos metacrílics [131], pèptids derivats de la carnosina [136], espècies de plom, mercuri i seleni [137] i en la determinació de triazina en mostres d'aigua mineral i d'aixeta [32].

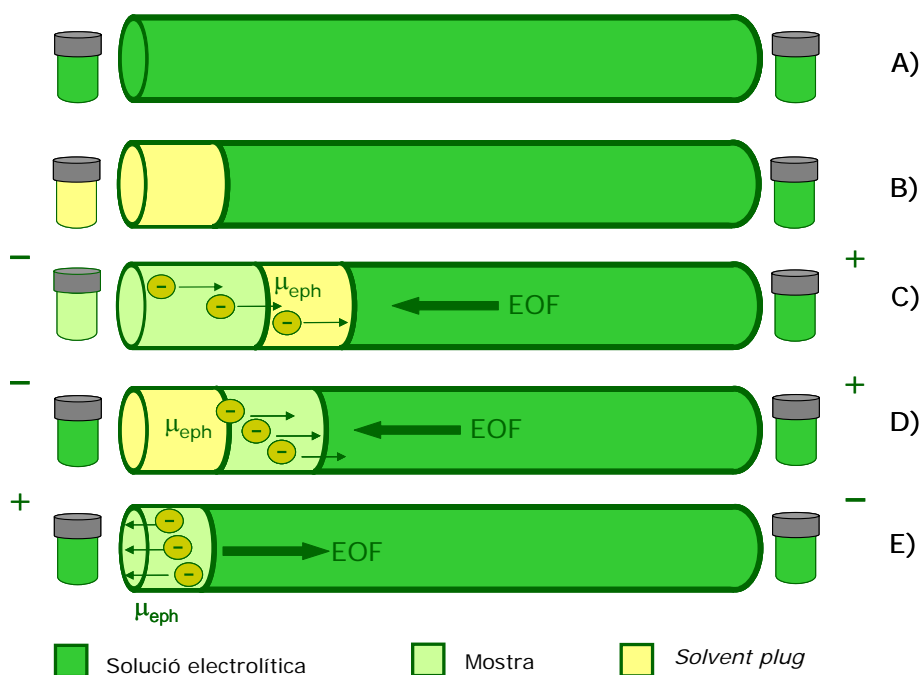


Figura 1.4. Representació esquemàtica de la tècnica *Field Amplified Sample Injection* (FASI) en CZE per a l'anàlisi d'anions.

Les principals limitacions d'aquest tipus de tècniques amb presència de EOF per a l'anàlisi d'anions són, principalment, la necessitat per una banda d'una acurada monitorització del corrent durant l'etapa d'eliminació de la matriu de la mostra per assegurar una bona precisió del mètode i per altra banda d'una matriu de la mostra relativament neta, amb baixa conductivitat i sense la presència d'interferents. Així doncs, en l'anàlisi de mostres reals, sovint és necessària una etapa de pretractament prèvia consistent majoritàriament en l'extracció en fase sòlida *off-line* [106,124,126].

#### Sample stacking amb inversió i/o supressió del EOF

El conjunt de tècniques que estan englobades en aquest mode tenen la particularitat de que en el *sample stacking* no és necessari fer un canvi de polaritat per eliminar la matriu de la mostra ja que el sistema electroforètic realitza automàticament el pas de la preconcentració a la separació dels analits [119]. Aquest fet augmenta la reproductibilitat respecte a les tècniques que necessiten la monitorització de corrent i és molt útil en el cas de que l'equip utilitzat no disposi de l'opció de treballar amb diferents polaritats.

Pel que fa a la separació electroforètica, si es treballa amb inversió del EOF, la migració dels analits cap al detector es deu fonamentalment al EOF i si es treballa amb supressió del EOF, la mobilitat predominant és l'electroforètica pròpia dels analits.

Per a invertir el EOF s'han emprat diferents modificadors com dietiltriàmina (DETA) [26] i alcohol polivinílic (PVA) [107]; i per a suprimir-lo s'ha utilitzat un medi a pH àcid [26,102,138-140], metanol [141-143], modificadors de la paret del capil·lar [132,144-146] i l'addició de diferents reactius com per exemple bromur de cetiltrimetil amoni (CTAB) i òxid de polietilè [147-149].

De la mateixa manera que quan es treballa amb presència del EOF, es poden diferenciar dos conjunts de tècniques en funció del tipus d'injecció realitzada: hidrodinàmica i electrocinètica.

Quan es realitza la injecció de la mostra hidrodinàmicament les tècniques reben el nom de *Large Volume Stacking Using the EOF Pump* (LVSEP) quan la separació es realitza per CZE [145,150], *Stacking with Reverse Migrating Micelles* (SRMM) [127,138,151] per a sistemes micel·lars i *Stacking with Reverse Migrating Pseudostationary Phase* (SRMP) per sistemes basats en la microemulsió [102,139]. En totes les tècniques, després de la introducció hidrodinàmica de la mostra, es canvia el vial de la mostra per l'BGE i s'aplica un únic potencial negatiu que permet tant la preconcentració eliminant la matriu de la mostra com la separació electroforètica. A la Figura 1.5 es poden veure les etapes de preconcentració i separació per a la tècnica *Large Volume Stacking Using the EOF Pump* (LVSEP) en el cas de treballar amb un sistema de supressió del EOF. Primer, es condiona el capil·lar amb electròlit de separació (A) i seguidament s'injecta hidrodinàmicament un gran volum de mostra (B). Llavors s'aplica un potencial negatiu per tal d'eliminar la matriu de la mostra i preconcentrar els analits (C). Al mateix temps que es va eliminant la mostra, el EOF es fa més petit ja que el capil·lar es va omplint d'electròlit de separació procedent del vial situat a l'extrem més proper al detector (D). Finalment, en el moment en què el EOF és menor que les mobilitat electroforètiques dels analits, aquests canvien el sentit de migració i es dirigeixen cap a l'ànode, produint-se la separació electroforètica.

Algunes aplicacions d'aquestes tècniques per augmentar la sensibilitat amb LVSEP inclouen la determinació de 3-nitrotirosina en orina de rata [147] i de derivats de metotrexat en plasma humà [149]. En sistemes amb fases pseudostacionàries, s'ha emprat SRMM en la separació de diferents fenols [151] i SRMP en la determinació d'antiinflamatoris no esteroidals (NSAIDs) en aigua de riu per MEEKC [139,141].



Es pot aconseguir un factor de preconcentració addicional en els sistemes MEKC i MEEKC amb la tècnica *Stacking Using Reverse Migrating Micelles and Water Plug* (SRW) que es basa en els mateixos principis que les tècniques SRMM i SRMP però introduint una quantitat d'aigua (també anomenada *water plug*) prèviament a la introducció de la mostra en el capil·lar. D'aquesta manera, a l'aplicar voltatge, els analits s'acumulen en aquesta zona perquè el camp elèctric present és més gran que en la zona de la mostra i en la zona de l'electròlit [127,152,153].

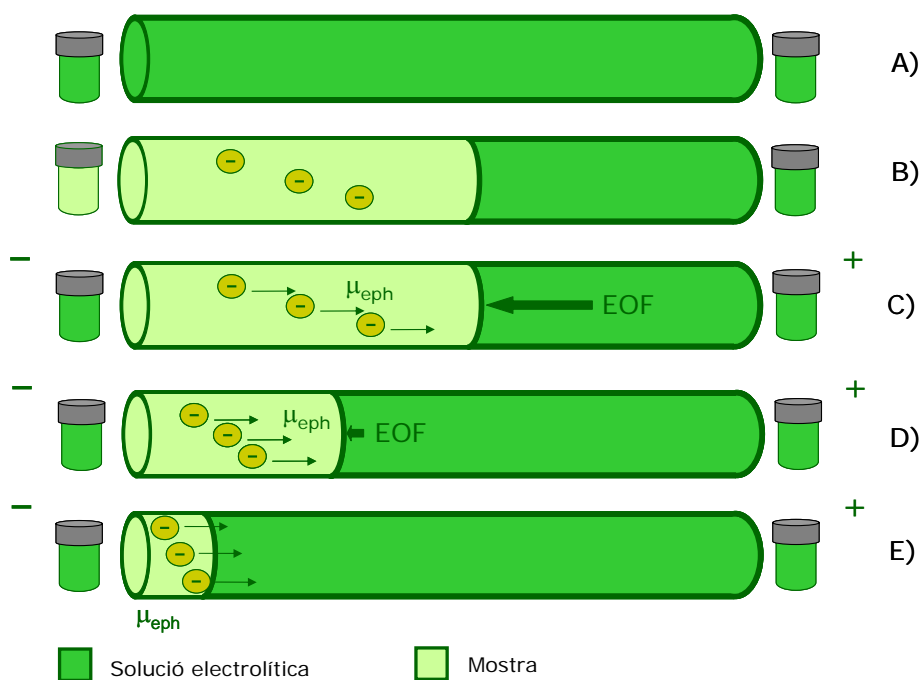


Figura 1.5. Representació esquemàtica de la tècnica *Large Volume Sample Stacking Using the EOF Pump* (LVSEP) en CZE per a l'anàlisi d'anions.

És possible també desenvolupar tècniques de preconcentració electroforètiques en què hi ha supressió del EOF en les quals es dugui a terme una injecció electrocinètica. Aquestes s'anomenen *Field Amplified*

*Sample Injection with Sample Matrix Removal Using the EOF Pump (FAEP)*, per CZE; *Field Enhanced Sample Injection with Reverse Migrating Micelles (FESI-RMM)*, per MEKC i *Field Enhanced Sample Injection with Reverse Migrating Pseudostationary Phase (FESI-RMP)*, per MEEKC. A la Figura 1.6 es troba representada la tècnica FAEP per a la determinació d'anions per CZE. Breument, la metodologia a seguir és la introducció d'una petita quantitat de solvent (*solvent plug*) amb conductivitat menor que la mostra i l'BGE (B) i la posterior aplicació d'un voltatge entre el vial de mostra i el d'BGE per injectar electrocinèticament la mostra (C). En aquest moment, la matriu de la mostra comença a ser eliminada del capil·lar de separació. Seguidament, després de canviar el vial de mostra pel d'BGE, se segueix aplicant la mateixa polaritat per tal de finalitzar la preconcentració (D) i

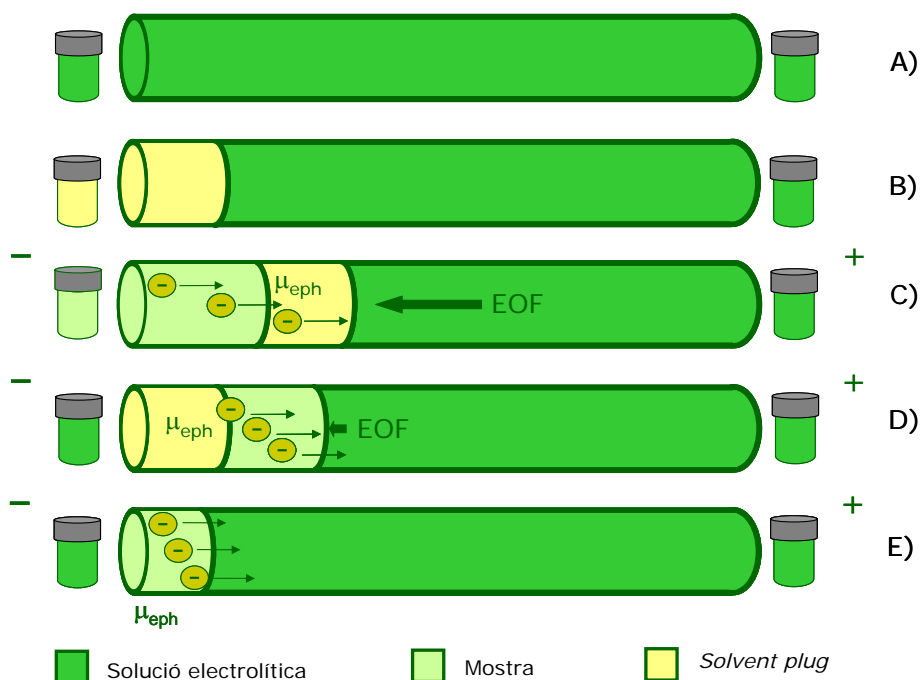


Figura 1.6. Representació esquemàtica de la tècnica *Field Amplified Sample Injection with Sample Matrix Removal Using the EOF Pump (FAEP)* en CZE per anions.

realitzar la separació dels analits (E) [132,140,154]. De la mateixa manera que en LVSEP, a l'eliminar la matriu de la mostra, el EOF va disminuint fins arribar un punt on les mobilitats electroforètiques dels anions són més grans i els analits migren cap a l'ànode.

A la bibliografia es troben aplicacions relativament recents d'aquest tipus de tècniques de *sample stacking*. A mode d'exemple, aquestes tècniques s'han utilitzat per determinar herbicides clorats en aigües de pou [132], fàrmacs en aigües mediambientals i plasma [138,148] i herbicides en aigües de riu [134].

Amb l'objectiu de millorar encara més la sensibilitat de CE mitjançant les tècniques de preconcentració electroforètiques, a la bibliografia es troben algunes referències que utilitzen tècniques en què es combina més d'una injecció de la mostra. Així, les tècniques *LVSS-Anion Selective Exhaustive Injection* (LVSS-ASEI) [143] i *SRMM-Anion Selective Exhaustive Injection* (SRMM-ASEI) [138,155] per CZE o MEKC, respectivament, combinen la injecció hidrodinàmica i electrocinètica. D'aquesta manera s'aconsegueix un factor de preconcentració encara més elevat que en les altres tècniques de *sample stacking* presentades. Aquest fet es va demostrar en un estudi comparatiu de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques basades en sistemes micel·lars [138]. Avaluant els factors de preconcentració obtinguts, 263 per a la tècnica SRMP-ASEI, 154 per a l'SRMM i 63 per FESI-RMM, es va concloure que en les tècniques que inclouen els dos tipus d'injecció, la preconcentració obtinguda és superior.

### 1.3.2. Tècniques de preconcentració cromatogràfiques

Una altra alternativa per augmentar la quantitat d'analit introduït és la utilització de les tècniques de preconcentració cromatogràfiques que s'han emprat amb gran èxit per a millorar la sensibilitat en CE. A més de l'augment de sensibilitat, simultàniament s'aconsegueix l'eliminació de sals, proteïnes i una àmplia varietat d'altres compostos interferents que poden estar presents

en la matriu de la mostra. Un dels grans avantatges que tenen aquest tipus de tècniques és que quan s'utilitzen en combinació amb l'CE, la separació és ortogonal amb la qual cosa es pot aconseguir una bona selectivitat [156].

La tècnica de preconcentració cromatogràfica més emprada ha estat l'extracció en fase sòlida (SPE) [26,124,157-159], tot i que a la bibliografia també es troben alguns mètodes en que les tècniques de preconcentració i pretractament són l'extracció líquid-líquid (LLE) [160-163], la microextracció en fase sòlida (SPME) [157,163-167] i la microextracció en fase líquida (LPME) [168,169]. Bàsicament, l'SPE consisteix en la retenció dels analits presents en un gran volum de mostra en un sorbent cromatogràfic. Una vegada retinguts, els analits són eluïts amb un petit volum de solvent.

Existeixen diferents modes en la combinació entre l'SPE i l'CE: *off-line*, *at-line*, *in-line* i *on-line*. D'entre aquests, el mode *off-line* ha estat aplicat més extensament degut a la seva major simplicitat. No obstant, la tendència en els darrers anys ha estat emprar els altres tipus d'acoblament pels seus avantatges respecte el mode *off-line* entre els que cal destacar la no manipulació de la mostra entre l'etapa d'extracció i la d'anàlisi de manera que s'evita el risc de pèrdua i contaminació i, consegüentment, milloren els límits de detecció i la reproductibilitat. Hi ha tres possibilitats d'acoblament: *at-line*, *in-line* i *on-line*. Molt breument, l'acoblament *at-line* utilitza un sistema mecànic per tal de recollir l'eluat en un vial i injectar una alíquota d'aquest en el capil·lar de separació. El mode *in-line* es basa en la integració completa del sorbent de l'SPE en el capil·lar de separació i finalment l'opció *on-line* utilitza una interfície per introduir el volum d'elució, o part d'ell, directament en el capil·lar de separació. Recentment, Santos *et al.* [159] han publicat un estudi on recullen diferents mètodes basats en l'acoblament del pretractament de la mostra a l'CE. Seguidament s'expliquen amb més detall el fonament i la metodologia a seguir per aquests tipus d'acoblements.

### SPE-CE at-line

El mode *at-line*, tal com i s'ha comentat anteriorment, es basa en recollir una al·lquota del volum d'elució de l'SPE en un vial de l'equip d'electroforesi capil·lar i seguidament es realitza la injecció en el capil·lar de separació. La injecció es realitza de manera convencional, amb l'aplicació de pressió (hidrodinàmica) o amb l'aplicació de voltatge (electrocínètica). A la bibliografia es poden trobar dues opcions principals per tal de combinar l'SPE i l'CE en el mode *at-line*: (i) utilitzar un braç robòtic que permet omplir amb l'eluat resultant de l'SPE un vial que està col·locat a la safata de l'equip electroforètic o (ii) modificar el sistema de *replenishment* de l'aparell de manera que l'eluat s'injecta mitjançant aquesta opció de l'equip.

El braç robòtic es troba representat a la Figura 1.7. Bàsicament, consisteix en un sistema de dues agulles de diferent mida, una de les quals, la més llarga, serveix per omplir el vial amb mostra procedent de l'SPE i l'altra, la més curta, s'utilitza per eliminar el volum sobrant i mantenir constant el nivell de líquid del vial. El braç robòtic ha de complir dos requisits especials: ha d'estar col·locat molt pròxim a la safata de vials i ha d'estar comunicat electrònicament tant al sistema d'SPE com al d'CE.

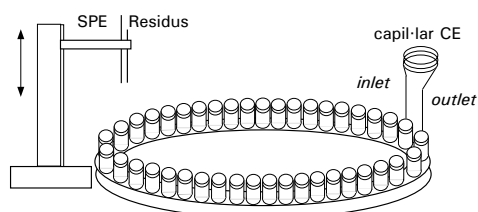


Figura 1.7. Representació esquemàtica del braç robòtic per introduir la mostra al vial de l'equip d'CE en un sistema *at-line* SPE-CE que van emprar Arce *et al.* [170], Nozal *et al.* [171] i Mardones *et al.* [35].

A la Figura 1.8 es mostra una representació de la modificació del sistema de *replenishment* [159]. Es pot veure com la peça encarregada d'omplir el vial en la safata de l'equip, està originàriament connectada mitjançant dos tubs

als recipients que contindrien l'electròlit de treball i els residus, respectivament. La modificació consisteix en fer que un d'aquests tubs estigui connectat al sistema que realitza el pretractament de la mostra de manera que el volum d'elució de l'SPE és dirigit directament al vial de mostra. L'altre tub, igual que en el sistema original, s'utilitza per mantenir constant el volum del vial. Una vegada els analits a determinar es troben en el vial, es procedeix a una injecció convencional en CE.

Tant en la versió amb el braç robòtic com en la modificació del *replenishment*, l'acoblament *at-line* entre l'SPE i l'CE permet una gran flexibilitat en les condicions de treball d'ambdues tècniques respecte a altres acoblaments. Això és degut a que el sorbent d'SPE no està en contacte físic amb el sistema electroforètic i la separació per CE es porta a terme en un capil·lar continu. D'aquesta forma, es pot escollir el mode de separació per CE més adient ja que no hi ha cap limitació en la composició de l'electròlit de treball respecte de les condicions de l'SPE [35]. Cal remarcar que en aquest acoblament les pèrdues de corrent durant l'anàlisi electroforètica no són tan freqüents com ho poden ser en els acoblaments *in-line* i *on-line* SPE-CE.

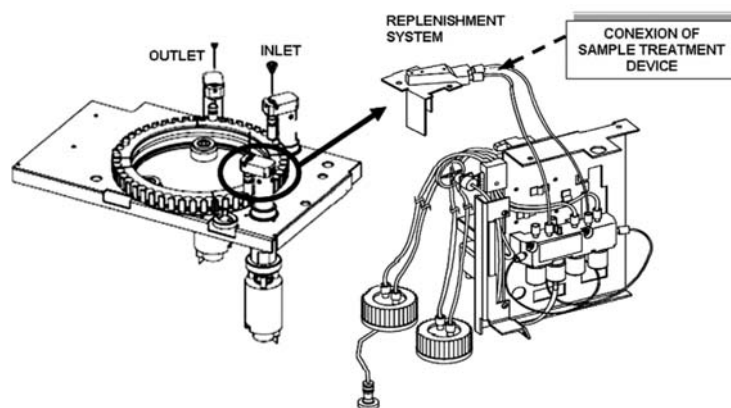


Figura 1.8. Representació esquemàtica de la modificació del sistema de *replenishment* en l'acoblament *at-line* [159].

En els diferents estudis en què s'empra l'acoblament *at-line* els sorbents cromatogràfics emprats han estat bàsicament d'intercanvi iònic (Chelex-100) [170], polimèrics basats en divinilbenzè [172] o en estirè-divinilbenzè (Strata X) [171] i en sílice amb cadenes carbonades de tipus C<sub>18</sub> [35,173].

En l'acoblament *at-line* un dels requisits és que l'SPE es realitzi de forma automàtica, cosa que es pot aconseguir mitjançant sistemes desenvolupats al propi laboratori, els anomenats *home-made*, o en sistemes comercials [172]. Al mercat, la casa comercial *Spark Holland* ofereix aquest tipus d'automatització en dues famílies de sistemes comercialitzats amb els noms de "Prospekt" i "Symbiosis".

#### SPE-CE in-line

L'acoblament *in-line* es basa en la immobilització d'un sorbent cromatogràfic en el mateix capil·lar de separació, concretament prop de l'extrem d'introducció de la mostra, de manera que l'SPE està completament integrada en el sistema d'CE [174,175].

A diferència de l'acoblament anterior (*at-line* SPE-CE), en aquest cas l'automatització de l'SPE es realitza amb el mateix equip d'CE, fonamentalment aplicant pressions elevades al capil·lar de separació per tal de fer passar la mostra i diversos solvents a través del sorbent d'SPE. D'aquesta manera, després de condicionar el sorbent, es realitza la càrrega de la mostra per a que els analits quedin retinguts. En aquest punt es pot realitzar opcionalment un rentat per tal d'eliminar les possibles substàncies interferents, i finalment l'elució dels analits es realitza, generalment, amb la injecció d'un petit volum de solvent. Aquest es mou a través del capil·lar degut al EOF i quan arriba on està situat el sorbent, els analits s'elueixen i té lloc la separació electroforètica.

La disposició del sorbent (*in-line*) confereix al sistema una característica molt important: tot el volum procedent de l'elució de l'SPE s'analitza per CE.

D'aquesta manera la sensibilitat aconseguida és millor que si només una part del volum final fos analitzada. Aquest avantatge és a la vegada una limitació ja que el volum necessari per a l'elució ha de ser suficientment baix per no provocar un eixamplament dels pics electroforètics. És a dir, si la retenció dels analits és molt elevada i es necessita un gran volum de solvent per eluir els analits, l'anàlisi posterior tindrà una eficàcia molt baixa. Així doncs, s'ha d'arribar a un compromís entre l'elució quantitativa dels analits i l'eficàcia de la separació electroforètica. Tanmateix, alguns autors han publicat diferents estratègies per tal d'augmentar el volum de solvent d'elució sense que l'eficàcia dels pics electroforètics es vegi perjudicada. Aquests mètodes es basen en l'aplicació de tècniques de preconcentració electroforètiques entre les que es troben la utilització d'un gradient d'isotacoforesi capil·lar per realitzar l'anomenada *transient*-isotacoforesi capil·lar (tITP) [176-179] o la manipulació del pH de l'electròlit de treball mitjançant la tècnica *dynamic pH-junction* [180,181].

Una altra de les problemàtiques de l'acoblament *in-line* SPE-CE és que la mostra passa pel capil·lar de separació, i això pot donar lloc a l'adsorció de proteïnes o d'altres macromolècules de la matriu en les parets del capil·lar, provocant una modificació del EOF. A més, és important remarcar la possibilitat de que tingui lloc una reducció del EOF en aplicar un voltatge respecte del EOF resultant en un capil·lar d'CE buit. Aquesta modificació en el EOF es deu a la presència del sorbent d'SPE i de diferents materials utilitzats per mantenir el sorbent fixat, tals com els fritats [27].

Un gran avantatge dels sistemes *in-line* SPE-CE és que no es necessiten modificacions de l'instrument d'electroforesi capil·lar. Així doncs, en principi, el capil·lar que conté el sorbent d'SPE es pot col·locar en qualsevol equip comercial. Tot i això, alguns autors han aplicat una pressió externa durant la separació electroforètica per disminuir els temps d'anàlisi [182-185].



En comparació als altres sistemes SPE-CE, la velocitat de càrrega de mostra no és molt elevada degut al petit diàmetre intern del capil·lar, en l'interval de 50 a 100  $\mu\text{m}$  [186]. Així, en *in-line* SPE-CE el que es fa normalment és establir una pressió per tal de permetre el pas de les diferents solucions que pot variar entre 50 mbar fins 10 bar.

En *in-line* SPE-CE hi ha diferents dissenys a l'hora d'introduir el sorbent en el mateix capil·lar de separació: (i) columnes *open-tubular*, (ii) sorbent empaquetat, (iii) membranes o discs i (iv) monòlits.

#### *(i) Columnes open-tubular*

Aquest tipus de sistemes es basen en recobrir les parets d'un tros del capil·lar de separació amb partícules de sorbent d'SPE. Aquesta secció es troba localitzada a l'extrem d'injecció de la mostra, és a dir, a la posició *inlet* del capil·lar. A la Figura 1.9A) es pot veure representat aquest tipus de disseny.

Les columnes *open-tubular* són molt utilitzades sobretot perquè la seva fabricació és relativament senzilla i els fluxos permesos per al condicionament i càrrega de mostra poden ser molt elevats. Això minimitza el temps invertit en la retenció dels analits en el sorbent i el temps d'anàlisi total quan s'empra aquest tipus de sistema. No obstant, presenten una limitació principal associada a la baixa capacitat de retenció que implica un menor increment en la sensibilitat respecte la presentada per altres formats, principalment en el cas de sorbents empaquetats o columnes monolítiques [156]. Aquest fet és especialment important en el cas d'analits amb una retenció moderada en el sorbent d'SPE pels quals es tenen volums de ruptura relativament baixos.

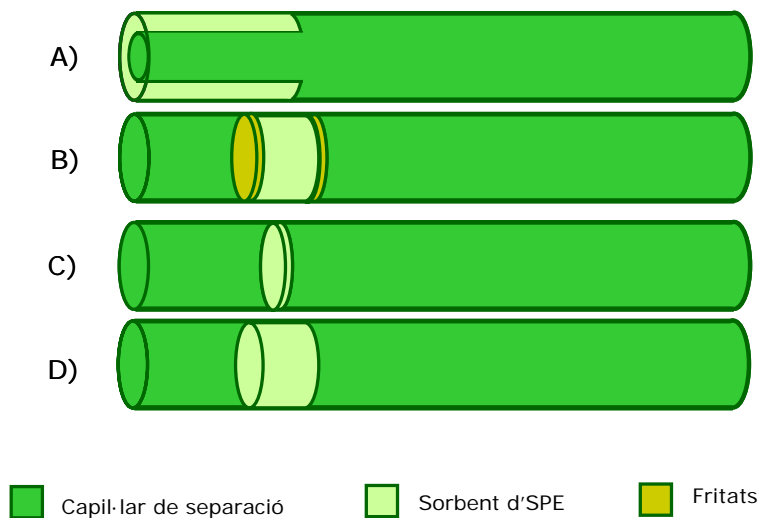


Figura 1.9. Representació esquemàtica dels diferents tipus de sistemes *in-line* SPE-CE: columna *open-tubular* (A), sorbent empaquetat (B), discs o membranes recobertes (C) i monòlits (D).

### (iii) Sorbent empaquetat

Aquest tipus de sistemes es caracteritzen per l'empaquetament de partícules de sorbent d'SPE dintre d'un capil·lar de diàmetre intern igual o superior al del capil·lar de separació. Sovint aquestes partícules de sorbent es mantenen a l'interior del capil·lar gràcies a la presència de fritats. Aquests poden ser fonamentalment de dos tipus: sintetitzats per calentament o poden provenir dels fritats emprats en els cartutxos d'SPE comercials. En el primer cas, en el procés de construcció del preconcentrador se solen fer servir fritats temporals de manera que un dels extrems del capil·lar es taponen per tal de permetre l'empaquetament i finalment, després de la formació dels fritats permanents s'elimina el temporal. En el cas d'utilitzar els fritats comercials, aquests es tallen en peces molt petites de tal manera que el seu diàmetre sigui menor al diàmetre intern del capil·lar que conté el sorbent i finalment es col·loquen dintre del capil·lar. Cal destacar que quan el capil·lar de separació té un diàmetre intern inferior al de l'SPE, en alguns

casos, la presència de fritats no és necessària ja que el sorbent queda retingut en el seu lloc degut al petit diàmetre del capil·lar de separació que impedeix el pas de les partícules de sorbent, que són de mida superior.

En general, la presència de fritats en el sistema d'SPE-CE augmenta la contrapressió produïda en aplicar una pressió externa i pel que fa a la separació electroforètica, les anàlisis solen presentar temps de migració més llargs i irreproduïbilitats en el EOF [178].

A la Figura 1.9 B) es troba representat un sorbent empaquetat fixat entre dos fritats. Normalment, la longitud del capil·lar que conté el sorbent d'SPE sol ser de l'ordre de 0.2-2.5 cm [124,182-184,187,188], molt menor que en el cas de les columnes *open-tubular* que presenten unes llargades d'entre 8.5 fins a 25 cm [176-179,181,189].

Per tal d'empaquetar el sorbent dintre del capil·lar s'han descrit dues metodiques: l'aplicació de pressió positiva o negativa. En el primer cas, s'aplica una pressió positiva per fer passar el sorbent d'SPE que es troba en suspensió en un solvent orgànic i en el segon s'aplica una pressió negativa, és a dir, buit, al sorbent d'SPE en estat sòlid. En la primera opció s'aconsegueix un empaquetament més compacte, però per altra banda la contrapressió associada és més gran en comparació a la segona opció i fins i tot, degut a la quantitat de sorbent present en el capil·lar de separació, la contrapressió que es crea en el sistema pot disminuir el flux en el capil·lar fins un 25% respecte al d'un capil·lar de sílice completament buit [26,33]. Aquest fet pren rellevant importància en la formació de bombolles si el corrent de treball és molt elevat o la quantitat de solvent orgànic present en el sistema electroforètic és considerable.

L'elevada quantitat de sorbent que es pot emprar amb la utilització de sorbents empaquetats està associada a una major capacitat de retenció dels analits. Aquest fet, tot i que és un gran avantatge respecte als altres models de sistemes *in-line*, presenta l'inconvenient de que s'obté un eixamplament

de la banda degut fonamentalment a la disminució del EOF i al volum del solvent d'elució, que normalment, és més gran que el corresponent a una injecció hidrodinàmica convencional que és de l'ordre de pocs nL. Això fa que la separació electroforètica presenti una baixa eficàcia.

Pel que fa a la reutilització dels sorbents empaquetats varia molt en funció de la mida de la partícula, de la quantitat i de la natura del sorbent d'SPE, del sistema de separació i del tipus de mostra analitzada. Pel que fa al preconcentrador, el seu ús continu pot provocar una compressió de les partícules del sorbent provocant resultats no reproduïbles. Així, aquest tipus de preconcentradors es poden utilitzar entre 5 i 200 vegades segons el sistema emprat [33].

La relativa facilitat d'empaquetar el sorbent en aquest tipus de sistema, fa que a la bibliografia es trobin nombroses aplicacions en què s'han avaluat sorbents de característiques molt diferents entre els que es troben sorbents basats en sílice enllaçada amb C<sub>18</sub> [124,184,190], polimèrics com l'Abselut Nexus [191,192] i el *blue chitin* [183] i immunosorbents [187].

### *(iii) Membranes o discs*

Els sistemes d'*in-line* SPE-CE basats en membranes o discs consisteixen en introduir una part d'aquest material en el capil·lar de separació o dintre d'un altre capil·lar de diàmetre superior. En principi, els discs estan formats per membranes de politetrafluoroetilè (PTFE) en les que es fixen els sorbents d'SPE (enllaçats a sílice, polimèrics o intercanviadors d'ions) [193]. A la Figura 1.9 C) es troba representat esquemàticament aquest tipus de disseny. Com es pot observar, de la mateixa manera que en el cas dels sorbents empaquetats, el sorbent d'SPE queda fixat entre dos capil·lars emprats per a la separació electroforètica. Aquest format presenta dos grans avantatges: la possibilitat d'emprar fluxos elevats i un baix volum de solvent d'elució. De la mateixa manera que en el format de columnes *open-tubular* el fet de treballar amb fluxos elevats fa disminuir el temps de càrrega de la

mostra, cosa que incideix directament en el temps d'anàlisi total. Pel que fa al solvent d'elució, a l'emprar volums baixos s'aconsegueix una separació electroforètica de gran eficàcia [26]. A diferència dels sorbents empaquetats, la contrapressió generada és relativament baixa, la magnitud del EOF no es veu tant afectada per la presència del sorbent i les pèrdues de corrent són menys freqüents.

Quan es comparen les membranes o discs amb les altres modalitats de l'acoblament *in-line* SPE-CE, s'observa que, en general, la quantitat de sorbent d'SPE emprat és molt menor. Tot i que per analits amb una elevada retenció aquest fet no hauria de ser una limitació, en el cas d'analits amb retencions moderades aquests es poden eluir fàcilment durant l'etapa de càrrega de la mostra degut als relativament baixos volums de ruptura que presenten. Per tal de minimitzar la problemàtica de la poca quantitat de sorbent en el sistema, alguns autors han estudiat la possibilitat d'introduir diverses capes de membrana o disc [194].

#### *(iv) Monòlits*

De manera simplificada, l'estructura dels monòlits es pot comparar a una enorme "partícula" de material porós de manera que ocupa tot el volum del capil·lar on es troba i no conté buits entre partícules que són propis dels sorbents empaquetats [195]. Així, els monòlits o columnes monolítiques també es coneixen amb el nom de fases estacionàries empaquetades contínues [196]. A la Figura 1.9 D) es troba representat esquemàticament aquest disseny. De la mateixa manera que en els altres formats, el sorbent d'SPE es col·loca a l'extrem més pròxim a l'*inlet*, és a dir, a l'entrada del capil·lar. A diferència dels sorbents empaquetats, en aquest cas, no es necessiten fritats per tal de mantenir fixat el material d'SPE i el sorbent se sintetitza dintre del mateix capil·lar.

Els materials monolítiques es poden classificar en dos grans grups: inorgànics o basats en sílice i orgànics o basats en polímers. Els monòlits de tipus

inorgànic se sintetitzen per polimerització d'un precursor de la sílice mitjançant un procés *sol-gel* o per immobilització de les partícules de sílice. Pel que fa als orgànics, la seva síntesi comprèn la polimerització en un sol pas d'un monòmer orgànic en presència d'un entrecreuador, un iniciador i una mescla de solvents porògens. La reacció s'inicia amb llum UV o amb un tractament tèrmic d'un radical lliure. Els monòlits d'origen orgànic emprats en electroforesi capil·lar es basen majoritàriament en polímers de poliestirè i de polimetacrilat [197,198].

Avui en dia, els monòlits es consideren com un dels materials amb més futur per realitzar l'acoblament *in-line* SPE-CE [199]. Són una nova generació de sorbents d'SPE amb unes característiques que permeten solucionar les limitacions dels altres formats d'SPE-CE *in-line*. Entre alguns avantatges es troben la facilitat i baix cost econòmic per a la seva preparació, l'eliminació dels fritats i la problemàtica que aquests comporten i l'elevada permeabilitat que permet interconnectar els porus presents a la seva estructura. Aquesta elevada permeabilitat del monòlit genera contrapressions tres vegades menors que en el cas de sorbents empaquetats i permet fluxos més elevats [197]. Un altre factor a tenir en compte és que la seva síntesi es pot dirigir per tal de controlar les propietats físiques i químiques del material sintetitzat [196,198].

Tot i els grans avantatges d'aquest tipus de material d'SPE, sovint el volum de solvent necessari per eluir els analits és massa gran i pot donar lloc a una baixa eficiència de la separació electroforètica [198]. En aquest cas, es pot disminuir el volum d'eluent arribant a un compromís entre l'elució quantitativa dels analits i l'eixamplament del pic electroforètic. Una altra opció és la utilització de tècniques de preconcentració electroforètiques per tal de fer més estreta la zona on es troba el solvent d'elució que conté els analits. Així doncs, a la bibliografia es troben exemples de diferents estratègies per millorar l'eficàcia de la separació per CE com és l'utilització de l'tITP com en el cas de les columnes *open-tubular* [196,198,200]. Una altra opció és la de realitzar l'elució i la separació electroforètica amb el

mateix electròlit de treball basat en un sistema no aquós [201] o basat en un sistema amb supressió del EOF [202].

### SPE-CE on-line

Aquest acoblament es basa en una connexió física entre el capil·lar de separació electroforètica i l'eluat que prové de l'SPE que es realitza a través d'una interfície que pot ser de diferents tipus: (i) vial [203-207], (ii) vàlvula [36,208,209] o (iii) peça T [186,210-213]. Apart de ser el nexa d'unió entre l'SPE i l'CE, aquesta interfície té una altra funció no menys important, la de controlar, en cas necessari, que el volum introduït en el capil·lar sigui de l'ordre d'una injecció convencional per CE, és a dir, de baixos nL. Això s'aconsegueix o bé injectant en el capil·lar de separació una porció concreta del volum eluït (interfície tipus vàlvula) o dividint el flux que prové de l'SPE de manera que part del volum s'elimina com a residu i part és injectat en el sistema electroforètic (interfícies tipus vial i peça T).

D'aquesta manera, l'SPE i l'CE es realitzen de forma paral·lela cosa que afavoreix l'optimització de les condicions de treball tant per a l'extracció com per a la separació posterior. Tot i això, al tenir un nexa d'unió, aquestes dues etapes depenen una de l'altra de manera que són molts els paràmetres a tenir en compte a l'hora d'optimitzar la metodologia de treball. En general, per automatitzar l'SPE s'utilitzen sistemes de flux continu que, molt breument, es basen en el bombeig d'una fase mòbil a través de connexions, vàlvules i la columna que conté el sorbent cromatogràfic. Així doncs, és necessari que el solvent d'elució sigui compatible amb el sistema electroforètic ja que en els sistemes que existeixen actualment no hi ha la possibilitat d'evaporació i posterior redissolució en un solvent adequat. Per una altra part, els fluxos i volums de l'SPE s'han d'adaptar per tal d'injectar en el capil·lar de separació volums adients per a CE mantenint una concentració màxima d'analits. S'ha de tenir en compte que, degut al mecanisme de flux continu, els extrems del volum d'elució (també anomenat *elution plug*) queden diluïts amb la fase mòbil emprada per realitzar l'SPE.

Pel que fa a l'CE, la principal influència que té el fet de realitzar l'acoblament en mode *on-line*, és que el sistema de separació és discontinu. Això vol dir que el voltatge de separació s'aplica a un sistema que consisteix en la unió de dos capil·lars de separació a una interfície fabricada d'un material inert. Degut a que el corrent derivat de l'aplicació del voltatge està en contacte amb la interfície, és necessari que les cavitats internes de la mateixa no tinguin cap component metàl·lic que resultaria en una fuga de corrent no controlada.

El tipus de sorbent d'SPE més emprat en l'acoblament *on-line* ha estat el C<sub>18</sub> enllaçat [36,186,203-206,208-213] tot i que es poden trobar algunes aplicacions amb C<sub>8</sub> enllaçat [207]. Les mides de les columnes oscil·len entre 1.5 i 20 mm de llargada i entre 100 µm i 3.0 mm de diàmetre intern [36,186,203-209,211-213].

Entre els avantatges d'aquesta opció *on-line* SPE-CE es troben la mínima manipulació de la mostra, la rapidesa en les anàlisis i l'elevat grau d'automatització que s'aconsegueix. Un aspecte important que s'ha de tenir en compte és que la matriu de la mostra no entra en contacte amb el sistema electroforètic de manera que no tenen lloc efectes d'adsorció secundaris en les parets del capil·lar de separació [158].

Per una altra banda, entre els principals desavantatges d'aquest acoblament cal destacar la dificultat en la construcció dels sistemes emprats per l'acoblament i l'eixamplament de banda [191]. Aquest eixamplament ve provocat principalment per la presència de la interfície en el sistema electroforètic i pel gran volum d'eluat introduït en el capil·lar de separació. També és important controlar l'existència de volums morts si l'eficàcia de la separació electroforètica no és l'apropiada. Aquests volums morts es poden evitar fent que l'interior de les interfícies no presentin cap tipus d'imperficcions i que els extrems dels capil·lars emprats per realitzar les connexions tinguin una forma adequada. Més concretament, si a l'hora de tallar els capil·lars, el tall no és completament net i amb un angle de 90°



respecte a la llargada, és a dir, sense bisellats, es poden produir volums morts.

### (i) Interfície tipus vial

En aquest tipus d'interfície hi ha la presència d'una cavitat o recipient que té la funció de recollir una fracció determinada de l'eluent que prové de l'SPE. Aquesta fracció ve determinada pel sistema de flux continu que s'utilitza per tal de portar a terme l'SPE. Aquesta característica presenta el gran avantatge de poder escollir la zona d'eluent on la concentració dels analits és màxima. Així, la millora de sensibilitat pot ser més gran respecte d'altres dissenys. A la Figura 1.10 es troben representats tres dissenys diferents d'interfícies de tipus vial.

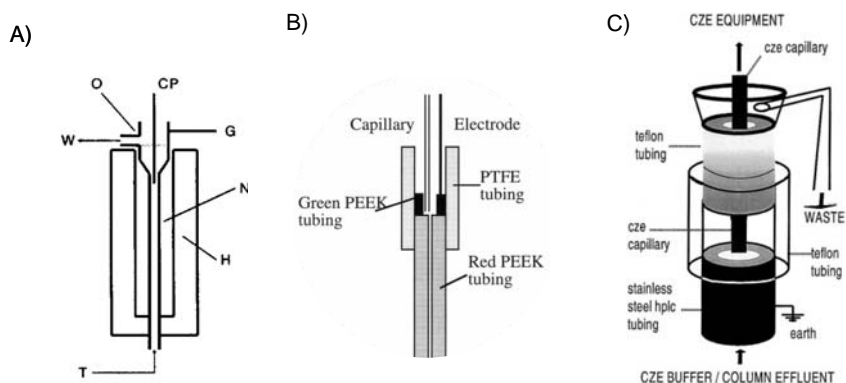


Figura 1.10. Representació esquemàtica de interfícies tipus vial emprades per A) Chen i Fang [203], B) Veraart *et al.* [204] i Visser *et al.* [207] i C) Stroink *et al.* [205,206].

En un dels dissenys representat a la Figura 1.10A) [203], la interfície, constituïda per una agulla d'acer inoxidable (N), es troba dintre d'un recipient de plàstic (H) que permet l'aïllament elèctric. El flux del sistema d'SPE arriba a la interfície per la part inferior (T) i un orifici situat a la part superior de l'interfície (O) controla el nivell de líquid dintre de la mateixa fent que el volum sobrant s'elimini al desguàs (W). L'agulla està elèctricament connectada a un generador d'elevat voltatge (G) de manera que, en presència d'electròlit al seu interior, es genera un corrent que permet

l'injecció electrocinètica i la separació dels analits carregats en el capil·lar de separació (CP).

La segona interfície tipus vial consisteix en una cavitat formada, principalment, per la unió de tres tubs de diferent diàmetre intern i extern [204,207]. Així, el tub de poli-éter-éter-cetona (PEEK) vermell (0.13 mm ID, 1/8 in. OD) és el que permet el pas de flux del sistema d'SPE fins l'interfície pròpiament dita. El tub de politetrafluoroetilè (PTFE o teflon), amb unes dimensions de 1/16 in. ID, 1/18 in. OD i 37 mm de llargada, dóna forma a la cavitat i permet l'acoblament de tots els components dintre de la interfície. En la cavitat del tub PEEK verd (0.75 mm ID, 1/16 in. OD) es troba un extrem del capil·lar de separació i sobre seu es troba un elèctrode connectat al terra que permet l'aparició d'un corrent en aplicar el potencial de separació. Una vegada l'eluat es troba a la cavitat formada pel tub PEEK verd, els analits s'injecten hidrodinàmicament en el capil·lar aplicant una pressió de 40-70 mbar a l'altre extrem.

La tercera interfície de tipus vial estudiada és la representada a la Figura 1.10 C) [205,206]. De la mateixa manera que les anteriors, es basa en la formació d'una cavitat per recollir la fracció d'interès de l'eluat de l'SPE. El sistema de flux continu que permet automatitzar l'SPE es connecta a l'interfície mitjançant un tub d'acer inoxidable que està elèctricament connectat al terra. D'aquesta manera, en presència d'una solució amortidora, es permet el pas d'un corrent a l'aplicar un voltatge. Un tub de PTFE (1.52 mm ID, 3.18 mm OD), permet la formació d'una cavitat entre el tub d'acer inoxidable que prové de l'SPE i un altre tub de teflon més petit situat a la part superior (0.38 mm ID, 1.59 mm OD). Aquest segon tub de PTFE més petit permet situar l'extrem del capil·lar de separació on es troba la mostra i delimita el volum total present a l'interior de la interfície, que és d'uns 11 µL. A la part superior de tota la interfície es troba un sistema per eliminar l'excés de mostra del sistema.

### (ii) Interfície tipus vàlvula

Generalment, aquest tipus d'interfície consisteix en una vàlvula col·locada en posició *in-line* respecte el sistema electroforètic. Això significa que, tot i que l'SPE i l'CE es realitzen en mode *on-line*, el corrent per a la separació electroforètica passa a través de l'interior de la vàlvula que permet la connexió entre les dues etapes de l'anàlisi. Així, les vàlvules emprades han de complir dos requisits molt importants: presentar un volum petit entre els ports i estar fabricades d'un material aïllant. El primer requisit es basa en les petites dimensions dels capil·lars que estan connectats en aquests tipus d'acoblements. En augmentar el volum intern de la vàlvula, es poden presentar més irreproduïbilitats i volums morts més grans. Pel que fa a l'aïllament, és fonamental per a què, en aplicar el voltatge, no hi hagin fuites de corrent a través de la vàlvula i, conseqüentment, a través del sistema d'SPE.

Hi ha dues possibilitats per a connectar l'SPE i l'CE amb un sistema de vàlvula *in-line*: en presència o en absència d'un *loop*. Això s'explica pel volum que s'introdueix en el sistema d'CE ja que les vàlvules amb *loop* s'utilitzen per tal de disminuir el volum procedent de l'SPE i adequar-lo als volums adients per CE [36,208]. A la Figura 1.11 es troba representat un sistema SPE-CE *on-line* amb una interfície tipus vàlvula de sis ports amb *loop* [36]. En aquest sistema, una vegada que la fracció desitjada de l'eluat es recollida en el *loop*, es canvia la posició de la vàlvula per tal de connectar els dos capil·lars emprats per a la separació electroforètica. En aquest moment, en aplicar un potencial, els analits s'injecten electrocinèticament en el sistema i seguidament la vàlvula 1 torna a canviar de posició de manera que el sistema electroforètic format per dos capil·lars de separació (un de 18+82 cm i l'altre de 20 cm) queda tancat per la vàlvula 1, la qual permet el pas del corrent de separació.

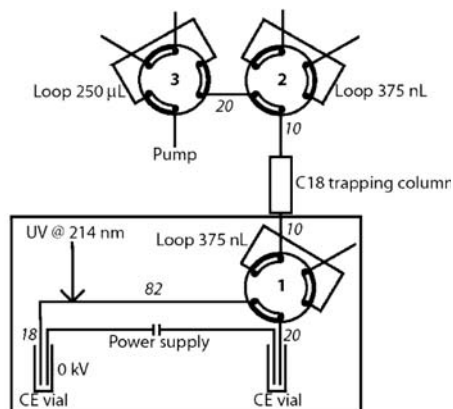


Figura 1.11. Representació esquemàtica d'un sistema *on-line* SPE-CE amb una interfície tipus vàlvula amb presència de *loop* [36].

En el cas de que no s'utilitzi *loop*, el volum introduït en el capil·lar de separació és considerablement més gran i per això cal adoptar diferents estratègies per tal de mantenir una adequada eficàcia de la separació electroforètica. Una d'aquestes estratègies és la utilització de tècniques de preconcentració electroforètiques per tal de preconcentrar el volum d'eluat procedent de l'SPE introduït en el capil·lar de separació [209].

### (iii) Interfície tipus peça T

La interfície de tipus peça T, també anomenada *T-split* es basa simplement en una peça que divideix el flux que prové de l'SPE mitjançant el sistema de flux continu [186,210-212]. En aquest cas, a diferència de les altres interfícies, no és possible escollir una fracció determinada de l'eluat de l'SPE ja que el flux es va dividint permanentment, fent que la fracció injectada en el capil·lar de CE sigui molt més homogènia que amb les interfícies tipus vàlvula i tipus vial. A més, amb aquest sistema no es requereix una manipulació de la interfície. S'ha de tenir en compte però, que la divisió de flux no depèn de la interfície, sinó de la diferència de longituds dels capil·lars

que uneix. A la Figura 1.12 es troba representat un sistema d'SPE-CE en mode *on-line* amb una interfície de tipus peça T.

En algun cas, per tal de controlar el volum de mostra introduït en el capil·lar s'utilitza un sistema mixt que inclou una interfície de peça T i una vàlvula. [210]. La peça T rep el volum d'eluat de l'SPE i divideix el flux en dos parts, una de les quals és dirigit cap al detector i l'altra cap a la vàlvula. Ja que la vàlvula emprada té dues posicions, quan està oberta permet el pas del flux al seu través i es produeix la seva divisió però quan està tancada no ho permet i fa que tot el flux es dirigeixi cap al capil·lar de separació.

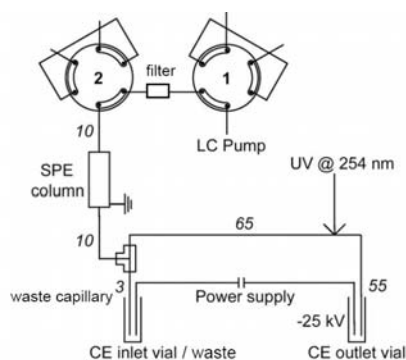


Figura 1.12. Representació esquemàtica d'un sistema *on-line* SPE-CE amb una interfície tipus peça T [213].

A continuació es presenta l'article en premsa a la revista *Trends in Analytical Chemistry* sorgit arran de la revisió bibliogràfica realitzada sobre els diferents acoblaments de l'extracció en fase sòlida a l'electroforesi capil·lar. En el treball es descriuen les metodologies desenvolupades i els resultats de les diferents aplicacions. A més s'inclouen alguns dels resultats més rellevants obtinguts en la present Tesi Doctoral ja que aquesta revisió s'ha efectuat un cop finalitzada la part experimental de la mateixa.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

**1.4 Recent advances in coupling between solid  
phase extraction and capillary electrophoresis  
(SPE-CE)**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



## RECENT ADVANCES IN COUPLING BETWEEN SOLID PHASE EXTRACTION AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS (SPE-CE)

Patricia Puig, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

Solid phase extraction (SPE) is a good strategy for overcoming the low sensitivity of capillary electrophoresis (CE). Here, we present a critical review of applications of coupling between SPE and CE reported between 2000 and March 2007. We highlight selected developments and advances and focus on various combinations of these two techniques, which include at-line, in-line and on-line modes of SPE-CE. We discuss the advantages and the drawbacks of the different set-ups and methodologies. We also outline novel trends in SPE-CE coupling.

**Keywords:** At-line; Capillary electrophoresis; Coupling; In-line; Off-line; On-line; Preconcentration technique; Solid-phase extraction; SPE

---

### 1 INTRODUCTION

Capillary electrophoresis (CE) is a very popular, widely accepted analytical technique for separation. Its success is due to its ability to determine different analytes simultaneously with high efficiency, high resolution, low consumption of samples and electrolytes, and short analysis times.

However, an important limitation hampers the use of CE: lack of sensitivity. It is well known that CE usually suffers from poor concentra-

tion sensitivity, especially in the most widely used ultraviolet (UV) absorbance detection because of the short optical path length and low volume. So, enhancing analytical response is a major challenge in CE.

To improve sensitivity in CE, several strategies have been proposed. They are mostly based on using more sensitive detection systems and/or on increasing the sample volumes injected into the electrophoretic system. Although highly sensitive methods of detection are available,

(e.g., laser-induced fluorescence (LIF) and mass spectrometry (MS) [1-4], they are also highly selective and expensive, so UV absorbance detection is still the most widely used.

When CE is used with UV detection, the main way of increasing the detection signal is therefore to increase the concentration of the analyte, since the molar absorptivity and the optical path length are fixed with the capillary diameter. There are two main ways in which the concentration of the analytes in a sample can be increased prior to their separation by CE: electrophoresis-based methods [5-7] and chromatography-based methods [8-16].

In short, electrophoretic methods are based on the difference in the electrophoretic mobility of the analytes in different zones. Despite their good performance and simplicity, when hydrodynamic injection is applied, they suffer because sample volume is limited to one capillary volume. This limitation can partly be overcome by using electrokinetic injection, but this approach generally suffers from poor reproducibility, discriminates on the basis of ion mobility and is also susceptible to small differences in the sample matrix. The main drawback when working with these procedures is the analysis of complex matrices, since numerous substances may be concentrated simultaneously with the analytes and this finally leads to bad separation. In that case, it is essential to have an effective clean-up step.

By contrast, chromatographic methods enable higher sample volumes to be injected because the analytes are adsorbed onto a stationary phase. Moreover, the sample clean-up in chromatographic methods is effective because the sample matrix can be removed from the system. Another advantage of chromatographic-based preconcentration prior to CE is that the preconcentration technique can be performed more selectively, since the chromatographic mechanism is orthogonal to the electrophoresis. Chromatography-based preconcentration includes solid phase extraction (SPE) and solid phase microextraction (SPME) [10-18] but SPE is the most widely used because it can achieve high concentration and is versatile [11, 13-18].

Covering publications in the period from 2000 to March 2007, this article discusses the latest approaches to coupling SPE and CE, and the different sample matrices studied. It comprises four main sections, each of which will deal with one way of coupling SPE and CE: off-line; at-line; in-line; and, on-line.

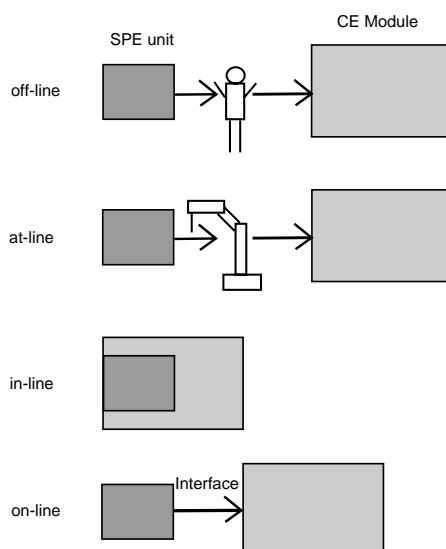
## 2 SOLID PHASE EXTRACTION-CAPILLARY ELECTROPHORESIS (SPE-CE)

SPE can solve the two main problems in CE; it improves sensitivity and cleans the sample. It retains the analyte from a large volume of sample in a sorbent. These analytes can then be eluted in a lower volume of elution solvent. Besides, when the sample

needs to be cleaned, an additional step is added between the retention and elution of the compounds. SPE can therefore simultaneously enrich the trace analytes and remove the potentially interfering compounds. Obviously, if there are no losses, the higher the ration between sample and elution volumes, the higher the preconcentration factor obtained. However, since injection volumes suitable for CE are at the low-nL levels, generally only part of the eluted sample from SPE can be injected into the separation capillary.

Figure 1 shows the four possible options for coupling SPE and CE:

- Off-line SPE-CE has no integration and the sample must be manually transferred from the SPE column to the CE system.
- At-line coupling is an automated off-line combination that uses a robotic device to prepare the sample and an auto-injector to inject the extract into the CE instrument. There is no direct stream of liquid between the SPE unit and the analytical unit and the whole extract is not transferred to the CE instrument.
- In-line SPE-CE entails complete integration between SPE and CE, which normally involves inserting the SPE material into the capillary in which the electrophoretic separation is performed.



**Figure 1.** Different types of interfacing between a sample-preparation method and capillary electrophoresis (CE) (modified from [16]).

- On-line coupling comprises physical connection and contact between the capillary and the stream flowing from the SPE column. This coupling is performed via an interface that automatically transfers the analytes from the SPE column to the separation capillary.

Various materials have been used as sorbents in SPE, including low-specific materials and high-specific materials. Of the low-specific materials, C<sub>18</sub> is the most widely used sorbent. However, when high selectivity is required, high-specific materials can be more appropriate (e.g., immunoaffinity materials and molecularly-imprinted polymers (MIPs)).

In the period covered by this article, several interesting combinations and applications of SPE and CE, have been proposed (see Table 1). Some of the applications require an additional sample-pretreatment step (see below). We need to point out that the enrichment factors reported in the literature should be interpreted with caution because different conditions are used for comparison with conventional CE injection.

### 2.1 Off-line SPE-CE

The off-line combination of SPE and CE is the easiest. It cannot be considered as a coupling but as a combination of SPE and CE. In short, it percolates a high sample volume

through a SPE cartridge in such a way that the analytes are retained in the sorbent. Afterwards, the analytes are eluted with a small volume of an appropriate elution solution and can be injected in the CE system. Due to the high volumes, the limits of detection (LODs) of this mode are in general very low. Moreover, compared with other SPE-CE modes, further preconcentration can be obtained if the eluted sample is evaporated to dryness and redissolved in a lower volume. It is very useful for cleaning up complex matrices before electrophoretic analysis or even before preconcentrating the analytes using other approaches. Besides, the off-line mode has considerable potential in determining analytes at very low concentrations when a large sample volume is available [14, 19-22]. However, when low sample volumes are treated, sample losses are frequent and minimal sample handling is advisable. Other drawbacks of the off-line procedures are that they lack precision, are time consuming and frequently require manual handling of toxic reagents and organic solvents [7, 13].

### 2.2 At-line SPE-CE

The first level of SPE automation is at-line coupling to CE, which can be performed in two different ways, using:

- a robotic arm interface; or,
- The replenishment system of the CE equipment.

**Table 1.** Different SPE-CE methods (at-line, in-line and on-line) for the analysis of standards and real samples.

Analytes	Sample	CE mode	SPE material	Enrichment factor	Detection	LODs	Remarks	Ref
<b><i>At-line SPE-CE</i></b>								
Pesticides	River water	MEKC	C <sub>18</sub>	12	UV (226 nm)	10-30 µg·L <sup>-1a</sup>	- Robotic arm	[24]
NSAIDs	Urine, serum	MEKC	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (200 nm)	12-250 µg·L <sup>-1 a</sup>	- Robotic arm Pre-treatment: filtration	[25]
Phenolic compounds	Citrus	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (200 nm)	120-390 µg·L <sup>-1 a</sup>	- Mechanic arm	[26]
Mercury species	River water	CZE	C <sub>18</sub>	20	UV (200 nm)	1-2 µg·L <sup>-1 a</sup>	- Robotic arm - Confirmatory method	[27]
Tetracyclines	Surface water	CZE	Strata-X	n.d.	UV (260 nm)	2 µg·L <sup>-1 a</sup>	- Robotic arm	[28]
Sulfonamides	Milk	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	MS	0.6-1.1 µg·L <sup>-1</sup>	- Replenishment system Pre-treatment: deproteinization	[29]
Biological markers	Urine	CZE	Hysphere Resin GP	3-10	UV (214 nm)	140-4500 µg·L <sup>-1 a</sup>	- Replenishment system Pre-treatment: acidification	[30]
<b><i>In-line SPE-CE</i></b>								
Inorganic anions	Standards	tITP	Latex AS5A	2400-50	UV (214 nm)	0.28-69 µg·L <sup>-1</sup>	- Open-tubular column	[32]
Inorganic anions	Antartic ice core	tITP	Latex AS5A	100	UV (195 nm)	2.2-11.6 µg·L <sup>-1</sup>	- Open-tubular column	[33]

Analytes	Sample	CE mode	SPE material	Enrichment factor	Detection	LODs	Remarks	Ref
Amino acids	Standards	CZE	Sol-gel C <sub>18</sub> -TMS	150000	UV (200 nm)	24.5-60.7 nM	- Open tubular column	[36]
Myoglobin, asparagine	Standards	CZE	Sol-gel C <sub>18</sub> -TEOS	3000-7000	UV (214 nm)	n.d.	- Open tubular column	[53]
Propranolol, metoprolol	Standards	CZE	Cation exchanger	5000	UV (214 nm)	0.02-0.1 µg·L <sup>-1</sup>	- Open tubular column	[54]
Inorganic anions	Tap, river waters	tITP	Latex AS5A	n.d.	UV (195 nm)	n.d.	- Open tubular column	[35]
Neuropeptide	Urine, serum	CZE	Immobilized FAB	n.d.	UV (195, 230, 260, 292 nm)	1 µg·L <sup>-1</sup>	- Packed beds Pre-treatment: filtration	[37]
Peptides	Impurity profile	CZE	C <sub>18</sub>	100-200	UV (214 nm)	110 µg·L <sup>-1</sup>	- Packed beds Pre-treatment: filtration	[38]
Aromatic amines	Urine	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (195 nm) MS	22 nM	- Packed beds Pre-treatment: deproteinization	[57]
Aromatic amines	Urine	CZE	Blue chitin	4800	MS/MS	14 ng·L <sup>-1</sup>	- Packed beds Pre-treatment: deproteinization	[56]
Oxprenolol	Urine	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (195 nm)	250 ng·L <sup>-1</sup>	- Packed beds Pre-treatment: LLE	[39]

Analytes	Sample	CE mode	SPE material	Enrichment factor	Detection	LODs	Remarks	Ref
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	MS	100 pM	- Packed beds Pre-treatment: digestion	[40]
Chlorophenols	River water	CZE	Absolut Nexus	4000	UV (230 nm)	70-100 ng·L <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	- Packed beds Pre-treatment: filtration	[41]
Chlorophenols	River water	CZE	Absolut Nexus	16000	UV (230 nm)	17-25 ng·L <sup>-1</sup> <sup>a</sup>	- Packed beds Pre-treatment: filtration	[58]
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (195 nm) MS	10 µg·L <sup>-1</sup>	- Packed beds	[42]
Ceftiofur	River water	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (254 nm)	10 ng·L <sup>-1</sup>	- Packed beds Pre-treatment: off-line SPE	[21]
3-nitrotyrosine	Urine	CZE	Oasis MCX	100	UV (430 nm)	4.4 µM	- Packed beds	[43]
Peptides	Standards	CZE	St-DVB	n.d.	UV (205 nm)	1 µg·L <sup>-1</sup>	- Disks	[44]
Peptides	Standards	CZE	St-DVB	n.d.	MS	20 ng·L <sup>-1</sup>	- Disks	[59]
Peptides	Plasma	CZE	St-DVB	n.d.	UV (205 nm)	5 µg·L <sup>-1</sup>	- Disks Pre-treatment: off-line SPE	[60]
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	MS	0.5 nmol	- Disks Pre-treatment: digestion	[45]
Peptides	Standards	CZE	St-DVB	n.d.	MS/MS	0.1 mM	- Disks Pre-treatment: digestion	[46]

Analytes	Sample	CE mode	SPE material	Enrichment factor	Detection	LODs	Remarks	Ref
Inorganic anions	Seawater	tITP	Latex AS18	20	UV (214 nm)	0.6-52800 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	- Monolithic column Filtration	[47]
Organic anions	Standards	tITP	Latex AS18	10400	UV (214 nm)	1.5-12 nM	- Monolithic column	[50]
Amino acids	Standards	tITP	Methacrylate	300	UV (214 nm)	n.d.	- Monolithic column	[48]
S-propranolol	Standards	CZE	Methacrylate	n.d.	UV (225 nm)	n.d.	- Monolithic column	[49]
Antidepressants	Standards	CZE	Methacrylate	500	UV (200 nm)	n.d.	- Monolithic column	[62]
Protein	Serum	CZE	Methacrylate	n.d.	UV (214 nm)	12 nM <sup>a</sup>	- Monolithic column Pre-treatment: dilution	[63]
Peptides, proteins	Leukemic cells	CZE	Methacrylate	n.d.	UV (214 nm)	n.d.	- Monolithic column Pre-treatment: digestion	[64]
Peptides	Standards	CZE	Methacrylate	n.d.	UV (214 nm)	n.d.	- Monolithic column	[65]
Peptides	Urine	CZE	Sol-gel C <sub>18</sub>	n.d.	MS	n.d.	- Monolithic column	[51]



Analytes	Sample	CE mode	SPE material	Enrichment factor	Detection	LODs	Remarks	Ref
<b><i>On-line SPE-CE</i></b>								
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (215 nm)	1.5 mg·L <sup>-1</sup>	- Interface: Vial Pre-treatment: on-line SEC	[68]
Peptides	Cerebro-spinal fluid	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (215 nm)	1.5 mg·L <sup>-1</sup>	- Interface: Vial Pre-treatment: on-line SEC	[67]
Insulin derivatives	Urine, serum, plasma	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (200 nm)	5 mg·L <sup>-1</sup>	- Interface: Vial Pre-treatment: deproteinization	[31]
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (214 nm)	5-10 µg·L <sup>-1</sup>	- Interface: Valve	[69]
Ceftiofur, cefoperazone	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (254 nm)	250 ng·L <sup>-1</sup>	- Interface: Valve CE injection by LVSS	[70]
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	800	UV (200 nm)	n.d.	- interface: T piece Pre-treatment: digestion	[66]
Peptides	Standards	CZE	C <sub>18</sub>	200	UV (200 nm)	5 µg·L <sup>-1</sup>	- Interface: T piece	[71]
Peptides	Cerebrospinal fluid	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (215 nm)	100 µg·L <sup>-1</sup>	- Interface: T piece Pre-treatment: on-line SEC	[72]
Ceftiofur, cefoperazone	Plasma	CZE	C <sub>18</sub>	n.d.	UV (254 nm)	100 µg·L <sup>-1</sup>	- Interface: T-piece Pre-treatment: deproteinization	[73]

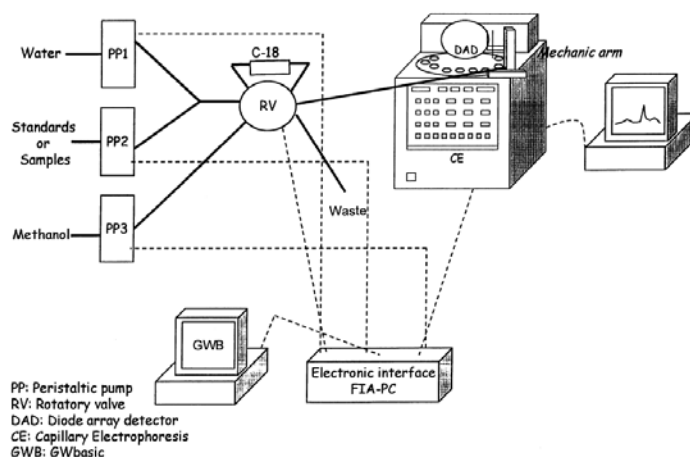
<sup>a</sup> in standards; n.d. = no data.

In both, a discrete fraction of the eluate containing the analytes is introduced into an empty vial. The difference between them lies in how the sample is introduced. When the robotic arm is used, it should have access to the equipment autosampler to fill the vial [23-28]. If the replenishment system is used, the needle which fills the vials should be connected to the continuous flow system in such a way that a vial inside the CE system can be filled with the flow from the SPE system [23, 29, 30].

At-line SPE-CE coupling was used to determine nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in biological fluids [25]. Figure 2 shows the at-line system used. A maximum volume of 12 mL of sample was extracted in a C<sub>18</sub> sorbent through a continuous flow system. The elution was performed with 0.4 mL of 75% methanol in water. In this case, a laboratory-made

robotic arm transported the vial containing the eluate from the SPE to the CE system. The analytes were then injected into the CE capillary hydrodynamically (20 psi for 5 s). Sensitivity for standards improved with the at-line SPE step in such a way that the LODs decreased from 880-1710 to 12-61  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for acetylsalicylic acid). When the method was applied to human urine and serum, the clean-up of the matrix was extremely efficient, especially with the serum samples. SPE recoveries for all the compounds were in the range between 71-107% in both urine and serum samples, except for acetylsalicylic acid which could not be extracted.

Another system, in which a robotic arm also transported the vial containing the sample to the separation capillary, was used to determine tetracyclines in surface waters [28]. In this case, 20 mL of



**Figure 2.** Automatic flow-injection (FI) manifold coupled to a capillary electrophoresis (CE) system for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (from [25]).

sample was loaded into a modified styrene-divinylbenzene polymer (Strata-X) and eluted with 0.5 mL of methanol. Calibration of the method performed with standards showed LODs lower than  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The method was successfully applied to the determination of three of the tetracyclines studied in spiked samples of groundwater and surface water with recoveries ranging from 94 to 106%.

An at-line coupling of SPE and CE was also used by Santos *et al.* to determine antibiotic sulfonamides in milk samples [29]. The methodology involved preconcentration of 2 mL of sample using a  $\text{C}_{18}$  cartridge after protein precipitation with hydrochloric acid 35%. The at-line coupling was performed by modifying the replenishment system in the CE equipment. In this approach, the eluent obtained from the SPE elution step (250  $\mu\text{L}$  of methanol) was introduced into vials for CE analysis in such a way that the SPE continuous flow system was connected to the replenishment system. Then, when the needle used for replenishment was inserted into an empty vial to fill it, the valves that connected the sample treatment and CE were switched to the inject position with the air flow driving the sample to the CE vial. Finally, once the sample had been introduced into the vial, a conventional hydrodynamic injection was performed (50 bar for 7 s). Recoveries of the whole method (both deproteinization and at-line SPE) ranged were 89-96%.

Another option presented by Ruiz-Jiménez *et al.* [30] for the determina-

tion of several biomarkers in urine by at-line SPE-CE involved using a commercial automatic SPE extractor (Prospekt unit) coupled to the replenishment system of the CE equipment. In this approach, 2.5 mL of sample was loaded into a Hysphere Resin GP and the elution was performed by pumping a mixture of acetonitrile with acidified water 25:75 (pH 3) at  $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  for 20 s. However, the best injection conditions for CE (50 mbar for 5 s) involved a sample pH around 11. To achieve the suitable pH, the tubing that connected the SPE cartridge and the replenishment system was loaded with 0.1 M NaOH. Results showed that sensitivity increased 3-10-fold.

### 2.3 In-line SPE-CE

As stated above, in in-line SPE-CE systems, the preconcentration column is an integral part of the CE system, so the voltage is applied through the SPE sorbent. The main advantage of these systems is that they are easily automated with fewer sample-handling steps and, unlike at-line and off-line systems, the complete eluate from SPE is analyzed by CE. However, except for special cases, the main drawback is difficulty in analyzing complex samples since problems with clogging, a reversed electroosmotic flow (EOF) or irreproducible results caused by adsorption of sample matrix components to the capillary wall can be observed [31]. Moreover, because of the complete injection of the eluate, the separation efficiency greatly depends on the volume and the nature of the elution

solvent used.

Numerous papers have been published in recent years reporting in-line SPE-CE methods that use such approaches as open-tubular (OT) columns [32-36], small packed beds [36-43], disks [44-47] and monoliths (also known as continuous beds) [47-51], so this is an area of considerable interest in CE research.

#### *Open-tubular columns*

OT columns are a simple way of performing preconcentration in capillary columns. Briefly, a short section of the capillary at the injection end (a few cm long) is coated with stationary phase. This capillary section works as a SPE column integrated into the CE system in such a way that, when the sample is loaded by flushing, the analytes are retained. Then, after the elution-solvent plug is injected, a voltage is applied and the analytes are simultaneously eluted and separated. The main advantage is fast sample loading, but the main drawback is lack of capacity because these columns are easily overloaded.

Breadmore *et al.* [32, 33, 52] were the first to use an OT device for preconcentrating ionic analytes by ion-exchange interactions. The analytes were adsorbed in positively-charged latex particles that coated the inner wall of the capillary where a layer of anion-exchange stationary phase was formed. The retained analytes were eluted by transient isotachophoretic (tITP) gradient that

involved a further preconcentration of the elution plug. Figure 3 shows the steps of the methodology. The method developed was applied to environmental samples and  $\text{NO}_3^-$  was determined in Antarctic ice cores [33]. To be more precise, the sample was loaded at 2 bar for 600 s and the  $\text{NO}_3^-$  ions were retained in the sorbent. Then, the capillary was 95% filled from the outlet end (~3 bar for 90 s) with a background electrolyte (BGE) containing a weak ion-exchange competing anion of low mobility (100 M NaF). After that, the vials were changed to a new BGE containing a stronger anion-exchange competing anion of higher mobility (1,5-naphthalenedisulfonate (NSD)). In this way, when the separation voltage was applied, some of these more mobile, more strongly competing anions migrated ahead of the less mobile, more weakly competing anions, establishing a gradient boundary according to isotachophoretic (ITP) principles. As the NSD ion reached the retained  $\text{NO}_3^-$ , immediate desorption occurred and the analyte migrated in accordance with its electrophoretic mobility. This method improved sensitivity 100-fold and the LOD was  $2.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The most important advantage of this application over the method based on HPLC (LOD of  $0.31 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was that the sample can be 100 times smaller ( $< 50 \mu\text{L}$ ).

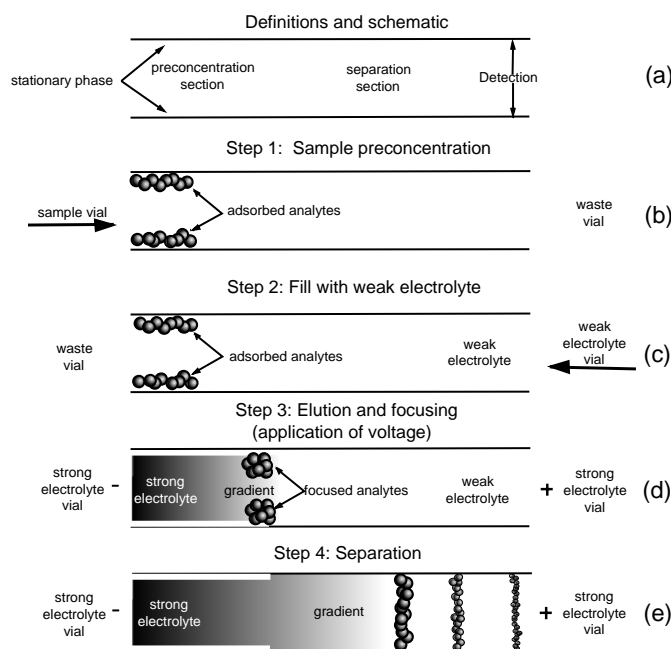
In another OT system [36], zwitterionic analytes (amino acids) were extracted using electrostatic interaction and the positively-charged sol-gel  $\text{C}_{18}$ -TMS coating. In this

system, after the SPE step, the extracted amino acids can be further focused into a narrow band by manipulating the buffer pH. Two different methods were presented:

- In the first one, the negatively-charged amino acids retained in the sorbent were desorbed by using a low-pH running buffer and a high electric field. In this way, when the acidic running buffer came into contact with the

extracted solute zone, the net charge of the amino-acid molecules was reversed, providing a repulsion mechanism so that they could be desorbed from the capillary surface.

- In the second one, the sample matrix was removed by the EOF and the resulting method was more efficient and more sensitive with an enrichment factor for alanine of  $15 \cdot 10^4$  fold.



**Figure 3.** Preconcentration and separation procedures. (a) capillary schematic and definitions, (b) injection of the sample and analyte preconcentration, (c) filling of capillary with weak electrolyte from the outlet end (in order to minimize the possibility of movement of the preconcentrated analytes), (d) application of voltage resulting in the generation of a gradient that focuses and elutes the analytes from the preconcentration section of the capillary, and (e) electrophoretic separation of the focused analytes in the separation section of the capillary (from [52]).

In a similar system [53], a negatively charged sol-gel coating was used to preconcentrate an amino acid (asparagine) and a test protein (myoglobin). In this method, the extracted analytes can be desorbed from the sol-gel coating by using a high-pH buffer that changes the charge of the analytes to negative values. Once the basic buffer enters the capillary filled with sample solution, the analytes are desorbed from the SPE material and a dynamic pH junction is formed between the running buffer and the sample solution. The sensitivity of the different columns tested improved by between 97 and 7000 fold.

One modification of the open-tubular approaches involves combining two capillaries with different internal diameters for both in-line SPE and CE separation [35, 54, 55]. In these systems the first capillary is the SPE step and the second the electrophoretic separation. The main advantage is that, as the separation capillary does not take part in the coating procedure, the CE separation and the coating can be optimized independently.

Some approaches for coupling the two capillaries have been developed, one of which used a PTFE sleeve to join them [35, 55]. In this set-up, a 10-cm latex-coated capillary (25- $\mu\text{m}$  or 50- $\mu\text{m}$  i.d.) which was used for the SPE step, was connected to the separation capillary (75  $\mu\text{m}$  i.d.) to determine inorganic anions in river and tap waters. The in-line SPE-CE method used to analyze tap water

comprised a sample injection by pressure (950 mbar for 10 min) and elution by tITP gradient (10 mM NaF as the weak electrolyte (WE) and 10 mM octanesulfonate as the strong electrolyte (SE)). One advantage of the system is that it was suitable for the in situ sampling and preconcentration of anions in the SPE capillary, so the elution could be performed in-line coupled to the separation capillary, as explained above. In this way, 0.5  $\mu\text{L}$  of river water was analyzed without the CE capillary being contaminated by the sample-matrix ions. Results showed that, while no inorganic anions were found at  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  levels in tap-water or river-water samples, nitrite, nitrate and iodine were detected at concentrations of 28  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 11  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and 74  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

The other option used a T-piece to join the capillaries and that prevented the sample matrix or the SPE conditioning solvents from entering the separation capillary [54]. Capillaries with different inner diameters were bonded with weak cation-exchanger and glycolic acid. Good reproducibility was achieved by joining capillaries 100 cm long and then cutting them in accordance with the experimental requirements. Of the different inner diameters and total lengths tested, results were best with a 100- $\mu\text{m}$  i.d., 12-cm long capillary. With the proposed set-up, samples were loaded by applying pressure at a flow rate of 0.03  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  for 3 min and the optimum elution conditions comprised an elution plug of 2.0 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  introduced electrokinetically

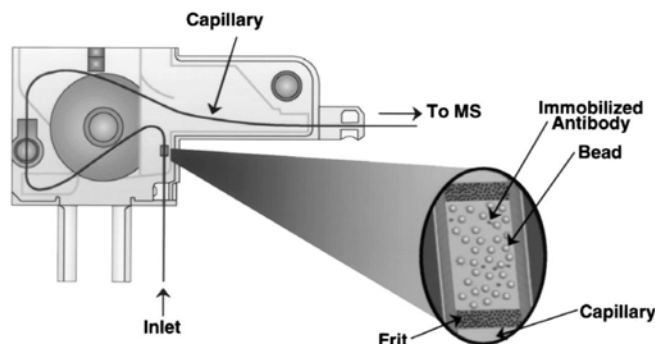
(10 kV for 10 s). The sensitivity for propranolol and metoprolol was about 5000 times greater than that of conventional electrokinetic injection.

#### *Packed beds*

Small packed beds have been widely used by several in-line SPE-CE devices [37-41]. In this set-up, the packing material is most commonly kept in place by retaining frits in a section near to the injection end of the electrophoretic capillary. As in OT systems, the capillary that contains the SPE sorbent can be the same as that for the CE separation or a different one that it is coupled in-line. The packed columns generally have higher retention and column capacity than OT columns because of the greater amount of SPE material present. However, frits are normally needed to prevent sorbent loss and this can lead to increases in backpressure, long analysis times and irreproducible EOFs [32]. While the set-ups are relatively easy and fast to build, continuous use can result in compression of the column bed, which leads to irreproducible flow rates. And if the elution of the analytes from the SPE material is inefficient, peak broadening can occur [48]. However, it is very useful for testing new SPE materials because the capillary is easy to pack. As far as packed columns are concerned, the novelty in the papers published in the period studied was the SPE material [37] and the possibility of packing the chromatographic sorbent inside the separation capillary [39-41].

Guzman [37] used a packed bed (see Figure 4) in an in-line SPE-CE method (also called immunoaffinity CE) for the selective determination and characterization of the peptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH), in serum and urine. The novelty of the method was that the packed beds were placed in a capillary other than the CE capillary which comprised monovalent FAb-antibody fragments immobilized on a solid support structure of controlled porosity. The peptide under study was preconcentrated by selectively binding to the antibody fragments. This was done by loading about 30  $\mu\text{L}$  of sample (930 mbar for 9 min) into the capillary containing the SPE sorbent. Afterwards, the SPE material was cleaned up to remove other serum and/or urine components and the analyte was eluted with 90 nL of 0.3 M glycine-HCl buffer at pH 2.5 by applying a pressure lower than in the loading step (40 mbar for 35 s). Two different detectors were coupled: UV to GnRH quantification and MS for molecular information of the peptide. By using UV detection, GnRH was detected in serum at a concentration of 1  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

In another study [56], blue chitin was used as the solid-phase material for the analysis of heterocyclic aromatic amines in biological samples. Previously, the authors had developed an in-line SPE-CE-MS method with  $\text{C}_{18}$  sorbent [57]. In both cases, a considerable amount of sorbent (50-10 mg) was packed because of the difference in the inner diameters of the SPE and CE capillaries (200  $\mu\text{m}$  and 30  $\mu\text{m}$ , respectively). With the



**Figure 4.** A commercial cartridge-cassette containing a fused-silica capillary with an analyte concentrator positioned at approximately 10 cm from the inlet of the capillary (from [37]).

$C_{18}$  method, the reported LODs in standards were around 10 fmol, which is a 10-100 fold improvement in sensitivity compared to HPLC-MS. More recently, the method was improved by using MS/MS detection and blue chitin instead of  $C_{18}$  to achieve a more efficient extraction of the amines. Moreover, the frits were removed to minimize band broadening, since the blue-chitin particles got stuck between the two narrower capillaries because of their flat structure [56].

When human urine samples were analyzed with this last approach, after deproteinization, SPE conditions involved loading sample volumes of 0.21 and 10  $\mu\text{L}$  and an elution step with 18 nL of methanol and 100 nL of methanol/water (85:15) with 0.075% formic acid for the  $C_{18}$  and the blue-chitin method, respectively. It was therefore demonstrated that the blue-chitin sorbent extracted heterocyclic aromatic amines more efficiently because the aromatic compounds with three or more rings were more

tightly bound and prevented many contaminants from being extracted. The LODs were  $66.76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $0.014 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine with the  $C_{18}$  and blue-chitin method, respectively. Moreover, the total analysis time, which was relatively fast in the first method (30 min), decreased by 40%, partly due to the lower backpressure of the new set-up.

In another paper, an in-line SPE-CE method was developed for the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in river water [21]. It involved retaining the analytes in a  $C_{18}$  sorbent that was placed in a fused-silica capillary (250- $\mu\text{m}$  i.d.) between two other capillaries (75- $\mu\text{m}$  i.d.) using frits from a commercial cartridge. All the capillaries were joined with polyethylene sleeves. While the loading step was performed at high pressure (930 mbar for 30 min), the elution involved injecting acetonitrile:water (80:20) at 50 mbar for 10 s. The method was first developed for



standard samples and it was compared to another method based on a sample stacking technique known as Large Volume Sample Stacking (LVSS). It was shown that the sensitivity was better in SPE than in LVSS because of the greater sample volume loaded (265  $\mu\text{L}$  and 2138 nL, respectively). When river water samples were analyzed, an additional off-line SPE step was performed in order to clean-up and further improve sensitivity. Because the volume percolated in the off-line SPE prior to LVSS (500 mL) was high, the sensitivity of this strategy improved dramatically. The final LODs were 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and 100  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for the in-line SPE-CE and the LVSS-CE methods, respectively. Repeatability values were acceptable for both strategies with  $\text{RSD} \leq 11.2\%$  in terms of precision intra-day and inter-day.

With this kind of packing based on small packed beds, and if the i.d. of the SPE capillary is larger than that of the separation capillary, there could be dead volume in the connection between the SPE and CE capillaries. This would lead to losses in CE efficiency and peak band broadening. One way to completely eliminate the dead volume is to perform SPE and CE in a single capillary. However, the preconcentration capacity is usually limited because the ratio between the surface area of the sorbent and the capillary volume is relatively small [41]. However, in the last few years, some in-line devices incorporating SPE sorbents into the separation capillary (in the inlet end) have been developed [39-41].

One such in-line device was used by De Rossi *et al.* to analyze a lipophilic  $\beta$ -blocker, oxprenolol, in a spiked urine sample [39]. The SPE sorbent was 1-cm long  $\text{C}_{18}$  material placed at the injection end and the sintered frits were made by heating the  $\text{C}_{18}$  stationary phase. It is important to note that, in order to prevent bubbles from forming at the interface between the packed and the empty capillary paths, both ends of the system were pressurized by applying 8 bar of external pressure. The sample was injected hydrodynamically (9 bar) for 6 min and the elution was performed with a short plug of water/acetonitrile mixture (30:70, v/v) (7 bar, 0.04 min). In order to obtain a clean baseline (suitable for detecting oxprenolol at very low concentration levels), they added an off-line liquid/liquid extraction (LLE) of urine with *n*-hexane/ethyl acetate mixture (8:2) before the analysis and an additional clean-up step after sample injection by flushing 30% acetonitrile aqueous solution in counter-flow. Although the clean-up of the SPE sorbent decrease SPE recovery by 27% in the, this was compensated by the cleaner urine-baseline-electropherogram profiles. By using this system, the LOD value for oxprenolol was 250  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , which is about 400 times better than normal capillary-zone electrophoresis (CZE) analysis.

Sandra *et al.* [40] presented a similar system in which the  $\text{C}_{18}$  chromatographic sorbent was packed directly in the CE capillary to form a short (3-5 mm) packed bed near the injection side. As in the previous study, the

frits were formed by heating and supplementary pressure was needed for correct CE performance. Under the best SPE conditions, which involved high pressure (0.8 MPa) for sample injection (30 min) and analyte elution with 75% 2-propanol (20 s), the method was applied to the analysis of peptides in the high picomolar (pM) range.

Zhang *et al.* [41] presented an alternative set-up for the in-line SPE-CE analysis of chlorophenols in which the sorbent (1 mm) was also packed directly into the inlet end of the SPE-CE capillary. Unlike the systems described above in which the sorbent was limited by frits made only by heating, in this case the small sorbent bed was sandwiched between a glass-wool material in the end close to the injection side and a sol-gel frit in the other end. The new sol-gel frit had a large through-pore with good mechanical strength and a long lifetime. Zhang *et al.* also demonstrated that the glass-wool in the inlet end had little influence on CE analysis and prevented the sorbent from leaking out as long as the flow rate was lower than  $2.7 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . With an elution step that hydrodynamically injected 4 nL of methanol, by increasing sample loading time from 35 s to 100 min at a flow rate of  $5.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , the LODs improved from  $4.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  to 0.1 and  $0.07 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for 2,4-dichlorophenol and 2,4,5-trichlorophenol, respectively. The preconcentration factors of the chlorophenol compounds studied were more than 4000 times greater than those of conventional CE with

acceptable efficiency. The method was applied to determine these analytes in river water with a previous filtration step. Since the compounds were not found at  $\text{sub-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  levels, the samples were spiked in order to study the recovery of the method, (in the range 90-99%).

More recently, Zhang *et al.* [58] developed an in-line SPE-CE strategy for the determination of chlorophenols in such a way that the sample did not pass through the separation capillary during the loading and clean-up steps. The adsorption of species from the sample matrix on the inner capillary wall was therefore avoided. The device comprised a capillary with a hole after the zone where the sorbent was placed. The procedure was based on loading the sample to the hole after the analyte had been retained in the sorbent. This was done by pressing the outlet end with a block of rubber throughout the loading step. The rubber block was then removed and the elution solvent and a buffer plug were injected by negative pressure. Finally, the CE analysis was performed by applying 20 kV. When the sample was injected for 120 min, which means a sample volume of 516  $\mu\text{L}$ , the analytes were eluted with 12 nL of methanol and the LODs were 17-25  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . In comparison with the previous study, the preconcentration factor was better (16000) because more sorbent was used for the SPE (3 mm). This system was applied to a downstream river water sample, which had been difficult to analyze using the previous SPE-CE system because the migration time had been

shifted by adsorption.

### Disks

By using membrane-based SPE systems (e.g., disks or coated membranes), higher flow rates and smaller elution volumes were obtained to overcome the main drawbacks of packed bed set-ups [34]. With membrane-based SPE systems, the bed volume of the adsorptive phase at the capillary inlet can be reduced to a greater extent than with packed beds. Analytes can be therefore eluted more efficiently during the desorption step and with less organic solvent. However, disk devices have a lower capacity than controlled-porosity glass beds, which concentrate larger quantities of analytes [3]. This drawback is especially important in compounds with moderate retention in the SPE sorbent.

Waternal *et al.* presented three designs for the preconcentration of peptides by in-line SPE-CE [44]. Two of them consisted of C<sub>18</sub> packed beds, both placed between a piece of polymer and a silica frit or in a capillary with large i.d. between two narrower capillaries and limited by a silica frit that had been sintered by heating. The third design, preferred because it is easy to construct, avoided the frit by placing a piece of polymer-extraction disk between two narrower capillaries. The disk contained polymeric adsorbent particles in a matrix of inert Teflon. The preferred method involved tITP conditions for post-elution focusing, and analyte resolution and separation

efficiency were both high. In this way, after the sample had been loaded under high pressure (20  $\mu$ L, 100 kPa), a plug of 100 mM ammonia as leading electrolyte was introduced at low pressure (10 kPa) for 0.4 min and then the elution was performed with acetonitrile/water 80% at the same pressure (10 kPa) for 0.2 min. Results showed that analysis of angiotensin II and gondorelin were performed with satisfactory reproducibility and the LOD for both was 1  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> with UV detection. The sensitivity was further improved in another study by the same authors using sheathless MS detection with a LOD of 20 ng·L<sup>-1</sup> [59]. The method was successfully applied to the determination of two model peptides in plasma samples [60]. In this case, an additional off-line SPE step based on a cation-exchange mechanism was added as sample pretreatment.

Another in-line SPE-CE approach based on disks improved the sensitivity of a sheathless CE-MS method for the characterization of proteomic samples (e.g., protein digests, in-gel-digested proteins and hydrophobic peptides). The approach was also used to quantitate ICAT-labeled peptides in the mM-nM range [45]. Multiple pieces of C<sub>18</sub> impregnated extraction disks were inserted into the fused-silica capillary sleeve (which worked like an SPE cartridge) up to a length of ~3 mm. The sleeve was coupled to the CE capillary that was 12 cm from the inlet end so that, if the cartridge was clogged or contaminated by the sample matrix, it could be easily

replace in the CE separation capillary itself. The method preconcentrated a volume of 0.5  $\mu\text{L}$  of sample to a final elution volume of 26.4 nL with an elution plug of a mixture consisting of 0.1% acetic acid and acetonitrile 20:80, v/v).

The potential of the in-line SPE-CE in a disk device with MS detection was also explored by Pelzing and Neusüß [46]. They used a set-up comprising an in-line microfilter as SPE cartridge filled with a plug of St-DVB copolymer disk for the analysis of a tryptic digest of bovine serum albumin as a reference standard. The SPE-disk length (0.5 mm), 9 cm from the injection end, could be reduced by cutting the initial disk or increased by punching several plugs together. Pelzing and Neusüß demonstrated that, even though there were four layers of the disk material, the peptides could be eluted. The sample was injected by applying a pressure of 1 bar for a maximum time of 30 min (108  $\mu\text{L}$ ) and the elution was performed at 50 mbar with a 3% capillary-volume plug of a mixture of acetonitrile and 1 M formic acid (80:20, v/v). Between the loading and the elution step, a plug of 2 M  $\text{NH}_3$  (0.3% capillary) was injected so that, when the high voltage was applied, the elution plug focused on a shorter zone. The authors directly compared CE-MS/MS with nano-LC-MS/MS using the same MS instrument because the injection-sample volume in CE was increased to 100  $\mu\text{L}$  by the SPE device. The sensitivity of both systems was then of the same order.

### *Monolithic columns*

Monolithic columns are considered to be one of the most promising materials for in-line SPE-CE. In these columns, the preconcentration bed does not contain individual stationary-phase particles or require any retaining end frits to operate. They allow high flow rates, so the sample loading time can be minimized.

Continuous monoliths are new-generation chromatographic media that are highly permeable and have high surface areas. They overcome the main limitations of packed columns and OT columns, which are basically the presence of frits and the low sorbent capacity, respectively. Since monolithic columns allow frit-free operation, they are less susceptible to bubble-formation problems during high-voltage operations. Considerable effort is being made to create monolithic columns that comprise a single piece of porous material synthesized with the tubular confinement of the column through in situ polymerization of a monomeric solution. It allows simple preparation and precise control over the chemical and physical properties of the material [48, 61]. At present, they can be divided into two groups: silica (inorganic) monoliths; and, rigid polymer (organic) monoliths [47].

Acrylate, metacrylate-based, polystyrene-based a polyacrylamide-based monoliths are the most commonly used polymeric columns. Silica-based columns can be made by sintering octadecylated silica microspheres in

fused-silica capillaries but an easier way is to use sol-gel technology [47]. Very recently, Svec [61] published a review describing the less common applications of monoliths, which include methods based on SPE before to CE analysis.

Monolithic polymeric columns coated with latex particles have been used to analyze inorganic ions [47]. More concretely, the SPE capillary comprised a sulfonated substrate monolith agglomerated with anion-exchange latex particles (AS18). The monolithic capillary in the injection end (15 cm long) and the CE capillary (with different diameters) were coupled by PEEK microtight union instead of PTFE sleeves in order to prevent air bubbles from entering the joint. The set-up aimed to simplify the synthesis of the monolith and to allow the large-diameter preconcentration capillary to be coupled with a smaller diameter separation capillary capable of providing an efficient separation. The method, based on sample injection at 1.2 MPa for 10 min and elution by tITP (weak electrolyte: 120 mM NaF injected at 1.2 MPa for 5 min; strong electrolyte: 120 mM Tris/ $\text{ClO}_4^-$ ) was used to determine bromide, nitrate, nitrite and iodide at concentrations of  $52.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $0.6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively in seawater samples [47]. Results were best for iodide, which could be preconcentrated from seawater to provide LODs (at the low  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  levels) that are around 20 times lower than those reported in previous capillary electroseparation methods.

A monolithic methacrylate column with mixed-mode ion-exchange reversed-phase material characteristics was used to preconcentrate amino acids by in-line SPE-CE [48]. The method involved a maximum sample volume of 511 nL (hydrodynamically injected) and elution by dual solvation/ion-exchange transient boundary. In this way, an aqueous solution of  $\text{H}_2\text{SO}_4$  at pH 2.9 and a solution of 62.5 mM ethylenediamine:acetonitrile (60:40) at pH 2.9 adjusted with  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , gave the best WE and SE, respectively, in the preconcentration and separation of alanine, tyrosine, phenylalanine and tryptophan. The quantitative tests performed for tryptophan amino acid showed that the sensitivity improved by about 300-fold with the in-line SPE-CE system when compared with conventional hydrodynamic injection.

Baryla *et al.* presented an in-line SPE method that used a methacrylate-based monolith, in which elution and separation buffers were the same solution [49]. The sample was introduced for a maximum of 10 min by applying 20 psi in the SPE-CE capillary, which contained the 1-cm methacrylate polymeric monolith in the injection end. After the analyte (S-propranolol) had been adsorbed on the SPE sorbent, the unbound sample was removed from the capillary by rinsing with water at high pressure; the capillary was then filled with the separation/elution buffer by applying a negative voltage and using the EOF as a pump. Once the capillary had been completely filled with buffer, a positive voltage was applied to allow

the eluted analyte to migrate through the separation capillary. Sensitivity improved considerably and the LODs were in the low-nM range not in the low- $\mu$ M range of traditional UV detection in CE. The method afforded efficient separations due to the extra band sharpening that resulted from filling the capillary with the separation/elution buffer in the reverse direction to the loading of sample.

Schaller *et al.* developed an alternative monolithic material [62] by adding an ionizable monomer (3-sulfonylpropyl methacrylate) to the polymerization mixture (butyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate). With a 1-cm monolithic column placed in the injection end, the sample was loaded for 1-5 min by applying a maximum pressure of 0.6 MPa. Elution was efficient with an elution solvent that also acted as BGE (acetonitrile in 200 mM acetate buffer at pH 3.5 (90:10, v/v) and by simultaneously applying a pressure of 0.6 MPa from the detection end and -25 kV until current reached at 60% of original value (when the capillary is completely filled with BGE). Results were good for the preconcentration and analysis of three commonly prescribed antidepressants —sertraline, fluoxetine and fluvoxamine— with enrichment factors of over 500 for each of the analytes.

A similar system was developed by Armenta *et al.* [63] who proposed that a polymeric monolith be used to support selective protein preconcentration prior to CE. The polymeric monolith was made with glycidyl

methacrylate (GMA) as monomer to allow covalent immobilization of Protein G on the surface. The protein G monolith was evaluated by preconcentrating human immunoglobulin G (IgG) by in-line SPE-CE. IgG can be specifically retained by the monolithic preconcentrator because of the high affinity between IgG and protein G. The method was as follows:

- after the monolith had been preconditioned with 50 mM ammonium formate at pH 7.6 (buffer 1), the sample was loaded (28  $\mu$ L at 1 bar) and cleaned with buffer 1.
- a second preconditioning was performed with 12.5 mM ammonium formate at pH 7.6 (buffer 2) before the elution with 50 mM formic acid (1 bar 0.3 min);
- the elution plug was followed by a plug of buffer 2 sufficient to cover the monolith; otherwise, the desorbed IgG was re-adsorbed in the protein G monolith; and, finally,
- the voltage was applied for the CE analysis.

When the method was applied to human-serum samples, the pretreatment considerably diluted the sample (500 and 65000 times). However, although the IgG was effectively preconcentrated, the system could be used for only about eight consecutive runs with no significant loss in performance.

In another study, a monolithic material was also used as support for in-line SPE-CE based on immobilized

metal affinity chromatography (IMAC) [64]. A 1-cm methacrylate monolith was first polymerized inside the capillary. The chelating ligand iminodiacetic acid (IDA) then bonded to the glyceryl groups of the monolith. IDA is generally used to immobilize metal ions and, in this case, it immobilized Cu(II) on the monolithic column. The system was applied to analyze synthetic peptides and proteins. This was possible because, the metal ions interact selectively with the functional groups of amino acids of peptides, (e.g., imidazole group of histidine, thiol group of cysteine, and indole group of typtophan). The processes of retention and elution were performed by changing the pH of the sample and buffer so that the analytes were retained in a basic buffer (pH 8) and eluted by an acidic buffer (pH 4.6). Because of its high selectivity, this new material might be very useful in proteomic research.

Vizioli *et al.* [65] used a similar monolith for the selective retention and separation of histidine-containing peptides. Unlike the system reported earlier, the system joined three capillaries with different inner diameters:

- injection (75- $\mu\text{m}$  i.d., 10 cm long);
- monolithic column (150- $\mu\text{m}$  i.d., 8 cm long); and,
- separation (75- $\mu\text{m}$  i.d., 27 cm long).

In this way, the monolithic column contained a higher amount of monolithic material than if the same 75- $\mu\text{m}$  i.d. capillary was used for both

SPE and CE separation. In this case, the peptides were eluted by injecting 5 mM imidazole solution for 45 s (hydrostatic injection, 10 cm) because of the high affinity of the imidazole group to the monolith.

#### 2.4 On-line SPE-CE

In on-line SPE-CE coupling, the SPE column is not a part of CE and the elution plug from the SPE is directed to the CE capillary by means of an interface. Apart from connecting the SPE and CE systems, the other main objective of the interface is to solve the problem deriving from the difference in volume between the SPE-elution plug and the conventional hydrodynamic injection volumes in CE.

The interfaces developed can be classified as "vial", "valve" or "T-piece" [66]. In all cases, the main advantages over off-line SPE-CE are minimum handling, faster performance and higher degree of automation. Among the drawbacks of this kind of coupling are that it is complicated to construct and that band-broadening is sometimes inevitable because of the dead volume from the interface [41]. Moreover, as the amount of desorption solvent required is usually much higher than the acceptable injection volume in CE, only a small part of the eluted sample can usually be injected into the separation capillary. This leads to a drop in the preconcentration efficiency. Unlike in-line SPE-CE, in on-line coupling, the sample matrix does not enter the electrophoretic system, so secondary

adsorption effects of matrix components are avoided. Moreover, as SPE is separate from CE, electrophoretic performance is not disturbed by the SPE sorbent [11].

#### Vial interface

The vial interface is based on a reservoir from which the SPE-elution plug is collected in such a way that only part of the sample plug is injected (hydrodynamically or electrokinetically) into the capillary and the remaining sample is flushed to waste [31].

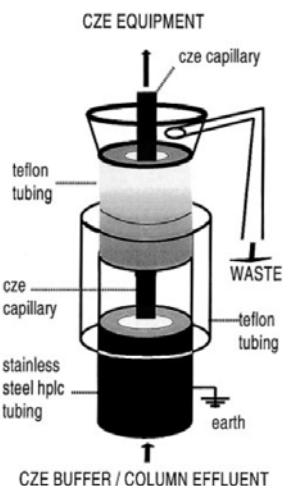
Stroink *et al.* developed an on-line system combining size-exclusion chromatography (SEC), SPE and CE to analyze peptides [67, 68]. SPE and CE were connected by a vial interface. The system comprised two parts: the first one was sample treatment; and, the second was CE separation. To treat the sample (50  $\mu\text{L}$ ), SEC and SPE minicolumns were connected by valve and, for subsequent separation, the vial interface transfers the analytes to the CE inlet. The vial interface (Figure 5) supplied the effluent from the SPE column to the CZE buffer and simultaneously served as a grounded electrode for electrokinetic injection and CZE separation. The system was very efficient, since most of the interfering endogenous components of the matrix were removed by SEC (mostly big peptides and proteins) and SPE (salts). Moreover, the SPE step produced a preconcentration factor.

The method was applied to quantify a group of very similar enkephalins in

the presence of albumin and in samples of cerebrospinal fluid (CSF). When CSF was analyzed, a protective concentration of imipramine HCl was added and separated from the peptides by the SEC step. A good limit of quantification (LOQ) of 2.5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  was reported for all the compounds. However, the weak point was the relative lack of reproducibility between days for CSF samples (RSD  $\sim 20\%$ ) because of the irreproducibility of the electrokinetic injection, which depended on the partial adsorption of compounds at the capillary wall.

Visser *et al.* [31] applied an on-line SPE-CE system to determine insulin derivatives in biological samples. In their study, SPE was used only as a clean-up step before the CE analysis. Three pumps and a HP Hypersil MOS column ( $\text{C}_8$ ) (20 mm long, 2.1 mm i.d.) were needed for SPE and a vial interface for connection to the CE system. Then, to inject a suitable volume to CE, part of the eluted plug from SPE was hydrodynamically injected into the separation capillary by the CE equipment and the other part was directed to waste. To reduce peak tailing, elution was performed in the backflush mode. While only filtration was needed for urine samples, when serum and plasma were analyzed, proteins had to be precipitated with acetonitrile and the supernatant then had to be evaporated. The method was linear in the range 5-80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for bovine, human and Arg-human insulin in urine, serum and plasma samples.





**Figure 5.** Solid-phase extraction-capillary-zone electrophoresis (SPE-CZE) interface developed by Stroink *et al.* (from [67, 68]).

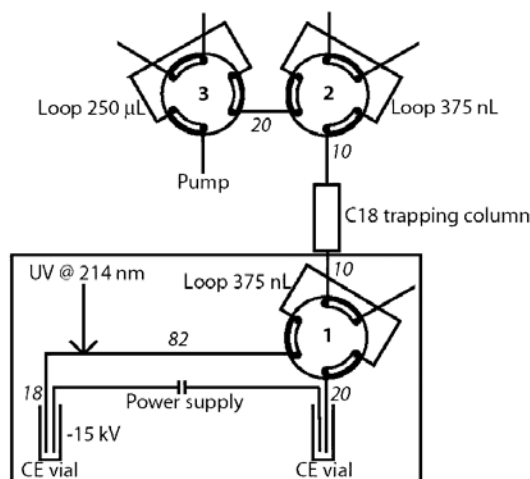
#### Valve interface

Another option for connecting SPE and CE is a valve coupled in-line to the separation capillary, which means that, during CE analysis, the separation current passes through it. In this way, the solvents and the sample matrix from SPE are directed to waste and, if the valve is switched, usually only a specific part of the elution plug is directed to the CE capillary while the other part is flushed to waste.

Tempels *et al.* [69] developed a system (Figure 6) to combine SPE and CE in the on-line mode by an in-line valve interface. After the analytes had been eluted from the SPE column, the plug was directed to the valve, where

most of the plug was flushed to the waste and a smaller part was loaded in the valve loop. Then, the analytes were electrokinetically injected by applying voltage through the electrophoretic system. Two enkephalin peptides were used as model compounds. The system was optimized so that the maximum concentration fraction of the elution plug stayed in the loop. The results showed that the peptides were efficiently separated, although some band broadening was caused by the injection valve. The system clearly improved sensitivity and LODs were  $5\text{-}10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for both peptides.

In another system, the whole elution plug was injected into the separation capillary by means of a valve interface and cephalosporins were determined by on-line SPE-CE that used a stacking step to remove sample matrix [70]. Tempels *et al.* [69] modified the system so that the loop in the valve interface was removed. Here, the only function of the interface was to connect the SPE and CE systems, and the volume injected into the CE capillary (around 1500 nL) was considerable higher than the usual hydrodynamic injection volumes (in the range of a few nL). In this way, Large Volume Sample Stacking (LVSS) allowed the CE analysis of the whole elution plug, and increased sensitivity to 40 times more than the on-line SPE-CE system using a T piece interface.



**Figure 6.** Preconcentration-capillary electrophoresis (CE) system with in-line injection valve. The framed part represents the in-line injection valve-CE system. Lengths of fused-silica capillaries (75  $\mu\text{m}$  i.d.) are shown in italics (cm). Valves 1 and 2 are microvalves; valve 3 is a regular valve. Valve arrangements are shown during sample injection into the CE. After sample injection, valve 1 is switched back to its original position (from [69]).

To give more detail, 250  $\mu\text{L}$  of sample was loaded onto a  $\text{C}_{18}$  sorbent and eluted with an elution plug of 426 nL acetonitrile. Because of the flow-through transfer from the SPE column to the valve interface, the elution plug was diluted with the mobile phase ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and about 1500 nL was injected into the CE capillary to ensure no analyte losses and the whole elution plug was injected into the separation capillary. Then, the mobile phase:elution plug mixture was removed by EOF (applying a negative voltage) and the analytes were stacked on the boundary of the BGE and the mixture. When most of the plug had been removed, the voltage was switched to positive in order to perform CZE. The method presented good sensitivity (LODs 250  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and acceptable precision (RSD < 3%)

for the two cephalosporins studied.

#### *T piece interface*

Tempels *et al.* [71] used the T-piece interface to replace the in-line valve interface used in a previous study for analyzing enkephalin peptides [69]. With the T-piece interface (see Figure 7), the elution plug split in two depending on the length of the capillaries that joined the T-piece. Unlike the valve system, with the T-split system, the part of the elution plug that contained the greatest analyte concentration of analyte could not be optimized, but the plug injected into the CE capillary seemed more homogeneous. Despite these differences, method sensitivities were in the same range. The precision of the valve and T-split methods was in

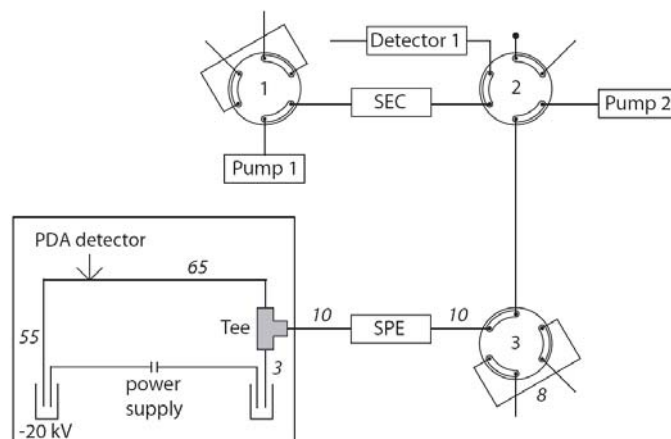
the same range but the valve required a more accurate methodology.

For the T-split method to be applied to the analysis of biological samples, two sample pre-treatment steps were studied [72, 73]. In the first, a SEC column was added to remove proteins from CSF samples in the determination of two enkephalin peptides. Because of the complexity of the matrix, lower sample volumes were analyzed and that meant that sensitivity was not as good as when standards were analyzed. The method involved a CSF sample volume of 20  $\mu\text{L}$  and LODs of  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . An alternative was the T-split system without a SEC column; that was used to determine two cephalosporin antibiotics in plasma samples. In this way, the biological samples could be analyzed with a simple deproteination step and 10% perchloric acid was required for the method to perform well. The method's reproducibility was acceptable for all the compounds and LODs were in the  $100\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  range for a sample volume of 50  $\mu\text{L}$  of plasma.

Bonneil and Waldron [66] coupled on-line an immobilized-enzyme micro-reactor, a SPE preconcentrator and a CE system for tryptic peptide mapping (insulin chain B, cytochrome c and  $\beta$ -casein). In this system, the microreactor digested up to 100  $\mu\text{L}$  of peptide sample, the fragments of

which had been preconcentrated in a  $\text{C}_{18}$  minicolumn. After this, the eluted sample was injected by a micro T-piece interface into the CE system.

This on-line coupling solved some of the problems presented in another method in which the SPE and CE had been coupled in the in-line mode [74]. The main problems of the in-line method arose from the presence of the SPE material in the CE system: contributions to band broadening, loss of resolution, backpressure generated by the solid state and re-adsorption of the peptides onto the solid phase due to the reversal of the EOF at low pH. In the on-line method, since the preconcentrator was not part of the separation capillary it did not interfere in the separation process. The T-piece interface involved two possible sample paths, so a shut-off valve was needed to ensure that the elution plug (60 nL acetonitrile: phosphate buffer, 90:10, v/v) was pushed toward the cathodic end of the capillary during the desorption process. Otherwise, the plug traveled into both branches of the separation capillary and generated band broadening. Reproducibility for peptide mapping was good. However, efficiency and resolution were poor because of backpressure generated by the preconcentrator, dispersion caused by the transfer of the injection plug to the CE and dead volumes.



**Figure 7.** On-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis (SPE-CE) system with the Tee-split interface. Lengths of fused silica ( $75 \mu\text{m}$  i.d.) are shown in italics (cm). Length  $x$  is varied (i.e. 3, 6, 9 or 12 cm). Valve 1 is a microvalve, valve 2 is a regular valve (from [71]).

### 3 CONCLUDING REMARKS

The data presented above demonstrate that coupling SPE and CE improves the performance of the separation technique. SPE considerably improves concentration sensitivity when diluted samples are analyzed and makes it possible to analyze complex matrices by CE.

However, in the analysis of highly complex matrices, a further pre-treatment step should be added to SPE in order to avoid the problems of clogging or high backpressures that hinder the correct performance of SPE-CE.

Of all the couplings presented, at-line is the most suitable automatic option for studying SPE methodology. It is easier than the in-line and on-line modes for studying the SPE material,

different conditionings or elution steps. However, the considerable difference between the SPE-elution and CE-injection volumes means that high sample volumes need to be analyzed if the method sensitivity is to be good.

With in-line systems, the amount of sample needed is really low (a few  $\mu\text{L}$ ) and, as SPE is performed inside the separation capillary, the whole eluate is then analyzed by CE. Because of this, in-line SPE-CE systems are highly sample dependent.

On-line coupling is an alternative that does not require the sample to be injected into the separation capillary. However, unlike in-line systems, and because of the higher elution volume (in the high-nL range), the whole eluate from SPE cannot be analyzed and only part of it is injected in the

separation capillary. This involves a loss of sensitivity, which can be avoided by applying electrophoretic-based techniques to remove the sample matrix.

#### **Acknowledgments**

*This study was financially supported by the Dirección General de Investigación of the Ministry of Science and Technology, project CTM2005-01774.*

#### **4 REFERENCES**

- [1] G. Hempel, *Electrophoresis* 21 (2000) 691.
- [2] S. Y. Chang, F. Wang, J. *Chromatogr. B* 799 (2004) 265.
- [3] N. A. Guzman, R. E. Majors, *LC-GC* 19 (2001) 14.
- [4] G. Manetto, F. Tagliaro, F. Crivellente, V. L. Pascali, M. Marigo, *Electrophoresis* 21 (2000) 2891.
- [5] C. H. Lin, T. Kaneta, *Electrophoresis* 25 (2004) 4058.
- [6] J. B. Kim, S. Terabe, *J. Pharm. Biom. Anal.* 30 (2003) 1625.
- [7] D. M. Ousbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [8] T. Stroink, E. Paarlberg, J. C. M. Waterval, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 22 (2001) 2375.
- [9] S. Sentellas, L. Puignou, M. T. Galceran, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 975.
- [10] Z. Liu, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 366.
- [11] M. Zhang, F. Wei, Y. F. Zhang, J. Nie, Y. Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 294.
- [12] K. Jinno, M. Kawazoe, Y. Saito, T. Takeichi, M. Hayashida, *Electrophoresis* 22 (2001) 3785.
- [13] M. C. Breadmore, P. R. Haddad, *Electrophoresis* 22 (2001) 2464.
- [14] D. Martinez, M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65.
- [15] L. Saavedra, C. Barbas, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 289.
- [16] J. R. Veraart, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 483.
- [17] Z. Liu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 77 (2005) 165.
- [18] Z. Liu, J. Pawliszyn, *Analyst* 131 (2006) 522.
- [19] C. Y. Kuo, S. S. Chiou, S. M. Wu, *Electrophoresis* 27 (2006) 2905.
- [20] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Chromatographia*, 65 (2007) 501.
- [21] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 208.
- [22] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.
- [23] B. Santos, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 968.
- [24] P. Hinsmann, L. Arce, A. Ríos, M. Valcarcel, *J. Chromatogr. A* 866 (2000) 137.
- [25] C. Mardones, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 22 (2001) 484.
- [26] K. Kanistar, L. Arce, A. Ríos, M.

- Valcárcel, *Electrophoresis* 22 (2001) 1553.
- [27] L. Manganiello, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 319.
- [28] L. Nozal, L. Arce, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 89.
- [29] B. Santos, A. Lista, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 26 (2005) 1567.
- [30] J. Ruiz-Jiménez, J. M. Mata-Granados, M. D. Luque de Castro, *Electrophoresis* 28 (2007) 789.
- [31] N. F. C. Visser, M. Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 451.
- [32] M. C. Breadmore, M. C. Boyce, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *Analyst* 125 (2000) 799.
- [33] M. C. Breadmore, C. P. Palmer, M. Curran, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2112.
- [34] L. H. Zhang, C. J. Zhang, X. Z. Wu, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1039.
- [35] J. P. Hutchinson, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 1039 (2004) 187.
- [36] W. Li, d. Fries, A. Alli, A. Malik, *Anal. Chem.* 76 (2004) 218.
- [37] N. A. Guzman, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 197.
- [38] N. M. Vizioli, M. L. Rusell, C. N. Carducci, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 167.
- [39] A. De Rossi, C. Desiderio, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 6.
- [40] K. Sandra, F. Lynen, B. Devreese, J. V. Beeumen, P. Sandra, *Anal. Bioanal. Chem.* 485 (2006) 671.
- [41] L. H. Zhang, C. J. Zhang, X. Chen, Y. Q. Feng, X. Z. Wu, *Electrophoresis* 27 (2006) 3224.
- [42] F. Benavente, M. S. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N. A. Guzman, *J. Chromatogr. A* 1140 (2006) 205.
- [43] L. Saavedra, N. Maeso, A. Cifuentes, C. Barbas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 471.
- [44] J. C. M. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwssen, A. Bult, H. Lingeman, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 21 (2000) 2851.
- [45] G. M. Janini, M. Z. Zhou, L. R. Yu, J. Blonder, M. Gignac, T. P. Conrads, H. J. Isaaq, T. D. Veenstra, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5984.
- [46] M. Pelzing, C. Neubsub, *Electrophoresis* 26 (2005) 2717.
- [47] J. P. Hutchinson, P. Zakaria, A. R. Bowiet, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *Anal. Chem.* 77 (2005) 407.
- [48] M. C. Breadmore, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 121.
- [49] N. E. Baryla, N. P. Toltl, *Analyst* 128 (2003) 1009.
- [50] J. P. Hutchinson, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 43.
- [51] N. Johannesson, E. Pearce, M. Dulay, R. N. Zare, J. Bergquist, K. E. Markides, *J. Chromatogr. B* 842 (2006) 70.
- [52] M. C. Breadmore, M. Macka, N. Avdalovic, P. R. Haddad, *Anal. Chem.* 73 (2001) 820.
- [53] W. Li, D. Fries, A. Malik, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2153.
- [54] Z. X. Zhang, Y. Z. He, J.

- Chromatogr. A 1066 (2005) 211.
- [55] S. Zhang, M. Macka, P. R. Haddad, *Electrophoresis* 27 (2006) 1069.
- [56] P. Viberg, K. G. Wahlund, K. Skog, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 347.
- [57] P. Viberg, S. Nilsson, K. Skog, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1729.
- [58] L. H. Zhang, X. Z. Wu, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2562.
- [59] J. C. M. Waterval, P. Besterbreurtje, H. Lingeman, C. Versluis, A. J. R. Heck, A. Bult, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 22 (2001) 2701.
- [60] J. C. Waterval, G. Hommels, P. Besterbreurtje, C. Versluis, A. J. R. Heck, A. Bult, H. Lingeman, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 22 (2001) 2709.
- [61] F. Svec, *J. Chromatogr. B* 841 (2006) 52.
- [62] D. Schaller, E. F. Hilder, P. R. Haddad, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 104.
- [63] J. M. Armenta, B. Gu, P. H. Humble, C. D. Thulin, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 171.
- [64] L. Zhang, L. Zhang, W. Zhang, *Electrophoresis* 26 (2005) 2172.
- [65] N. M. Vizioli, M. L. Rusell, M. L. Carbajal, C. N. Carducci, M. Grasselli, *Electrophoresis* 26 (2005) 2942.
- [66] E. Bonneil, K. C. Waldron, *Talanta* 53 (2000) 687.
- [67] T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J. C. M. Waterval, A. Bult, G. J. de Jong, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 25 (2003) 897.
- [68] T. Stroink, P. Schravendijk, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J. C. M. Waterval, A. Bult, G. J. de Jong, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 24 (2003) 1126.
- [69] F. W. A. Tempels, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4432.
- [70] P. Puig, F. W. A. Tempels, G. W. Somsen, G. J. de Jong, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull *Electrophoresis* (2007) (submitted).
- [71] F. W. A. Tempels, J. Teeuwsen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263.
- [72] F. W. A. Tempels, G. Wiese, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 30.
- [73] P. Puig, F. W. A. Tempels, M. Calull, C. Aguilar, F. Borrull, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. B* (2007) (in press).
- [74] E. Bonneil, K. C. Waldron, *J. Chromatogr. B* 736 (1999) 273.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



## 1.5. Bibliografia

- [1] L. Okerman, K. De Wasch, J. Van Hoof, *Analyst* 123 (1998) 2361.
- [2] A.L. Myllyniemi, L. Nuotio, E. Lindfors, R. Rannikko, A. Niemi, C. Backman, *Analyst* 126 (2001) 641.
- [3] L. Okerman, J. Van Hende, L. De Zutter, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 284.
- [4] J. Lamar, M. Petz, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 296.
- [5] J.P. Abjean, V. Lahogue, *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1171.
- [6] U. Meetschen, M. Petz, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990).
- [7] F.J. Schenck, P.S. Callery, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 99.
- [8] A. Medvedvici, M. Ionescu, V. Mircioiu, V. David, *Microchem. J.* 72 (2002) 85.
- [9] G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 661.
- [10] L.K. Sorensen, L.K. Snor, *Chromatographia* 53 (2001) 367.
- [11] H. Terada, Y. Sakabe, *J. Chromatogr.* 348 (1985) 379.
- [12] J.O. Boison, G.O. Korsrud, J.D. MacNeil, L. Keng, M. Papich, *J. Chromatogr.* 576 (1992) 315.
- [13] W.J.J. Krauwinkel, N.J. Volkers-Damermans, *J. Chromatogr. B* 679 (1996) 129.
- [14] P. Kowalski, I. Oledzka, H. Lamparezyk, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937.
- [15] G. Suhren, K. Knappstein, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 363.
- [16] S. Bompadre, L. Ferrante, L. Leone, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 191.
- [17] L.K. Sorensen, L.K. Snor, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 145.
- [18] D.J. Fletouris, J.E. Psomas, A.J. Mantis, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 617.
- [19] C.L. Flurer, *Electrophoresis* 22 (2001) 4249.
- [20] M. Hernández, *Determinació d'antibiòtics en mostres biològiques per electroforesi capil·lar*, Tesi Doctoral, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, (2000).

- [21] E.F. Hilder, C.W. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414.
- [22] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 309.
- [23] A. Gáspár, M. András, S. Kardos, *J. Chromatogr. B* 775 (2002) 239.
- [24] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini, *J. Chromatogr. A* 711 (1995) 339.
- [25] H. Liu, A. Yu, F. Liu, Y. Shi, L. Han, Y. Chen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1376.
- [26] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, *Electrophoresis* 22 (2001) 2464.
- [27] G. Hempel, *Electrophoresis* 21 (2000) 691.
- [28] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1046.
- [29] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 26 (2005) 970.
- [30] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 196.
- [31] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 255.
- [32] E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Camara, *Analyst* 125 (2000) 1725.
- [33] L. Schweitz, M. Peterson, T. Johansson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 203.
- [34] M. Petersson, K.G. Wahlund, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 249.
- [35] C. Mardones, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 22 (2001) 484.
- [36] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4432.
- [37] E. Jiménez-Lozano, *Desarrollo y optimización de métodos de separación y análisis de quinolonas en materiales biológicos por electroforesis capilar*, Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona, (2003).
- [38] <http://www.infecto.edu.uy>, [Març 2004].
- [39] G.Y. Miller, K.A. Algozin, P.E. McNamara, E.J. Bush, *J. Agric. Appl. Econ.* 35 (2003) 469.

- [40] A. Anadón, M.R. Martínez-Larrañaga, *Livest. Prod. Sci.* 59 (1999) 183.
- [41] B. Grande, M.S. Garcí Falcón, J. Simal Gándara, *Cien. Tecnol. Aliment.* 3 (2000) 39.
- [42] <http://edicion-micro.usal.es>, [Març 2004].
- [43] M. Martín, F. Gudiol, *Enferm Infec. Microbiol. Clin.* 21 (2003) 42.
- [44] R. Zamora, A. Areu, J. Gundián, R. Manresa, J. Sánchez, R. Morales, *Acta Medica* 8 (1998) 40.
- [45] S. Mella, C. Zemelman, H. Bello, M. Dominguez, G. González, R. Zemelman, *Rev. Chil. Infect.* 18 (2001) 7.
- [46] J.R. Andraca, E. Rodríguez, A. Fundora, *Rev. Cubana Farm.* 35 (2001) 219.
- [47] C. Hishta, D.L. Mays, M. Garofalo, *Anal. Chem.* 43 (1971) 1530.
- [48] H. Liu, H. Wang, V.B. Sunderland, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 395.
- [49] P. Wang, M. Qi, Y. Sun, J. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 565.
- [50] K.M. Matar, *Chromatographia* 64 (2006) 255.
- [51] P. Pérez-Lozano, E. García-Montoya, A. Orriols, M. Miñarro, J.R. Ticó, J.M. Suñé-Negre, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 192.
- [52] W. Li, F. Tan, K. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 594.
- [53] L.K. Sorensen, L.K. Snor, T. Elkaer, H. Hansen, *J. Chromatogr. B* 734 (1999) 307.
- [54] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1550.
- [55] S. Babic, D. Asperger, D. Mutavdzic, A.J.M. Horvat, K. Kastelan-Macan, *Talanta* 70 (2006) 732.
- [56] V.F. Samanidou, E.N. Evaggelopoulou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1879.
- [57] G. Balizs, A. Hewitt, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 105.
- [58] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 704.

- [59] S. Riediker, A. Rytz, R.H. Stadler, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 359.
- [60] S. Baere, P. Wassink, S. Croubles, S. Boever, K. Baert, P. Backer, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 221.
- [61] K.H. Yoon, S.Y. Lee, W. Kim, J.S. Park, H.J. Kim, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 121.
- [62] O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 83.
- [63] D.N. Heller, M.L. Smith, O.A. Chiesa, *J. Chromatogr. B* 830 (2006) 91.
- [64] D.N. Heller, C.B. Nochetto, N.G. Rummel, M.H. Thomas, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 5267.
- [65] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. B* 800 (2004) 203.
- [66] H.B. Wan, J. Liu, K.C. Ang, S.F.Y. Li, *Talanta* 45 (1998) 663.
- [67] S. Taniguchi, K. Hamase, A. Kinoshita, K. Zaitso, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 219.
- [68] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
- [69] Z. Yongxin, J. Dalle, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 83.
- [70] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 69.
- [71] J. Samskog, M. Wetterhall, S. Jacobsson, K. Markides, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 919.
- [72] W.F. Smyth, *Electrophoresis* 26 (2005) 1334.
- [73] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 265.
- [74] Y. Zhu, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 417.
- [75] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 197.

- [76] Y.M. Li, A.V. Schepdel, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A 812 (1998) 227.
- [77] Z. Yongxin, C. Hoogmartens, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Liq. Chrom. & Rel. Technol. 22 (1999) 1403.
- [78] M. Dolezalova, B. Kunteova, R. Jobanek, J. Sep. Sci. 27 (2004) 560.
- [79] G. Pajchel, K. Pawlowski, S. Tyski, J. Pharm. Biomed. Anal. 29 (2002) 75.
- [80] G. Pajchel, S. Tyski, J. Chromatogr. A 846 (1999) 223.
- [81] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, J. Chromatogr. A 768 (1997) 97.
- [82] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Electrophoresis 26 (2005) 954.
- [83] L. Nozal, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 523 (2004) 21.
- [84] M.I. Bailón, L. Cuadros, C. Cruces-Blanco, J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 746.
- [85] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 844 (1999) 371.
- [86] A. Klekner, A. Gaspar, S. Kardos, J. Szabo, G. Csecsei, J. Neurosurg. Anesth. 15 (2003) 249.
- [87] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Härtl, J. Chromatogr. B 690 (1997) 321.
- [88] C.E. Lin, H.W. Chen, E.C. Lin, K.S. Lin, H.C. Huang, J. Chromatogr. A 879 (2000) 197.
- [89] R. Wang, Z.P. Jia, J.J. Fan, X.L. Hu, Y.M. Li, L.R. Chen, J.W. Xie, Q. Zhang, Chirality 16 (2004) 45.
- [90] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Härtl, J. Wohlrab, Anal. Chim. Acta 349 (1997) 207.
- [91] Y.M. Li, Y. Zhu, D. Vanderghinste, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, Electrophoresis 20 (1999) 127.
- [92] G. Castaneda, M. Kelly, H. Maillols, H. Fabre, Anal. Chem. 69 (1997) 1364.
- [93] M. Steppe, M.S. Prado, M.F.M. Tavares, T.J.A. Pinto, R.M.E. Kedor-Hackmann, M.I.R.M. Santoro, J. AOAC Int. 86 (2003) 707.

- [94] A. Farina, R. Porra, V. Cotichini, A. Doldo, J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 521.
- [95] R. Porra, A. Farina, V. Cotichini, R. Lecce, J. Pharm. Biomed. Anal. 18 (1998) 241.
- [96] G. Pajchel, S. Tyski, J. Chromatogr. A 895 (2000) 27.
- [97] S.H. Tseng, Y.H. Yang, Y.R. Chen, S.H. Chen, Electrophoresis 25 (2004) 1641.
- [98] H.H. Yeh, Y.H. Yang, Y.W. Chou, J.Y. Ko, C.A. Chou, S.H. Chen, Electrophoresis 26 (2005) 927.
- [99] O.K. Choi, Y.S. Song, J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1265.
- [100] B.X. Mayer, U. Hollenstein, M. Brunner, H.G. Eichler, M. Müller, Electrophoresis 21 (2000) 1558.
- [101] M. Andrasi, A. Gaspar, A. Klekner, J. Chromatogr. B 846 (2007) 355.
- [102] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Chromatographia 62 (2005) 603.
- [103] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, Electrophoresis 27 (2006) 4439.
- [104] A. Dermaux, P. Sandra, Electrophoresis 20 (1999) 3027.
- [105] N.W. Smith, M.B. Evans, Chromatographia 38 (1994) 649.
- [106] J.J. Soto-Chinchilla, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, C. Cruces-Blanco, Electrophoresis 27 (2006) 4060.
- [107] W.S. Law, J.H. Zhao, S.F.Y. Li, Electrophoresis 26 (2005) 3486.
- [108] J.P. Quirino, N. Inoue, S. Terabe, J. Chromatogr. A 892 (2000) 187.
- [109] S. Casado-Terrones, S. Cortacero-Ramírez, A. Carrasco-Pancorbo, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 1835.
- [110] C.K. Zacharis, F.W.A. Tempels, G.A. Theodoridis, A.A. Voulgaropoulos, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. A 1132 (2006) 297.
- [111] T. Wu, Y.Q. Guan, J.N. Ye, Food Chemistry 100 (2007) 1573.

- [112] G. Chen, X.J. Xu, Y.Z. Zhu, L.Y. Zhang, P.Y. Yang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1479.
- [113] Q.C. Chu, X.H. Tian, M. Lin, J.N. Ye, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 7979.
- [114] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 25 (2004) 3441.
- [115] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [116] X.Z. Wu, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 48.
- [117] S. Sentellas, L. Puignou, M.T. Galcerán, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 975.
- [118] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 119.
- [119] C.H. Lin, T. Kaneta, *Electrophoresis* 25 (2004) 4058.
- [120] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 281.
- [121] N. Siri, P. Riolet, C. Bayle, F. Couderc, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 151.
- [122] R. Sabapathy, P.W. Liu, A.U.J. Yap, H.K. Lee, *Electrophoresis* 21 (2000) 2886.
- [123] J. Kruaysawat, P.J. Marriott, J. Hughes, C. Trenerry, *Electrophoresis* 24 (2003) 2180.
- [124] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 208.
- [125] J. Safra, M. Pospisilova, A. Kavalirova, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1022.
- [126] C.C. Wang, S.S. Chiou, S.M. Wu, *Electrophoresis* 26 (2005) 2637.
- [127] J.B. Kim, S. Terabe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1625.
- [128] P.L. Urban, C. García-Ruiz, M.A. García, M.L. Marina, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2200.
- [129] E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, *Analyst* 125 (2000) 1725.
- [130] G.Q. Song, Z.L. Peng, J.M. Lin, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2065.
- [131] J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 251.
- [132] Y. Xu, W. Qin, Y.H. Lau, S.F.Y. Li, *Electrophoresis* 26 (2005) 3507.

- [133] M. Unger, J. Stockigt, J. Chromatogr. A 791 (1997) 323.
- [134] L. Zhu, H.K. Lee, Anal. Chem. 73 (2001) 3065.
- [135] Z.K. Shihabi, J. Chromatogr. A 902 (2000) 107.
- [136] Y. Huang, Y. Shi, J. Duan, G. Chen, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1026.
- [137] W.P. Liu, H.K. Lee, Electrophoresis 20 (1999) 2475.
- [138] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, J. Chromatogr. A 1117 (2006) 234.
- [139] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Chromatographia 63 (2006) 149.
- [140] J.P. Quirino, S. Terabe, J. Chromatogr. A 850 (1999) 339.
- [141] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis 24 (2003) 2779.
- [142] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 205.
- [143] B. Kim, D.S. Chung, Electrophoresis 23 (2002) 49.
- [144] M. Urbánek, L. Krivánková, P. Bocek, Electrophoresis 24 (2003) 466.
- [145] H.K. Lee, O.K. Choi, H.S. Jung, K.R. Kim, D.S. Chung, Electrophoresis 21 (2000) 930.
- [146] M.S. Chun, D. Kang, Y. Kim, D.S. Chung, Microchem. J. 70 (2001) 247.
- [147] N. Maeso, A. Cifuentes, C. Barbas, J. Chromatogr. B 809 (2004) 147.
- [148] Y. Chen, Y. Jong, S.M. Wu, J. Chromatogr. A 1119 (2006) 176.
- [149] C.Y. Kuo, S.S. Chiou, S.M. Wu, Electrophoresis 27 (2006) 2905.
- [150] Y. He, K.L. Lee, Anal. Chem. 71 (1999) 995.
- [151] J.P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 70 (1998) 149.
- [152] J.P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. B 714 (1998) 29.
- [153] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh, J. Chromatogr. A 838 (1999) 3.
- [154] J.P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 70 (1998) 1893.
- [155] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis (2004) 428.



- [156] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 483.
- [157] D. Martínez, M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65.
- [158] M. Zhang, F. Wei, Y.F. Zhang, J. Nie, Y.Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 294.
- [159] B. Santos, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 968.
- [160] M. Afshar, W. Thormann, *Electrophoresis* 27 (2006) 1517.
- [161] R. Theurillat, M. Knobloch, O. Levionnois, P. Larenza, M. Mevissen, W. Thormann, *Electrophoresis* 26 (2005) 3942.
- [162] H. Borwitzky, W.E. Haefeli, J. Burhenne, *J. Chromatogr. B* 826 (2005) 244.
- [163] J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 1153 (2006) 214.
- [164] J. Hernández-Borges, A. Cifuentes, F.J. García-Montelongo, M.A. Rodríguez-Delgado, *Electrophoresis* 26 (2005) 980.
- [165] N.A. Guzmán, *Electrophoresis* 24 (2003) 3718.
- [166] Z. Liu, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 366.
- [167] C.W. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.* 35 (1998) 353.
- [168] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 3.
- [169] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1.
- [170] L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 279.
- [171] L. Nozal, L. Arce, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 517 (2004) 89.
- [172] J. Ruiz-Jiménez, J.M. Mata-Granados, M.D. Luque de Castro, *Electrophoresis* 28 (2007) 789.
- [173] B. Santos, A. Lista, B.M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Electrophoresis* 26 (2005) 1567.
- [174] N.A. Guzmán, M.A. Trebilcock, J.P. Advis, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 997.

- [175] N.A. Guzmán, J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 3751.
- [176] M.C. Breadmore, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, Anal. Chem. 73 (2001) 820.
- [177] M.C. Breadmore, C.P. Palmer, M. Curran, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, Anal. Chem. 74 (2002) 2112.
- [178] M.C. Breadmore, M.C. Boyce, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, Analyst 125 (2000) 799.
- [179] J.P. Hutchinson, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, J. Chromatogr. A 1039 (2004) 187.
- [180] W. Li, D. Fries, A. Malik, J. Sep. Sci. 28 (2005) 2153.
- [181] W. Li, D. Fries, A. Alli, A. Malik, Anal. Chem. 76 (2004) 218.
- [182] P. Viberg, S. Nilsson, K. Skog, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1729.
- [183] P. Viberg, K.G. Wahlund, K. Skog, J. Chromatogr. A 1133 (2006) 347.
- [184] A. De Rossi, C. Desiderio, J. Chromatogr. B 839 (2006) 6.
- [185] K. Sandra, F. Lynen, B. Devreese, J.V. Beeumen, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 671.
- [186] F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Electrophoresis 28 (2007) 1214.
- [187] N.A. Guzmán, J. Chromatogr. B 749 (2000) 197.
- [188] N.M. Vizioli, M.L. Rusell, C.N. Carducci, Anal. Chim. Acta 514 (2004) 167.
- [189] Z.X. Zhang, Y.Z. He, J. Chromatogr. A 1066 (2005) 211.
- [190] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzmán, J. Chromatogr. A 1140 (2006) 205.
- [191] L.H. Zhang, C.J. Zhang, X. Chen, Y.Q. Feng, X.Z. Wu, Electrophoresis 27 (2006) 3224.
- [192] L.H. Zhang, X.Z. Wu, Anal. Chem. 79 (2007) 2562.
- [193] I. Liska, J. Chromatogr. A 885 (2000) 3.
- [194] M. Pelzing, C. Neubsub, Electrophoresis 26 (2005) 2717.
- [195] F. Svec, J. Chromatogr. B 841 (2006) 52.

- [196] J.P. Hutchinson, P. Zakaria, A.R. Bowiet, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, *Anal. Chem.* 77 (2005) 407.
- [197] D. Allen, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 24 (2003) 3962.
- [198] M.C. Breadmore, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 121.
- [199] M.C. Breadmore, *Electrophoresis* 28 (2007) 254.
- [200] J.P. Hutchinson, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 1106 (2006) 43.
- [201] D. Schaller, E.F. Hilder, P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 104.
- [202] N.E. Baryla, N.P. Toltl, *Analyst* 128 (2003) 1009.
- [203] H.W. Chen, Z.L. Fang, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 135.
- [204] J.R. Veraart, C. Gooijer, H. Lingeman, N.H. Velthorst, U.A.T. Brinkman, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1161.
- [205] T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwesen, H. Lingeman, J.C.M. Waterval, A. Bult, G.J. Jong, W.J.M. Underberg, *Electrophoresis* 25 (2003) 897.
- [206] T. Stroink, P. Schravendijk, G. Wiese, J. Teeuwesen, H. Lingeman, J.C.M. Waterval, A. Bult, G.J. Jong, W.J.M. Underberg, *Electrophoresis* 24 (2003) 1126.
- [207] N.F.C. Visser, M. Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 451.
- [208] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Electrophoresis* 28 (2007) 1319.
- [209] P. Puig, F.W.A. Tempels, G.W. Somsen, G.J. de Jong, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* (submitted) (2007).
- [210] E. Bonneil, K.C. Waldron, *Talanta* 53 (2000) 687.
- [211] F.W.A. Tempels, J. Teeuwesen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263.
- [212] F.W.A. Tempels, G. Wiese, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 30.
- [213] P. Puig, F.W.A. Tempels, M. Calull, C. Aguilar, F. Borrull, G.W. Somsen, G.J. Jong, *J. Chromatogr. B* (in press) (2007).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## **2. PART EXPERIMENTAL I RESULTATS**

### ***EXPERIMENTAL PART & RESULTS***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

Tal i com s'ha esmentat en el capítol anterior, la tècnica d'electroforesi capil·lar presenta l'inconvenient de la manca de sensibilitat per a la determinació d'analits a baixos nivells de concentració. Amb l'objectiu de millorar la sensibilitat de la tècnica, en la part experimental de la present Tesi Doctoral s'han estudiat diferents estratègies per tal de preconcentrar els analits i així incrementar la seva concentració prèviament a la separació electroforètica. Els compostos estudiats han estat dues famílies de  $\beta$ -lactames, concretament un grup de penicil·lines i un grup de cefalosporines.

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

D'entre els nombrosos antibiòtics  $\beta$ -lactàmics, en la present tesi s'han estudiat aquells que tenen un interès especial en veterinària i estan legisllats per la Unió Europea a través de l'establiment d'uns valors de MRL (*maximum residue limits*). Pel que fa a la família de les penicil·lines, es van estudiar vuit compostos: amoxicil·lina, ampicil·lina, penicil·lina G, penicil·lina V, oxacil·lina, cloxacil·lina, dicloxacil·lina i nafcil·lina. En quant a les cefalosporines, es van estudiar les següents: cefalexina, ceftiofur, cefoperazona, cefazolina i cefacetil. Les mostres analitzades en els diversos estudis han estat preparats farmacèutics, mostres aquoses mediambientals i mostres biològiques.

La part experimental es divideix en dos grans blocs en funció de l'objectiu principal que es pretén assolir. D'aquesta manera, en la primera part, que inclou els apartats 2.1 i 2.2, es va estudiar la millora de la sensibilitat de l'CE mitjançant l'aplicació de tècniques electroforètiques de preconcentració. Així, es va estudiar la separació i preconcentració electroforètica de

penicil·lines (2.1.1) per MEKC. També es va estudiar el potencial i l'aplicabilitat de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques a la determinació de penicil·lines (2.2.1) i cefalosporines (2.2.2) per MEEKC.

El segon gran bloc, que inclou els apartats 2.3, 2.4, 2.5 i 2.6, es va centrar en l'ús de tècniques cromatogràfiques per augmentar la sensibilitat de l'CE, concretament, es van estudiar diferents combinacions entre l'extracció en fase sòlida i l'CE. Aquest bloc, es va iniciar amb l'estudi de la combinació *off-line* de l'SPE amb l'CE (2.3.1) i l'objectiu del treball va ser l'avaluació de diferents sorbents (Lichrolut-C<sub>18</sub> i Oasis HLB) per a la determinació de cefalosporines en aigües. A partir de l'apartat 2.4.1 es va fer més èmfasi en diferents acoblaments de l'SPE amb l'CE, concretament a través dels modes *in-line* i *on-line*. Així doncs, es va desenvolupar un mètode basat en l'acoblament *in-line* SPE-CE per a la determinació de ceftiofur i es va realitzar un estudi comparatiu amb la tècnica de preconcentració electroforètica LVSS. Pel que fa a la combinació *on-line*, a l'apartat 2.5.1, es va estudiar la determinació de ceftiofur i cefoperazona emprant una peça T com a interfície entre l'SPE i l'CE. Finalment, a l'apartat 2.6.1, arran dels bons resultats obtinguts en l'apartat anterior, es va emprar una interfície de vàlvula en l'acoblament *on-line* SPE-CE i una tècnica electroforètica de preconcentració per tal de poder introduir el volum total d'elució de l'SPE en el capil·lar de separació electroforètica.

En el mètode descrit a l'apartat 2.4.1 basat en l'acoblament *in-line* de l'SPE amb l'CE, els capil·lars utilitzats es van preparar en els laboratoris del grup d'investigació Bioanàlisi del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona dirigit pel Dr. José Barbosa.

Pel que fa a l'acoblament *on-line* de l'SPE amb l'CE presentat en l'apartat 2.5.1, la part experiment es va desenvolupar en el *Department of Biomedical Analysis* de la Universitat d'Utrecht (The Netherlands) sota la tutela del professor G.J. de Jong, el Dr. G.W. Somsen i el Dr. F.W.A. Tempels durant una estada de quatre mesos realitzada en aquesta universitat.



It is well known that capillary electrophoresis is a technique that is not particularly efficient at determining analytes at low concentration levels. In an attempt to improve its sensitivity, the experimental part of this PhD thesis studies a variety of strategies for preconcentrating the analytes and increasing their concentration before CE separation. The compounds studied were antibiotics from two  $\beta$ -lactam families: penicillins and cephalosporins.

This chapter presents the experimental part and the results from the various studies that were carried out as a part of this PhD thesis. The results have been published in several scientific journals and are presented in journal paper format. Each study, or group of studies, is preceded by a brief introduction which makes clear the main aim as well as the novelty of the study. The most important results are also briefly discussed.

Of the numerous  $\beta$ -lactam antibiotics, only those of particular importance in veterinary medicine which are legislated for by the European Community through the establishment of MRL (maximum residue limits) values have been studied. We studied eight penicillin compounds: amoxicillin, ampicillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin and nafcillin. The following cephalosporin compounds were also studied: cephalexin, ceftiofur, cefoperazone, cefazolin and cephacetrile. The samples analyzed in the various studies were pharmaceutical preparations, aqueous environmental samples and biological samples.

The experimental part is divided into two sections, one for each main aim of the study. The first part, sections 2.1 and 2.2, focuses on improving the sensitivity of CE by applying electrophoretic preconcentration techniques. Therefore, we studied the separation and electrophoretic preconcentration of penicillins (2.1.1) by MEKC. We also studied the potential and application of different electrophoretic preconcentration techniques for the penicillins (2.2.1) and cephalosporins (2.2.2) by applying MEEKC as the separation technique.

In the second part, which includes sections 2.3, 2.4, 2.5 and 2.6, we focus on enhancing the sensitivity of chromatographic techniques as alternative strategies for increasing sensitivity, in particular of solid phase extraction (SPE) coupled to CE. We start by studying the off-line combination between SPE and CE (2.3.1) with the aim of evaluating different sorbents (Lichrolut-C<sub>18</sub> and Oasis HLB). In section 2.4.1 we focus on different couplings between SPE and CE, particularly the in-line and on-line modes. In this way, we develop an in-line SPE-CE method to determine ceftiofur and the results are compared with those obtained when the electrophoretic preconcentration technique LVSS is used. As far as the on-line coupling is concerned, section 2.5.1 studies the determination of ceftiofur and cefoperazone using a T-piece interface between SPE and CE. Finally, after the promising results obtained in the previous section, a valve interface is used to combine the on-line SPE-CE coupling and an electrophoretic preconcentration technique so that the total elution volume can be injected from SPE into the CE capillary.

In the method developed in section 2.4.1, based on the in-line coupling of SPE and CE, the capillaries used were prepared by the Bioanalysis research group from the Department of Analytical Chemistry of the University of Barcelona directed by Dr. José Barbosa.

The experimental part of the on-line coupling of SPE and CE presented in section 2.5.1 was carried out during a four-month stay in the Department of Biomedical Analysis of the University of Utrecht (The Netherlands) under the guidance of Professor G. J. de Jong, Dr. G. W. Somsen and Dr. F. W. A. Tempels.

**2.1 Separació de  $\beta$ -lactames i  
preconcentració electroforètica per  
cromatografia capil·lar micel·lar  
electrocinètica**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

Després de realitzar un estudi bibliogràfic exhaustiu dels mètodes existents per a la determinació de  $\beta$ -lactames, es va plantejar el desenvolupament d'un mètode analític per a la determinació de les vuit penicil·lines d'utilització veterinària que estan regulades per la Unió Europea. Per al desenvolupament i proposta de metodologies analítiques per a la determinació de penicil·lines és convenient tenir en compte no solament les estructures d'aquests compostos sinó també les seves propietats físico-químiques més rellevants, que determinen la seva activitat farmacològica, com són les característiques àcid-base d'aquestes substàncies. Les penicil·lines contenen grups ionitzables a diferents valors de pH, per això es va considerar adequada l'elecció de l'electroforesi capil·lar com a tècnica analítica. Concretament es va optar pel mode MEKC per facilitar la separació de tots els compostos ja que les penicil·lines estudiades són estructuralment molt similars. En l'anàlisi per MEKC, apart de que la separació es realitza en funció de la diferent mobilitat electroforètica pròpia dels analits, també es té en compte la seva hidrofobicitat.

A la bibliografia existeixen mètodes basats en MEKC per a la determinació d'aquest tipus de compostos [1] però quan s'empra aquesta tècnica electroforètica la sensibilitat és baixa i sovint insuficient per a algunes aplicacions. Per tal de solucionar aquest problema, es va estudiar la possibilitat d'utilitzar un sistema de preconcentració de la mostra basat en tècniques electroforètiques per a disminuir els límits de detecció del mètode. En aquest sentit, cal remarcar que en el nostre grup de recerca s'havia desenvolupat una tècnica de preconcentració anomenada *Field Amplified Sample Injection* (FASI) per a la determinació d'amoxicil·lina per CZE amb resultats molt satisfactoris [2]. En el present apartat es va utilitzar com a tècnica de preconcentració electroforètica "*Reversed Electrode Polarity Stacking Mode*" (REPSM) que comporta l'injecció hidrodinàmica d'un gran volum de mostra en el capil·lar i la posterior eliminació del solvent de la mostra [3]. Aquesta és la primera vegada que es va aplicar la tècnica REPSM per a la determinació de penicil·lines per MEKC.

En primer lloc es va portar a terme la separació de les penicil·lines emprant com a surfactant el sulfat de dodecil sòdic (SDS) que és el més utilitzat a la bibliografia. D'aquesta manera, es van plantejar dos mètodes de separació per MEKC en funció de l'amortidor emprat, fosfat sòdic o tetraborat sòdic. Es va estudiar l'efecte de la concentració d'aquest l'amortidor i com afectava a la resolució la concentració del surfactant present en l'electròlit de separació i el pH del medi. Tot i l'optimització d'aquests paràmetres amb el mètode en què s'emprava fosfat sòdic no es va aconseguir una completa separació de les vuit penicil·lines estudiades ja que l'ampicil·lina i l'oxacil·lina, per una banda, i la penicil·lina V i la cloxacil·lina, per una altra banda, van presentar temps de migració molt similars. Emprant l'altre amortidor, el tetraborat sòdic, el temps d'anàlisi va ser menor, uns 17 min i la separació de tots els analits va ser satisfactòria. Així, la natura de l'amortidor emprat va ser un factor determinant per a l'anàlisi per MEKC de les penicil·lines. D'aquesta manera, les condicions òptimes per a la separació electroforètica inclouen un electròlit format per tetraborat sòdic 20 mM i SDS 60 mM a un pH de 8, un potencial de separació de 15 kV i una temperatura de 25 °C.

Una vegada optimitzada la separació es va procedir a l'estudi del sistema de preconcentració *on-column*, REPSM. Aquest consisteix en introduir en el capil·lar, hidrodinàmicament, un gran volum de la mostra a analitzar. Quan s'ha omplert el capil·lar, s'aplica un potencial negatiu, menor que el de separació, de manera que tots els analits i les micel·les migren cap al començament del capil·lar on queden concentrats en un volum molt petit. Una vegada s'assoleix el 95% del corrent màxim generat per aquest potencial negatiu, s'atura la seva aplicació i es comença la separació electroforètica. En aquest estudi, es va emprar una pressió d'injecció de la mostra de 50 mbar i un potencial negatiu per realitzar la preconcentració de -10 kV. Amb aquestes condicions es va optimitzar el volum de la mostra a analitzar. Ja que l'objectiu era aconseguir la màxima sensibilitat del mètode amb una bona resolució, la mostra es va introduir en el capil·lar fins aconseguir omplir-lo en la seva totalitat (2450 nL). Una vegada introduïda la

mostra, es va procedir a la preconcentració i separació per MEKC amb bons resultats pel que fa a l'eficàcia i resolució dels pics electroforètics. L'eficàcia del mètode es va demostrar amb els factors de preconcentració obtinguts que van estar entre 11 i 27.

Finalment, es va procedir a la calibració del mètode establert. Es va observar una linealitat en la relació senyal analítica *versus* concentració per a un interval de concentracions entre 10-50 i 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per a totes les penicil·lines estudiades. Pel que fa a la reproductibilitat, els valors de RSD(%) resultants a una concentració de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , van ser menors de l'11% i es van considerar adequats en termes de precisió del mètode en diferents dies. La tècnica de preconcentració utilitzada va millorar la sensibilitat del mètode de separació electroforètica presentant uns límits de detecció entre 5 i 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per a tots els analits.

Els treball que s'adjunta a continuació inclou els resultats obtinguts en aquest estudi i ha estat publicat a la revista *Electrophoresis* 26 (2005) 954.

### Bibliografia

- [1] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, J. Chromatogr. 477 (1989) 259.
- [2] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, J. Chromatogr. B 731 (1999) 309.
- [3] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, Electrophoresis 21 (2000) 2768.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



***2.1.1 Sample stacking for the analysis of eight  
penicillin antibiotics by micellar electrokinetic  
capillary chromatography***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## SAMPLE STACKING FOR THE ANALYSIS OF EIGHT PENICILLIN ANTIBIOTICS BY MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY

Patricia Puig, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

We studied the use of micellar electrokinetic capillary chromatography for separating eight penicillins. The method consists of (i) an electrophoretic separation based on micellar electrokinetic capillary chromatography, which uses sodium dodecyl sulfate (SDS) as surfactant; (ii) a sample stacking technique called reverse electrode polarity stacking mode (REPSM); and (iii) direct UV detection. The background electrolyte that gave complete separation contained 20 mM sodium borate buffer and 60 mM SDS. The sensitivity of the method was improved by an enrichment step that used on-column stacking. The limits of detection were at the  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  level for the penicillins and did not detract from the peak resolution.

**Keywords:** Antibiotics; Micellar electrokinetic capillary electrophoresis; Penicillin; Sample stacking

---

### 1 INTRODUCTION

Penicillins are  $\beta$ -lactam antibiotics that are widely used in veterinary medicine to treat and prevent diseases. Should there be any residues in edible tissues, individuals who are hypersensitive to penicillins may experience some health problems [1]. The Council Regulation of the European Community 2377/90/EC [2] sets the maximum limits for these

residues (MRL) in animal tissues. Annex I of this regulation, which is a list of compounds with a fixed MRL, includes all the penicillins that we discuss in this paper. For reasons of public health, therefore, methods must be found that can determine these penicillin residues at the levels required by legislation [3].

The first techniques used to measure antibiotics in foods were micro-

biological assays. However, their lack of specificity and precision meant that they could not identify antibiotics [1]. Recently, several chromatographic methods have been reported that can analyze penicillin residues in different matrices. These multiresidue methods prepare the sample in significantly different ways but the determinative step is usually based on HPLC coupled with UV detection [4–8]. Some studies that have determined penicillins have coupled mass spectrometry (MS) to HPLC in order to unequivocally confirm the identity of analyte residues [9, 10]. HPLC-MS/MS has also been used for this kind of analysis [4, 11].

Capillary electrophoresis (CE) is a common alternative technique that is used in drug analysis for determining active compounds and their impurities. It is more efficient than chromatographic techniques, its chemistry is simpler, its separation time is faster, and it requires smaller amounts of sample and reagents [4, 12]. Penicillins have been determined by two different CE modes: capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) [13–20]. CZE was used by Hernández *et al.* [15] to determine amoxicillin in pig plasma and by Ahrer *et al.* [21] to determine drug residues in water by analyzing penicillin V. It has also been used to determine penicillin V, and its impurities and by-products, with aqueous and nonaqueous electrolytes [14]. Oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin have been separated with a CZE method that combines cyclo-

dextrins (CDs) and sample stacking techniques to improve resolution and sensitivity, respectively [12].

Penicillins are mainly determined by MEKC because it is particularly efficient at separating similar analytes. Nishi *et al.* [13], for example, found that MEKC had many advantages over other techniques for separating a group of penicillin antibiotics that included three regulated penicillins with MRL: penicillin G, ampicillin, and amoxicillin. They developed a MEKC method that used two different anionic surfactants—SDS and sodium *N*-lauroyl-*N*-methyltaurate (LMT)—and a phosphate-borate buffer to separate a mixture of seven penicillin antibiotics. They compared their results for the two CE modes (MEKC and CZE) and found that MEKC gave much better selectivity and peak shapes. MEKC has been used to analyze some penicillins together with other antibiotics. Hows *et al.* [16], for example, studied the simultaneous separation of sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors, and  $\beta$ -lactam antibiotics. The bibliography includes other methods for individually analyzing penicillin G, penicillin V, amoxicillin, ampicillin, and their respective derivatives [17–20, 22, 23].

When MRL compliance has to be checked, a sufficiently sensitive analytical technique must be used. This is normally a problem for CE. Several preconcentration procedures have been shown to be useful [24] for determining analytes at low

concentrations. In general, they can be divided into two categories. The first category manipulates the analyte's electrophoretic velocity (sample stacking and transient isotachopheresis). The second explores the analyte's ability to partition into a pseudostationary phase (sweeping and analyte concentrator devices). In CE, various on-line preconcentration strategies decrease limits of detection by filling the capillary with a large volume of sample without compromising peak efficiency or resolution [25].

Sample-stacking techniques were first introduced for ionic analytes in CZE. They have been used to analyze antibiotics in biological samples and when a FASI system was used to analyze amoxicillin in pig-plasma samples by CZE, sensitivity increased fourfold [15]. MEKC uses charged surfactants to give neutral analytes effective electrophoretic mobilities and to increase the mobilities of ionic analytes. The stacking techniques used in MEKC are therefore a little different from those used in CZE. They are: normal stacking mode (NSM), reversed electrode polarity stacking mode (REPSM), stacking with reverse migrating micelles (SRMM), stacking using reverse migrating micelles and water plug (SRW), field-enhanced sample injection (FESI) and field-enhanced sample injection with reversed migrating micelles (FESI-RMM) [25–29]. In this paper, we used REPSM as a preconcentration technique to improve detection limits when analyzing penicillins.

In the REPSM mode, the sample is dissolved in a less conductive matrix than the BGE and the capillary is hydrodynamically filled with this sample. Reverse polarity is applied with BGE at the detection end of the capillary. As a result, the EOF backs the sample matrix out of the capillary while anionic analytes and anionic micelles move towards the detection end and stack at the interface with the BGE. The electrophoretic current is monitored until it reaches approximately 95–99% of its original value. At this point, the polarity returns to normal and the separation occurs in the usual way [28]. Field amplified sample injection (FASI), one of the sample stacking techniques reported for penicillins analyzed by CZE [15], fills the capillary with the sample differently from REPSM: REPSM fills it hydrodynamically and FASI fills it electrokinetically. In the latter injection mode more high mobility ions are introduced and focused than lower mobility ions. On the other hand, reproducibility is lower with electrokinetic injection than with hydrodynamic injection.

The aim of this study was to develop an analytical method for analyzing the eight penicillin antibiotics with MRL legislated by the European Community [2]. For this purpose, we used MEKC coupled to diode array detection (DAD) and, to improve the detection limits, an REPSM technique was introduced. The most important parameters governing the separation, *e.g.*, buffer composition, SDS concentration, buffer pH, and the stacking step were optimized. To our

knowledge, this is the first time REPSM has been optimized to analyze penicillins.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals and standards

Penicillin V potassium salt was purchased from Riedel de-Häen (Seelze, Germany). SDS, amoxicillin, dicloxacillin sodium salt, and nafcillin were obtained from Sigma (St. Louis, MO; USA). Sodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), penicillin G potassium salt, oxacillin sodium salt, cloxacillin sodium salt, and ampicillin sodium salt were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium hydroxide and hydrochloric acid (37%) were obtained from Prolabo (Bois, France). The water required to prepare standards and buffers was purified by a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Individual penicillin stock solutions were prepared at a concentration of  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in Milli-Q water. Mixed stock standard solutions of the penicillins were prepared weekly at a concentration of  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  and the working standard solutions were prepared daily. Both solutions were prepared by diluting the stock standard solutions in purified water. All solutions were stored in dark-glass flasks at  $4^\circ\text{C}$ .

### 2.2 CE analysis

The 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 210 nm. Separations were performed in an uncoated fused-silica capillary (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with an inner diameter of  $75 \mu\text{m}$  and a total length of 64 cm. A window was created 8.5 cm from the end of the capillary. The capillary was thermostated at  $25^\circ\text{C}$  using a Peltier system. Buffer solutions were prepared by dissolving the suitable electrolyte and surfactant in water. The pH was then adjusted with NaOH or with HCl, depending on the solution. Finally, these solutions were filtered through a  $0.45 \mu\text{m}$  pore size membrane filter before they were used. The new capillary was rinsed with 1 M NaOH for 5 min at  $60^\circ\text{C}$ , then with purified water for 10 min at  $20^\circ\text{C}$ , and finally with the background solution for 30 min at  $25^\circ\text{C}$ . Before each run, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH for 2 min, with purified water for 2 min, and with running buffer for 2 min. After each run, the capillary was flushed for 2 min with purified water. At the beginning of each working day, the capillary was pretreated with 0.1 M NaOH for 5 min, with water for 10 min, and finally with the background solution for 30 min at  $25^\circ\text{C}$ . At the end of the day, the capillary was cleaned with water for 5 min and kept in water overnight. The penicillins were analyzed with a background buffer consisting of 20 mM tetraborate sodium buffer and 60 mM SDS at pH 8, and at a voltage of 15 kV. Samples were introduced by

hydrodynamic injection (10 s at 50 mbar) or by reverse electrode polarity stacking.

### 2.3 Sample stacking

First, all analytes were loaded at a pressure of 50 mbar for 360 s into the electrophoretic system so that the whole capillary was almost full. Water was used as the sample solvent to produce a low-conductivity analyte matrix. A negative voltage was then applied and the sample stacking began. When 95% of the current was reached, the voltage was stopped. A positive voltage was then applied to separate the compounds.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

We have developed a procedure for analyzing a mixture of eight penicillins

in the range of  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Figure 1 shows their chemical structures. First, we focused on separating the penicillins by MEKC with phosphate or borate buffer by MEKC with phosphate or borate buffer and SDS as surfactant. To optimize separation, we studied the influence of the buffer concentration, SDS concentration, and the pH of the background buffer.

### 3.1 Separations with phosphate buffer

We first studied how the concentration of the buffer affected the separation. We evaluated its effect on the apparent mobility ( $\mu$  apparent) by using a phosphate buffer containing 25 mM SDS. Increasing the concentration of the buffer electrolyte leads to a wider elution range and this improves the resolution of MEKC. We tested two

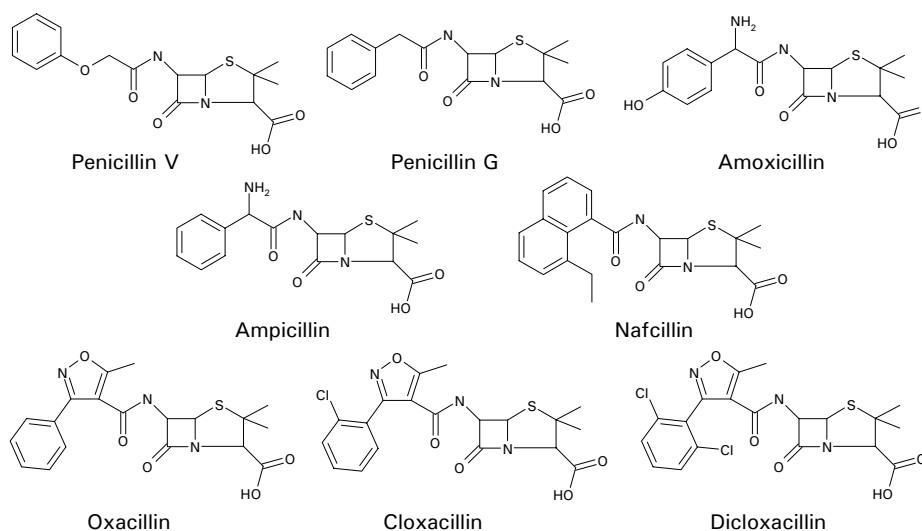
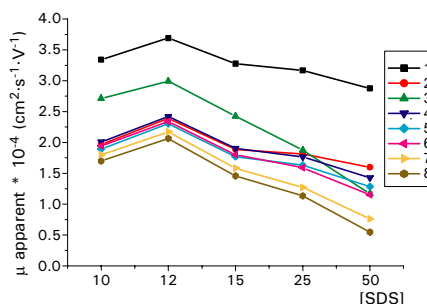


Figure 1. Chemical structures of the penicillin antibiotics studied.

different concentrations of phosphate buffer (50 and 60 mM) at pH 6. As expected, the apparent mobilities of the penicillins increased as the buffer concentration decreased. With 50 mM phosphate, the compounds had acceptable values, ranging from 3.167 for amoxicillin to 1.135 for dicloxacillin (apparent mobility units are given  $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). However, with 60 mM, nafcillin and dicloxacillin mobilities were close to zero (0.002 and 0.001, respectively), which meant that their migration times were too long and that the analysis lasted more than 1 h. At 60 mM, the other compounds had apparent mobilities with suitable values between 2.663 for amoxicillin and 1.242 for cloxacillin. Therefore, a concentration of 50 mM of phosphate was used in subsequent experiments.

The next parameter investigated was the SDS concentration because, in MEKC, the retention and selectivity of the solutes can be manipulated by the total concentration of the surfactant in the buffer system [30]. We used a phosphate buffer to study the effect of the SDS concentration on the separation between 10 mM, which is slightly above its critical micellar concentration (CMC, *ca.* 8 mM [30, 31]), and 50 mM. We kept the phosphate concentration at 50 mM and pH 6. The SDS range was chosen to avoid excessively long migration times. The results are shown in Fig. 2. As the SDS concentration increases, the number of micelles increases and, under these conditions, the concentration of solute in the micelles also increases, which leads to longer

migration times *i.e.*, to reduced mobility. To ensure maximum separation in the shortest time, the SDS concentration was kept at 12 mM in subsequent experiments.



**Figure 2.** Influence of SDS concentration on penicillin apparent mobilities in phosphate 50 mM buffer at pH 6. Capillary, uncoated fused-silica, 60 cm (effective length, 55.5 cm) and 75  $\mu\text{m}$  ID; temperature, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; detection wavelength, 210 nm; direct injection, hydrodynamic injection for 10 s at 50 mbar. Compound assignments: (1) amoxicillin; (2) penicillin G; (3) ampicillin; (4) oxacillin; (5) penicillin V; (6) cloxacillin; (7) nafcillin; (8) dicloxacillin.

The next step in the method development process was to select the optimum pH value. We examined how pH affects migration times in the electrophoretic system. In MEKC, pH is a critical factor for ionizable analytes because even small differences in  $pK_a$  can cause closely related substances to be separated. If the ionized form of the solute has the same charge as the micelle, it will not be incorporated into the micelles as much as when it is neutral. Moreover, the electroosmotic flow is influenced by the pH buffer in such a way that it decreases as the pH medium decreases.



The  $pK_a$  values of the carboxylic acid group on the  $\beta$ -lactam ring were around 3, which means that at pH 3 the proton of the carboxylic group is removed. Therefore, the molecule has an anionic charge. Amoxicillin and ampicillin have amino groups whose  $pK_a$  values are between 7.2 and 7.4, and amoxicillin has a phenolic substitution leading to a third  $pK_a$  of 9.6 [32]. In these cases, the anionic charge coexists with the cationic charge of the amino group in the zwitterionic form of the molecule and this form is in equilibrium with the neutral one as the amino group is protonated until the pH medium reaches the second  $pK_a$ . Above the third  $pK_a$ , amoxicillin loses the proton in the phenolic group. Therefore, we studied three different pH (4, 6, and 8) for the phosphate system. The differences between pH 6 and 8 (see Table 1) are due to the fact that, in this pH range, the compounds were moved mainly by the electroosmotic flow, which was therefore higher than the elec-

trophoretic flow. Note that the electroosmotic flow was highest at pH 8. Our results showed that the migration times were very similar. At both pH 8 and pH 6, the pair of peaks which had the worst resolution (3–4 and 5–6) overlapped but the overlappings were greater at pH 8 than at pH 6. Therefore,  $R_s$  (3–4) and  $R_s$  (5–6) were slightly greater at pH 6.

At pH 4 the electroosmotic flow is lower than the electrophoretic flow, so the polarity had to be reversed in order to carry out the separation. The voltages used were -10 kV for pH 4 and 12 kV for pH 6 and 8. In the first case, only the compounds whose electrophoretic mobilities were higher than their electroosmotic mobilities were detected. Under these conditions, we detected only four of the compounds with a migration time of less than 60 min. The electrophoretic mobilities of the other penicillins were smaller or similar to their electroosmotic mobilities.

**Table 1.** Comparison of the peak resolution for different pH for 50 mM phosphate with 12 mM SDS

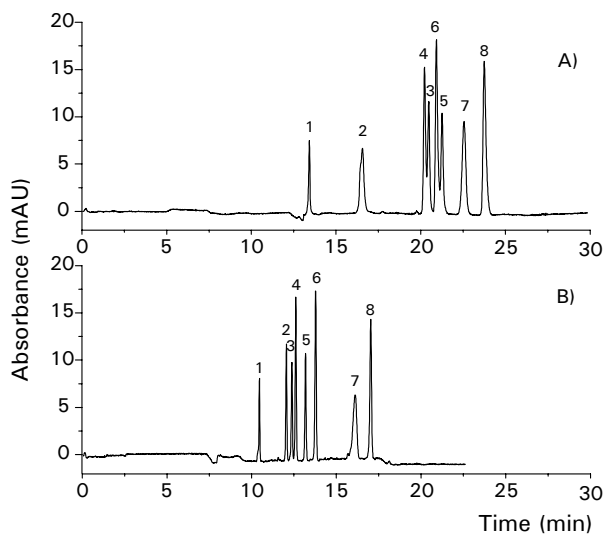
	Resolution ( $R_s$ )	
	pH 6	pH 8
$R_s$ (1-2)	16.7	16.5
$R_s$ (2-3)	18.8	9.8
$R_s$ (3-4)	1.8	1.2
$R_s$ (4-5)	4.1	5.3
$R_s$ (5-6)	2.1	1.4
$R_s$ (6-7)	6.2	8.4
$R_s$ (7-8)	5.1	6.3

Therefore, they were not detected, either because they did not migrate along the capillary or because their migration times (>1 h) were too long for the method. Thus, our results in this part showed that the separation was better at pH 6. Figure 3A shows the electropherogram of all compounds using the best background buffer in the phosphate system. This consisted of a 50 mM phosphate sodium buffer at pH 6 with 12 mM SDS at a voltage of 12 kV.

### 3.2 Separations with borate buffer

The second system investigated used borate as the separation buffer. As in the case of phosphate, the first parameter that was optimized was the

concentration buffer. We tested the effect of the borate buffer concentration at 20, 30, and 40 mM at pH 8 and an SDS concentration of 25 mM. The results showed that the apparent mobilities increased as the concentration decreased. For example, in the cases of amoxicillin and dicloxacillin, which had the highest and lowest mobilities, respectively, the apparent mobilities ( $10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) decreased from 4.144 and 3.158 to 2.832 and 1.906 when borate changed from 20 mM to 40 mM. We should point out that the mobilities of penicillin G and oxacillin, and the mobilities of penicillin V and cloxacillin were so similar in the three buffer concentrations that they overlapped and were not well-resolved in any of



**Figure 3.** Electropherograms of a standard mixture of the penicillins at a concentration of  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . MEKC conditions: (A) 50 mM phosphate, 12 mM SDS, pH 6; applied voltage, 12 kV. (B) 20 mM borate buffer, 60 mM SDS, pH 8; applied voltage, 15 kV. Other conditions and peak assignments as in Figure 2.

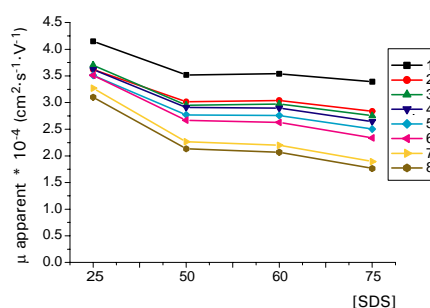
them. Even though the separation was not complete in the concentration range studied, 20 mM was chosen for further studies because its short migration times made it possible to increase the amount of SDS used without making the analysis time too long.

Then, we investigated how the concentration of SDS influenced the separation. We chose concentrations between 25 and 75 mM to improve the analyte separation and to prevent migration times from being too long. We rejected SDS concentrations lower than 25 mM because more peaks would overlap. The experiments were done at pH 8 and a borate concentration of 20 mM (Figure 4). It can be seen that the effect of SDS concentration on the mobility of the compounds was very similar in all cases. As the SDS concentration increased, the number of micelles increased, which resulted in lower analyte mobilities. Analyte mobilities were highest with 25 mM SDS but, as happened with 50 mM SDS, some peaks coeluted. When we used 60 and 75 mM, all the compounds separated, but 60 mM was preferred because the migration times were shorter.

With regard to the pH medium in the borate system, only two pH were tested (8 and 9) at a voltage of 17 kV (Table 2). These pH were higher than

for the phosphate system because borate works better at these values.

Both pH were above the second amoxicillin and ampicillin  $pK_a$  but below the third amoxicillin  $pK_a$ . So, for both pH values, the analyte charge and solubility in the micelles were the same. For pH 9, however, the electroosmotic flow was slightly higher, which meant that at this pH some peaks coeluted. Peak 1 and 2 were totally overlapped so the resolution between them was zero. For pH 8, on the other hand, all the peaks were separated with acceptable resolution values.



**Figure 4.** Influence of SDS concentration on penicillin apparent mobilities in borate 20 mM buffer at pH 8. Other conditions and compound assignments as in Figure 2.

Figure 3B shows the electropherogram of the eight penicillins obtained in the best conditions for the borate buffer. These consisted of a 20 mM tetraborate sodium buffer and 60 mM SDS at a voltage of 15 kV at pH 8.

**Table 2.** Comparison of the peak resolution for different pH for 20 mM borate with 60 mM SDS

	Resolution (Rs)	
	pH 8	pH 9
Rs (1-2)	20.1	0.00
Rs (2-3)	2.6	5.1
Rs (3-4)	4.1	8.1
Rs (4-5)	6.6	7.1
Rs (5-6)	6.2	6.6
Rs (6-7)	12.9	11.9
Rs (7-8)	4.7	4.2

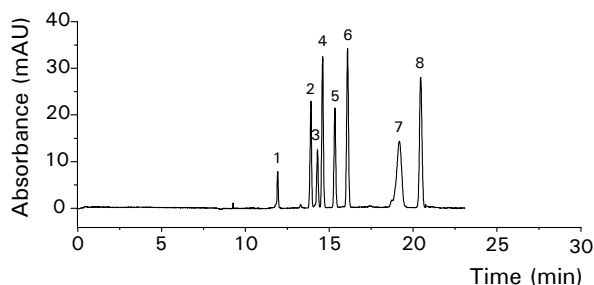
Under these conditions, the resolution was satisfactory for all the compounds. Figure 3 shows that the resolution was better and the analysis time lower in the borate conditions than in the phosphate ones, so the borate system was preferred.

### 3.3 Enhancing sensitivity through sample stacking

To improve the detection limits of the method and achieve MRL values, we carried out sample stacking as a way of tracing enrichment in CE. REPSM was chosen as the preconcentration technique. The pressure applied was 50 mbar and the duration of this pressure was optimized to achieve a maximum concentration factor. The capillary was completely filled with the sample and the optimum time was 360 s. The sample injection time is limited by the peak broadening because this can negatively affect the separation efficiency. However, under these conditions, peak broadening was not observed. Figure 5 shows the electropherogram of the stacking

mode for a mixture of the penicillins at a concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . In this mode, the electropherograms did not detract from peak resolution or involve a loss in peak symmetry. As we can see if we compare the electropherograms for direct injection (see Figure 3B) and sample stacking (Figure 5), the migration times were only slightly affected by the stacking mode: the shorter times were less affected than the longer ones. In the case of amoxicillin, for example, the first peak in the electropherograms, the difference between the migration times in the direct and the sample stacking methods is approximately 1 min, whereas for the last-eluted compound this difference is approximately 3 min.

In this paper, the concentration factors obtained for REPSM, calculated by comparing peak areas with normal hydrodynamic injection, with an injection time of 360 s and 50 bar pressure, were between 11 and 27 for all analytes (see Table 3).



**Figure 5.** Electropherogram of a standard mixture of the penicillins. MEKC optimum conditions: 60 mM SDS, 20 mM borate buffer, pH 8; applied voltage, 15 kV. Sample stacking: REPSM injection for 360 s at 50 mbar, analyte concentration, 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Peak assignments as in Figure 2.

### 3.4 Calibration

We examined the quantitative aspects of this method (see Table 3). A series of calibration solutions were prepared with penicillin concentrations between 10 and 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Linearity was very good throughout the range, with correlation coefficients above 0.997 for all the compounds except ampicillin ( $r=0.992$ ). We determined the precision of the method for a standard solution containing the analytes at a concentration of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The RSD ( $n=8$ ) in terms of reproducibility between days was between 5 and 10.

The limit of detection (LOD), defined as the lowest concentration of analyte that can be detected, was estimated to be three times the signal-to-noise ratio. On this basis, the LOD were as low as 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for amoxicillin, 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for ampicillin and nafcillin, and

5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the other compounds. The LODs obtained here could only be compared with the LODs obtained by CZE methods because in the literature there is no MEKC method that uses stacking techniques to analyze penicillins. For example, in the determination of amoxicillin in pig plasma by CZE, a stacking method (FASI) was used that improved LOD from 280 to 15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [15]. In the analysis of the three isoxazolylpenicillins (oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin), a large-volume sample stacking was used with an electroosmotic flow pump to inject the sample. In this mode, the detection limits obtained were 2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for all compounds [12]. This method could be used to determine these compounds at levels below the limits imposed by international regulations in muscle, fat, kidney, and liver (MRL between 25 and 300  $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ ) with fairly good precision.

**Table 3.** Linearity, calibration curves, reproducibility (RSD), and detection limits (LODs) of REPSM for standard solutions

Compound	Linearity ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n = 8)	Fold stacking	LODs (REPSM-CE, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Amoxicillin	50-1000	$y = 0.0456x + 0.0078$	0.998	6	11	25
Penicillin G	10-1000	$y = 0.1542x + 1.2226$	0.999	6	27	5
Ampicillin	25-1000	$y = 0.0718x + 1.5025$	0.992	11	16	15
Oxacillin	10-1000	$y = 0.2277x + 0.0811$	0.997	6	27	5
Penicillin V	10-1000	$y = 0.1622x + 1.2566$	1	5	27	5
Cloxacillin	10-1000	$y = 0.2748x + 0.8087$	1	6	26	5
Nafcillin	25-1000	$y = 0.2840x - 0.55426$	1	3	26	15
Dicloxacillin	10-1000	$y = 0.3165x - 3.152$	1	7	27	5

a) RSD in terms of reproducibility between days. Other CE conditions as in Figure 5.

#### 4 CONCLUDING REMARKS

In this study, MEKC was found to be a powerful analytical technique for quickly and simultaneously determining a group of penicillin antibiotics. The eight penicillins legislated by the European Community were completely separated within 17 min. Moreover, we established a system for on-line preconcentrating penicillins during MEKC, which provides detection limits in the range of 5–25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . REPSM, the stacking mode used greatly improved sensitivity without detracting from the resolution and it should be pointed out that it is the first time this mode has been used in conjunction with MEKC for the analysis of penicillins.

#### 5 REFERENCES

- [1] M. McGrane, M. O'Keeffe, M. R. Smyth, *Analyst* 123 (1998) 2779.
- [2] Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990.
- [3] G. Balizs, A. Hewitt, *Anal. Chim. Acta* 492 (2003) 105.
- [4] S., Riediker, R. H. Stadler, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1614.
- [5] F. J. Schenck, P. S. Callery, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 99.
- [6] M. Marchetti, I. Schwaiger, E. R. Schmid, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 371 (2001) 64.
- [7] A. Medvedvici, M. Ionescu, V. Mircioiu, V. David, *Microchem. J.* 72 (2002) 85.
- [8] G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 661.
- [9] F. Bruno, R. Curini, A. D. Corcia, M. Nazzari, R. Samperi, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 3463.
- [10] S. Horimoto, T. Mayumi, K. Aoe, N. Nishimura, T. Sato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1093.
- [11] D. M. Holstege, B. Puschner, G. Whitehead, F. D. Galey, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 406.

- [12] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
- [13] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, J. *Chromatogr.* 477 (1989) 259.
- [14] E. F. Hilder, C. W. Klampfl, W. Buchberger, P. R. Haddad, *Electrophoresis* 23 (2002) 414.
- [15] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull, J. *Chromatogr. B* 731 (1999) 309.
- [16] M. E. P. Hows, D. Perrett, J. Kay, J. *Chromatogr. A* 768 (1997) 97.
- [17] Y. M. Li, A. V. Schepdel, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, J. *Chromatogr. A* 812 (1998) 227.
- [18] Y. Zhu, A. V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. *Chromatogr. A* 781 (1997) 417.
- [19] Z. Yongxin, J. Dalle, A. V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. *Chromatogr. A* 792 (1997) 83.
- [20] Y. Zhu, C. Hoogmartens, A. Van Schepdael, E. Roet, J. Hoogmartens, J. *Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 22 (1999) 1403.
- [21] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, J. *Chromatogr. A* 910 (2000) 69.
- [22] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, J. *Chromatogr. B* 800 (2004) 203.
- [23] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, J. *Chromatogr. A* 1032 (2004) 265.
- [24] P. Kowalski, I. Oledzka, H. Lamparczyk, J. *Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937.
- [25] C. L. Silva, E. C. Lima, M. F. M. Tavares, J. *Chromatogr. A* 1014 (2003) 109.
- [26] J. B. Kim, S. Terabe, J. *Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1625.
- [27] M. Molina, M. Silva, *Electrophoresis* 23 (2002) 3904.
- [28] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [29] J. P. Quirino, S. Terabe, J. *Chromatogr. A* 798 (1998) 251.
- [30] Y. He, H. K. Lee, J. *Chromatogr. A* 749 (1996) 227.
- [31] P. L. Desbène, C. M. Rony, J. *Chromatogr. A* 589 (1995) 107.
- [32] S. S. Huang, J. R. Wu, M. L. Chen, J. *Chromatogr.* 564 (1991) 195.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



**2.2. Separació de  $\beta$ -lactames i  
preconcentració electroforètica per  
cromatografia capil·lar de microemulsió  
electrocinètica**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

En el treball anterior s'ha demostrat que la utilització de micel·les en el sistema electroforètic ha fet possible la separació de les vuit penicil·lines estudiades. Després d'aquests encoratjadors resultats, es va plantejar la utilització d'una tècnica relativament recent, la cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica (MEEKC) que també es basa en la utilització d'una fase pseudo-estacionària, una microemulsió. Aquesta està formada per petites gotes d'oli en suspensió en una fase aquosa. Per tal de disminuir l'elevada tensió superficial que es presenta entre la gota i la fase aquosa, en l'electròlit de separació és molt important la presència d'un surfactant i d'un co-surfactant. La partició del analit en la microemulsió es deu fonamentalment a la hidrofobicitat dels compostos de manera que els menys polars tenen una tendència més gran a quedar-se retinguts a l'interior de la gota. D'aquesta manera, i tal com succeeix en MEKC, els compostos se separen en funció del seu grau d'hidrofobicitat i de la seva mobilitat electroforètica. Degut a que la natura de la micel·la i de la microemulsió és diferent, les diferents interaccions analit-fase pseudo-estacionària permeten selectivitats diferents en cadascuna de les tècniques [1].

En primer lloc es va procedir a la separació per MEEKC dels mateixos compostos estudiats en el treball anterior. Basant-nos en un mètode descrit a la literatura per a la separació d'un ampli ventall de fàrmacs [2], es va estudiar l'efecte de diferents paràmetres com la concentració de co-surfactant i de tampó de separació així com del pH i de la temperatura de la separació. També es va estudiar l'efecte en la separació de diferents surfactants, olis, amortidors de pH i solvents orgànics. Pel que fa als surfactants, es van escollir dos de tipus aniònic, el sulfat de dodecil sòdic (SDS) i el colat sòdic i un de tipus zwitteriònic el polietilè lauril éter (Brij 35), i també es va avaluar l'opció d'emprar una mescla al 50% de SDS i Brij 35. Tot i que en aquest punt del desenvolupament del mètode la separació no va ser completa, la utilització de SDS o de Brij 35 van ser les dues opcions que van proporcionar els millors resultats. En tots dos casos, dos dels analits es van solapar però per altra banda hi va haver diferències pel que fa al temps

d'anàlisi ja que emprant SDS la separació es realitzava en 23 minuts, aproximadament, i amb Brij 35 en 10 minuts.

La natura de l'oli utilitzat per formar la gota de la microemulsió també va tenir una gran importància en la separació. Concretament es van avaluar tres olis el *n*-octà, l'acetat d'etil i el *n*-tartrat, aquests dos últims presenten una tensió superficial menor, cosa que fa que la quantitat de surfactant necessària per establir la microemulsió sigui molt menor. D'aquesta manera, en disminuir la quantitat de surfactant, els temps d'anàlisi també queden dràsticament reduïts. Tot i que es va optar per desenvolupar el mètode amb acetat d'etil, no es van observar diferències significatives entre aquest i el *n*-tartrat.

L'addició d'un solvent orgànic va millorar la resolució entre els pics electroforètics de manera que, en afegir un 10% de 2-butanol a l'electròlit de treball, es va aconseguir la completa separació de tots els analits. Així doncs, la microemulsió que va presentar millors resultats va ser la formada per 0.5% d'acetat d'etil, 1.2% d'1-butanol, 2% de Brij 35, 10% de 2-butanol i de 86.3% tetraborat sòdic 10 mM (pH 10) a una temperatura de 25 °C aplicant un potencial de 10 kV. El mètode desenvolupat es va aplicar a mostres reals, concretament es va quantificar amoxicil·lina en un preparat farmacèutic comercial.

Per tal de millorar la sensibilitat, i de la mateixa manera que en el treball anterior, es va aplicar la tècnica de preconcentració REPSM. Introduint en el capil·lar un volum de mostra d'uns 2 µL, pràcticament la totalitat del volum del capil·lar de separació, i emprant un voltatge de preconcentració de -5 kV fins al 95% del corrent original, els límits de detecció del mètode van disminuir de 0.5-1 mg·L<sup>-1</sup> (injecció hidrodinàmica convencional) fins 10-25 µg·L<sup>-1</sup> (REPSM). Tot i que els límits de detecció del mètode per MEEKC són molt similars als obtinguts en el treball anterior per MEKC, el temps d'anàlisi va disminuir fins a 12 minuts.

Degut als bons resultats obtinguts en aquest estudi i per tal d'aprofundir més en el coneixement de tècniques de preconcentració electroforètiques aplicades en MEEKC, es van estudiar dos sistemes de MEEKC: (i) amb presència del EOF (pH bàsic) i (ii) amb supressió del EOF (pH àcid). Aquests sistemes es van aplicar a la separació d'uns altres antibiòtics  $\beta$ -lactàmics de la família de les cefalosporines: cefazolina, cefoperazona i cefalexina. De la mateixa manera que en els treballs anteriors es va millorar la sensibilitat del mètode amb l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica. Pel que fa al primer cas, amb presència del EOF, es va aplicar la tècnica REPSM i en el segon, en condicions de supressió del EOF, es va estudiar una altra tècnica, l'anomenada *Stacking with Reverse Migrating Pseudostationary Phase* (SRMP).

Pel que fa a la separació per MEEKC, amb el primer dels sistemes, amb presència del EOF, la direcció de la separació la va determinar la mobilitat electroosmòtica. Això és degut a que la magnitud del EOF era molt més gran que la mobilitat electroforètica tant dels analits com de les gotes de microemulsió, tots carregats negativament. En el segon dels sistemes, sota condicions de supressió del EOF, les mobilitats aparents de les gotes de microemulsió i dels analits estaven dominades per la mobilitat electroforètica de la microemulsió que presentava càrrega negativa procedent del surfactant emprat, el SDS. A diferència del sistema a pH bàsic, a pH àcid la cefalexina presenta una càrrega positiva i el cefazolín i la cefoperazona són compostos neutres. Així, amb presència del EOF l'ordre de migració va ser cefoperazona, cefazolina i cefalexina amb una diferència de temps de migració de 0.5 min entre el primer i últim pic, i amb condicions de supressió del EOF aquest ordre es va invertir apareixent el primer pic al minut 3 i l'últim al minut 9.4.

Una vegada establerts els mètodes de separació dels analits per MEEKC, es van aplicar les tècniques de preconcentració REPSM [4], per al sistema amb presència del EOF i SRMP [5] per al sistema amb supressió del EOF. Tant REPSM com SRMP tenen en comú que es basen en la injecció hidrodinàmica

d'un gran volum de mostra però la segona tècnica estudiada, presenta l'avantatge de presentar una millor precisió ja que no és necessària la monitorització del corrent per a realitzar el pas de l'etapa de preconcentració a la de separació. En SRMP, la diferencia de potencial aplicada per a l'eliminació de la mostra és la mateixa que la aplicada per a la separació electroforètica. D'aquesta manera, en introduir el volum de mostra a preconcentrar en el capil·lar de separació i aplicar el potencial negatiu la matriu de la mostra es va eliminant. Durant l'eliminació de la matriu, el EOF del sistema es va reduint fins que arriba a un punt en que la magnitud de la mobilitat electroforètica de les gotes de microemulsió és superior i té lloc la separació per MEEKC. En els dos casos, es van estudiar diferents temps d'injecció de la mostra a una pressió de 50 mbar amb l'objectiu d'introduir el màxim volum de mostra possible sense perdre resolució en la separació electroforètica. Els millors resultats es van obtenir amb uns temps de 200 i 50 segons per a REPSM i SRMP, respectivament. En la calibració dels mètodes es van estudiar diferents paràmetres quantitius que van indicar una bona linealitat en els intervals estudiats des de 40-75 fins 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per a tots els analits. Pel que fa als factors de preconcentració, tot i que es va trobar que van ser lleugerament més alts en REPSM, els límits de detecció van ser del mateix ordre, entre 30 i 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per a les dues tècniques d'*stacking*.

Per tal de disminuir el temps d'anàlisi per MEEKC, es va estudiar el potencial de la tècnica anomenada *short-end injection* [3] que es basa en la injecció de la mostra per l'extrem del capil·lar més proper a la finestra de detecció. D'aquesta manera la longitud efectiva de separació és molt més curta, 8.5 cm respecte 36.5 cm en el cas de la injecció hidrodinàmica convencional. Tant en el sistema de separació per MEEKC amb presència del EOF com en el de supressió del EOF es van estudiar diferents paràmetres com el temps i la pressió de la injecció hidrodinàmica i el potencial de separació. Degut a la petita longitud del capil·lar fins a la finestra de detecció, en el primer sistema, els pics dels analits es van solapar però en el segon sistema, a pH

àcid, es va aconseguir una bona separació en un temps d'anàlisi molt més curt, 3 minuts respecte 9 minuts en la injecció hidrodinàmica convencional.

Els dos treballs que s'adjunten a continuació inclouen els resultats obtinguts arran d'aquests estudis. En el primer treball (apartat 2.2.1) s'inclou la determinació de penicil·lines per MEEKC i millora de la sensibilitat amb REPSM que ha estat publicat a la revista *J. Chromatogr. B* 831 (2006) 196 i en el segon treball (apartat 2.2.2), publicat a la revista *Chromatographia* 62 (2005) 603, es presenta la separació de cefalosporines mitjançant MEEKC i l'aplicació de REPSM i SRMP per disminuir els límits de detecció.

### **Bibliografia**

- [1] X. Cahours, S. Cherkaoui, G. Rozing, J.L. Veuthey, *Electrophoresis* 23 (2002) 2320.
- [2] K.D. Altria, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 371.
- [3] P.E. Mahuzier, B.J. Clark, S.M. Bryant, K.D. Altria, *Electrophoresis* 22 (2001) 3819.
- [4] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Electrophoresis* 26 (2005) 954.
- [5] J.P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.* 70 (1998) 149.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



***2.2.1 Sample stacking for the analysis of  
penicillins by microemulsion electrokinetic  
capillary chromatography***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## SAMPLE STACKING FOR THE ANALYSIS OF PENICILLINS BY MICROEMULSION ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY

Patricia Puig, Francesc Borrull, Carme Aguilar, Marta Calull

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

We present a method for determining eight penicillin antibiotics using microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC). We studied how the composition of the microemulsion affected separation by modifying such parameters as the surfactant or the addition of organic solvents. The best microemulsion system consisted of 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35, 10% 2-butanol and 86.3% 10 mM borate buffer at pH 10. We studied the suitability of this microemulsion composition for analyzing a commercial drug. To improve the sensitivity of the method, we used the stacking technique reversed electrode polarity stacking mode (REPSM), which increased the detection limits by about 40-fold.

**Keywords:** Antibiotics; Capillary electrophoresis; Penicillins; Microemulsion electrokinetic chromatography; Preconcentration

---

### 1 INTRODUCTION

An antibiotic is any chemical compound that is used to kill or inhibit the growth of infectious organisms, particularly bacteria and fungi. It is generally believed that there is a link between the use of antibiotics in animal fodder, bacterial resistance to these drugs and human diseases [1]. In particular, several penicillin group antibiotics with various chemical structures are widely used to treat

infectious diseases in humans and animals [2]. The presence of these compounds in food chains can lead to the development of allergic reactions and new strains of bacteria that are resistant to antibiotics. These risks led to the legislation of these antibiotics by the Council Regulation of the European Community 2377/90/EC [3]. Annex I of this regulation (updated 22/12/04) establishes the maximum limits of eight penicillins in animal tissues.

Most analytical methods for determining penicillin compounds are based on liquid chromatography [4-10]. Recently, several papers have described how capillary electrophoresis (CE) [1,4,11-19] can be used to analyze these compounds, mostly with micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [12-15,17-20] because of its good selectivity and wide applicability.

In the last few years, a technique known as microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) has been used to insert microemulsions as alternative pseudo-stationary phases in electrokinetic separations [21]. As with MEKC, the technique separates solutes on the basis of their hydrophobicities and electrophoretic mobilities [22] but with different selectivity [21]. Microemulsions are solutions containing dispersed nanometersized droplets of an immiscible liquid [23]. Typically, droplets consist of an immiscible oil suspended in water. There is a high surface tension between the layers of immiscible liquids that prevents them from mixing. A surfactant, which is soluble in both layers because it contains both hydrophilic and hydrophobic portions, is added to coat the oil droplets formed. The oil drops are coated in order to reduce the surface tension between the two liquids. The surface tension is further lowered by adding a short-chain alcohol called a co-surfactant, which stabilizes the microemulsion system [22, 23]. Therefore, a typical microemulsion used for MEEKC may consist of 0.8% *n*-octane, 3.3% sodium dodecyl

sulfate (SDS), 6.6% 1-butanol and 89.3% 10 mM borate buffer at pH 9.2 [24-27]. It should be taken into account that solutes in MEEKC are more able to penetrate the surface of the droplet than the surface of a micelle, which is much more rigid. This means that MEEKC can be applied to a wider range of solutes, including neutral and charged compounds, than MEKC.

One of the advantages of MEEKC is that it takes into account many parameters: the type and concentration of the oil, buffer, surfactant, co-surfactant, counter-ion and the pH all affect the separation performance [26]. As well as the mostly aqueous electrolyte solution and the surfactant responsible for stabilizing the oil droplets, various organic solvents with different properties play an important role in the composition of the microemulsions used in MEEKC [28].

Although MEEKC has been used to separate some penicillins [29], to the best of our knowledge, it has not yet been used to separate the analytes studied in this paper. Altria *et al.* [29] showed that MEEKC could be used to analyze penicillin compounds. They separated penicillin G and penicillin V from a mixture of several cephalosporins in an analysis time of less than 4 min.

To verify if MEEKC has any advantages over MEKC in terms of resolution and analysis time, this paper studies the potential of MEEKC to separate and determine the eight

legislated penicillins used as veterinary drugs. The microemulsion parameters (pH, the nature of the surfactant, the temperature of the capillary, the nature and concentration of the buffer and the addition of organic solvents) were optimized. We evaluated the usefulness of the method by analyzing a commercial drug sample.

Because CE capillaries are small, only very small sample volumes can be loaded into the column. CE is therefore not a very sensitive technique. To preconcentrate samples and increase the amount of sample that can be loaded into the column without degrading the separation, several techniques have been developed in the various electrophoretic modes [19, 30, 31]. One of them is the reversed electrode polarity stacking mode (REPSM), which has been used as stacking technique in MEKC [19, 31]. REPSM introduces the sample into the capillary hydrodynamically. A stacking voltage is then applied at negative polarity to preconcentrate analytes at the interface between the sample zone and the background electrolyte, and the sample matrix is pumped out from the capillary by EOF. This technique was first coupled to MEEKC to analyze some NSAIDs by Macià *et al.* [32]. In the present paper, we study how the on-line coupling of REPSM-MEEKC can be used to analyze penicillins at trace levels for the first time

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Chemicals

Penicillin V potassium salt was purchased from Riedel de-Häen (Seelze, Germany). Sodium dodecyl sulfate (SDS), amoxicillin sodium salt, dicloxacillin sodium salt, nafcillin and sodium cholate were obtained from Sigma (St. Louis, USA). Penicillin G potassium salt, oxacillin sodium salt, cloxacillin sodium salt, ampicillin sodium salt, sodium tetraborate and polyethylene glycol dodecyl ether (Brij 35) were obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium hydroxide and hydrochloric acid (35%) were obtained from Prolabo (Bois, France). Ethyl acetate and 1-butanol were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), *n*-octane and methanol from SDS (Peypin, France), Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) buffer and dibutyl tartrate from Aldrich (Steinheim, Germany) and *n*-heptane from Probus (Badalona, Spain). Water was obtained from a Millipore Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA).

### 2.2 Equipment

MEEKC analyses were performed using a Hewlett Packard <sup>3D</sup>CE Capillary Electrophoresis System (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with an on-column diode-array detector, an autosampler and a power supply able to deliver up to 30 kV. A HP ChemStation (Agilent) version A:04.01 was used for instrument control, data acquisition and data analyses.

### 2.3 MEEKC conditions

Separations were performed on 45-cm long (detection window at 36.5 cm), 75- $\mu\text{m}$  internal diameter, uncoated fused-silica capillaries (Supelco, Bellefonte, USA). Unless otherwise specified, the capillary was thermostated at 25 °C, the voltage was kept constant at 10 kV during analysis and the detection wavelength was 210 nm. Normal sample injection was carried out using the pressure mode for 5 s at 50 mbar.

New capillaries were conditioned with 1 M sodium hydroxide for 5 min at 60 °C, water for 10 min and electrolyte for 30 min at 25 °C. At the beginning of each day, the capillaries were rinsed successively with 0.1 M sodium hydroxide, then with water for 8 min each and finally with microemulsion solution for 10 min. The capillaries were rinsed between injections with the microemulsion solution for 2 min. When not in use, the capillaries were washed with 0.1 M sodium hydroxide, with water for 8 min and then dry stored.

### 2.4 Buffers and standards

Microemulsions were prepared by weighing the appropriate ratio of components to obtain different compositions. The order of addition was the same in all cases: initially the oil was mixed with the co-surfactant, and then the surfactant and the buffer were added. When organic solvents were used, they were added before the surfactant. The mixture was sonicated for 30 min to aid complete

dissolution and an optically transparent microemulsion was formed. The pH was adjusted using 1 M NaOH or HCl 35%. Before use, the microemulsion solutions were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  microfilter. The solution remained transparent and stable for several weeks.

Stock standard solutions of penicillins were prepared by dissolving each compound in Milli-Q water to obtain a concentration of 1000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . For MEEKC experiments, a standard mixture of 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  was prepared and working solutions were made by dissolving a volume of this solution in water to obtain final concentrations.

A commercial pharmaceutical preparation containing amoxicillin was used to test the suitability of the method for industrial samples. The individual solution was prepared by dissolving a quantity of the preparation in water to give an amoxicillin concentration of 100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . This was then diluted to obtain a final concentration of 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

All the solutions were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter prior use.

### 2.5 REPSM procedure

After the capillary had been conditioned with the microemulsion separation solution, hydrodynamic injection was performed at 50 mbar for 270 s. The injection end of the capillary was then placed on a microemulsion separation solution and a voltage of -5 kV was applied. When the current was 95% of that reported

when the capillary was filled only with background solution, the voltage was turned off and the separation began.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

In a previous study, we developed a simultaneous MEKC separation of the eight legislated penicillins [19]. Now,

in this study, one of our main aims was to evaluate the potential of MEEKC for separating these penicillins and compare the results with those obtained by MEKC.

It has been shown that a micro-emulsion consisting of 0.8% *n*-octane (oil), 6.6% 1-butanol (co-surfactant),

**Table 1.** Structure and  $pK_a$  of the studied compounds (a) [34]

Compound	R	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
Amoxicillin		2.61	7.2	9.6
Ampicillin		2.62	7.4	—
Penicillin G		2.62	—	—
Oxacillin		2.61	—	—
Penicillin V		2.62	—	—
Cloxacillin		2.60	—	—
Nafcillin		2.61	—	—
Dicloxacillin		2.60	—	—

a) Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V8.14 (© 1994-2005 ACD/Labs)

3.3% SDS (surfactant) and 89.3% tetraborate (buffer) can be used at pH 9.31 for a wide range of drugs [29]. We therefore selected this mixture to explore the potential of MEEKC at separating penicillins. To study the separation, we investigated the effect of the pH, the temperature of the capillary, the concentration of the co-surfactant, the type of surfactant, the type and concentration of the buffer and the addition of organic solvents, taking the system mentioned as the starting point. The voltage applied was 10 kV.

### 3.1 Effect of microemulsion pH

The pH of the microemulsion has a strong effect on separation selectivity because it affects both solute ionization and the level of EOF generated [33]. Table 1 shows the structure of the compounds investigated with the corresponding  $pK_a$ . Acidic drugs like penicillins typically have  $pK_a$  values in the region of pH 2.5-6, so they are ionized at a pH above 6. In order to ensure that the compounds were negatively charged and to maximize the EOF, we selected pH 10. Acidic solutes have a negative electrophoretic mobility and partition into the droplet, but they are repelled from it because solutes and micelles are both negatively charged [33].

### 3.2 Effect of co-surfactant concentration

The co-surfactant is normally added to decrease the surface tension between the nanodroplet and the aqueous phase. This additive affects

the partition coefficients of the analytes and has an impact on migration and separation selectivity. The migration times can be altered by varying the co-surfactant concentration; this affects the solution viscosity, which in turn affects the EOF. The size of the oil droplet increases as the co-surfactant concentration increases, which reduced the charge density of the droplet and makes it less able to oppose the EOF [22, 23]. 1-Butanol is the most frequently used co-surfactant in MEEKC [23]. To investigate the effect of co-surfactant on the separation of penicillins, we tested various concentrations between 5.6 and 7.6% (6.6% is the most common concentration of 1-butanol and, around this value, the microemulsion is stable). We observed that the method selectivity changed as the co-surfactant concentration changed so, although the analysis times were similar, the separation between the peaks was different. Results were best with 6.6% of 1-butanol.

### 3.3 Effect of capillary temperature

We tested several temperatures between 20 and 35 °C and no change in the migration order was observed. We kept 25 °C as the analysis temperature because there was less overlapping and migration times were not too long.

### 3.4 Effect of the nature of the surfactant

The nature of the surfactant has a marked effect on the separation; it

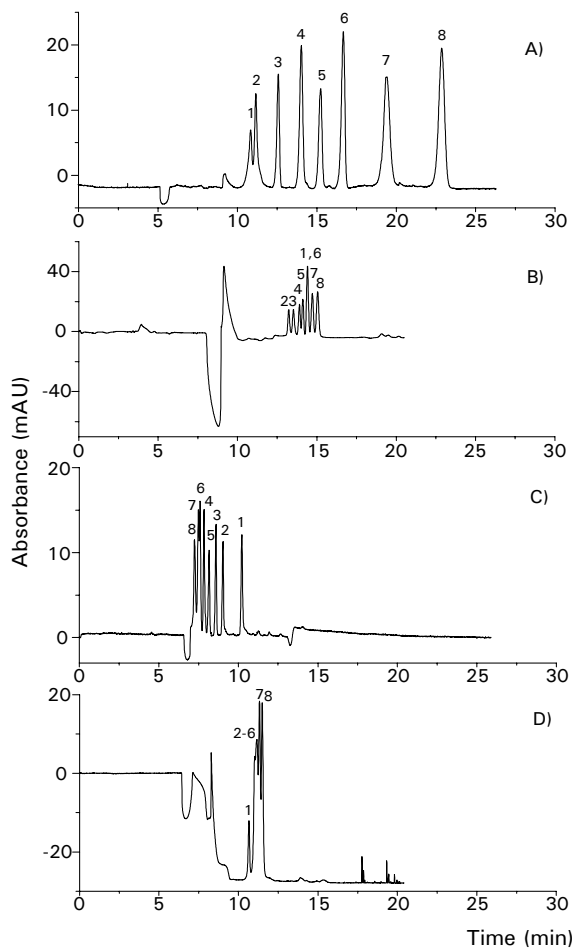


influences the droplet charged and size, the level and direction of the EOF and the level of ion-pairing with charged solutes [22, 23, 33]. SDS is the most commonly used surfactant and 3.3% is the most common SDS concentration. As can be seen in Figure 1A, with 3.3% SDS, the eight peaks were separated in less than 24 min.

To investigate how the nature of the surfactant affects migration times and selectivity, we tested another anionic surfactant, sodium cholate. Sodium cholate is an anionic bile salt surfactant that has also been used to generate negatively charged droplets. Figure 1B shows that the resolution was worse for cholate than for SDS, since only seven peaks were separated and amoxicillin and cloxacillin co-eluted. The migration times were shorter than with SDS since the analysis time was 9 min lower. The migration order was almost the same, except for amoxicillin which, with SDS, eluted first and, with cholate, overlapped with cloxacillin in fifth place. This may be due to the structure of cholate. Some studies have suggested that cholate forms helical micelles, which leads to more polar aggregated than those formed with *n*-alkyl surfactants [35]. Amoxicillin was double charged, so its high polarity allowed it to remain longer inside the droplet.

Although the zero electrophoretic mobilities of neutral surfactants cannot be exploited in the MEEKC separation of non-ionic compounds, they can be used successfully in the separation of ionic compounds. The problems with Joule heating at increasing concentrations of ionic surfactants can be avoided by using non-ionic surfactants, which can be added to the buffer at higher concentrations. Voltages can also be high.

We also investigated non-ionic surfactant Brij 35 [36]. One of the consequences of the neutrality of Brij 35 is that the droplet formed has no electrophoretic mobility of its own and migrates with the EOF. Figure 1C shows the separation when this non-ionic surfactant is used. In comparison with cholate, we found that the resolution improved and eight peaks were obtained, although cloxacillin and nafcillin overlapped. The migration times were also much lower than those obtained with SDS, since the latest peak migrated at approximately 10 min. As we can see in Figure 1C, the elution order was very different from that of the anionic surfactants. This may be because Brij 35 is a non-ionic surfactant, so there was no repulsion between the ionic charges of the solutes and the negative charges of the surface of the droplet, as there was with SDS.



**Figure 1.** Electropherograms obtained from a standard mixture of penicillins with different microemulsion systems. Separation conditions: 0.8% *n*-Octane, 6.6% 1-butanol, 89.3% 10 mM borate buffer and A) 3.3% SDS; B) 3.3% sodium cholate; C) 3.3% Brij 35; D) 1.65% SDS-1.65% Brij 35 as surfactant; fused-silica capillary (36.5 cm effective length) thermostated at 25 °C; hydrodynamic injection (50 mbar, 5 s); UV detection at 210 nm; voltage 10 KV. The analytes in a concentration of 10 mg·L<sup>-1</sup> are listed in order of increasing migration time: (1) amoxicillin; (2) ampicillin; (3) penicillin G; (4) oxacillin; (5) penicillin V; (6) cloxacillin; (7) nafcillin and (8) dicloxacillin.

Finally, we tested a mixture of SDS-Brij 35 [23, 27, 37]. Changing the surfactant of the microemulsion from SDS (Figure 1A) to the mixture (1.65% SDS: 1.65% Brij 35; Figure 1D) considerably reduced the

separation window and shortened the analysis time (from 24 to 12 min), but seven of the eight compounds co-eluted. This was probably because the droplets formed in this case contained both a non-ionic and an ionic

surfactant and the solute partition in the droplet was affected by the partition behavior with the two surfactants individually.

Results were best when SDS or Brij 35 was used individually. So further analyses were carried out with these surfactants.

### 3.5 Effect of oil type

*n*-Octane and *n*-heptane are the most commonly used oils in MEEKC. However, they lead to microemulsions with a high surface tension, which means that if the microemulsion is to be stabilized, the level of the surfactant must be high. When the microemulsion consists of *n*-octane (or *n*-heptane), 1-butanol, SDS and borate, separations are not fast because the concentration of SDS required to form droplets is high. When the ratio of surfactant increases, the EOF decreases which slows down the migration of the droplets and compounds to the detector.

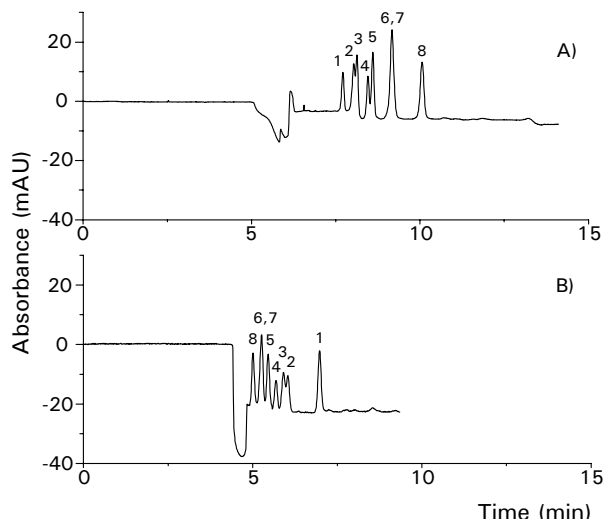
Oils with a lower surface tension such as ethyl acetate and dibutyl tartrate have been used in MEEKC [25] so the microemulsion can be produced with less surfactant, which reduces the analysis time. In this way, we studied the effect of changing the inner organic phase in the microemulsion droplets from *n*-octane (or *n*-heptane) to ethyl acetate or dibutyl tartrate with two types of surfactants, SDS and Brij 35. The microemulsion solutions studied consisted of 0.5% lower surface tension oil, 1.2% 1-

butanol, 0.6% SDS (or 0.6% Brij 35) and 97.7% 10 mM borate buffer.

Our results agree with the literature [32] and the electropherograms obtained using *n*-octane and *n*-heptane (data not shown) were almost identical. In the same way, when we compared the lower surface tension oils (ethyl acetate and dibutyl tartrate), we noticed no change in either selectivity or analysis time. So the discussion focused on the comparison between *n*-octane and ethyl acetate.

As expected [32], the analysis time decreased when ethyl acetate was used instead of *n*-octane. When ethyl acetate and 0.6% SDS were used, the resolution was worse than with octane, so none of the compounds separated completely. However, when we increased the SDS concentration from 0.6 to 1.2% (Figure 2A) to enhance separation, the resolution improved but the analysis time increased slightly. Seven peaks were obtained because cloxacillin and nafcillin co-eluted and the separations between the ampicillin-penicillin G and oxacillin-penicillin V pairs were not satisfactory because the peaks overlapped.

When Brij 35 was used as surfactant, in the case of ethyl acetate, 2% had to be added because at lower concentrations, the analytes could not be separated. Clearly, the resolution of the analytes using *n*-octane (see Figure 1C) is higher than when ethyl acetate is used (see Figure 2B) but the analysis time dropped from



**Figure 2.** Electropherograms of a standard mixture of penicillins. Separation conditions: A) 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 1.2% SDS; B) 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35; in 10 mM borate buffer. Other conditions as in Figure 1.

around 10 to 7 min.

When Brij 35 was used as surfactant, in the case of ethyl acetate, 2% had to be added because at lower concentrations, the analytes could not be separated. Clearly, the resolution of the analytes using *n*-octane (see Figure 1C) is higher than when ethyl acetate is used (see Figure 2B) but the analysis time dropped from around 10 to 7 min.

### 3.6 Effect of buffer type and concentration

The choice of buffer is extremely important in MEEKC separation. The buffer can also be used to directly affect the selectivity of a MEEKC separation. Generally, MEEKC has been performed with low-ionic

strength (5-10 mM) borate or phosphate buffers [33]. These generate relatively low currents and a reasonably fast EOF. Borate was therefore chosen as the buffer to develop the method under study. Borate has so far provided fairly good results but the analytes have not been totally separated. To improve both separation and resolution, we studied increasing the amount of borate in the microemulsion mixture. We tested 10 and 20 mM borate buffer with ethyl acetate as the oil phase and Brij 35 as the surfactant. Our results were more or less the same because the resolution of the peaks was almost identical. We therefore kept 10 mM borate buffer for further analysis.

As we have already stated, small concentrations of borate or phosphate

buffers (5-10 mM) have been widely used in microemulsion systems. However, the literature reports that zwitterionic buffers such as Tris at a concentration of 100 mM are especially useful because they generate minimum currents and create a strong EOF in which the droplets are swept towards the detector [25]. So, to increase the separation voltage and reduce analysis time, we tested Tris.

First we tested a 100 mM zwitterionic buffer, Tris, as microemulsion buffer, keeping the oil phase (0.5% ethyl acetate), the co-surfactant (1.2% 1-butanol) and the surfactant (SDS 0.6%) constant. The resolution, however, did not improve. Using the same system (Tris and SDS), we tried increasing the amount of SDS to 2% while keeping the Tris concentration constant at 100 mM. The separation clearly improved because eight peaks were observed (though six of them overlapped in pairs and the peaks were fairly asymmetrical).

Then we studied the effect of the Tris buffer with the Brij 35 system. With microemulsion systems and Brij 35 values of less than 2%, no separation was achieved. We found that peaks were fairly asymmetrical and only seven peaks were obtained. The migration times were very similar to those of the borate system (just over 6 min).

We also tried increasing the amount of buffer, testing 130 mM Tris with 2% Brij 35. We took into account the fact that higher buffer concentrations suppress the EOF and generate high

currents that may limit the level of voltage that can be applied, but in these cases, the currents obtained were too low and the peak separation did not improve.

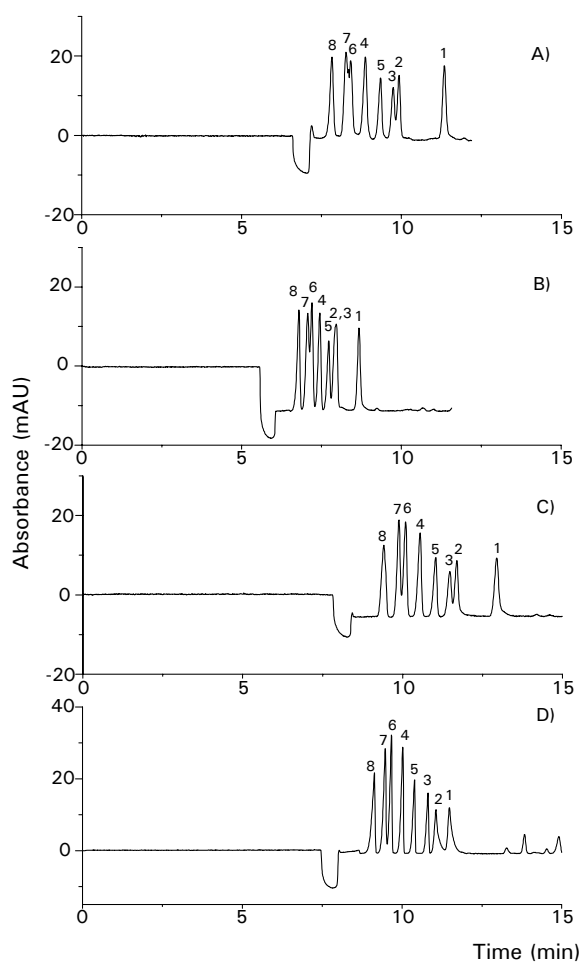
### 3.7 Effect of adding organic solvents

As well as modifications to the nature and/or concentration of the co-surfactant, a more polar and water-miscible organic solvent can be added to the aqueous phase to influence its physical properties and improve the resolution [28]. These modifiers are often also described as "second co-surfactants". Using an organic solvent makes the analytes more soluble in the aqueous phase and affects electrophoretic parameters such as EOF and the electrophoretic mobilities of charged analytes.

In our study, methanol (Figure 3A), acetonitrile (Figure 3B), isopropanol (Figure 3C) and 2-butanol (Figure 3D) were individually added to the microemulsion solution so that the effect of organic modifiers could be studied. The microemulsion solution consisting of ethyl acetate, 1-butanol, 2% Brij 35, and borate 10 mM was chosen as the optimum background electrolyte because the separation between the peaks was good and the current obtained in the analysis procedure was not as low as with Tris. The amount of organic solvent added was 10%. Figure 3 shows the electropherograms obtained when these four organic modifiers were used and Figure 2B shows the electropherogram obtained with no

organic modifier. Our results indicate that the addition of these organic solvents increased the migration time, probably because they affect the electrolyte viscosity and slow down the EOF [22, 38]. They also change the selectivity of the analytes. The separation did not improve when acetonitrile was used but with methanol, isopropanol and 2-butanol

peak resolution improved. When methanol was used, all the peaks were observed, although four of them (nafcillin-cloxacillin and penicillin G-ampicillin) overlapped. However, when isopropanol and 2-butanol were used, the degree of overlapping was lower. We should point out that when the carbon number in the organic solvent increased, the resolution



**Figure 3.** Electroferograms of a standard mixture of penicillins. Separation conditions: 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35 in 10 mM borate buffer and A) 10% methanol; B) 10% acetonitrile; C) 10% isopropanol and D) 10% 2-butanol. Other conditions as in Figure 1.

increased and the separation improved. The results were therefore best when 2-butanol was used as organic solvent.

In a previous study, a MEKC method for separating the same penicillin antibiotics was developed [19]. The method consisted of a 20 mM tetraborate sodium buffer and 60 mM SDS at a voltage of 15 kV at pH 8. Both this method and MEEKC present similar peak resolutions. As far as analysis time is concerned, separation by MEKC takes 17 min while separation by MEEKC takes less than 12 min but the MEEKC system requires a longer and more complex buffer preparation.

### 3.8 Method calibration

The optimum microemulsion solution obtained consisted of 0.5% ethyl

acetate, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35, 10% 2-butanol and borate 10 mM. Once the method had been established, the calibration step was carried out. The linearity, range, precision and detection limit of the method were investigated essentially following International Conference of Harmonization (ICH) guidelines. The calibration plots were found to be linear, based on external standard calibration, in the 2.5-20 mg·L<sup>-1</sup> range for penicillin G and ampicillin and in the 1-20 mg·L<sup>-1</sup> range for the other compounds. In order to draw the slope, five standard solutions were prepared in this range and three points were made at each level. The correlation coefficients (R<sup>2</sup>) were satisfactory and the detection limits, based on a signal-to-noise ratio of 3, ranged from 0.5 to 1 mg·L<sup>-1</sup> (see Table 2).

**Table 2.** Linearity, calibration curves, repeatability and intermediate precision (RSD) and detection limits (LODs) of the method for standard solutions

Compound	Linearity (mg·L <sup>-1</sup> )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n = 4)	%RSD (b) (n = 4)	LODs (mg·L <sup>-1</sup> )
Amoxicillin	1-20	y = 0.0456x + 0.0078	0.99	4.4	8.5	0.5
Ampicillin	2.5-20	y = 0.1542x + 1.2226	1.00	8.0	8.3	1.0
Penicillin G	2.5-20	y = 0.0718x + 1.5025	0.99	9.0	10.5	1.0
Oxacillin	1-20	y = 0.2277x + 0.0811	1.00	4.9	5.1	0.5
Penicillin V	1-20	y = 0.1622x + 1.2566	0.99	5.6	8.6	0.5
Cloxacillin	1-20	y = 0.2748x + 0.8087	1.00	3.6	5.0	0.5
Nafcillin	1-20	y = 0.2840x - 0.5543	1.00	3.5	3.9	0.5
Dicloxacin	1-20	y = 0.3165x - 3.1520	0.99	3.0	3.4	0.5

Other CE conditions as in Figure 3D

a) RSD in terms of intra-day precision at 5 mg·L<sup>-1</sup>

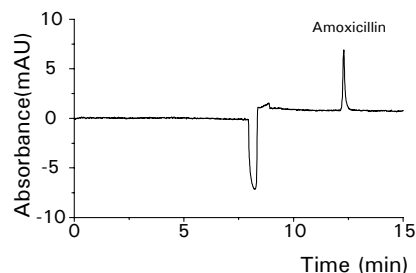
b) RSD in terms of inter-day precision at 5 mg·L<sup>-1</sup>

Multiple inter-day and intra-day injections of several solutions of all penicillins were performed to verify the intermediate precision and repeatability of the peak area. The intermediate precision was investigated by injecting a solution containing the eight penicillins at a concentration of  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  on four different days. The repeatability was calculated by analyzing the same concentration standard four times in the same day. The relative standard deviation, RSD, was calculated in terms of the peak area. The RSDs obtained at the level of  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  for all analytes, are summarized in Table 2.

### 3.9 Application to commercial drugs

The potential of this method for analyzing a real sample was demonstrated by determining amoxicillin in pharmaceutical samples. A commercial sample of this penicillin was assayed by the proposed method (see Figure 4). We identified the peak observed as amoxicillin by comparing the corresponding migration time with that obtained in the standard samples (Figure 3D). We assessed the accuracy of the method with the real sample since the composition was known, and a sample solution of  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  was analyzed. Amoxicillin was quantified at 515 mg, which is very close to the concentration of amoxicillin reported in the commercial drug (500 mg). So the recovery, defined as the percentage ration between the determined and theoretical amounts of amoxicillin, was 103%. We also calculated the

confidence interval of the method and the result was  $515 \pm 20 \text{ mg}$ . These results demonstrate that the MEEKC method is suitable for determining these kinds of penicillin compounds in commercial drugs.



**Figure 4.** Electropherogram of the commercial pharmaceutical sample of amoxicillin at a concentration of  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . CE conditions as in Figure 1.

### 3.10 Enhancing sensitivity through sample stacking

As previously stated, CE is not a very sensitive technique and some applications (e.g. analysis of penicillin residues in biological fluids, animal tissues or water samples) need highly sensitive method if these compounds are to be determined at trace levels. To enhance the detection limits, several on-column preconcentration techniques have been developed [39]. REPSM is an on-column sample preconcentration technique in which the sample, whose conductivity is lower than in the background electrolyte, is introduced into the capillary hydrodynamically and stacked by applying reverse polarity. When reverse polarity is applied after the capillary has been completely filled with the sample dissolved in distilled water, the reduced EOF presses the

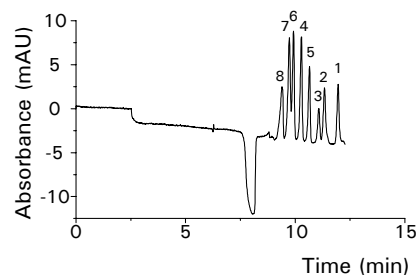


aqueous plug out of the capillary and into the inlet vial. The analytes in the sample plug of low conductivity get stacked at the concentration boundary, which moves backwards to the inlet. As the capillary is filled with the run buffer of high conductivity from the outlet vial, the current increases. When the current reached 95-97% of its initial value, the polarity is changed to the separation voltage.

In the present study, 50 mbar was applied to inject the sample in REPSM. We found that the time needed to completely fill the capillary with the sample was 270 s. This was accepted as the optimum time for performing the stacking step because it enabled the maximum amount of sample to be introduced into the capillary without causing peak broadening. The voltage chosen to reverse the polarity (-5 kV) was lower than the one for separation. The current dropped to 95% of the maximum current obtained with the capillary filled with the background buffer and the voltage was then switched on in order to separate the compounds. Figure 5 shows an electropherogram of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  obtained by REPSM.

Following ICH guidelines (linearity, range, precision and detection limit), we investigated the method. Under the selected conditions, the calibration graphs were obtained by plotting the peak area against the concentration of the analyte. The data in Table 3 show that responses were linear in the sample concentration range of 25-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  except for amoxicillin, penicillin G and diclo-

xacillin, whose range was 50-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . As in part 3.8, the linearity of the response was investigated with five standards covering the linear range of the eight penicillins and three repetitions were made at each level. On the basis of a signal-to-noise ratio of 3 ( $S/N=3$ ), the LODs for the eight penicillins with the REPSM method were determined from a range of 10-25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and enhancements in the concentration sensitivity were between 26 and 41-fold (see Table 3). The intermediate precision and repeatability were calculated in the same way as in part 3.8 but a concentration level of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The values are equal to or lower than 10.6% which means that the precision of the method is good.



**Figure 5.** Electropherogram of a standard mixture of penicillins in a concentration of 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Separation conditions as in Figure 3D. Other conditions as in Figure 1. Sample injection (REPSM): 50 mbar for 270 s, -5 kV until 95% of original current reached.

REPSM has been previously used as a stacking technique in MEKC for analyzing the same penicillin compounds [19]. The REPSM preconcentration systems performed in MEKC and MEEKC modes both have a similar range of linearity with similar

% RSD in terms of inter-day precision. Moreover, although the preconcentration folds obtained were slightly

higher in the MEEKC mode, the detection limits were in the same range.

**Table 3.** Linearity, calibration curves, repeatability and intermediate precision (RSD) and detection limits (LODs) of the method for standard solutions

Compound	Linearity ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n=4)	%RSD (b) (n=4)	Prec. fold	LODs (REPSM) ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Amoxicillin	50-1000	$y=0.0989x - 1.61124$	0.99	4.8	10.3	34	25
Ampicillin	25-1000	$y=0.1052x - 0.6882$	0.98	6.1	7.1	41	10
Penicillin G	50-1000	$y=0.561x + 0.0997$	0.97	3.3	7.5	38	25
Oxacillin	25-1000	$y=0.1504x + 0.2472$	0.98	2.5	5.2	37	10
Penicillin V	25-1000	$y=0.1068x + 0.2698$	0.98	2.6	4.4	38	10
Cloxacillin	25-1000	$y=0.1523x + 0.5487$	0.98	2.0	6.0	39	10
Nafcillin	25-1000	$y=0.1763x + 0.3085$	0.99	3.6	6.5	40	10
Dicloxacillin	50-1000	$y=0.1045x + 0.3665$	0.99	7.7	10.6	26	25

Other CE conditions as in Figure 5

a) RSD in terms of intra-day precision at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   
b) RSD in terms of inter-day precision at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

#### 4 CONCLUSIONS

Eight penicillins were successfully separated by MEEKC using a buffer solution consisting of 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 2% Brij 35, 86.3% borate 10 mM and 10% 2-butanol at pH 10 and applying a voltage of 10 kV. The factors that most influenced the separation were the surfactant, the oil phase and the addition of organic solvents. This method allowed us to analyze a penicillin compound (amoxicillin) in a commercial pharmaceutical drug. In order to develop a more sensitive method for analyzing these compounds, we used REPSM or an on-column preconcentration of highly diluted samples. In this way, we increased sensitivity 26-40-fold and

achieved LODs of between 10 and  $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 5 REFERENCES

- [1] Z. Zhu, L. Zhang, A. Marimuthu, Z. Yang, *Electrophoresis* 24 (2003) 3089.
- [2] C.C. Hong, F. Kondo, *J. Food Protection* 60 (1997) 1006.
- [3] Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990.
- [4] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, *J. Chromatogr. A* 910 (2000) 69.
- [5] S. Horimoto, T. Mayumi, K. Aoe, N. Nishimura, T. Sato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1093.
- [6] C. Shan-Ying, H. Chang-Qin, X. Ming-Zhe, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 589.

- [7] L. Valvo, E. Ciranni, R. Alimenti, S. Alimonti, R. Draisci, L. Giannetti, L. Lucentini, J. Chromatogr. A 797 (1998) 311.
- [8] G. Hoizey, D. Lamiable, C. Frances, T. Trenque, M. Kaltenbach, J. Denis, H. Millart, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 661.
- [9] A. Aghazadeh, G. Kazemifard, J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 325.
- [10] G. Boatto, R. Cerri, A. Pau, M. Palomba, G. Pintore, M.G. Denti, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 733.
- [11] E.F. Hilder, C.W. Klampfl, W. Buchberger, P.R. Haddad, Electrophoresis 23 (2002) 414.
- [12] Y.M. Li, A.V. Schepdel, Y. Zhu, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A 812 (1998) 227.
- [13] Z. Yongxin, J. Dalle, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A 792 (1997) 83.
- [14] Y. Zhu, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A 781 (1997) 417.
- [15] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, J. Chromatogr. A 768 (1997) 97.
- [16] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, J. Chromatogr. B 800 (2004) 203.
- [17] G. Pajchel, K. Michalska, S. Tyski, J. Chromatogr. A 1032 (2004) 265.
- [18] H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, J. Chromatogr. 477 (1989) 259.
- [19] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Electrophoresis 26 (2005) 954.
- [20] Z. Yongxin, C. Hoogmartens, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 22 (1999) 1403.
- [21] X. Cahours, S. Cherkaoui, G. Rozing, J.L. Veuthey, Electrophoresis 23 (2002) 2320.
- [22] K.D. Altria, B.J. Clark, P.E. Mahuzier, Chromatographia 52 (2000) 758.
- [23] K.D. Altria, P.E. Mahuzier, B.J. Clark, Electrophoresis 24 (2003) 315.
- [24] S.H. Hansen, C. Gabel-Jensen, D.T.M. El-Sherbiny, S. Pedersen-Bjergaard, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 614.
- [25] P.E. Mahuzier, B.J. Clark, S.M. Bryant, K.D. Altria, Electrophoresis 22 (2001) 3819.
- [26] V. Harang, S.P. Jacobsson, D. Westerlund, Electrophoresis 25 (2004) 1792.
- [27] S. Pedersen-Bjergaard, C. Gabel Jensen, S.H. Hansen, J. Chromatogr. A 897 (2000) 375.
- [28] C.W. Klampfl, Electrophoresis 24 (2003) 1537.
- [29] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 844 (1999) 371.
- [30] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, Electrophoresis 21 (2000) 2768.
- [31] J.B. Kim, S. Terabe, J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2003) 1625.
- [32] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Electrophoresis 26 (2005) 970.
- [33] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 892 (2000) 171.
- [34] S.S. Huang, J.R. Wu, M.L. Chen, J. Chromatogr. 564 (1991) 195.

- [35] M. Aguilar, A. Farran, C. Serra, M.J. Sepaniak, K.W. Whitaker, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 201.
- [36] R. Schöftner, W. Buchberger, J. Sep. Sci. 26 (2003) 1247.
- [37] C.W. Klampfl, T. Leitner, E.F. Hilder, *Electrophoresis* 23 (2002) 2424.
- [38] A. Marsh, B.J. Clark, M.F. Broderick, J. Power, S. Donegan, K.D. Altria, *Electrophoresis* 25 (2004) 3970.
- [39] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis* 24 (2003) 2779.

***2.2.2 Strategies for analyzing cephalosporins by  
microemulsion electrokinetic chromatography***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## STRATEGIES FOR ANALYZING CEPHALOSPORINS BY MICROEMULSION ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Patricia Puig, Francesc Borrull, Marta Calull, Carme Aguilar

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

We studied microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) for the analysis of cefazolin, cefoperazone and cephalexin. We compared the separation of the cephalosporins obtained by MEEKC at a high pH and at a low pH. Good separations of the compounds were achieved within 9 min by both methods. To reduce the analysis time, we used the "short-end" injection technique. We also present two on-line preconcentrations of the analytes by sample stacking, reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) (at high-pH) and stacking with reverse migrating pseudostationary phase (SRMP) (at low-pH). We also report parameters for validation such as linearity and limit of detection. Our results show that the developed methods are suitable for analyzing these three cephalosporins.

**Keywords:** Capillary electrophoresis; Microemulsion electrokinetic chromatography; Sample stacking; Antibiotics; Cephalosporins

---

### 1 INTRODUCTION

Cephalosporins have assumed a prominent role in modern antimicrobial therapy due to their enhanced intrinsic microbiological activities and favorable safety profile [1]. Cephalosporins, which are  $\beta$ -lactam antibiotics, are semisynthetic antibiotics with a broad spectrum from Gram-negative bacteria [2].

Cephalosporins can readily be detected by microbiological methods and receptor tests. However, these methods generally lack selectivity and only produce qualitative or semi-quantitative results [3]. High-performance liquid chromatography (HPLC) is the most popular technique for determining related substances and for assay of cephalosporins [4,5].

CE is a powerful separative and quantitative technique that often provides higher resolving power, shorter analysis times and lower operational costs than HPLC [6]. In the last few years, some studies on the determination of cephalosporins by means of capillary zone electrophoresis (CZE) [2,4,7] and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [6-8] have been published. Another electrophoretic technique, microemulsion electrokinetic capillary chromatography (MEEKC), has recently been used to analyze cephalosporins [9-11].

MEEKC is a relatively new variant of CE that combines chromatographic partitioning between two phases and electrokinetic migration. Typically, the separation media are microemulsions consisting of droplets of immiscible organic solvents (also called oil phase) in aqueous buffers. The presence of a surfactant and a co-surfactant reduce the surface tension at the liquid interface, thus stabilizing the droplets by coating their outer part.

The short-end injection technique is an alternative to normal injection mode that reduces the analysis time. With this procedure, the separation length is decreased by injecting the sample at the capillary end closest to the detection window (outlet). This reduces the migration distance and allows for shorter migration times [12].

The main disadvantage of MEEKC, as it happens with other modes of CE, is the low concentration sensitivity of the UV detector due to the cell's

short optical pathlength. Some sample concentration steps are therefore needed to decrease the technique's detection limits. The potential of two on-column preconcentration techniques REPSM [13,14] and SRMP [15] have been studied. Both of these stacking techniques are based on the difference in conductivity between the sample and the background electrolyte.

The main aim of this study was to develop various strategies for analyzing three cephalosporins by MEEKC. In this paper we report the optimization of the experimental conditions. We studied the composition of the microemulsion (high-pH and low-pH MEEKC methods) and the possibility of applying short-end injection. We also used REPSM and SRMP to improve the sensitivity of the methods by stacking.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Instrumentation and conditions

All separations were performed on a Hewlett Packard <sup>3D</sup>CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. The detection wavelength was 254 nm. An HP ChemStation (Agilent) version A:04.01 was used for instrument control, data acquisition and data analysis.

The uncoated fused-silica capillary (Supelco, Bellefonte, USA) was 45 cm long x 75 μm ID with an effective length of 36.5 cm (normal injection) or 8.5 cm (reverse



injection), respectively. Normal sample injection was achieved using the pressure mode for 5 s at 50 mbar in both high-pH and low-pH methods. The voltage for the high-pH method was 8 kV and for the low-pH method it was -20 kV.

New capillaries were used for each set of experiments. These were pre-treated with 1 M NaOH at 60 °C for 5 min, water at 25 °C for 10 min and BGE at 25 °C for 30 min. At the start of the day, the capillary was conditioned with 0.1 M NaOH and water for 8 min each and then dry stored.

## 2.2 Chemicals and reagents

Cefazolin sodium salt, cefoperazone sodium salt, cephalexin hydrate and sodium dodecyl sulfate (SDS) were obtained from Sigma (Saint Louis, USA). Ethyl acetate and 1-butanol were provided by Merck (Darmstadt, Germany), sodium tetraborate by Fluka (Buch, Switzerland) and sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) by Probus (Badalona, Spain). Sodium hydroxyde and hydrochloride acid 35% were purchased from Prolabo (Bois, France) and Tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris) buffer and dibutyl tartrate from Aldrich (Steinheim, Germany). The water used to prepare the solutions and running buffers was purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA).

## 2.3 Microemulsion solution and sample preparation

We prepared borate buffer from sodium tetraborate and phosphate

buffer from sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) by weight. Phosphate buffer was adjusted to pH 2 with HCl 35% and, if necessary, the final solution was also adjusted to the same pH. The microemulsions were prepared by weighing together 0.125 g ethyl acetate, 0.3 g 1-butanol and 0.15 g SDS. Then 24.4 ml of buffer was added. Microemulsion solution was added and sonicated for 30 min to obtain a clear solution. Fresh microemulsion solutions were prepared every day to prevent migration time and reproducibility problems that may occur with oil solutions. Moreover, SDS can hydrolyze to form dodecanol in acidic media [16]. Before use, the microemulsion solutions were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  microfilter.

We prepared individual stock standard solutions of  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  by dissolving cephalosporins in Milli-Q water. For the experiments, we used a standard mixture of  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . All working solutions were made by dissolving a volume of the standard mixture in water to obtain the final concentrations.

## 2.4 Short-end injection

A hydrodynamic injection was performed in both high-pH and low-pH methods. As the sample was injected close to the detector, we placed the sample vial in the outlet and the buffer in the inlet. We then applied negative pressure for a specific time. After injecting the sample, we had to reverse the polarity of the electrodes with respect to normal injection in order to separate the analytes. The

sample was thus injected by applying -20 mbar for 1 s with the high-pH method and by applying -50 mbar for 7 s with the low-pH method. The voltage for separating the analytes was then -5 kV and 20 kV for the high-pH and low-pH methods, respectively.

## 2.5 Sample stacking

### *REPSM*

Once the capillary was filled with the microemulsion separation solution, we placed the sample vial in the inlet and injected the sample. The hydrodynamic injection was performed at 50 mbar for 200 s so that the sample filled the capillary. We then changed the sample vial for the BGE vial and a voltage of -4 kV was applied until the current reached 95% of the pre-determined current reported for a capillary filled only with background solution. At this point, we turned the voltage off and applied the separation voltage in order to separate the analytes.

### *SRMP*

First, the capillary was conditioned with the BGE. Then, as with REPSM, we injected a long plug of sample hydrodynamically. We applied a pressure of 50 mbar for 50 s, then replaced the sample vial with the BGE vial and applied the separation voltage. In this case we did not need to switch off the polarity because the matrix was removed at the same polarity as the separation.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

The main aims of this paper were: (i) to investigate the separation of cefoperazone, cefazolin and cephalixin by MEEKC at high-pH and low-pH electrolyte, (ii) to verify the potential of the short-end injection technique. In decreasing analysis times, and (iii) to apply stacking techniques to MEEKC methods in order to decrease the detection limits.

### 3.1 Development of MEEKC methods

#### *Method optimization at high-pH microemulsion*

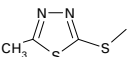
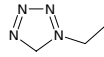
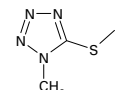
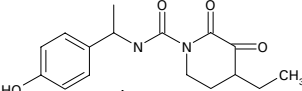
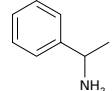
In the separation of cefazolin, cefoperazone and cephalixin, the microemulsion taken as the starting point was the solution formed by 0.81% *n*-octane, 6.61% 1-butanol, 3.31% SDS and 89.27% of aqueous buffer because this microemulsion had been used to separate several pharmaceuticals, including some cephalosporins [9-11]. We studied two buffers at high pH: 10 mM tetraborate buffer at pH 9.4 and 100 mM Tris at pH 10.3. Table 1 shows the structure of the compounds studied and their respective  $pK_a$ . As can be seen, at pH over the second  $pK_a$  of cephalixin (6.8) the three cephalosporins were negative charged. Therefore, when they were not inside the droplet, at this pH the electrophoretic mobility of the cephalosporins was towards the anode at the inlet of the capillary. However, a high pH generates such a

high electroosmotic flow (EOF) in the capillary that it forces the negatively charged analytes and the negatively charged surfactant to the detector despite their electrophoretic mobility to the anode, which is in the opposite direction.

The electropherogram obtained using tetraborate buffer (Figure 1A) showed a good separation of the compounds within 14 min. The analysis was carried out at 10 kV and under these conditions the current was approximately 70  $\mu$ A. This was a relatively high current so, within this microemulsion, it was not possible to increase the voltage in order to decrease the analysis time.

Figure 1B shows the electropherogram obtained when 100 mM of Tris buffer was used. When the same voltage as with the tetraborate buffer (10 kV) was used, the current was slightly lower (60  $\mu$ A) so we tried to increase the voltage in order to shorten the migration time of cefoperazone. Our results showed that when the voltage was increased, the peaks of cefazolin and cephalixin overlapped. When we compared these results with those when tetraborate was used, we found that the selectivity was different because the peak order changed. This may be due to the nature of the buffer: while tetraborate is a negatively charged buffer, Tris is a zwitterionic one.

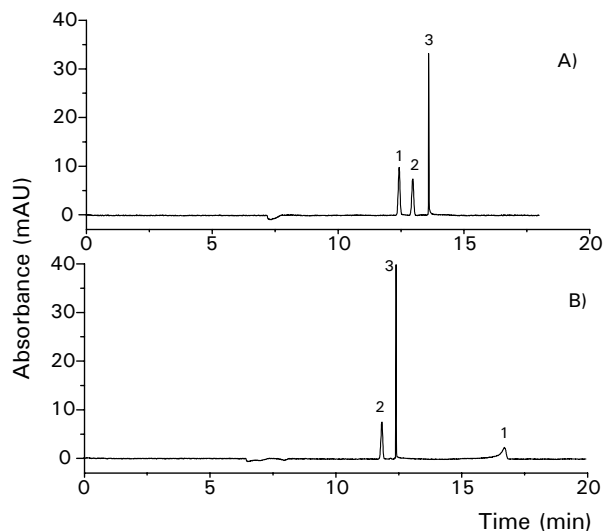
**Table 1.** Structure and  $pK_a$  of the studied compounds

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
Cefazolin	H			2.60	—
Cefoperazone	H			2.62	—
Cephalexin	H	CH <sub>3</sub>		3.12	6.80

Moreover, when we used Tris, the peak corresponding to cefoperazone presented band-broadening, probably due to its longer migration time. Because of this band-broadening, we preferred to use the tetraborate buffer for the cephalosporin separation.

With regard to the oil phase, *n*-octane or *n*-heptane [13,17] are generally used to generate the oil droplet but a range of other water-immiscible liquids have also been used [12,13, 18]. In this paper, we studied the effect on changing the inner organic phase in the microemulsion droplets using *n*-octane, ethyl acetate and dibutyl tartrate. Because of the high surface tension between a very hydrophobic solvent (i.e. *n*-octane) and

water, a high surfactant concentration is needed to allow droplet formation. High surfactant contents lead to high operating currents, which limits the voltage to low levels and thus compromises analysis time [19]. Oils with higher polarity such as dibutyl tartrate and ethyl acetate have a lower surface tension, so microemulsions can be produced with lower surfactant and co-surfactant contents, which means lower analysis times [12]. In the case of *n*-octane, the solution was formed by 0.81% oil, 6.61% 1-butanol, 3.31% SDS and 89.27% of 10 mM sodium tetraborate buffer, and in the cases of ethyl acetate and dibutyl tartrate the solutions were formed by 0.5% oil, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS and



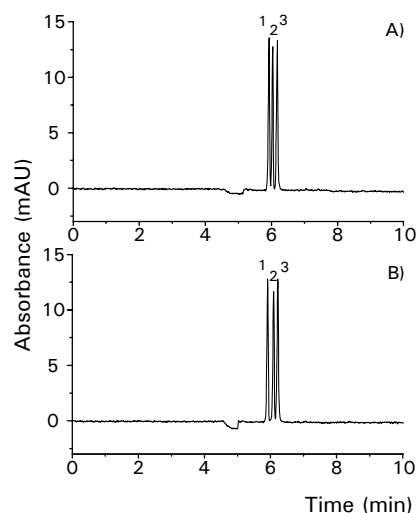
**Figure 1.** Representative electropherograms obtained from a standard mixture of cephalosporins with different microemulsion systems. Separation conditions: MEEKC with 0.8% *n*-octane, 6.6% 1-butanol, 3.3% SDS and 89.3% A) 10 mM borate buffer at pH 9.4; B) 100 mM Tris at pH 10.3; fused-silica capillary (36.5 cm effective length) thermostatted at 25 °C; hydrodynamic injection (50 mbar, 5 s); UV detection at 254 nm, voltage 10 KV. The analytes in a concentration of 25 mg·L<sup>-1</sup> are listed in following the order of increasing migration time: (1) cefoperazone, (2) cefazolin and (3) cephalixin.

97.7% of 10 mM sodium tetraborate buffer.

As reported in the literature [18], the change in the type of water-immiscible organic solvent appears not to have much influence on separation performances. When we used ethyl acetate and dibutyl tartrate (Figure 2A and 2B), the compositions of the microemulsion solutions only differed in the nature of the oil. When we compared these two methods, we found that the compounds migrated in the same way: the order of the peaks did not change (cefoperazone, cefazolin and cephalixin) and the migration times were similar. When we compared these methods with *n*-octane method (Figure 1A), the analysis time was lower (because we had used lower amounts of SDS and 1-butanol than in the other microemulsion solution) but we observed no change in the selectivity of the separation. This was due to changes in the EOF and in the size and surface charge of the droplet. We took into account that, under the current working conditions, the mobility of the EOF towards the detector was higher than the electrophoretic mobilities of the microemulsion droplets and compounds went towards the opposite direction. When we decreased the concentration of SDS and 1-butanol, the EOF increased. This made the droplets and compounds migrate faster to the detector. Moreover, when the ratio went down, the size and surface charge of the droplet decreased and the electrophoretic

mobilities of the droplets towards the anode decreased.

Of the three oil phases studied, the best results were obtained using ethyl acetate and dibutyl tartrate. To validate the method, the following experiments were conducted with ethyl acetate as the oil phase.



**Figure 2.** Electropherograms of a standard mixture of cephalosporins. Separation conditions: A) 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS; B) 0.5% dibutyl tartrate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS; in 10 mM borate buffer. Other conditions as in Figure 1.

#### *Method optimization at low pH microemulsion*

Microemulsion pH is a major factor for electrophoretic separations because it affects both the EOF and the ionization of the solutes. Typically, a pHa of 7-9 is used in MEEKC, which provides and EOF greater in the direction of the detector than the

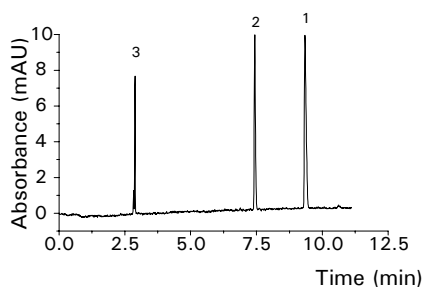
electrophoretic mobility of the negatively charged microemulsion droplets in the opposite direction. Under these circumstances, hydrophobic analytes are more strongly retained than hydrophilic ones. Moreover, the alkaline conditions ensure that most of the ionizable acidic compounds are ionized. The field strengths must be kept reasonably low to avoid joule heating because a high concentration of surfactant is required to stabilize the microemulsion. This prolongs the analysis time caused by a slow electroosmotic flow (EOF) due to the high ionic strength of the separation electrolyte. One of the most promising ways to separate compounds by MEEKC is to use a low pH to strongly reduce the EOF. When the pH of the MEEKC electrolyte solution is below 5, silanol groups of the capillary surface are partly protonated and the EOF is lower than the electrophoretic mobility of the microemulsion droplets. To completely remove the EOF, a phosphate buffer at pH 2 was selected as medium for the microemulsion. At this pH, the electroosmotic flow is strongly suppressed, so a negative voltage is needed to attract the negatively charged microemulsion droplets toward the detector. Under the reversed polarity, the hydrophobic analytes have lower migration times than the hydrophilic analytes because the microemulsion droplets reach the detector first [20].

Since the three cephalosporins studied have a strongly acidic group (carboxylic,  $pK_a > 2$ ) in their molecule and cephalexin also has a basic group

(amino,  $pK_a \approx 6.8$ ) [21], changes in the pH of the BGE influence these compounds' degree of dissociation. This is important because, depending on their charge, the analytes modify their partitioning between the aqueous solution and the microemulsion droplets. As we worked with BGE at pH 2, cefoperazone and cefazolin were not charged and cephalexin was positively charged (see Table 1). In the presence of SDS, the non-charge compounds (cefazolin and cefoperazone) had a certain tendency to enter the droplet, and cationic cephalexin was probably retained in the droplet system because it formed ion-pairs with the anionic SDS molecules.

Figure 3 shows the separation of the three cephalosporins with the low-pH MEEKC method. The microemulsion solution comprised 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS and 97.7% 5 mM phosphate at pH 2. The analysis was performed at -20 kV, which produced 80  $\mu$ A. The low-pH MEEKC method had longer migration times (9.4 min) than the high-pH MEEKC method (6.2 min) (see Figure 2A) and the migration of the compounds changed. As expected, cephalexin migrated first because of the high interaction with the negative charge of the droplet. Then the cefazolin peak appeared, and finally cefoperazone. Unlike the high-pH MEEKC separation performed before, the most retained compounds eluted first. The fact that the migration times of cefazolin and cefoperazone were longer means that they

were not highly retained in the microemulsion droplets.



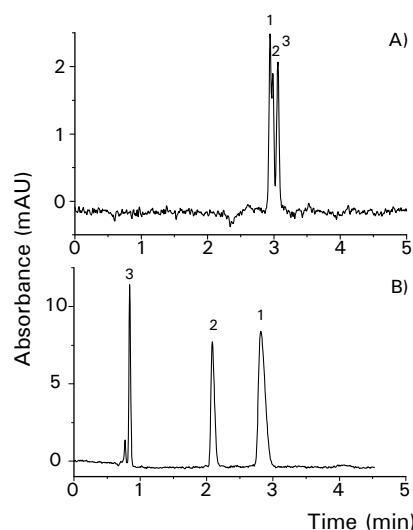
**Figure 3.** Electropherogram of a standard mixture of cephalosporins. Separation conditions: 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS in 5 mM phosphate buffer at pH 2, voltage -20 KV. Other conditions as in Figure 1.

### 3.2 Short-end injection

One way to reduce the analysis time is to shorten the migration distance that analytes have to cover. To do this, we injected the cephalosporins at the end of the capillary, close to the detection window and in this way, the effective capillary length was reduced to 8.5 cm. This portion of the capillary was used for the separation by reversing the polarity so, for the analysis, we used a negative voltage with high-pH microemulsion and a positive voltage with low-pH microemulsion.

With the high-pH method we tried to perform "short-end injection". We optimized several parameters: the injection pressure (20, 10 and 5 mbar), the injection time (1 and 2 s) and the separation voltage (-2.5, -5 and -10 kV). We obtained the best

results by applying -20 mbar for 1 s to inject the samples and a voltage of -5 kV to run the analysis (Figure 4A). Even with the shorter analysis time (3 min compared with the 6 min in the normal mode), the separation was not complete because two of the peaks overlapped.



**Figure 4.** Electropherogram of a standard mixture of cephalosporins with short-end injection. Separation conditions: A) 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS in 10 mM borate buffer at pH 9.24, voltage: -5kV, injection: -20 mbar for 1 s; B) 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS in 5 mM phosphate buffer at pH w, voltage: 20 kV, injection: -50 mbar for 7 s. Other conditions as in Figure 1.

With the low-pH method, we studied the injection with a range of pressures from 20 to 50 mbar for 2 s and a range of time from 2-10 s at 50 mbar. The best conditions were when we injected at 50 mbar for 7 s and applied a separation voltage of 20 kV. The three compounds were separated

within 3 min with good resolution (Figure 4B). When we compared the normal and reverse injections, we found that, due to the short migration distance taken to reach the detector, all the peaks suffered a slight band broadening.

### **3.3 Enhancing sensitivity by stacking**

One of our aims in this paper was to compare the performances of on-column preconcentration strategies for the separation of three cephalosporins. We studied two preconcentration strategies: the reverse electrode polarity stacking mode (REPSM) [13, 22] and stacking with reverse migrating pseudostationary phase (SRMP) [15]. The first stacking technique was applied to the high-pH MEEKC method and the second technique was applied to the low-pH MEEKC method.

#### *Reverse electrode polarity stacking mode (REPSM)*

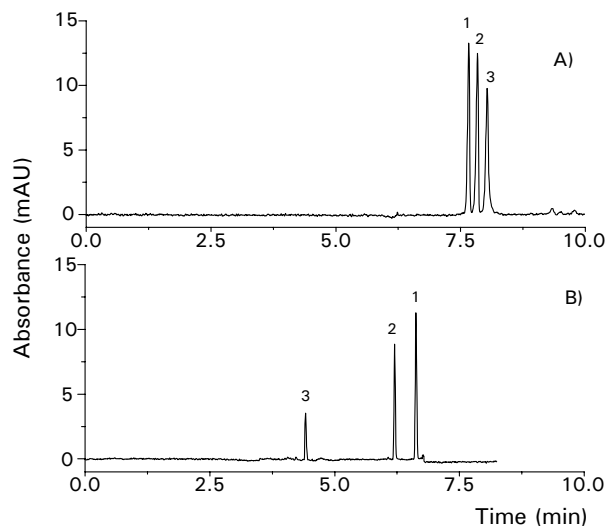
With REPSM, we conditioned the capillary with the high-conductivity BGE containing microemulsion droplets. Samples, that are injected as long plugs into the capillary have to be prepared in low conductivity matrices (water at pH 7), so the field is higher in the sample zone than in the separation zone. As the electrophoretic velocities are much greater in the sample than in the electrolyte, samples will stack as concentrated zones in the concentration boundary between the

sample and separation zones. To stack the analytes and remove the sample matrix, a voltage with negative polarity is applied. When the electrophoretic current reached approximately 95% of its original value, the polarity quickly returned to positive, thus leading to the reversal of EOF.

Several studies have shown that the effect of sample concentration depends strongly on the stacking period and voltage when polarity is reversed [23,24]. Switching back to normal polarity is very important because any back-flush during the "stacking period" can lead to a loss of analytes.

Normally, when using REPSM there is a slight increase in the migration times and a band-broadening of the peaks due to the stacking period. This can lead to an overlapping in the peaks that migrated very closely. To stop the peaks from overlapping, since they were very close, we dropped the separation voltage from 10 to 8 kV. The analysis time increased by 2 min but the peaks did not lose their resolution. To increase the sample introduced to the capillary as much as possible, we applied a pressure of 50 mbar for 200 s. After totally filling the capillary, we reversed the voltage using a value of -4 kV. Higher voltages produced such a dramatic decrease in the current that it was difficult to control the moment when the voltage had to be switched back. Figure 5A shows the electropherogram at 8 kV.





**Figure 5.** Electropherogram of a standard mixture of cephalosporins. Separation conditions: 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol, 0.6% SDS in A) 10 mM borate buffer at pH 9.24, voltage: 8 kV. REPSM: 50 mbar for 200 s, -4 kV until reach 95% of original current; B) 5 mM phosphate buffer at pH 2, voltage -20 kV. SRPM: 50 mbar for 50 s. Analyte concentration of 1 mg·L<sup>-1</sup>. Other conditions as in Figure 1.

#### *Stacking with reverse migrating pseudostationary phase (SRMP)*

The method of stacking with reverse migrating pseudostationary phase we propose in this paper is a variation of the original SRMP described by Quirino *et al.*[15]. SRMP uses an acidic microemulsion BGE to reduce the EOF. Under these conditions the electrophoretic velocity of EOF is lower than the electrophoretic velocity of the droplets. As with REPSM, the sample was prepared in a low-conductivity matrix that contained no MEEKC droplets. First we used water at pH 7 as a sample matrix but found a high lack of reproducibility in the migration times. This problem was solved by using water at pH 2 to dissolve the

analytes. At this pH, the analytes in the sample and in the BGE were equally charged, cephalexin was positively charged and cefoperazone and cefazolin were neutral compounds.

We first injected the sample at longer times than for direct injection and then applied the separation voltage at a negative polarity at the injection end. Since the negative polarity was applied at the inlet, the sample matrix was slowly pushed out of the capillary by the weak EOF. Unlike REPSM, only negative polarity was needed to focus and separate the analytes without the polarity switching step.

To introduce as much sample as possible into the capillary, we applied 50 mbar at four different times: 50, 75, 100, and 175 s. The capillary was completely full at 175 s but under these conditions we observed only one peak due to the co-elution of the analytes. Finally, the best conditions were found to be an injection time of 50 s at 50 mbar (Figure 5B) because enabled us to inject the maximum sample and obtain a good separation of the peaks.

With REPSM the migration times of the compounds increased slightly. As expected with SRMP, they varied in several ways. The migration time of cephalixin was longer because of its electrophoretic mobility in the sample. This means that, as cephalixin in the sample was positive charged, when we applied the negative voltage to stack the sample, cephalixin migrated to the cathode in the inlet of the capillary until it reached the droplets. When the matrix was replaced by the background electrolyte, cephalixin paired with the droplets of the microemulsion and migrated towards the anode. This increased the analysis time of cephalixin. On the other hand, cefazolin and cefoperazone migrated faster than with direct injection. This could be because, as the capillary had a zone without a buffer (the sample zone), the ionic strength was lower than with the direct injection method, so the electrophoretic mobility of the droplets was increased and the droplets migrated faster.

### 3.4 Validation of the methods

Once the optimum conditions were established, we determined the quality parameters of the five methods according to the ICH guidelines. Tables 2 and 3 show parameters such as the range of linearity, the calibration curves and the precision values. The representative electropherograms of standards are shown in Figure 2A, 3, 4B and 5.

Linearity was evaluated from external standard calibration. To draw the slope, five standard solutions were prepared in this range and three points were made at each level. The calibration plots were found to be linear in the 0.5-2.5 to 20 mg·L<sup>-1</sup> range for all the compounds for the high-pH, low-pH and short-end injection methods. For the stacking methods, the linearity ranged from 40-50 to 1000 µg·L<sup>-1</sup> for all the compounds except cephalixin in SRMP, which ranged from 75 to 1000 µg·L<sup>-1</sup>. The correlation coefficients (R<sup>2</sup>) between the peak area and the concentration were all above 0.994.

We also evaluated the limits of detection based on a signal-to-noise ratio of 3. These ranged from 0.25 to 1 mg·L<sup>-1</sup> in the methods without a stacking step. For REPSM and SRMP, the LODs were in the 30-40 µg·L<sup>-1</sup> range for cefoperazone and cefazolin and in the 40-50 µg·L<sup>-1</sup> range for cephalixin. When we compared sensitivity in REPSM and SRMP, we

**Table 2.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD,) and detection limits (LODs) of the high-pH and low-pH methods for standard solutions. Other CE conditions as in Figure 2A and 4B.

Compound	Linearity (mg·L <sup>-1</sup> )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n = 5)	%RSD (b) (n = 5)	LODs (mg·L <sup>-1</sup> )
<i>High-pH</i>						
Cefoperazone	0.5-20	y = 1.3211x + 0.0712	0.999	1.3	4.8	0.25
Cefazolin	0.5-20	y = 1.268x + 0.0622	0.999	0.9	2.8	0.25
Cephalexin	0.5-20	y = 1.3727x + 0.0323	0.999	2.1	4.7	0.25
<i>Low-pH</i>						
Cefoperazone	1-20	y = 1.758x + 0.9559	0.999	4.0	6.0	0.50
Cefazolin	1-20	y = 1.4353x + 0.2322	0.996	4.2	6.4	0.50
Cephalexin	2.5-20	y = 0.3876x - 0.1765	0.998	5.1	8.9	1.00
<i>Short-end injection</i>						
Cefoperazone	2.5-20	y = 2.4046x - 1.3224	0.996	7.2	10.7	1.00
Cefazolin	1-20	y = 1.6202x - 0.2288	0.996	10.5	14.8	0.50
Cephalexin	1-20	y = 0.6193x - 0.3372	0.998	11.1	14.8	0.50

a) RSD in terms of intra-day precision at 5 mg·L<sup>-1</sup>  
 b) RSD in terms of inter-day precision at 5 mg·L<sup>-1</sup>

observed no great differences between the two methods. The preconcentration folds were slightly higher in REPSM but the limits of detection were very similar.

The precision of the peak areas were expressed as relative standard derivations (RSD values). We evaluated intra-day precision or repeatability by injecting five replicates on the same day and inter-day precision or intermediate precision by injecting five replicates on five different days. The precision with the high-pH method was high because the RSD for both intra and inter-day precision were very low. Unlike with the high-pH method, the RSD corresponding to the low-pH method was not so low and precision was therefore poorer. With the low-pH method the source of irreproducibility

was the stability of the microemulsion. At low pH values, the stability of the droplets was lower because there were changes in the solution viscosity and the SDS hydrolyzed to form dodecanol [16]. The short-end injection method presented the poorer precision results. This was due to that the capillary section utilized in the separation was not thermostated. With regard to the precision of the stacking methods, the RSD (in terms of intra-day and inter-day reproducibility) were below 14% with both REPSM and SRMP but, as expected, they were higher than the corresponding high-pH and low-pH methods because of error caused by the added stacking step. While, as with the low-pH method, irreproducibility with SRMP was due to the stability of the microemulsion, with REPSM the lack of reproducibility

**Table 3.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD,) and detection limits (LODs) of the REPSM and SRPM methods for standard solutions. Other CE conditions as in Figure 5.

Compound	Linearity ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n = 5)	%RSD (b) (n = 5)	Prec. fold	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<i>REPSM</i>							
Cefoperazone	40-1000	$y = 0.0385x - 0.5809$	0.999	3.3	5.7	25	30
Cefazolin	40-1000	$y = 0.0393x - 0.2414$	0.999	6.9	7.8	22	30
Cephalexin	50-1000	$y = 0.0390x - 0.7289$	0.998	9.7	12.0	25	40
<i>SRPM</i>							
Cefoperazone	50-1000	$y = 0.0226x + 0.7687$	0.997	8.9	8.9	14	40
Cefazolin	50-1000	$y = 0.0160x + 0.2565$	0.996	7.8	7.8	13	40
Cephalexin	75-1000	$y = 0.0066x + 0.3215$	0.998	10.0	10.0	15	50

a) RSD in terms of intra-day precision at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$   
b) RSD in terms of inter-day precision at  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

was due to the switching back the polarity. Switching back the polarity was probably the most complex step in the method but we could control it easily because the sample matrix was removed from the capillary slowly.

Comparing the MEEKC methods (both high-pH and low-pH) with other electrophoretic methods, such as CZE [2] or MEKC [6,25], the detection limits obtained decreased from around  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  to  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This is due to the sample stacking step included in the MEEKC methods. HPLC methods published [3] reported detection limits (around  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in raw milk) slightly lower than the obtained in this paper but it should be noted that in this case, a SPE preconcentration step was included and the sample was 20-fold preconcentrated.

#### 4 CONCLUSIONS

We contribute to improve the analysis of cephalosporins by MEEKC by combining different techniques as short-end injection to decrease the analysis time and sample stacking to decrease the detection limits of the methods.

We have studied various mode of microemulsion electrokinetic chromatography for analyzing cefazolin, cefoperazone and cephalexin. Starting with the separation of the compounds, we developed two methods: a high-pH method and a low-pH method. The composition of the microemulsion used was 0.5% ethyl acetate, 1.2% 1-butanol and 0.6% SDS in the corresponding buffer (10 mM tetraborate buffer at pH 9.4 and 5 mM phosphate at pH 2 for the high and low-pH methods, respecti-

vely). The analysis time and resolution of the peaks was satisfactory for separating the compounds. With the low-pH method when we applied the "short-end" injection technique, the analysis time was cut from 9-3 min but the intra and inter-day precision of the method decreased. The detection limits of the methods were decreased by using the stacking techniques: (i) the reverse electrode polarity stacking mode for the high-pH method, and (ii) stacking with reverse migrating pseudostationary phase for the low-pH method. We achieved limits of detection between 30 and 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for REPSM and between 40 and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for SRMP. All the methods were validated following the ICH guidelines on linearity, limits of detection, repeatability and intermediate detection. Our results show that the MEEKC method can be used for quantitative purposes.

## 5 REFERENCES

- [1] S. Bompadre, L. Ferrante, L. Leone, J. Chromatogr. A 812 (1998) 191.
- [2] A. Gáspár, M. András, S. Kardos, J. Chromatogr. B 775 (2002) 239.
- [3] L.K. Sorensen, L.K. Snor, J. Chromatogr. A 882 (2000) 145.
- [4] C.E. Lin, H.W. Chen, E.C. Lin, K.S. Lin, H.C. Huang, J. Chromatogr. A 879 (2000) 197.
- [5] F. Péhoureq, C. Jarry, J. Chromatogr. A 812 (1998) 159.
- [6] Y.M. Li, Y. Zhu, D. Vanderghinste, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, Electrophoresis 20 (1999) 127.
- [7] G. Castaneda, M. Kelly, H. Maillols, H. Fabre, Anal. Chem. 69 (1997) 1364.
- [8] G. Pajchel, S. Tyski, J. Chromatogr. A 895 (2000) 27.
- [9] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Chromatogr. A 871 (2000) 439.
- [10] Y. Mrestani, N. El-Mokdad, H.H. Rüttinger, R. Neubert, Electrophoresis 19 (1998) 2895.
- [11] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 844 (1999) 371.
- [12] P.E. Mahuzier, B.J. Clark, S.M. Bryant, K.D. Altria, Electrophoresis 22 (2001) 3819.
- [13] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Electrophoresis 26 (2005) 970.
- [14] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, J. Chromatogr. B 831 (2006) 196.
- [15] J.P. Quirino, S. Terabe, K. Otsuka, J.B. Vincent, G. Vigh, J. Chromatogr. A 838 (1999) 3.
- [16] J.P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 70 (1998) 149.
- [17] K.D. Altria, J. Chromatogr. A 892 (2000) 171.
- [18] Z.X. Zheng, J.M. Lin, W.H. Chan, A.W.M. Lee, C.W. Huie, Electrophoresis 25 (2004) 3263.
- [19] M.S. Aurora-Prado, C.L.d. Silva, Tavares M. F. M., K.D. Altria, J. Chromatogr. A 1051 (2004) 291.
- [20] R. Pomponio, R. Gotti, B. Luppi, V. Cavrini, Electrophoresis 24 (2003) 1658.
- [21] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Munk, M. Wiese, J. Chromatogr. A 803 (1998) 273.
- [22] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Electrophoresis 26 (2005) 954.

- [23] H.C. Chen, W.H. Ding, J. Chromatogr. A 996 (2003) 205.  
[24] D.S. Burgi, R.L. Chien, Anal. Chem. 63 (1991) 2042.

- [25] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini, J. Chromatogr. A 711 (1995) 339.

### **2.3. Aplicació de l'extracció en fase sòlida a la determinació de $\beta$ -lactames**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



Com s'ha comentat prèviament, en els darrers anys la utilització de compostos farmacèutics, entre els que es troben els antibiòtics, en medicina humana i veterinària s'ha incrementat significativament. Aquests antibiòtics poden arribar al medi ambient aquàtic si no son degradats completament a les plantes depuradores. Aquesta presència de residus d'antibiòtics al medi ambient provoca resistències dels microorganismes als antibiòtics i causa una seria amenaça a la salut pública perquè cada vegada és més difícil tractar infeccions amb els antibiòtics actuals [1]. Degut a les baixes concentracions en les que es poden trobar aquests compostos, és necessària una etapa prèvia de preconcentració abans de l'anàlisi electroforètica [2,3]. D'aquesta manera, en augmentar la baixa sensibilitat de l'CE, és possible la determinació dels antibiòtics a nivells traça. Sovint, aquesta etapa de preconcentració es realitza mitjançant l'SPE en mode *off-line* de manera que, simultàniament, es produeix una neteja de la mostra, necessària sobretot quan la matriu de la mostra és complexa.

En el següent treball es proposa un mètode basat en la CZE per a la determinació de quatre cefalosporines (cefazolina, cefoperazona, cefacetril i ceftiofur) en diferents aigües mediambientals (d'aixeta, de riu i residual d'hospital) realitzant un pretractament de la mostra amb SPE en mode *off-line* a l'CZE. El mètode es va validar amb aigua de riu i es va demostrar la seva aplicabilitat en els altres dos tipus d'aigües.

En primer lloc es va optimitzar la separació electroforètica. Amb la utilització d'un electròlit basat en acetat amònic 25 mM a pH 7.5 es va aconseguir una bona separació per CZE de les quatre cefalosporines estudiades en 5 minuts.

Seguidament es va procedir a l'optimització de l'SPE. Per això, es van avaluar comparativament dos tipus diferents de sorbents: un de base sílice, Lichrolut C<sub>18</sub>, i un de polimèric, Oasis HLB. En l'etapa d'SPE es van estudiar els diferents paràmetres principals que afecten al procés: pH i volum de mostra i composició i volum del solvent d'elució.

L'elecció del pH de la mostra va ser de gran importància en el cas del Lichrolut C<sub>18</sub> ja que es va observar una màxima capacitat de retenció a pH àcid ja que les cefalosporines es presentaven en la seva forma neutra. En canvi, aquest paràmetre no va tenir influència per l'Oasis HLB degut a les interaccions polars entre els analits i el sorbent cromatogràfic.

Pel que fa al volum de mostra analitzat, també es van observar grans diferències entre els dos sorbents. Mentre que el basat en sílice va presentar recuperacions petites per alguns compostos, sobretot en el cas del cefacetril i cefazolina amb volums superiors a 100 mL, les recuperacions pel sorbent polimèric van ser superiors al 76% per a tots els compostos per a volums de mostra de 500 i 1000 mL.

Així doncs, els millors resultats es van observar emprant Oasis HLB com a sorbent. En aquest cas es va realitzar la preconcentració d'un volum de mostra de 500 mL a pH neutre i l'elució amb 5 mL de metanol. Per tal de preconcentrar encara més la mostra, es va procedir a l'evaporació de l'eluat per corrent de N<sub>2</sub> i posterior redissolució amb aigua bidestil·lada. D'aquesta manera la recuperació per a tots els analits es va trobar al voltant del 100%.

En la validació del mètode, es va estudiar la linealitat en l'interval de concentracions entre 5-10 fins 200 µg·L<sup>-1</sup>, obtenint uns límits de detecció d'entre 3 i 5 µg·L<sup>-1</sup> en aigua de riu.

Finalment, el mètode es va aplicar a aigua d'aixeta i a aigua residual procedent d'un hospital. En l'aigua d'aixeta, es va emprar el mateix mètode que en el cas d'aigua de riu i els resultats van ser comparables. En el segon cas, però, el mètode es va haver de modificar pel que fa al volum de mostra analitzat ja que la càrrega orgànica de l'aigua residual era molt elevada. Així, el volum màxim de mostra que es va poder analitzar en aquest cas va ser de 100 mL.

A continuació (apartat 2.3.1) s'adjunten els resultats obtinguts en aquest estudi i que s'han publicat a la revista *Chromatographia* 65 (2007) 501.

### **Bibliografia**

- [1] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, *Science of the Total Environment* 225 (1999) 109.
- [2] R. Lindberg, P. Wennberg, M. Johansson, M. Tysklind, B. Andersson, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3421.
- [3] J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 46.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

***2.3.1 CE analysis of cephalosporins in environmental waters***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## CE ANALYSIS OF CEPHALOSPORINS IN ENVIRONMENTAL WATERS

Patricia Puig, Francesc Borrull, Carme Aguilar, Marta Calull

Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

This study investigates an off-line solid phase extraction (SPE) for improving the sensitivity in the capillary electrophoretic (CE) analysis of four cephalosporins. Two sorbent —Lichrolut-C<sub>18</sub> and Oasis HLB— were used in a SPE process to detect cephalosporins in natural waters (tap, river and hospital sewage) and their performances were compared. By using Oasis HLB sorbent higher recoveries for river water were obtained (94-107% when 500 mL of sample were analyzed). The off-line SPE-CZE method was validated for river water with good detection limits ( $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and the linearity ranged between 5 and  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Keywords:** Capillary electrophoresis; Solid phase extraction; Antibiotics; Cephalosporins in environmental water

---

### 1 INTRODUCTION

Drugs are continuously being released into the environment mainly as a result of manufacturing processes and excreta [1]. In fact, antibiotics have been detected in different types of water: sewage water, hospital wastewater and river water among others [2-6]. Antibiotic residues in the environment are suspected of inducing resistance in bacterial strains and causing a serious threat for public health [7]. One of the most important and frequently used antibiotics are  $\beta$ -lactams, particularly cephalosporins.

Capillary electrophoresis (CE) has proved to be a useful technique for analyzing cephalosporins [8-14]. However the poor sensitivity of CE can be a problem for determining these compounds in environmental matrices [15]. Solid phase extraction is the most commonly used preconcentration technique to determine these compounds at low concentration levels [3, 5, 16].

The aim of this study was to optimize SPE for the determination of cefoperazone, cefazolin, ceftiofur and ce-

phacetriole in environmental samples by capillary zone electrophoresis with diode array detector (CZE-DAD). To our knowledge, this is the first time that this group of cephalosporins has been simultaneously determined in water samples by SPE-CZE-DAD. The advantages and disadvantages of two sorbents (Lichrolut-C<sub>18</sub> and Oasis HLB) were discussed. Finally, the method was validated for river water and its performance was checked with two other natural waters: tap and hospital sewage water.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Chemicals and standards

Cefazolin, cefoperazone and ammonium acetate were obtained from Sigma (Saint Louis, USA). Ceftiofur was kindly donated by Pfizer (Madrid, Spain) and cephacetrile by Novartis Animal Health Inc. (Basel, Switzerland). Sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloric acid 35% were purchased from Prolabo (Bois, France). Methanol and acetonitrile were from SDS (Peypin, France).

### 2.2 Equipment

Capillary electrophoretic analyses were performed on a Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE instrument (Agilent Technologies, Waldronn, Germany) system equipped with a UV diode-array detector. The detection wavelength was 254 nm. An HP ChemStation (Agilent) version A:04.01 was used for instrument control, data acquisition and data analysis. The

uncoated fused-silica capillaries (Beckman, Palo Alto, CZE, USA) had a total length of 55 cm (46.5 cm effective length) and 75 µm ID.

### 2.3 Capillary zone electrophoresis

The background solution (BGE) consisted of 5 mM ammonium acetate adjusted to pH of 7.5. The analysis was carried out in cathodic mode (anode at the inlet) at 25 kV. In all cases, hydrodynamic injection was used at 50 mbar for 10 s at the capillary inlet.

### 2.4 Sample preparation

Off-line trace enrichment was performed with Lichrolut-C<sub>18</sub> (500 mg) or Oasis HLB (500 mg) (Water, Mildford, MA, USA). Before preconcentration, when Lichrolut-C<sub>18</sub> was used, samples were adjusted to pH 2 with HCl 35%. The SPE methods were as follows. (i) For the Lichrolut-C<sub>18</sub> sorbent, the conditioning was done with water, MeOH, water (4 mL each) and 8 mL of BGE. After the sample had been loaded, clean-up was with 4 mL of BGE. The analytes were eluted with 2 mL of acetonitrile. (ii) The conditioning process with Oasis HLB consisted of passing 5 mL of both MeOH and water through the cartridge. Afterwards, some sample water (the volume depended on the origin) was extracted and the clean-up was done with 2 mL of water. The retained cephalosporin compounds were then eluted with 5 mL of MeOH. In both methods, the sample was loaded through the cartridge at a flow rate of 10 mL·min<sup>-1</sup> and the final



extract was evaporated to dryness under a stream of N<sub>2</sub> and dissolved with 1 mL of water to be analyzed by CZE. To avoid carryover effects, the cartridges were washed with water and acetonitrile (5 mL). Preliminary studies and SPE method development for both sorbents, were done with purified water (100 mL) and river water, respectively. Since the best results were obtained for Oasis HLB, the method was validated using 500 mL of river water. The performance of the method was also tested with tap (500 mL) and hospital sewage (100 mL) waters.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The four cephalosporins: cefoperazone, cefazolin, ceftiofur and cephacetrile, were good baseline separated within 5 min by using 25 mM ammonium acetate (pH 7.5) as BGE, a separation voltage of 25 kV and a capillary temperature of 25 °C.

The solid phase extraction procedure was then optimized and two SPE sorbents were investigated: Lichrolut-C<sub>18</sub> (500 mg) and Oasis HLB (500 mg). The most important SPE parameters taken into consideration to find the optimum conditions for the SPE procedure were the sample pH, the composition of the elution solvent and the sample volume. Initial experiments were made by preconcentrating 100 mL of standard solutions of cephalosporins in purified water through the cartridges. The analytes were then eluted with 2 mL

of acetonitrile. The CE injected solution contained a concentration of 25 mg·L<sup>-1</sup> for all the compounds.

The aqueous solutions of cephalosporins can be present as neutral, anionic or cationic forms, therefore, their extraction behavior is pH dependent. So, the sample pH was investigated and samples were prepared in purified water at pH 2 and 7. While for Oasis HLB cartridges retention was not pH dependent in the pH range studied, for Lichrolut-C<sub>18</sub> the recoveries improved with the acidic sample matrix. This can be explained because at neutral pH the cephalosporins were negatively charged and their interactions with the sorbent were lower than when the analytes were uncharged as happens at pH 2. On the other hand, when Oasis HLB was used, the polar interactions between the sorbent and the analytes were less influenced by the analyte charge.

The elution of the analytes was assayed with two different solvents: acetonitrile and methanol. The silica based sorbent presented better results with 2 mL of acetonitrile since the recoveries for all the compounds studied were around 100%. On the other hand, recoveries for the polymeric sorbent were higher when 5 mL of methanol was used (recoveries around 100%). These differences in the elution step may again be explained by the different analyte-sorbent interactions.

**Table 1.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD,) and detection limits (LODs) of the SPE-CE-UV method for river water. Other CE conditions as in Figure 1.

Compound	Linearity (mg·L <sup>-1</sup> )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n = 5)	%RSD (b) (n = 5)	LODs (µg·L <sup>-1</sup> )
Cefoperazone	5-500	y = 0.1303x - 0.0498	0.9996	5.0	8.6	3
Ceftiofur	10-500	y = 0.2441x - 0.8558	1.0000	4.4	10.5	5
Cefazolin	10-500	y = 0.1298x - 0.1898	1.0000	7.5	8.0	5
Cephacetrile	5-500	y = 0.1605x - 0.2708	0.9993	5.3	6.9	3

a) RSD in terms of intra-day precision at 15 µg·L<sup>-1</sup>

b) RSD in terms of inter-day precision at 15 µg·L<sup>-1</sup>

To improve the sensitivity of the methods an extra step was added to the procedure in which the eluted extract was evaporated to dryness by using a stream of N<sub>2</sub>. The residue was then dissolved in 1 mL of water. We observed no loss in the evaporation step and the recoveries remained the same.

Under the best conditions found for both SPE cartridges, we evaluated the recoveries of the compounds by percolating different volumes (100, 500 and 1000 mL) of river water with different analyte concentrations so that the amount of each analyte was kept constant in the solution injected in CE (25 mg·L<sup>-1</sup>).

For Lichrolut-C<sub>18</sub> (sample at pH 2 and elution with 2 mL of acetonitrile) we started to study the optimum sample volume at 100 mL. The low recovery of cephacetrile (approximately 40%) could not be improved even for a lower sample volume of 25 or 50 mL. For 100 mL recoveries were acceptable for all the compounds (>90%) but they decreased as the volume increased (mainly for cefazolin

and cephacetrile). Recoveries were acceptable even for 1000 mL only for ceftiofur and cefoperazone (80-90%).

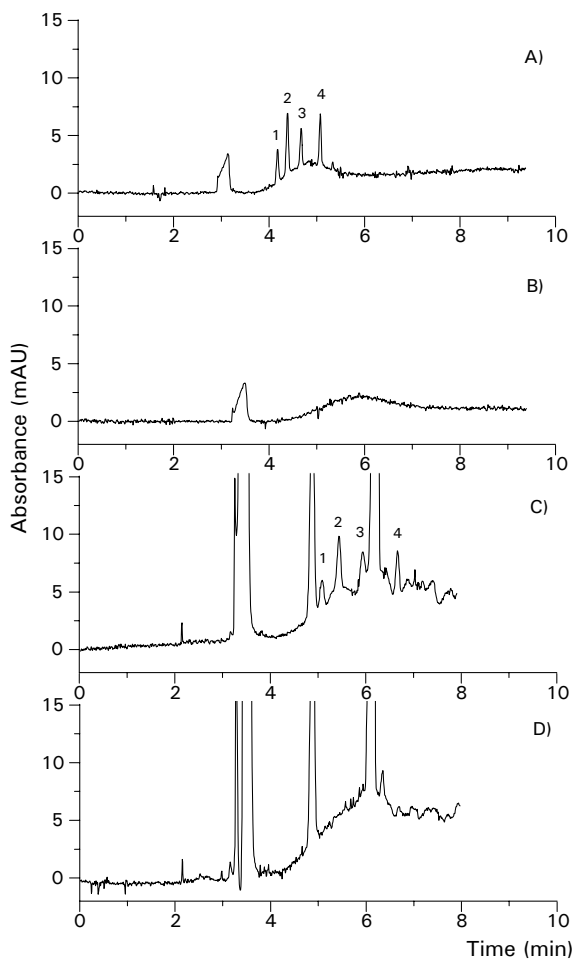
Recoveries from the sample volume studies for Oasis HLB (neutral sample matrix and elution with 5 mL of MeOH) were better for all the compounds even at high sample volumes. When 1000 mL of sample was percolated, cefoperazone, ceftiofur and cefazolin were totally recovered but the recovery of cephacetrile decreased to 76%. Finally a volume of 500 mL was chosen since under these conditions the recovery for all the cephalosporins was around 100%. Because of the better sensitivity achieved with the polymeric sorbent, Oasis HLB was used for further experiments.

### 3.1 Method calibration

Results for the method calibration presented in Table 1 showed a linear calibration curve in the range from 5-10 to 200 µg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>>0.9993). The limits of detection, calculated as the response for which the signal-to-noise ratio was 3, were in the 3-5 µg·L<sup>-1</sup>

range. The repeatability (intra-day precision) was investigated by analyzing five times in the same day samples spiked with  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and the intermediate precision (inter-day

precision) by injecting the samples at the same concentration on five different days. The relative standard deviation, RSD, was calculated in terms of corrected peak area. The



**Figure 1.** Representative electropherogram obtained from SPE-CZE-UV analysis of A) 500 mL of river water and B) 500 mL of river water spiked with  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of the compounds studied, C) 100 mL of hospital sewage water and D) 100 mL of sewage hospital water spiked with  $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of the compounds studied. Separation conditions: hydrodynamic injection (50 mbar, 10 s); UV detection at 254 nm, voltage 25 kV. The analytes are listed in the following order of increasing migration time: (1) cefoperazone, (2) ceftiofur, (3) cefazolin and (4) cephalotriole.

repeatability was less than 7.5% and the intermediate precision less than 10.5%. These results mean that the precision of the method is good enough for analyzing cephalosporins in river water. Figure 1 shows the electropherograms of 500 mL of river water sample; a blank (Figure 1A) and a spiked sample at a concentration of  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of compounds (Figure 1B).

### 3.2 Analysis of environmental samples

We checked the performance of the method in different matrices by analyzing samples of tap water and hospital sewage water. For this purpose, spiked and non-spiked samples were analyzed. In both samples, the non-spiked sample showed that none of the peaks migrated at the same time as the analytes studied, so this sample was used as a blank. For tap water, the sample analyzed was a volume of 500 mL at pH 2 spiked at  $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of the cephalosporins studied. For this kind of water the obtained results were similar than the obtained for river waters.

Hospital sewage water samples collected at the effluent of a hospital were also analyzed. The high concentration of organic matter in the samples did not enable us to differentiate between the analytes and the matrix when 500 mL of sample was analyzed. So lower sample volumes should be percolated. When 100 mL were tested some peaks appeared at the migration times close to the migration times of

cephalosporins (see Figure 1C). None of these peaks could be identified as cephalosporins with the corresponding spectra obtained by DAD. To confirm this, the hospital sewage water was spiked with the analytes at a concentration of  $75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 1D). No overlapping occurred so the peaks observed in the non-spiked sample did not correspond to the cephalosporins under study.

## 4 CONCLUSIONS

We improve the sensitivity of the CE method for analyzing cefoperazone, ceftiofur, cefazolin and cephacetrile by using off-line SPE as a sample pretreatment. Our study has shown that the recoveries for the cephalosporins studied are higher when Oasis HLB has been used as sorbent enabling to preconcentrate a higher sample volume (500 mL), which therefore lowers the limits of detection. The performance of the system was evaluated with river water and linearity was good (between 5-10 and  $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The sensitivity was at the  $3\text{-}5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  level. The applicability of the method was verified by analyzing tap water, river water and hospital sewage water.

## 5 REFERENCES

- [1] M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1067 (2005) 1.
- [2] E. Turiel, G. Bordin, A.R. Rodríguez, J. Sep. Sci. 28 (2005) 257.

- [3] R. Lindberg, P. Wennberg, M. Johansson, M. Tysklind, B. Andersson, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3421.
- [4] Benito-Peña E., A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.
- [5] R. Lindberg, P.A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind, *Chemosphere* 57 (2004) 1479.
- [6] J.M. Cha, S. Yang, K.H. Carlson, *J. Chromatogr. A* 1115 (2006) 46.
- [7] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, *Science of the Total Environment* 225 (1999) 109.
- [8] G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 27.
- [9] Y.M. Li, Y. Zhu, D. Vanderghinste, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 20 (1999) 127.
- [10] Y. Mrestani, M. Janich, H.H. Rüttinger, R.H.H. Neubert, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 237.
- [11] Y. Mrestani, N. El-Mokdad, H.H. Rüttinger, R. Neubert, *Electrophoresis* 19 (1998) 2895.
- [12] C. García-Ruiz, M.L. Marina, *Electrophoresis* 27 (2006) 266.
- [13] C.E. Lin, H.W. Chen, E.C. Lin, K.S. Lin, H.C. Huang, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 197.
- [14] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Chromatographia* 62 (2005) 603.
- [15] H. Suzuki, M. Nagata, S. Ohzono, C. Fujimoto, *Chromatographia* 61 (2005) 333.
- [16] S. Reverte, F. Borrull, E. Pocurull, R.M. Marce, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 225.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

#### **2.4. Acoblament *in-line* de l'extracció en fase sòlida i l'electforesi capil·lar per a la determinació de $\beta$ -lactames**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



A través dels resultats obtinguts en l'estudi presentat prèviament en el capítol 2.3.1 es va poder veure el potencial que oferia la tècnica d'SPE en la seva combinació en mode *off-line* a l'CE en quant a un augment de sensibilitat i neteja de la mostra. No obstant els avantatges hi ha nombroses limitacions com són l'elevat temps d'anàlisi total, el gran volum de mostra necessari i sobretot l'elevat grau de manipulació de la mostra i la dificultat d'automatització del sistema. Per tal de superar aquestes limitacions, un dels camps en fase de recerca és l'acoblament de l'SPE amb l'CE bàsicament en dos modes: *in-line* [1-4] i *on-line* [5,6].

En el següent estudi, l'objectiu va ser l'avaluació i comparació de dues tècniques de preconcentració en l'anàlisi de mostres mediambientals, una basada en tècniques cromatogràfiques, com és l'acoblament en mode *in-line* de l'SPE i de l'CE i l'altra basada en tècniques electroforètiques, concretament a través de la tècnica *Large Volume Sample Stacking* (LVSS).

Es va realitzar aquest estudi emprant un compost model, el ceftiofur, que és una cefalosporina que ja s'havia determinat en mostres mediambientals per SPE-CE *off-line* en l'anterior apartat (2.3.1). L'anàlisi es va portar a terme mitjançant electroforesi capil·lar per zones emprant com a BGE acetat sòdic 25 mM a pH 5. En aquestes condicions, el temps de migració va ser de 8 minuts.

Com a tècnica de preconcentració electroforètica es va seleccionar la LVSS doncs prèviament s'havien obtingut bons resultats amb dues tècniques molt similars, REPSM i SRMP. De la mateixa manera que en REPSM, s'introdueix hidrodinàmicament un gran volum de mostra en el capil·lar i la matriu de la mostra és eliminada mitjançant el EOF quan s'aplica un voltatge de diferent polaritat al de la separació.

En l'optimització de la tècnica de LVSS, es va estudiar el volum de mostra injectat en el capil·lar per tal d'omplir el 25, 50, 75 i 100% del volum d'aquest i l'aplicació de diferents potencials per a realitzar l'eliminació de la

mostra per LVSS entre -5 i -25 kV. Els millors resultats es van obtenir quan es va preconcentrar el màxim volum de mostra possible que correspon a la totalitat del volum del capil·lar (aproximadament 2138 nL) emprant un potencial per LVSS de -15 kV. En aquestes condicions no es va observar un eixamplament de banda en el pic electroforètic degut a la tècnica de preconcentració i el límit de detecció es va millorar des de  $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per l'injecció hidrodinàmica convencional a  $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  per LVSS.

Pel que fa a la tècnica cromatogràfica, es va procedir a l'estudi de l'acoblament en mode *in-line* en un format tipus sorbent empaquetat [1] on el sorbent s'empaqueta en un capil·lar de diàmetre intern superior al del capil·lar de separació. Els capil·lars emprats en aquest acoblament es van preparar en el laboratori del grup d'investigació Bioanàlisi de la Facultat de Química de Barcelona que està dirigit pel Dr. José Barbosa i l'aplicació analítica es va desenvolupar en els laboratoris del Grup de Cromatografia. Aplicacions mediambientals de la nostra universitat.

En *in-line* SPE-CE també es va estudiar el volum de mostra òptim aplicant una pressió de 930 mbar durant diferents temps, entre 5 i 45 minuts. El volum de mostra òptim va ser d'uns 265  $\mu\text{L}$  aproximadament, que prové de la injecció a 930 mbar durant 30 min. Pel que fa al solvent d'elució, per tal d'evitar la formació de bombolles dintre del capil·lar que donen lloc a pèrdues de corrent, es va emprar una mescla d'acetonitril i aigua (80:10). A més, la mostra es va preparar BGE:aigua (90:10). Amb el mètode proposta es va aconseguir un límit de detecció de  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En l'aplicació a mostres reals, va ser necessària la incorporació d'una etapa prèvia de pretractament basada en l'SPE *off-line* per tal de aconseguir un grau addicional de preconcentració de l'analit i per realitzar una neteja prèvia de la matriu de la mostra. Amb el mètode que inclou la tècnica de LVSS, es van analitzar 500 mL d'aigua de riu obtenint-se un LOD de  $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . En el mètode que inclou l'acoblament *in-line* SPE-CE, degut a la bona sensibilitat del mètode, no va ser necessari preconcentrar un volum de mostra tan

elevat i només es van analitzar 25 mL de mostra per SPE *off-line* obtenint un LOD final de 10 ng·L<sup>-1</sup>.

En la comparació entre les dues tècniques de preconcentració es va veure que, tot i que el mètode en que s'utilitza LVSS és més simple i ràpid que la combinació *in-line* SPE-CE, la sensibilitat no és tan bona degut a que en la tècnica electroforètica el màxim volum de mostra que es pot analitzar està limitat pel volum del capil·lar de separació. Per una altra banda, aquesta diferència en els LODs va disminuir quan, en l'aplicació a mostres reals, es va aplicar l'etapa d'SPE *off-line* ja que, per disminuir el LOD va ser necessari tractar un volum de mostra molt més gran que en *in-line* SPE-CE.

Els resultats obtinguts en aquest estudi s'inclouen en el treball que s'adjunta a continuació (apartat 2.4.1) i que s'ha publicat a la revista *Analytica Chimica Acta 587 (2007) 208*.

### Bibliografia

- [1] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman, J. Chromatogr. A 1140 (2007) 205.
- [2] M.C. Breadmore, M.C. Boyce, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, Analyst 125 (2000) 799.
- [3] J.C.M. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingeman, W.J.M. Underberg, Electrophoresis 21 (2000) 2851.
- [4] M.C. Breadmore, Anal. Chim. Acta 556 (2006) 121.
- [5] F.W.A. Tempels, J. Teeuwsen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 263.
- [6] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, Anal. Chem. 76 (2004) 4432.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

***2.4.1 Improving the sensitivity of the  
determination of ceftiofur by capillary  
electrophoresis in environmental water  
samples: In-line solid phase extraction and  
sample stacking techniques***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## IMPROVING THE SENSITIVITY OF THE DETERMINATION OF CEFTIOFUR BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES: IN-LINE SOLID PHASE EXTRACTION AND SAMPLE STACKING TECHNIQUES

Patricia Puig<sup>1</sup>, Francesc Borrull<sup>1</sup>, Marta Calull<sup>1</sup>, Fernando Benavente<sup>2</sup>,  
Victoria Sanz-Nebot<sup>2</sup>, José Barbosa<sup>2</sup>, Carme Aguilar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

<sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, Barcelona University,

Martí i Franquès 1-11, 08028 BARCELONA, Spain

---

### Abstract

This paper describes two different approaches for increasing the sensitivity for the analysis of ceftiofur by capillary electrophoresis (CE). Two different techniques based on the introduction of an enlarged volume sample, namely large volume sample stacking (LVSS) and in-line solid phase extraction (SPE) were studied and compared. LVSS allowed the on-column electrophoretic preconcentration of ceftiofur without modification of the separation capillary. In-line SPE-CE was developed by using a home-made microcartridge that was filled with a reversed-phase sorbent (C<sub>18</sub>). The microcartridge was coupled in-line near the inlet of the separation capillary. LVSS and in-line SPE-CE allowed automated operation and improved sensitivity for the analysis of ceftiofur with respect to conventional CE. When environmental water samples were analyzed, an additional pretreatment step based on off-line SPE was necessary in both cases to further decrease the detection limits. In terms of sensitivity for the determination of ceftiofur in river water samples, the combination of off-line SPE with in-line SPE-CE was found the most sensitive with a detection limit of 10 ng·L<sup>-1</sup>, whereas the method based on the use of off-line SPE with LVSS presented a detection limit of 100 ng·L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Ceftiofur; Capillary electrophoresis; In-line preconcentration; Large Volume Sample Stacking; Solid phase extraction

---

## 1 INTRODUCTION

A high percentage of antibiotics consumed by humans and animals are excreted unchanged through urine and feces into domestic sewage. In the sewage treatment plants these compounds are only partially removed and they are potentially released into the aquatic environment. The trace concentration of antibiotics in the aquatic environment has been related with the evolution of novel antibiotic-resistant bacteria [1]. Therefore, there is a need for sensitive and reliable analytical methods to determine antibiotics at the trace levels found in the aquatic environment at the  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  levels [2, 3].

Cephalosporines, are  $\beta$ -lactam antibiotics that are widely used in the treatment of human and veterinary diseases. They have been analyzed mainly by high performance liquid chromatography (HPLC) [4, 8], but different capillary electrophoresis (CE) methods have also been developed [9-17]. The application of CE to trace level analysis has been hindered by its relatively poor concentration sensitivity which is primarily a consequence of the small injection volumes and the short optical pathlengths with UV detection. Two main directions have been followed to overcome this limitation: improving the sensitivity of the detection and increasing the amount of analyte introduced in the capillary [18]. There are different instrumental options to improve the detection sensitivity, such as the use of Z-shaped or bubble cells to increase the detection path-length

with UV detectors [18, 19] or the use of laser-induced fluorescence, conductivity, electrochemical or mass spectrometry detectors [19, 20]. However, the use of modified cells decrease the separation resolution and some of these detectors can be too specific and expensive. In order to improve the average results obtained in this way, there are two main approaches to increase the amount of analyte introduced in the capillary after injecting an increased volume of sample: the electroforetic-based and the chromatographic-based methods [20].

The mechanism for analyte preconcentration in the electrophoretic-based methods, also called on-column preconcentration methods, lies on the principle of stacking analytes in a narrow band between two separate zones in the capillary where the compounds have different velocities [20]. One of the modes is sample stacking which is based on the difference of conductivity between the sample and the background electrolyte. Specifically, in large volume sample stacking (LVSS), the analytes with negative charge stack up at the boundary between the sample zone and the background electrolyte while the large volume of sample, that is hydrodynamically injected, is electroosmotically pushed out of the capillary after the application of a reversed voltage [21].

The chromatographic-based methods group different modes of solid phase extraction (SPE) [22-29]. In SPE coupled in-line to CE (in-line SPE-CE) a



large volume of dilute sample is introduced into an SPE microcartridge placed in-line near the inlet of the separation capillary. The SPE sorbent selectively retains the target analytes that are subsequently eluted in a smaller volume of an appropriate solution. This resulted in sample clean-up and concentration enhancement with minimum sample handling [20, 30]. Several devices and sorbents have been described for in-line SPE-CE [26-28, 31-34] but microcartridges containing reversed-phase silica based particles are easy to construct from commercially available materials and have produced improved results [28, 32, 33].

In this study, LVSS and in-line SPE were studied for increasing the sensitivity of capillary zone electrophoresis (CZE) for the analysis in water samples of ceftiofur, a cephalosporin antibiotic approved for veterinary use. When environmental samples were analyzed, an additional pretreatment step based on off-line SPE was necessary in order to further decrease the detection limits. The critical parameters and the quantitative aspects of both approaches will be discussed and compared. To our knowledge, this is the first time that in-line SPE-CE have been applied to analyze a cephalosporin antibiotic.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals and standards

Ceftiofur was kindly donated by Pfizer (Madrid, Spain) and sodium acetate was purchased from Sigma-Aldrich

(St. Louis, MO, USA). Methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were from SDS (Peypin, France). Sodium hydroxide (NaOH) and hydrochloride acid 35% were purchased from Prolabo (Bois, France).

All solutions were prepared using 18.2 M $\Omega$  deionized water from a Millipore water purification system (Bedford, MA, USA).

The 1000 and 100 mg·L<sup>-1</sup> standard solutions of ceftiofur were prepared in water monthly and weekly, respectively. The background electrolyte (BE) was a solution of 25 mM of sodium acetate adjusted at pH 5 with acetic acid. Working standard solutions were prepared daily by diluting the stock standard solutions with either water (LVSS) or BGE diluted in water (10%, v/v) (in-line SPE-CE). All the solutions were stored in dark-glass flasks at 4 °C. Before use, all the solutions were filtered through a 0.22  $\mu$ m microfilter (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain).

### 2.2 Equipment

All the experiments were performed with at 25 °C on a Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE instrument from Agilent Technologies (Waldronn, Germany) equipped with direct UV absorbance detection at 254 nm. Instrument control, data acquisition and data analysis were performed using the HP ChemStation software (version A:04.01) (Agilent Technologies). The uncoated fused silica capillaries were from Beckman (Palo Alto, CA, USA) and Polymicro Technologies (Phoenix,

AZ, USA) for LVSS and in-line SPE-CE experiments, respectively.

River water samples were pretreated off-line using a SPE manifold supplied by Teknokroma (Barcelona, Spain) connected to a vacuum pump.

### **2.3 Construction of the enrichment capillary**

The enrichment microcartridges which contained the SPE sorbent were home made [35]. A 55 cm length base fused-silica capillary (365  $\mu\text{m}$  OD x 75  $\mu\text{m}$  ID) was conditioned with 1 M sodium hydroxide for 20 min and Milli-Q water for 15 min at 930 mbar. Then, it was cut in two pieces of 7.5 and 46.5 cm, respectively, in order to insert the SPE microcartridge. A polyethylene frit (0.1 cm), obtained from small pieces of the original filters found in a commercial Sep-Pak<sup>®</sup> cartridge (Millipore, Marlborough, MA, USA), was introduced in a 1 cm piece of another bare fused-silica capillary activated before, using a 0.5 cm polyethylene sleeve "Intramedic" PE 10 (610  $\mu\text{m}$  OD x 250  $\mu\text{m}$  ID) (Clay Adams division of Becton and Dickinson, NJ, USA). Then, it can be easily vacuum-packed with the C<sub>18</sub> sorbent obtained from a Sep-Pak<sup>®</sup> cartridge (40  $\mu\text{m}$  particles). When the microcartridge was almost completely full, a second in-column frit was inserted in the end side. The SPE-CE capillary column was extended to full-length with the 46.5 cm piece of activated fused silica capillary using another polyethylene sleeve. Finally, it was checked for blockage by rinsing

with the separation BGE solution at 930 mbar for 10 min. Voltage was immediately applied and a stable current meant that the SPE-CE system was ready to use.

### **2.4 Procedures**

#### *CZE and LVSS*

New capillaries of 55 cm (46.5 cm effective length) for CZE or LVSS were pre-treated before use with 1 M NaOH, H<sub>2</sub>O and BGE for 15 min each. Then a voltage of 25 kV was applied for 15 min. The capillaries were rinsed with the BGE for 1 min after each analysis and with methanol for 10 min for its overnight storage.

Ceftiofur samples were dissolved in water because a low conductivity sample matrix was necessary for LVSS. For CZE experiments the sample was hydrodynamically injected for 10 s at 50 mbar and separation was performed in cathodic mode (anode at the inlet) at 25 kV. For LVSS, under optimum conditions, the sample was loaded into the electrophoretic system at a pressure of 50 mbar for 270 s in such a way that the capillary was completely full of sample (2138 nL). Then, a negative voltage was applied (-15 kV) and the electroosmotic flow (EOF) pushed the sample into the inlet of the system and started the stacking process. When 95% of the original current was reached, the voltage was stopped and a positive voltage (25 kV) was applied to start the analysis.

### *In-line SPE-CE*

New SPE-CE separation capillaries were rinsed before use with BGE for 15 min and a voltage of 25 kV was applied for 15 min. For every SPE-CE analysis the sorbent was wetted and conditioned with H<sub>2</sub>O, MeOH, H<sub>2</sub>O and BGE at 930 mbar for 2 min each one. The sample in diluted BGE (10 % v/v, in water) was loaded at 930 bar for 30 min (265 µL). Retained molecules were eluted by injecting a solution of acetonitrile:water (80:20, v/v) at 50 mbar for 10 s (79.2 nL). Then, a voltage of 25 kV was applied between two vials filled with BGE to perform the electrophoretic separation. The SPE-CE column was rinsed for 1 min with BGE and regenerated by flushing acetonitrile at 930 mbar for 5 min after each analysis.

### *Off-line SPE*

The river water samples were filtered through a 0.45 µm nylon membrane filter and pH was adjusted to 2 with HCl 35% (v/v) (Whatman, Maidstone, UK). An off-line SPE manifold was used to clean-up and preconcentrate the filtered samples. We used SPE cartridges from Merck (Darmstadt, Germany) packed with 500 mg of a reversed-phase C<sub>18</sub> sorbent (Lichrolut®). These cartridges were conditioned by passing at a flow-rate of 10 mL·min<sup>-1</sup> 5 mL of water, 5 mL of methanol and 5 mL of water. The difference between the off-line SPE treatment before LVSS or in-line SPE-CE methods lies in the sample volume percolated and in the matrix that was used to dissolve the final extract. 500

mL of sample and 25 mL of sample were passed at 10 mL·min<sup>-1</sup> for LVSS and in-line SPE-CE, respectively. The cartridge was cleaned up after passing 5 mL of water and the retained ceftiofur was eluted with 2 mL of acetonitrile. The extract was evaporated to dryness under a stream of N<sub>2</sub> and finally it was dissolved with 1 mL of H<sub>2</sub>O or 1 mL of diluted BGE (10%, v/v, in water) for LVSS and in-line SPE-CE, respectively. Between analysis, the sorbent was regenerated with 5 mL of H<sub>2</sub>O and 5 mL of acetonitrile. In order to illustrate better the methodologies, Table 1 describes the procedures related to LVSS, in-line SPE-CE and off-line SPE-CE.

### 2.5 Quality parameters

The quantification of ceftiofur was performed by the external standard method. In this way, linear calibration curves in LVSS were obtained by plotting the corrected peak areas of ceftiofur against the concentration of the analyte in the injected solution. In order to quantify ceftiofur peak area, the peak integration method used was the based on horizontal baseline. For in-line SPE-CE, the corrected peak areas of the eluted ceftiofur were represented versus the concentration of the analyte in the loaded solution. The concentration ranges were determined by triplicate measurements at five concentration levels. The detection limit was calculated as the response for which the signal-to-noise ratio was 3. The precision, repeatability (intra-day precision) and intermediate precision (inter-day

precision) of the corrected peak areas were also studied. The repeatability was determined as a percentage of the relative standard deviation (%RSD) obtained for the corrected peak area of the eluted ceftiofur after five consecutive injections of a water

sample containing the compound at different concentrations depending of the method evaluated. In a similar way, intermediate precision was evaluated by injecting the samples containing ceftiofur on five different days.

**Table 1.** Procedures of LVSS, in-line SPE-CE and off-line SPE-CE methods

<b><i>Off-line SPE-CE</i></b>
Conditioning: 5 mL H <sub>2</sub> O, MeOH, H <sub>2</sub> O each
Sample loading: sample matrix pH 2, LVSS-CE (500 mL) // in-line SPE-CE (25 mL)
Clean-up: 5 mL H <sub>2</sub> O
Elution: 2 mL ACN
Evaporation with N <sub>2</sub> stream
Redissolution: LVSS-CE 1 mL H <sub>2</sub> O // in-line SPE-CE 1 mL BGS 10%
<b><i>LVSS-CE</i></b>
Sample injection: 50 mbar 270 s
Stacking: -15 kV until 95% original current
CE separation: 25 kV
Post-conditioning: 1 min BGE
<b><i>In-line SPE-CE</i></b>
Conditioning: 930 mbar for 2 min H <sub>2</sub> O, MeOH, H <sub>2</sub> O, BGE each
Sample loading: 930 mbar for 30 min
Elution: 50 mbar for 10 s ACN/H <sub>2</sub> O (80/20)
CE separation: 25 kV
Post-conditioning: 930 mbar for 1 min BGE, ACN each

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1A shows the electropherogram obtained for a standard solution of ceftiofur of 10 mg·L<sup>-1</sup> using a BGE of 25 mM of sodium acetate at pH 5. Ceftiofur, according to the structure and pK<sub>a</sub> values shown in Table 2, was negatively charged at this pH value, but migrated towards the detection

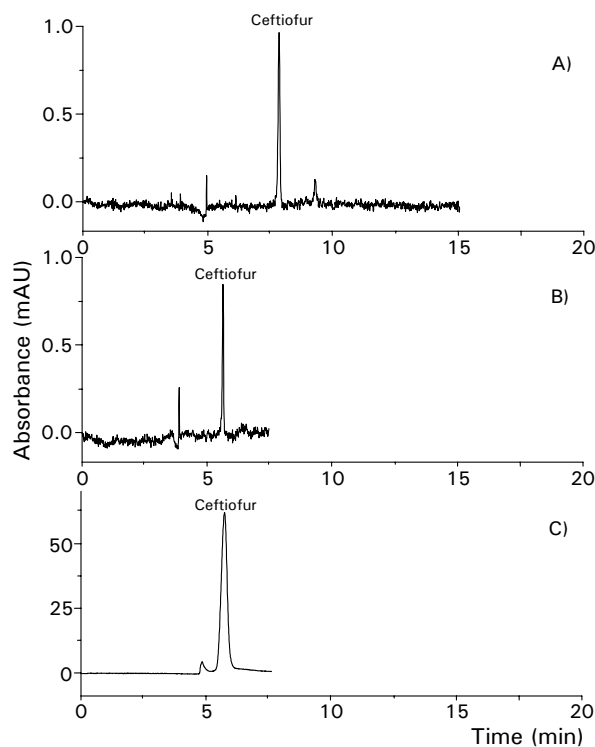
end in less than 8 min because of the electroosmotic flow (EOF). Using these CZE conditions, the detection limit for the standard solutions of ceftiofur was 300 µg·L<sup>-1</sup>, when the sample was hydrodynamically injected a 50 mbar for 10 s. In order to analyze ceftiofur at the levels found in the environmental water

samples, we explored preconcentration by LVSS and in-line SPE-CE.

### 3.1 Large volume sample stacking

In a previous work, we investigated two sample stacking techniques for the analysis of cephalosporins by microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC): the reversed

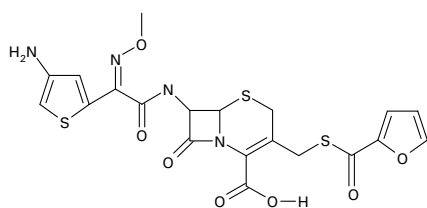
electrode polarity stacking mode (REPSM) and the reverse migrating pseudostationary phase method (SRMP) [15]. Now, we have alternatively chosen LVSS, a sample stacking technique for CZE, where it is easier to develop methodologies compatible with on-line electrospray mass spectrometry detection.



**Figure 1.** Representative electrochromatogram of the analysis of ceftiofur by: A) CZE: a solution of  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur was hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s; B) LVSS: a solution of  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur was hydrodynamically injected at 50 mbar for 270 s and C) in-line SPE-CE: a solution of  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur was hydrodynamically loaded at 930 mbar for 30 min. Separation conditions: BGE of 25 mM sodium acetate adjusted at pH 5 with acetic acid; UV detection at 254 nm; T 25 °C, voltage 25 kV.

In LVSS at pH 5, ceftiofur was in its anionic form and stacked-up at the boundary between the sample zone and the background electrolyte while the sample matrix was electro-osmotically pushed out of the capillary after the application of the anodic voltage (cathode in the inlet). When 95% of the original current was reached, the anodic voltage was stopped and the polarity was switched. Ceftiofur migrated to the cathode because the cathodic EOF at this pH value was higher than the electrophoretic velocity of ceftiofur towards the anode in the inlet.

**Table 2.** Structure and  $pK_a$  values of ceftiofur (a)



$pK_{a1}$  COOH = 2.62

$pK_{a1}$   $NH_3^+$  = 2.90

a) Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software Solaris V8.14 (© 1994-2005 ACD/Labs)

A standard solution containing ceftiofur at  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration was used to optimize the sample injection volume and the polarity switching step. The standard solution was hydrodynamically injected at 50 mbar for 67, 135, 202 and 270 s in order to fill a 25, 50, 75 and 100% of the total capillary volume. For this

study, the stacking voltage was kept at -15 kV and for CE analysis a voltage of 25 kV was applied. As no band-broadening was observed for any of the injection times, we selected an injection time of 270 s because it allowed to fill the whole capillary with sample.

The polarity switching was the next parameter to be optimized. The sample matrix was pumped out by applying the anodic stacking voltage. The optimum value was -15 kV because it was suitable to remove the sample matrix in a relatively short time (around 4 min). Longer stacking times were observed when we tested lower stacking voltages (-5 and -10 kV). Moreover a higher precision was obtained by applying -15 kV. In LVSS, precision is related to the monitoring of the current that should be as exact as possible for optimum precision. When higher stacking voltages were tested (-20 and -25 kV), the monitoring of the current was more difficult because it slowed down dramatically. Figure 1B shows the electropherogram resulting from the analysis of ceftiofur at  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  under the optimum LVSS conditions. As it can be observed, the migration time decreases in around 2 min with respect conventional hydrodynamic injection (Figure 1A), probably due to the stacking process. The sensitivity of CZE was clearly improved by LVSS since the electropherograms of Figure 1A and B are in the same y-scale and the concentration of ceftiofur in LVSS is 100 times lower than in CZE ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (CZE) and  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (LVSS), respectively). It's important to note

that this is the maximum improvement in sensitivity that could be obtained in LVSS because this was get by filling all the capillary volume.

In order to evaluate the linearity, different standard solutions of ceftiofur with concentrations ranging from 50 to 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  were injected. As it can be observed in Table 3, the linear relationship between the corrected peak area and the concentration of ceftiofur was excellent in all the concentration range ( $R^2 > 0.99$ ). The repeatability expressed as a percentage of the relative standard deviation (% RSD) obtained for the corrected peak areas of a standard solution containing 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur after five consecutive injections was satisfactory. Comparing with the results obtained with conventional hydrodynamic injection, ceftiofur was preconcentrated in a factor of 12. The preconcentration factor was calculated as the ratio of the peak areas obtained for LVSS and for CZE hydrodynamic injection (50 mbar for 10 s) at the same analyte concentration. The de-

tection limit obtained was 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Small differences were observed with the preconcentration factor and the detection limits previously reported by REPSM and SRMP [15]. In SRMP, the preconcentration factor was similar (around 15), but the detection limits were higher (around 40-50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Unlike SRMP, preconcentration factor in REPSM were slightly higher (around 25) but detection limits were closer to that obtained in LVSS (around 30-40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Differences in preconcentration factors of the techniques were due to differences in the methodologies of the stacking methods (capillary length, sample volume injected, ..). Moreover, since the quantification of the analyte was calculated by peak area and the sensibility was calculated by means the peak height the preconcentration factor is not directly related to the detection limit of the method. In this way, both parameters depend on the peak shape. As an example, with similar preconcentration factors, the higher detection limits in SRMP were due to the peak shape of ceftiofur that was slightly broader in MEEKC than in CZE.

**Table 3.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD), and detection limits (LODs) of the LVSS-CE and in-line SPE-CE methods for standards.

Method	Linearity ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	$R^2$	%RSD (a) (n = 5)	%RSD (b) (n = 5)	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
LVSS	50-1000	$y = 0.0244x - 0.145$	0.998	2.2	3.4	25
In-line SPE	0.5-100	$y = 1.7139x + 3.3091$	0.997	3.9	8.9	0.25

a) RSD in terms of intra-day precision at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (LVSS) and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (in-line SPE-CE).

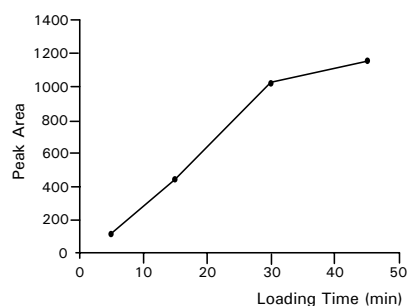
b) RSD in terms of inter-day precision at 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (LVSS) and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (in-line SPE-CE).

### 3.2 In-line solid phase extraction capillary electrophoresis (in-line SPE-CE)

The analysis of ceftiofur by in-line SPE-CE was developed in modified capillary columns containing the home-made enrichment microcartridges. The  $C_{18}$  sorbent was activated following the manufacturer directions by flushing water, methanol and water. A last rinse with BGE conditioned the sorbent and the separation capillary before sample loading, extraction and electrophoretic separation. The samples were initially prepared in water or diluted BGE 10%, v/v, in water). The samples diluted in BGE (10%, v/v, in water) were used for further experiments because the area of the eluted ceftiofur was higher and the current during the electrophoretic analysis was more stable.

As one of our objectives was to minimize the analysis time, the sample was loaded at 930 mbar. At high pressure, larger volumes of sample can be loaded in a shorter period of time. In addition, it is more effective because the amount of analyte retained is higher than at lower loading pressure when the same amount of sample is loaded [35]. The sample loading time was studied by introducing a standard solution containing  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur for 5, 15, 30 and 45 min. As it can be observed in Figure 2, the peak area of the eluted ceftiofur increased with the loading time, because a larger amount of ceftiofur was retained when a larger volume of sample was loaded. The variation was linear until the

maximum capacity of the  $C_{18}$  sorbent was reached at 45 min where the eluted amount of ceftiofur leveled off at a saturation value. As the objective of the in-line SPE-CE was to pre-concentrate the maximum amount of ceftiofur in a relatively short time, 30 min was chosen as optimum loading time.



**Figure 2.** Effect of the loading sample time on peak area of the eluted ceftiofur in the in-line SPE-CE procedure. A solution of  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur was hydrodynamically loaded at 930 mbar. Other conditions as in Figure 1.

At this point, the elution step was studied. Acetonitrile was chosen as organic solvent because of its high elution power [16]. The analyte was supposed to be completely eluted from the SPE system by injecting pure acetonitrile at 50 mbar for 10 s, because no ceftiofur was further detected after rinsing the capillary between runs with acetonitrile. However, current breakdowns were sometimes observed during the electrophoretic separations due to the formation of bubbles inside the microcartridges making difficult the electrophoretic analysis [26, 27]. In order to avoid the electrophoretic run failure, we added a small amount of water in



the elution plug. Using an elution plug consisting in a mixture of acetonitrile and water (80:20, v/v) ceftiofur was again efficiently eluted from the C<sub>18</sub> sorbent

It is important to note that just after the injection of the elution plug, the capillary remained almost completely full with BGE (10%, v/v) (sample matrix). Once the electrophoretic voltage was set at 25 kV, the elution plug migrated towards the microcartridge and the retained molecules were eluted from the sorbent. At the same time, a stacking effect was obtained because of the difference in conductivity between the sample matrix (BGE (10%, v/v)) which filled the capillary and the BGE of both ends of the column. The overall effect is an increase in the preconcentration factors because the eluted molecules stacked in a narrow band on the rear interface between the elution plug and the BGE.

In order to evaluate the linearity, different standard solutions of ceftiofur with concentrations ranging from 0.5 to 100 µg·L<sup>-1</sup> were injected. As it can be observed in Table 3, the linear relationship between the corrected peak area of the eluted ceftiofur and the concentration of ceftiofur in the loaded solution was excellent in all the concentration range ( $R^2 > 0.99$ ). The repeatability and reproducibility expressed at the % RSD (n=5) obtained for the corrected peak areas of the eluted ceftiofur after loading a standard solution

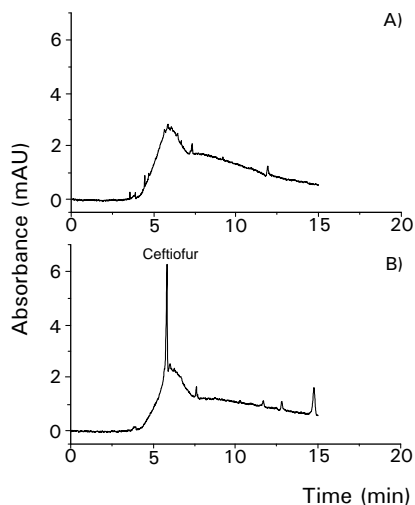
containing 25 µg·L<sup>-1</sup> were satisfactory, but slightly lower than those observed with LVSS. The detection limit was 0.25 µg·L<sup>-1</sup>, around two levels of magnitude lower than that obtained with LVSS. Figure 1C, shows a representative electropherogram of the in-line SPE-CE analysis of a 100 µg·L<sup>-1</sup> solution of ceftiofur. Compared to the electropherogram of a conventional hydrodynamic injection and LVSS (Figure 1A and B), ceftiofur peak was broader probably because of the overall concentration enhancement after the elution (note y-scale). However, a similar band broadening was observed when samples containing ceftiofur at lower concentrations were loaded. On the other hand, migration times were similar to those obtained with LVSS. The presence of an in-line SPE process could affect migration time and peak efficiency, in this case, because of the elution plug size and composition, the type and amount of extraction sorbent and the unavoidable chromatographic interactions inside the microcartridge [35]. If we compare the total analysis time, when ceftiofur was analyzed by LVSS only a few minutes were needed to complete a run and around 1 h was needed to complete an in-line SPE-CE analysis. On the other hand, despite some extra work must be done to construct the home-made microcartridges for in-line SPE-CE, the volumes of samples introduced were larger than the total capillary volume and that allowed an improved sensitivity.

### 3.3 Analysis of environmental samples

The in-line SPE-CE and LVSS methods were applied to the analysis of real environmental water samples from Ebre river. The samples were pretreated using an off-line SPE clean-up step, in order to improve sensitivity and avoid the interference of some of the sample constituents in the LVSS or in-line SPE-CE analysis. A C<sub>18</sub> sorbent from a different manufacturer was selected according to our previous results concerning the extraction of ceftiofur from environmental water samples [16]. Using 500 mL of sample volume for off-line SPE followed by LVSS recoveries were of around 74% and the

detection limit was optimal (0.1 µg·L<sup>-1</sup>). Figure 3A and B shows the electropherograms for the LVSS method of a blank river water sample and a river water sample spiked with 1.5 µg·L<sup>-1</sup> of ceftiofur, respectively. In the analysis of the blank, the sample matrix slightly disturbed the baseline but did not avoid the integration of the ceftiofur peak.

Treating 25 mL of river water samples by off-line SPE before in-line SPE-CE, recoveries were around 90% and the detection limit was 10 ng·L<sup>-1</sup> which is at the levels found in real environmental samples. The treatment of a higher volume of sample resulted later in saturation of the sorbent of the in-line microcartridge. On the other hand, detection limits were higher with sample volumes lower than 25 mL. As detection limits with standard solutions were two levels of magnitude lower with in-line SPE-CE, the off-line treatment of a factor of 20 lower volume of river water sample still produce better detection limits for the overall off-line SPE and in-line SPE-CE procedure. In Figure 4 can be seen the blank river water sample and the same sample spiked with 300 ng·L<sup>-1</sup> of ceftiofur. No problems were observed in the in-line SPE-CE preconcentration procedure regarding to the presence of other components from the river water in the sample loaded. Like in the LVSS method, the baseline was little disturbed by the sample matrix, but now another peak appeared at the front of the elution plug baseline separated from the ceftiofur peak,



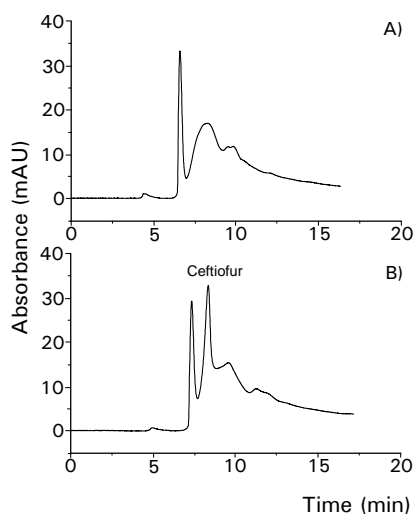
**Figure 3.** Electropherogram of the analysis of river water samples by off-line SPE and LVSS. A) Blank of the river water sample and B) the river water sample was spiked with 1.5 µg·L<sup>-1</sup> of ceftiofur. Off-line SPE conditions: sample volume 500 mL, elution with 2 mL of acetonitrile, evaporation and redissolution with 1 mL of H<sub>2</sub>O. Other conditions as in Figure 1B.

which could be integrated with the criterion of horizontal baseline.

River water samples spiked with ceftiofur at different concentrations were analyzed by off-line SPE followed by LVSS or in-line SPE-CE in order to determine the linearity, the repeatability and the reproducibility. As it can be observed in Table 4, the linear relationship between the corrected peak area of the eluted ceftiofur and the concentration of ceftiofur in the spiked samples was good ( $R^2 > 0.98$ ), but slightly better when the extract was analyzed by

LVSS ( $R^2 > 0.99$ ). The repeatability and reproducibility expressed as the % RSD ( $n=5$ ) obtained for the corrected peak areas of the eluted ceftiofur after pretreating a river water sample spiked with 100 and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  before LVSS or in-line SPE-CE were of around 8%. Again precision was slightly better when the extract was further analyzed by LVSS.

The use of an off-line SPE pretreatment step allowed to detect ceftiofur at 100 and 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in environmental water samples with LVSS and in-line SPE-CE, respectively. The limit of detection was better by off-line SPE followed by in-line SPE-CE, but compared to the limits of detection for standard solutions of ceftiofur, 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (LVSS) and 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (in-line SPE-CE), the gain in sensitivity with the off-line pretreatment as higher for LVSS. However, as it was necessary to percolate during the off-line SPE step a larger volume of sample (500 mL) in order to achieve these preconcentration factors, the total analysis time also increased. As a consequence, the total analysis time became equal for both analytical methods, while LVSS needed more time to load the sample in the off-line SPE step, in-line SPE-CE needed more time to load the sample in the SPE microcartridge. It should be pointed out that for lower concentrations of ceftiofur, sensitivity could be improved by applying a longer loading time. However, this could increase the total analysis time and also different parameters such as the breakthrough volume and the kind of matrix should be considered.



**Figure 4.** Electropherogram of the analysis of river water samples by off-line SPE and in-line SPE-CE. A) Blank of the river water sample and B) the river water sample was spiked with 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of ceftiofur. Off-line SPE conditions: sample volume 25 mL, elution with 2 mL of acetonitrile, evaporation and redissolution with 1 mL of diluted BGE (10% in  $\text{H}_2\text{O}$ ). Other conditions as in Figure 1C.

**Table 4.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD), and detection limits (LODs) of the LVSS-CE and in-line SPE-CE methods for river water

Method	Linearity ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	%RSD (a) (n=5)	%RSD (b) (n=5)	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
LVSS	0.150-3	$y = 13.319x - 1.1597$	0.999	5.6	7.4	100
In-line SPE	0.05-3	$y = 404.86x + 68.981$	0.983	7.3	11.2	10

a) RSD in terms of intra-day precision at  $0.300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

b) RSD in terms of inter-day precision at  $0.300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

The developed methods provided equivalent or better detectability than that obtained for the analysis of cephalosporins in environmental samples by off-line SPE followed by HPLC-MS or HPLC-MS/MS. For example, cefadroxil was analyzed by HPLC-MS [36] and HPLC-MS/MS [2] and the quantification limit was around  $50$  and  $70 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in sewage water samples. Cephapirin was analyzed in surface water and influent or effluent waste water and the detection limits were estimated to range between  $8$  and  $18 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 4 CONCLUDING REMARKS

We have described two methods, LVSS and in-line SPE-CE, for increasing sensitivity in capillary electrophoresis. Both of them were successfully applied and validated to the analysis of ceftiofur in environmental water samples. The comparison between methods revealed that while LVSS allowed faster and more reproducible analysis with higher peak efficiency, in-line SPE-CE allowed enhanced sensitivity with a detection limit of  $250 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  for ceftiofur in standard solutions. Both methods were cheap, fast, not very tedious and allowed the same level of

automation of conventional CZE. When river water samples were analyzed, an off-line SPE step was necessary in order to further decrease the detection limits. The combination of off-line SPE with LVSS or in-line SPE-CE, allowed detection limits up to  $100$  and  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Linearity was excellent over several orders of magnitude, and repeatability and reproducibility values were acceptable (lower than  $11.2\%$ ). These results suggest that both methodologies would potentially allow for daily analysis of ceftiofur in environmental water samples at levels of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 5 REFERENCES

- [1] S. Makeswaran, I. Patterson, J. Points, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 151.
- [2] R. Lindberg, P. Wennberg, M. Johansson, M. Tysklind, B. Andersson, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 3421.
- [3] Benito-Peña E., A.I. Partal-Rodera, M.E. León-González, M.C. Moreno-Bondi, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 415.
- [4] G.A. Jacobson, S. Martinod, C.P. Cunningham, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1249.

- [5] R.V. Oliveira, Q.B. Cass, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 1180.
- [6] S. De Baere, F. Pille, S. Croubels, L. Ceelen, P. De Backer, Anal. Chim. Acta 512 (2004) 75.
- [7] P.S. Jaglan, B.L. Cox, T.S. Arnold, M.F. Kubicek, D.J. Stuart, T.J. Gilbertson, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73 (1990) 26.
- [8] C.B. Navarre, L. Zhang, G. Sunkarra, S.H. Duran, U.B. Kompella, J. Vet. Pharmacol. Ther. 22 (1999) 13.
- [9] A. Gáspár, M. András, S. Kardos, J. Chromatogr. B 775 (2002) 239.
- [10] C.E. Lin, H.W. Chen, E.C. Lin, K.S. Lin, H.C. Huang, J. Chromatogr. A 879 (2000) 197.
- [11] H.H. Yeh, Y.H. Yang, Y.W. Chou, J.Y. Ko, C.A. Chou, S.H. Chen, Electrophoresis 26 (2005) 927.
- [12] P. Emaldi, S. Fapanni, A. Baldini, J. Chromatogr. A 711 (1995) 339.
- [13] G. Pajchel, S. Tyski, J. Chromatogr. A 895 (2000) 27.
- [14] Y.M. Li, Y. Zhu, D. Vanderghinste, A.V. Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, Electrophoresis 20 (1999) 127.
- [15] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Chromatographia 62 (2005) 603.
- [16] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Chromatographia 65 (2007) 501.
- [17] C. García-Ruiz, M.L. Marina, Electrophoresis 27 (2006) 266.
- [18] G. Hempel, Electrophoresis 21 (2000) 691.
- [19] G. Manetto, F. Tagliaro, F. Crivellente, V.L. Pascali, M. Marigo, Electrophoresis 21 (2000) 2891.
- [20] M.C. Breadmore, P.R. Haddad, Electrophoresis 22 (2001) 2464.
- [21] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, J. Chromatogr. A 757 (1997) 281.
- [22] A. Macià, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Electrophoresis 24 (2003) 2779.
- [23] C. Mardones, A. Ríos, M. Valcárcel, Electrophoresis 22 (2001) 484.
- [24] F.W.A. Tempels, J. Teeuwesen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 263.
- [25] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, Anal. Chem. 76 (2004) 4432.
- [26] J.C.M. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwesen, A. Bult, H. Lingeman, W.J.M. Underberg, Electrophoresis 21 (2000) 2851.
- [27] M. Petersson, K.G. Wahlund, S. Nilsson, J. Chromatogr. A 841 (1999) 249.
- [28] S. Sentellas, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Sep. Sci. 25 (2002) 975.
- [29] P. Puig, F.W.A. Tempels, M. Calull, C. Aguilar, F. Borrull, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. B (2007) (in press).
- [30] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte, Electrophoresis 21 (2000) 2768.
- [31] M.A. Strausbauch, J.P. Lander, P.J. Wettstein, Anal. Chem. 68 (1996) 306.

- [32] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 856 (1999) 483.
- [33] T. Stroink, E. Paarlberg, J.C.M. Waterval, A. Bult, W.J.M. Underberg, Electrophoresis 22 (2001) 2375.
- [34] C.B. Knudsen, J.H. Beattie, J. Chromatogr. A 792 (1997) 463.
- [35] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman, J. Chromatogr. A 1140 (2007) 205.
- [36] R. Lindberg, P.A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind, Chemosphere 57 (2004) 1479.

**2.5. Acoblament *on-line* de l'extracció en fase sòlida i l'electroforesi capil·lar per a la determinació de  $\beta$ -lactames**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



Per tal d'aprofundir en els coneixements sobre l'acoblament *on-line* entre l'SPE i l'CE es va realitzar una estada de quatre mesos en el *Biochemical Analysis Department* de la Universitat d'Utrecht (Països Baixos). En aquest departament, concretament en el grup d'investigació *Pharmaceutical Analysis* dirigit pel Dr. Gerhardus J. de Jong, s'havien desenvolupat prèviament diferents estudis d'aquesta combinació SPE-CE [1,2].

Com ja s'ha comentat anteriorment en el capítol d'introducció, en l'acoblament *on-line* SPE-CE, el sorbent no es disposa en l'interior del capil·lar de separació com es fa en l'acoblament *in-line*, sino que en aquest cas està col·locat en un cartutx situat fora del sistema electroforètic. A diferència dels modes *off-line* i *at-line* però, el volum de l'elució de l'SPE no es recull en un vial i posteriorment una al·lquota d'aquest s'injecta en el sistema d'CE. En aquest cas *on-line*, el volum d'elució s'introdueix directament en el capil·lar de separació mitjançant una interfície.

Hi ha diferents tipus d'interfícies que possibiliten la combinació *on-line* SPE-CE entre les que destaquen les de tipus vàlvula connectada al capil·lar de CE [2,3], les de tipus vial [4,5] i les de tipus peça T [1,6]. En els treballs previs desenvolupats per Tempels *et al.* [1,2] s'havien emprat amb èxit dues d'aquestes interfícies, una de tipus vàlvula amb un *loop* per tal de mesurar la quantitat d'eluat introduït en el capil·lar i l'altra de tipus peça T. Aquests dos sistemes es troben representats en les Figures 1.11 i 1.12 de la Introducció de la present Tesi Doctoral. En el treball que es presenta a continuació es realitza una aplicació en la que es determinen dues cefalosporines, ceftiofur i cefoperazona, en plasma de vaca per *on-line* SPE-CE emprant una interfície de tipus peça T. Molt breument, quan s'empra aquest tipus d'interfície es produeix un fraccionament del volum d'elució en dues parts, una de les quals s'analitzarà per CE i l'altra queda descartada. D'aquesta manera s'elimina un dels problemes fonamentals en *on-line* SPE-CE que és la dificultat d'injectar tot el volum d'elució d'SPE en el sistema electroforètic degut a la incompatibilitat entre aquests volums. La selecció d'aquesta interfície es va basar en la seva facilitat d'ús respecte la interfície de tipus

vàlvula i per, d'aquesta manera, familiaritzar-se amb l'acoblament *on-line* SPE-CE d'una manera més simple.

Per a la retenció dels analits es va utilitzar una columna d'SPE de 0.5 mm ID per 5 mm de llargada amb un sorbent de tipus C<sub>18</sub>. Es van estudiar diferents paràmetres que afecten a l'extracció com són el volum màxim de mostra que es pot preconcentrar i el volum d'acetonitril necessari per a eluir els analits. També es va determinar el volum d'elució, és a dir el volum en el qual es troben els analits després de ser eluïts de l'SPE ja que el sistema de flux continu emprat implica una dilució d'aquest eluat. Pel que fa al volum màxim de mostra a analitzar aquest està marcat pels volums de ruptura, que van ser superiors a 1000 µL per tots dos analits. Això va permetre analitzar un volum de mostra de 250 µL i a més realitzar un rentat amb la fase mòbil (BGE) del sorbent cromatogràfic sense observar pèrdues dels analits retinguts en la columna d'SPE. Respecte a l'elució de les cefalosporines estudiades, aquesta es va aconseguir emprant un volum d'acetonitril de 426 nL. Amb aquestes condicions, es va obtenir un volum d'elució d'1.8 µL per tots dos analits i una recuperació de 75 i 90% per a la cefoperazona i el ceftiofur, respectivament.

Una vegada optimitzats els paràmetres corresponents a l'SPE, es va procedir a l'acoblament a l'CE de manera que es va estudiar la quantitat d'eluat que podia ser introduïda en el capil·lar de separació per tal d'obtenir una màxima sensibilitat sense eixamplament de banda. Amb aquest objectiu, es van estudiar tres sistemes diferents en funció de la relació entre la llargada dels capil·lars que estan connectats per la interfície: el de residus o *waste* i el de separació (1:10, 1:20 i 1:40). Els millors resultats es van obtenir amb la relació 1:40, de manera que el capil·lar de separació tenia una llargada de 120 cm i el *waste* de 3 cm.

Amb aquestes condicions, es va procedir a la calibració del mètode amb estàndards. Es va observar que la relació concentració-absorbància a 254 nm era lineal entre 10 i 500 µg·L<sup>-1</sup> ( $R^2 > 0.992$ ) amb uns límits de detecció

de  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i la reproductibilitat per tots dos analits va ser inferior al 12% en termes de RSD entre diferents dies per a una concentració de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En aquest punt, es va passar a aplicar el mètode a les mostres de plasma de vaca. Per tal d'evitar problemes amb la pressió del sistema derivats de l'adsorció de proteïnes en el sorbent ( $\text{C}_{18}$ ), es va reduir la quantitat de mostra a analitzar a  $50 \mu\text{L}$  de plasma i es van estudiar dos tipus de pretractament de la mostra: dilució en aigua (1:4 i 1:10) i desproteïnitació amb àcid perclòric al 10%. Tot i que inicialment es van obtenir bons resultats amb els dos pretractaments, la contrapressió del sistema va anar augmentant progressivament en el cas d'utilitzar dilucions. Per aquest motiu es va escollir la desproteïnitació de la mostra com a pretractament necessari. Finalment, es va realitzar la validació del mètode amb mostres de plasma de vaca amb unes recuperacions del 90% i del 57% per a la cefoperazona i el ceftiofur respectivament. La sensibilitat del sistema, amb límits de detecció d'entre  $50$  i  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  no va ser tan bona com en el mètode per a estàndards degut, sobretot, a la reduïda quantitat de mostra que es va analitzar ( $50 \mu\text{L}$ ).

Els resultats obtinguts arrel d'aquest estudi que es presenten en el treball que s'inclou a continuació (apartat 2.5.1) s'han publicat a la revista *Journal of Chromatography B*.

### Bibliografia

- [1] F.W.A. Tempels, J. Teeuwssen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263.
- [2] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4432.
- [3] P. Puig, Tempels, F. W. A., Somsen, G. W., de Jong, G. J., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Electrophoresis* (2007) (submitted).

- [4] T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwesen, H. Lingeman, J.C.M. Waterval, A. Bult, G.J. Jong, W.J.M. Underberg, *Electrophoresis* 25 (2003) 897.
- [5] N.F.C. Visser, M. Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 451.
- [6] E. Bonneil, K.C. Waldron, *Talanta* 53 (2000) 687.

**2.5.1 *On-line coupling of solid-phase extraction and capillary electrophoresis for the determination of cefoperazone and ceftiofur in plasma***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## ON-LINE COUPLING OF SOLID-PHASE EXTRACTION AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR THE DETERMINATION OF CEFOPERAZONE AND CEFTIOFUR IN PLASMA

Patricia Puig<sup>1,2</sup>, F.W. Alexander Tempels<sup>1</sup>, Francesc Borrull<sup>2</sup>, Marta Calull<sup>2</sup>, Carme Aguilar<sup>2</sup>, Govert W. Somsen<sup>2</sup>, Gerhardus J. de Jong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Analysis. Utrecht University.

Sorbonelaan 16, NL-3584 CA UTRECHT, The Netherlands

<sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

---

### Abstract

We present a method for determining two cephalosporins (cefoperazone and ceftiofur) in plasma by on-line solid-phase extraction (SPE)— capillary zone electrophoresis (CZE) with a T-split interface. Using this interface, a part of the SPE elution plug containing the cephalosporins is injected while the rest of the sample is flushed to waste. SPE was carried out using a C<sub>18</sub> microprecolumn and the cephalosporins presented good retention properties with breakthrough volumes above 1 mL. Using a desorption volume of 426 nL of acetonitrile, recoveries were 75% and 90%, for cefoperazone and ceftiofur, respectively. With UV at 254 nm, linear relationships between the injected concentration and peak area was measured between 10-500 ng·mL<sup>-1</sup> for standards, and 200-1500 ng·mL<sup>-1</sup> for plasma samples. Intra-day (n=5) and inter-day (n=5) peak area repeatability were lower than 12% RSD. The detection limits obtained for spiked plasma (100 ng·mL<sup>-1</sup> cefoperazone and ceftiofur) are sufficient for applying the method to pharmacokinetic studies.

**Keywords:** Solid-phase extraction; capillary electrophoresis; on-line; cephalosporins; plasma samples.

---

### 1 INTRODUCTION

Cephalosporins are  $\beta$ -lactam antibiotics that are closely related to

penicillins in chemical structure and antibacterial action. Cephalosporins are the most prescribed antibiotics because they are among the safest

and the most effective broad-spectrum antimicrobial agents [1]. Cefoperazone and ceftiofur, which are two of the most important third-generation cephalosporins, are used for the treatment of infections caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria and have activity against  $\beta$ -lactamases. In veterinary medicine, cephalosporins are widely used to treat and prevent various infectious diseases. However, this can be a potential risk because drug residues may be present in biological fluids and tissues. Therefore, sensitive determination of cephalosporins in biological samples is required in various fields such as therapeutic drug monitoring and analytical and forensic toxicology.

Liquid chromatography (LC) has played a key role in the determination of cephalosporins in pharmaceutical preparations and in biological fluids [2-5]. This versatile technique has been commonly used to analyze cephalosporin residues in biological samples such as milk [2, 3], plasma [4], serum [1, 2, 5], cerebrospinal fluid [5], urine [1, 5] and synovial fluid [4]. Some papers have been published the determination of cefoperazone [6] or ceftiofur [4, 7-9] in plasma by HPLC and two different plasma pretreatment were used: a simple deproteinization, (using organic solvent or acidic media) [6, 7], and a derivatization step followed by SPE [4, 8, 9]. Detection limits ranged from 1000 [6, 7] to 150 ng·mL<sup>-1</sup> [4, 9], for the deproteinization and the derivatization pretreatment, respectively. However, while in the first pretreatment only the parent

compound ceftiofur is determined, in the second one, also their metabolites could be quantified. Although higher sensitivity is obtained by the derivatization method, the procedure is considerably longer and more time-consuming than the protein precipitation.

In the last few years, capillary electrophoresis (CE) has also been used as an alternative to HPLC to analyze cephalosporins in different matrices [10-17]. Generally, the electroseparation modes used for these compounds are capillary zone electrophoresis (CZE) [10-13] and micellar electrokinetic capillary electrophoresis (MEKC) [13-17]. The detection limits for the CE analysis of cephalosporins reported were in the range of 0.2-2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

CE offers high separation efficiency but its routine application in bioanalysis is still limited due to a relatively low sensitivity when UV absorbance detection is used. This is caused by the small injection volumes and the short detection path length, leading to concentration limits of detection which often are higher than analyte concentrations in biological matrices. A straightforward way of improving detection limits in capillary electrophoresis is sample stacking [18, 19] which is based on conductivity differences between the sample and the electrolyte solution. However, stacking can be problematic when complex sample matrices, such as biological samples, have to be analyzed because they often contain high concentrations of salts and



proteins. Solid-phase extraction (SPE) is frequently used as sample preparation technique because it can simultaneously enrich the trace analytes and remove salts and a wide variety of other compounds that can interfere with the subsequent CE separation [20-26]. The coupling of SPE and CE for the analysis of biological samples would preferably be carried out in an on-line mode because of short total analysis times, the minimum of sample handling, and the possibility of automation [21-23].

Recently, we have developed two on-line SPE-CE systems, in which the SPE and CE steps can be optimized and conducted independently [20, 21, 27]. In the present study, one of the systems [20], has been applied to determine cephalosporins in cow plasma. The on-line SPE-CE approach is based on a Tee-split interface which is required for coupling both techniques and to allow an injection volume that is suitable for CE analysis because the SPE elution volume is considerably larger than the maximum volume that can be injected into the CE capillary. Using this interface, a part of the SPE elution plug is injected while the rest of the sample is flushed to waste. As plasma is a relatively complex sample, the introduction of a pretreatment step prior to injection was necessary to prevent clogging of the SPE column. Attention has been paid to the optimization of the sample pretreatment in order to achieve a fast, easy and effective sample preparation procedure.

The aim of this study was to develop a simple and rapid method for the analysis of ceftiofur and cefoperazone in plasma samples. In order to improve the poor sensitivity of the CE, an SPE step on-line coupled to CE has been included. We also evaluated the suitability of a plasma pretreatment procedure.

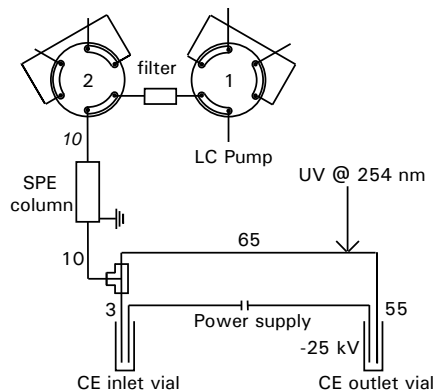
## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals

Sodium hydroxide, potassium hydroxide and ammonium acetate were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and acetonitrile from Biosolve BV (Valkenswaard, The Netherlands). Ammonium hydroxide was obtained from Fluka Chemie (Buchs SG, Switzerland) and perchloric acid 70% was from Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA). Cefoperazone was supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA) and ceftiofur was kindly donated by Pfizer (Madrid, Spain). Buffer and sample solutions were made with deionized water purified with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Cow plasma, treated with citrate, was from abattoir Van Kooten (Montfoort, The Netherlands). As a routine procedure, acetonitrile and buffer solutions were sonicated for 5 min before use.

### 2.2 Apparatus

A schematic diagram of the SPE-CE setup used for the experiments is shown in Figure 1. The system is similar to that used in previous work



**Figure 1.** Schematic diagram of the on-line SPE-CE system with the T-split interface. System components and dimensions are described in Section 2.2.

[21]. The preconcentration system consists of a pump, a SPE column and a two six-port switching valves. A Shimadzu LC10AD<sub>VP</sub> pump (Shimadzu, Kyoto, Japan) supplied the mobile phase to the PepMap C<sub>18</sub> SPE column (5 mm \* 0.5 mm ID, 5 µm particles, 100 Å pores) (LC Packings-A Dionex Company, Amsterdam, The Netherlands). Valve 1 in Figure 1 was a Rheodyne 7010 valve (Rhonert Park, CA, USA) and allowed the injection of the sample in the system. The introduction of the elution solvent was performed with a VICI Cheminert C<sub>2</sub>-1006 valve (valve 2) (VICI Ag/Valco International, Schenkon, Switzerland). For the study of the retention of the compounds on the trapping column, a UV detector (model K-2501 detector; Knauer Wellchrom, Berling, Germany) was placed just after the SPE column. All tubing used in the SPE system was red PEEK (1/16 in. OD, 0.005 in. ID, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) except for the tubing between

valve 2 and the CE apparatus, which was fused silica capillary of 75 µm ID, 375 µm OD and the loop in valve 2 which was a fused silica capillary of 50 µm ID, 375 µm OD. All capillaries in the system were from Polymicro (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA).

The interface between the SPE and CE systems was a micro-Tee (model P-775; Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA) that splits the flow in two parts depending on the length of the capillaries after the Tee-piece. Unless stated otherwise, the CE system consisted of a waste capillary of 3 cm and a separation capillary of 120 cm full length (both 75 µm ID, 375 µm OD), so the ratio between the part of the flow going to the waste and the part that goes to the separation capillary is 1 to 40. The detection window in the separation capillary was placed at 65 cm from the interface.

The CE instrument was either an Agilent CE system (model G1600Ax; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector for detection at a wavelength of 254 nm, or a PrinCE CE system (model 560; PrinCE Technologies, Emmen, The Netherlands) with the aforementioned Knauer detector set at a wavelength of 200 nm. The PrinCE system was used for the study of the retention of the analytes on the SPE column and for the method calibration for standards, while the Agilent system was used for the calibration of biological samples and for determining the detection limits of both methods.

### 2.3 Procedures

#### *SPE-CE system*

The procedure used for the on-line SPE-CE is summarized in Table 1. First, the sample was introduced by pumping mobile phase, consisting of 25 mM ammonium acetate at pH 7.5, with a flow rate of 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . At 11 minutes, the sample was loaded and washed with the mobile phase, and the flow was changed to 3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Thirty seconds later, the analytes were eluted with a 426-nL plug of acetonitrile introduced via valve 2 and the vial in which the waste capillary was placed, was changed to the CE inlet vial. At 13 minutes, the analytes were injected into the separation capillary, and the flow in the SPE system was stopped. Finally CE

analysis was started (see below). The background electrolyte (BGE) for the CE separation was the same as the mobile phase used for SPE, i.e., 25 mM ammonium acetate at pH 7.5. In order to avoid introduction of sample matrix into the separation capillary, BGE was flushed from the cathodic outlet vial of the CE system until the elution step at 11 minutes. The separation was started after the SPE step at 13 minutes by applying voltage. As the inlet of the capillary was grounded, negative polarity (-25 kV) was applied at the outlet of the capillary during analysis.

On each day, the SPE sorbent was conditioned by pumping water, acetonitrile, water and mobile phase each for five minutes. At the end of the day, the SPE system was cleaned for 10 min with water. Unless otherwise stated, the flow was 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . The CE system was conditioned daily flushing with 0.1 M NaOH, water, and background electrolyte for 5 min. Between runs, the capillary was rinsed with 0.1 M NaOH, water and BGE each for one minute.

#### *Sample pretreatment*

Cow plasma was obtained from animals which did not receive any medication. The plasma was centrifuged three times for 5 min at 1886 *g*, while after each step the supernatant was taken, and finally stored at -18 °C until use.

**Table 1.** Procedure used for the on-line SPE-CE

Time (min)	Flow ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Valve 1	Valve 2	
0	50	Load	Load	Fill loop of valve 1
	50	Inject	Load	Injection of sample
11	3	Inject	Load	Change pump flow
				Fill loop of valve 2
11.5	3	Inject	Inject	Injection of elution solvent
13	0	inject	inject	Start CE analysis (-25 kV)

Two sample pretreatments before SPE step were studied: dilution and deproteinization. When the sample was diluted 4 times, 375  $\mu\text{L}$  of plasma was spiked with a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  standard solution and diluted to a final volume of 1.5 mL. In the 10 times dilution, the sample procedure was used except that 150  $\mu\text{L}$  of plasma was spiked and diluted to 1.5 mL. For deproteinization of the sample, 1000  $\mu\text{L}$  plasma was transferred into a vial and spiked with a standard solution of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . then, 0.215  $\mu\text{L}$  of a 10% perchloric acid solution was added and the sample was diluted to a final volume of 1.5 mL. The sample was mixed for 15 s using a vortex and centrifuged at 12754  $g$  for 5 min. The supernatant was injected into the SPE-CE system.

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Optimization and performance of the SPE-CE method

For CE a BGE consisting of 25 mM ammonium acetate (pH 7.5) was selected because a good separation of cephalosporins was obtained with this BGE in a previous work [28]. Here, a short study showed that under the

chosen conditions (capillary 75  $\mu\text{m}$  ID, total capillary length 123 cm and capillary length to detector 65 cm) cefoperazone and ceftiofur could be completely separated in about 11 minutes.

Before coupling the SPE and CE, the appropriate SPE conditions for trapping and eluting the test compounds were investigated. The breakthrough volumes, desorption efficiency and desorption volume were studied. A solution of each analyte with a concentration of 25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was passed through the SPE column and the column effluent was monitored at 200 nm to examine retention of the cephalosporin on the SPE material. Analyte breakthrough was observed at 23 min for cefoperazone and 25 min for ceftiofur using a flow rate of 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . This means that the breakthrough volumes were 110 and 1250  $\mu\text{L}$  for cefoperazone and ceftiofur, respectively. A sample volume of 250  $\mu\text{L}$  was chosen for subsequent experiments because this volume allowed the trapping of the compounds and additional washing. To study the desorption efficiency, a desorption volume of 426 nL acetonitrile was

tested, and this volume provided elution efficiencies of 75% and 90% for cefoperazone and ceftiofur, respectively. These values were considered to be acceptable for both cephalosporins. When the desorption volume of 426 nL was used, the SPE elution volume was 1.8  $\mu\text{L}$  for both cephalosporins.

The SPE-CE system is depicted in Figure 1. Because the elution volume was too large to be completely injected in the electrophoretic system, a micro Tee piece was necessary as interface between SPE and CE. This interface splits the volume: one part is directed to the waste capillary, the other part to the separation capillary. Because the internal diameters of the waste and separation capillaries were equal, the split ratio was inversely proportional to the length ratio of those capillaries (see Table 2). Peak areas increased almost proportionally when a height for the two split ratios differed less and the resolution between cefoperazone and ceftiofur was higher when a larger split ratio was used. In further experiments, the 1:40 split ratio was chosen because of the better resolution. In this way, 2.5% of the elution volume was

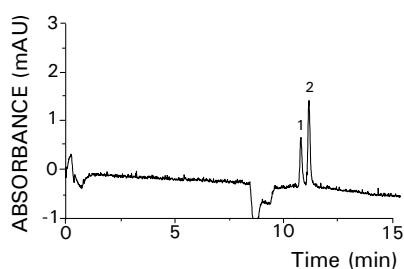
injected in the CE capillary. Figure 2 shows an example of the analysis of cefoperazone and ceftiofur at a concentration of 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  with 1:40 split ratio. The cephalosporins were baseline separated within 11 min. The negative signal at around 8 minutes is due to the acetonitrile plug used for desorption.

Detection limits ( $S/N = 3$ ) were 5  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  for both compounds at a detection wavelength of 254 nm using the Agilent CE system. Comparing with other CE systems in the literature for standards, cefoperazone presents lower detection limits with the proposed method than with the CZE method developed by Gàspar *et al.*, who could detect the cephalosporin down to 1.61  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  [29]. Two electrophoretic methods based on microemulsion electrokinetic chromatography at high pH and low pH were also used for the analysis of cefoperazone [18]. The sensitivity was improved by using the reversed electrode polarity stacking mode (REPSM) and a reverse migrating pseudostationary phase (SRPM) obtaining detection limits of 30 and 40  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . On the other hand, for

**Table 2.** Electrophoretic peak data for different split ratios in on-line SPE-CE system.

Split ratio		Cefoperazone	Ceftiofur
1:20	Area (mAU·s)	23.7	60.8
	Height (mAU)	2.6	6.4
	Resolution		1.4
1:40	Area (mAU·s)	14.6	36.5
	Height (mAU)	2.1	5.0
	Resolution		1.5

ceftiofur, better sensitivity was obtained in an in-line SPE-CE method (LOD of  $0.25 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) [12] in which the ratio between the sample and elution volumes in the SPE step was higher than in the present on-line SPE-CE method.

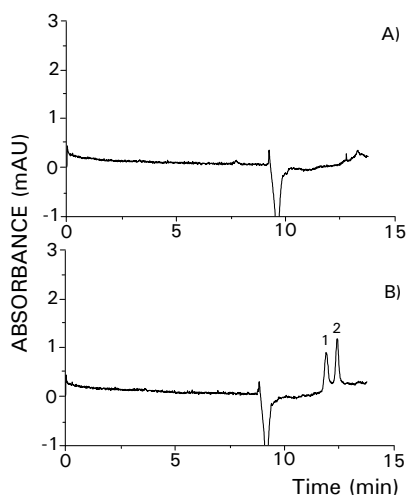


**Figure 2.** Electropherograms of a standard mixture of (1) cefoperazone and (2) ceftiofur at a concentration of  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . CE conditions: 25 mM ammonium acetate at pH 7.5; applied voltage, 25 kV. Capillary, uncoated fused-silica, 123 cm (effective length, 65 cm) and  $75 \mu\text{m}$  ID; temperature,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; detection wavelength, 254 nm. SPE conditions: sample volume:  $250 \mu\text{L}$ . Other conditions in Table 1.

### 3.2 Plasma analysis

The applicability of the method was evaluated by the analysis of spiked plasma samples. As plasma has a complex composition, the sample volume was reduced from 250 to  $50 \mu\text{L}$ , and a filter was included just after the sample loop (valve 1) in order to avoid clogging of SPE column. Nonetheless, direct injections of non-pretreated plasma samples led to rapid increase of the backpressure of the SPE column. Therefore, pretreatment of the plasma samples was necessary prior to introduction into

the SPE system. First, a dilution of the sample with water was tested because this appeared to be the simplest procedure. Blank plasma samples were diluted in two different ratios (1:4 and 1:10). The diluted plasma samples were directly injected into the system. Initially, good results were obtained for both dilution ratios when a plasma sample was spiked with cefoperazone and ceftiofur at a concentration of  $1000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Sensitivity is slightly reduced when using diluted plasma, in essence only a factor of 2 taking the sample volume into account. Unfortunately, the backpressure of the system increased considerably after a few runs, presumably because of protein adsorption in the SPE column. Therefore, another pretreatment procedure based on protein precipitation was tested [30]. In this case, 10% perchloric acid was added to precipitate the plasma proteins. Protein precipitation with an acidic solution was preferred over precipitation with organic solvents, such as acetonitrile, because these solvents reduce the breakthrough volume on the  $\text{C}_{18}$  SPE column. Moreover, evaporation of the organic solvent and reconstitution of the sample in an aqueous solvent would increase total analysis time. The electropherograms of Figure 3 show a satisfactory separation of cefoperazone and ceftiofur for a concentration of  $300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Figure 3B) and the absence of interfering compounds in the blank sample (Figure 3A).



**Figure 3.** Electropherograms obtained by on-line SPE-CE analysis of plasma samples after deproteinization with 10% perchloric acid A) Blank plasma and B) Plasma sample spiked with 300 ng·mL<sup>-1</sup> of cefoperazone and ceftiofur. SPE conditions: sample volume: 50  $\mu$ L. Other conditions as in Figure 2.

Loading of larger volumes of acid-deproteinized plasma samples (100 and 250  $\mu$ L) were also tested, but these resulted in a gradual increase of the backpressure of the system. Therefore, a volume of 50  $\mu$ L deproteinized plasma was used for further SPE-CE experiments.

The recovery factor of the pretreatment of the sample by precipitation with 10% of perchloric acid was studied by spiking plasma samples at 300 ng·mL<sup>-1</sup> and analyzing 3 replicates. The recoveries were 90% for cefoperazone and 57% for ceftiofur compared to the standard injections. These dissimilar peak area recoveries can be attributed to differences in retention on the SPE column. In more detail, at a pH below

pK<sub>a</sub> ceftiofur (2.62) cefoperazone is neutral and the retention on the C<sub>18</sub> sorbent is maximum, while ceftiofur is then positively charged and, thus, its retention is lower and can result in a loss of analyte mass.

The method was validated for biological samples (see Table 3) by spiking drug-free plasma samples with five known concentrations of the compounds. The samples were deproteinized and 50  $\mu$ L was loaded on the SPE column. The linear range was studied between 200 and 1500 ng·mL<sup>-1</sup> and adequate precision was observed at the 300 ng·mL<sup>-1</sup> level. Both intraday and interday precision were slightly higher than when standards were analyzed because of the additional deproteinization step. The detection limits were in the range of 50-100 ng·mL<sup>-1</sup> for the cephalosporins. Ceftiofur has been analyzed in plasma samples by HPLC-UV [4, 7-9, 31] with detection limits in the 150 ng·mL<sup>-1</sup> range. So, the SPE-CE results presented here are comparable to those reported LC-UV methods.

#### 4 CONCLUSIONS

A simple and sensitive CE method is presented for the simultaneous determination of ceftiofur and cefoperazone in plasma. The method developed for standards was adapted for the analysis of cephalosporins in plasma samples in the ng·mL<sup>-1</sup> range. The plasma samples were deproteinized, which avoided clogging of the SPE column. The simple pretreatment step for plasma samples, the high sensitivity (50-100 ng·mL<sup>-1</sup> for 50  $\mu$ L

**Table 3.** Linearity, calibration curves, relative standard deviations (RSDs) and detection limits (LODs) of the on-line SPE-CE method for plasma samples after deproteinization with 10% perchloric acid. Other conditions, see Experimental.

Compound	Range (ng·mL <sup>-1</sup> )	Calibration curves	R <sup>2</sup>	Intraday	Interday	LOD (ng·mL <sup>-1</sup> )
				Precision (a) (RSD)	Precision (a) (RSD)	
<i>CEFO</i>	200-1500	$y = 0.0173x + 1.761$	0.966	7.0	11.9	100
<i>CEFT</i>	200-1500	$y = 0.159x + 1.666$	0.976	3.6	8.1	100

a) RSD in terms of intraday precision. 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (n=5)

b) RSD in terms of interday precision. 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (n=5)

plasma) and the short overall analysis times are the main advantages of the presented approach. The validation data for analysis of the two cephalosporins are comparable to those reported in the literature for HPLC and show that the on-line SPE-CE method can be suitable for pharmacokinetic studies.

#### Acknowledgments

*The authors thank Willy Underberg for his helpful comments during the development of the method, and Gerard Wiese for his support with the SPE-CE experiments.*

*This study was financially supported by the Direcció General de Investigació of the Ministry of Science and Technology, project CTM2005-01774.*

#### 5 REFERENCES

- [1] V.F. Samanidou, E.A. Hapeshi, I.N. Papadoyannis, J. Chromatogr. B 788 (2003) 147.
- [2] K.L. Tyczkowska, R.D. Voyksner, K.L. Anderson, A.L. Aronson, J. Chromatogr. 614 (1993) 123.
- [3] J. Keever, R.D. Voyksner, K.L. Tyczkowska, J. Chromatogr. A 794 (1998) 57.
- [4] S. De Baere, F. Pille, S. Croubels, L. Ceelen, P. De Backer, Anal. Chim. Acta 512 (2004) 75.
- [5] F.J. Jiménez, M. Callejón, J.C. Jiménez, M.A. Bello, A. Guiráu, Chromatographia 62 (2005) 355.
- [6] S.A. Signs, T.M. File, J.S. Tan, Antimicrob. Agents Chemother. 26 (1984) 652.
- [7] C.B. Navarre, L. Zhang, G. Sunkarra, S.H. Duran, U.B. Kompella, J. Vet. Pharmacol. Ther. 22 (1999) 13.
- [8] F. Pille, S. Baere, L. Ceelen, J. Dewulf, S. Croubels, F. Gasthuys, P. Backer, A. Martens, Vet. Surg. 34 (2005) 610.
- [9] G.A. Jacobson, S. Martinod, C.P. Cunningham, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 1249.
- [10] Y. Mrestani, R. Neubert, A. Härtl, J. Wohlrab, Anal. Chim. Acta 349 (1997) 207.



- [11] Y. Mrestani, R. Neubert, J. Schiewe, A. Härtl, J. Chromatogr. B 690 (1997) 321.
- [12] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, Anal. Chim. Acta 587 (2007) 208.
- [13] G. Castaneda, M. Kelly, H. Maillols, H. Fabre, Anal. Chem. 69 (1997) 1364.
- [14] S.H. Tseng, Y.H. Yang, Y.R. Chen, S.H. Chen, Electrophoresis 25 (2004) 1641.
- [15] B.X. Mayer, U. Hollenstein, M. Brunner, H.G. Eichler, M. Müller, Electrophoresis 21 (2000) 1558.
- [16] T. Kitahashi, T. Furuta, J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 409.
- [17] H.H. Yeh, Y.H. Yang, Y.W. Chou, J.Y. Ko, C.A. Chou, S.H. Chen, Electrophoresis 26 (2005) 927.
- [18] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Chromatographia 62 (2005) 603.
- [19] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, J. Chromatogr. B 831 (2006) 196.
- [20] F.W.A. Tempels, G. Wiese, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. B 839 (2006) 30.
- [21] F.W.A. Tempels, J. Teeuwssen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 263.
- [22] N.F.C. Visser, M. Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 451.
- [23] T. Stroink, E. Paarlberg, J.C.M. Waterval, A. Bult, W.J.M. Underberg, Electrophoresis 22 (2001) 2375.
- [24] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 856 (1999) 483.
- [25] M. Petersson, K.G. Wahlund, S. Nilsson, J. Chromatogr. A 841 (1999) 249.
- [26] N.A. Guzman, Electrophoresis 24 (2003) 3718.
- [27] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, Anal. Chem. 76 (2004) 4432.
- [28] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Chromatographia 65 (2006) 501.
- [29] A. Gáspár, M. András, S. Kardos, J. Chromatogr. B 775 (2002) 239.
- [30] S. Sentellas, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Sep. Sci. 25 (2002) 975.
- [31] P.S. Jaglan, B.L. Cox, T.S. Arnold, M.F. Kubicek, D.J. Stuart, T.J. Gilbertson, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73 (1990) 26.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

**2.6. Combinació de tècniques electroforètiques  
i cromatogràfiques de preconcentració per  
a la determinació de  $\beta$ -lactames per  
electroforesi capil·lar**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

Per tal d'aprofundir en el coneixement de l'acoblament *on-line* SPE-CE, es va plantejar un nou estudi en el que es pretenia combinar aquesta tècnica de preconcentració cromatogràfica amb una tècnica de preconcentració electroforètica, concretament amb LVSS, per a la determinació de cefalosporines. Aquest treball es va portar a terme en el Grup de Cromatografia. Aplicacions mediambientals de la nostra universitat i ha suposat l'inici d'un àmbit de recerca nou dins de la investigació centrada en l'ús de l'electroforesi capil·lar en el que s'aprofundeix en els diferents aspectes relacionats amb l'increment de la sensibilitat per CE mitjançant l'ús de tècniques cromatogràfiques i la combinació d'aquestes amb tècniques electroforètiques.

Com ja s'ha comentat, en l'acoblament *on-line* SPE-CE, per tal d'obtenir una bona eficàcia de separació, no es pot introduir en el capil·lar de separació tot el volum d'elució procedent de l'SPE [1,2]. Per tal de poder augmentar el volum d'eluat injectat en el capil·lar, i així incrementar la sensibilitat, es va estudiar la possibilitat d'introduir una tècnica electroforètica de preconcentració que permeti la introducció de gran volums dintre del capil·lar d'CE. El mètode desenvolupat es va aplicar a la determinació de ceftiofur i cefoperazona.

Dels diferents tipus d'interfícies emprades en els acoblaments *on-line*, el de tipus vàlvula es va considerar el més adient per a poder combinar les tècniques cromatogràfiques amb les electroforètiques ja que, amb aquesta, s'aconsegueix un sistema elèctric tancat on es poden aplicar diferents polaritats sense que es produeixin problemes de fuites de corrent cap a l'exterior del sistema electroforètic. Així doncs, en el sistema *on-line* SPE-CE presentat en l'anterior apartat (apartat 2.5.1) [3], es va substituir la peça T per una vàlvula sense *loop* connectada *in-line* a dos capil·lars a través dels quals, a l'aplicar un potencial determinat, es produïa un corrent que va permetre la preconcentració i/o la separació electroforètica dels analits. Així doncs, l'objectiu de la utilització d'aquesta vàlvula era només la de introduir un gran volum d'eluat (de l'ordre de 2 mL) procedent de l'SPE en el capil·lar

de separació i no va ser utilitzada per a mesurar del volum exacte injectat en el capil·lar.

Breument, el mètode es va basar en un sistema de flux continu emprant aigua com a fase mòbil. Es va emprar un sorbent  $C_{18}$  per preconcentrar 250  $\mu\text{L}$  de mostra i l'elució es va realitzar amb 426 nL d'acetonitril. Una vegada realitzada l'elució, el volum corresponent a l'eluat es va injectar en el capil·lar d'CE. En aquest punt, en aplicar un potencial negatiu, el EOF és el responsable de l'eliminació del solvent de la mostra per l'extrem del capil·lar on s'aplica el voltatge donant lloc a la preconcentració dels analits. En monitoritzar el corrent del sistema, quan s'arribà al 95% del valor original, es va canviar el voltatge a 25 kV per tal de realitzar la separació per CZE.

Entre els paràmetres estudiats cal destacar el temps necessari per a que el volum d'elució arribi a la interfície (*delay time*) i el temps durant el qual es va introduir aquest en el capil·lar de separació (temps total d'introducció de l'eluat). Per a l'optimització d'aquests paràmetres es van estudiar diferents temps, entre 10 i 70 s. Els millors resultats es van obtenir amb un *delay time* de 20 s i un temps total d'introducció de l'eluat de 50 s. Amb aquestes condicions, es va observar que les àrees tant del pic corresponent al ceftiofur com del corresponent a la cefoperazona presentaven uns valors màxims.

Una vegada establert el mètode, es van avaluar la linealitat, la repetibilitat i la reproductibilitat. Es van obtenir uns bons valors per a tots els paràmetres de manera que el mètode va presentar un bon comportament lineal en l'interval  $0.5\text{-}10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  amb coeficients de correlació superiors a 0.996 i una correcta precisió amb valors inferiors a 9.2% com a % RSD per una concentració de  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Els límits de detecció, tant pel ceftiofur com per la cefoperazona van ser de  $0.2\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , valors més baixos que els obtinguts amb el mètode sense l'etapa de LVSS (amb la peça T) desenvolupat en el treball anterior [3] que van ser de  $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en el cas dels estàndards.

Els resultats derivats d'aquest estudi es troben inclosos en el treball que es presenta a continuació (apartat 2.6.1). Aquest treball s'ha enviat a la revista *Electrophoresis* per a la seva publicació.

### **Bibliografia**

- [1] F.W.A. Tempels, J. Teeuwsen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. A 1053 (2004) 263.
- [2] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. Jong, Anal. Chem. 76 (2004) 4432.
- [3] P. Puig, F.W.A. Tempels, M. Calull, C. Aguilar, F. Borrull, G.W. Somsen, G.J. Jong, J. Chromatogr. B (2007) (in press).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



***2.6.1 Use of stacking principles in on-line solid-phase—capillary electrophoresis for improved sensitivity***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## USE OF STACKING PRINCIPLES IN ON-LINE SOLID-PHASE EXTRACTION—CAPILLARY ELECTROPHORESIS FOR IMPROVED SENSITIVITY

Patricia Puig<sup>1</sup>, F.W. Alexander Tempels<sup>2</sup>, Govert W. Somsen<sup>2</sup>, Gerhardus J. de  
Jong<sup>2</sup>, Francesc Borrull<sup>1</sup>, Carme Aguilar<sup>2</sup>, Marta Calull<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Rovira i Virgili University.

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

<sup>2</sup>Department of Biomedical Analysis. Utrecht University.

Sorbonelaan 16, NL-3584 CA UTRECHT, The Netherlands

---

### Abstract

We present a new system for the sensitive analysis of cephalosporins by capillary electrophoresis (CE) using both on-line solid phase extraction (SPE) and large volume sample stacking (LVSS). Sample volumes of 250  $\mu\text{L}$  were loaded onto the SPE microcolumn which was then desorbed with 426 nL of acetonitrile. The SPE elution plug was injected into the CE system via a in-line valve interface filling approximately 60% of the volume of the separation capillary. Subsequently, LVSS was performed by applying a voltage of -5 kV, which resulted in the simultaneous removal of the elution solvent and the preconcentration of the analytes in a narrow zone. This way the amount of analyte loaded into the capillary could be considerably increased without serious loss of CE separation efficiency. Limits of detection for cefoperazone and ceftiofur were in the  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  range which represents an improvement of a factor of 8450 and 11450 when compared with direct CE injection. The cephalosporin test compounds presented a good linear response (corrected peak area) between 0.5 and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  with correlation coefficients higher than 0.995. The final method is compared with previously reported LVSS-CE and SPE-CE systems for the analysis of cephalosporins.

**Keywords:** Solid-phase extraction; capillary electrophoresis; on-line; on-column; large volume sample stacking; cephalosporins

---

## 1 INTRODUCTION

Capillary electrophoresis (CE) has developed into a powerful tool for the analysis of pharmaceutical compounds. It has the advantages of high separation efficiency, high analysis speed, low consumption of samples and reagents, and ease of automation. However, one of the main drawbacks of CE with UV detection is its low sensitivity in terms of analyte concentration. This low sensitivity is associated to both the small optical path-length provided by the separation capillary and the small volumes that can be injected (in the low nL range). Several approaches have been proposed to overcome this limitation [1-11]. Among these, methods based on sample preconcentration are attractive options. Such methods can be categorized into two groups: those based on electrophoresis [5-8] and those based on chromatography [9-11]. Electrophoretic preconcentration techniques, which are usually carried out in-capillary, involve the adjustment of the electrophoretic velocity of the analytes by manipulating the conductivity or pH of the sample, or by partitioning into a pseudostationary phase. One makes use of different velocities of the analyte in two separate zones in the capillary: in one zone, the analyte has a high electrophoretic mobility and in the second a low electrophoretic mobility, resulting in the focusing of the analyte molecules on the boundary between the two zones [12].

Chromatographic preconcentration techniques involve the trapping of analytes into a stationary phase. Solid-phase extraction (SPE) is the most frequently used chromatographic preconcentration technique in combination with CE. In SPE analytes are trapped on a sorbent packed in a small column and subsequently desorbed with a (preferably small) volume of a suitable solvent [9-11]. Compared with electrophoretic preconcentration techniques, the main advantage of SPE is that sample volumes larger than the volume of the separation capillary can be loaded and preconcentrated. Four modes of combining SPE and CE have been developed: off-line [5,13], at-line [11], in-line [9,14] and on-line [15,16].

Most often SPE is performed off-line, separate from the CE separation using a range of commercial SPE cartridges [5,13]. An alternative approach is the coupling of SPE and CE using a robotic interface (at-line mode) [11]. However, for SPE-CE, in-line and on-line couplings are preferable because of automation possibilities and a minimum of sample handling. In the on-line mode an interface is needed to connect the SPE column and the CE system [17-19]. Reported interfaces for SPE-CE are the valve [20], the T piece [15,16,21] and the vial [17,18, 22] types. The main advantage of on-line systems in comparison with in-line systems is that the sample matrix does not enter the separation capillary. This means that when complex matrices are analyzed potential adsorption of matrix components to the capillary wall is circumvented.

Moreover, in the on-line approach SPE and CE steps can be carried out quite independently. Nevertheless, the availability of efficient interfaces is crucial in on-line SPE-CE as dead volumes present in the interface can result in serious band broadening which is associated with a loss of resolution.

On-line coupling of SPE and CE has been achieved successfully and applied to the several compounds in various kinds of samples [16,18,21]. An important issue in on-line SPE-CE systems, however, is the discrepancy between the relatively large SPE desorption volumes ( $\mu\text{L}$  range) and the allowable injection volumes in CE (nL range). As a result, in most on-line SPE-CE set-ups a large part of the SPE eluate is discarded in order to maintain the CE separation efficiency [15-18, 20-22]. This can be done by continuously splitting the SPE eluate [15-18] or by introducing a distinct part of the eluate into the separation capillary [20]. Obviously, injection of only a small part of the SPE eluate leads to an overall loss of concentration sensitivity. If the injection of a higher (or the whole) part of the eluate in the CE system would be possible, higher sensitivities can be obtained.

In a previous paper of our group, a stacking method was introduced

which allowed injection of relatively large volumes of cephalosporin samples without sacrificing CE resolution [14]. With this large volume sample stacking (LVSS) method, the capillary is first almost completely filled with sample, and then a negative voltage is applied to simultaneously remove the sample solvent and focus the analytes in the boundary between the sample and background electrolyte zones. After focusing, a positive voltage is applied to conduct normal CE analysis [14]. This way, concentration limits of detection for cephalosporins could be improved with a factor of 12 [14].

Recently, we introduced a versatile on-line SPE-CE system employing an in-line positioned microvalve as interface [20]. In order to further improve the sensitivity of this system, here we present an SPE-CE method in which LVSS is used to allow the introduction of the complete SPE eluate in the separation capillary via a valve interface. The cephalosporins cefoperazone and ceftiofur have been used as model compounds in the development, optimization and validation of the method. The resulting method is compared with other preconcentration techniques used in cephalosporin analysis. To our knowledge, this is the first report showing the possibilities of the combined use of on-line SPE-CE and LVSS.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Chemicals and standards

Sodium hydroxide (NaOH) was purchased from Prolabo (Bois, France), acetonitrile (ACN) from SDS (Peypin, France). Cefoperazone and ammonium acetate were supplied from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and ceftiofur was kindly donated by Pzifer (Madrid, Spain). Demineralized water was obtained using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). In order to reduce gas bubble formation, acetonitrile was sonicated for 5 min before used.

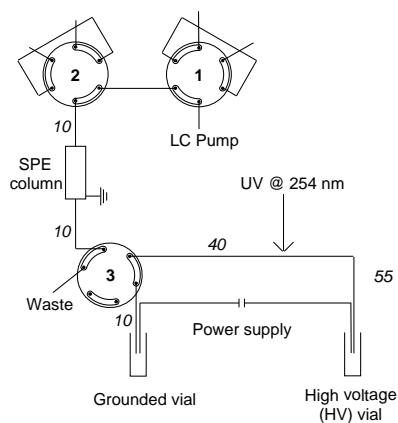
Stock solutions ( $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of cefoperazone and ceftiofur were prepared by weighing 10 mg of each compound into separate 10 mL volumetric flasks and dissolving the

materials in ultrapure water. The solutions were stable for at least 1 month when stored at  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  and protected against direct sunshine. Working standard solutions were freshly prepared by dilution of the stock solution with ultrapure water. A solution of 25 mM ammonium acetate at pH 7.5 was used as background electrolyte for the CZE separation. All solutions were filtered through  $0.22 \text{ }\mu\text{m}$  membrane filters (Tracer, Teknokroma, Barcelona, Spain) prior to use.

### 2.2 Instrumentation

#### *Equipment*

The on-line coupling of SPE system with CE was accomplished through an in-line six port valve. The complete system is shown in Figure 1.



**Figure 1.** Schematic diagram of the on-line SPE-CE system with the in-line valve interface. System components and dimensions are described in Section 2.2.

Solid phase extraction was performed with a PepMap C<sub>18</sub> SPE column (5 mm\*0.5 mm ID, 5 µm particles, 100 Å pores) (LC Packing-A Dionex Company, Amsterdam, The Netherlands). The mobile phase for SPE was supplied by an HP series 1100 IsoPump (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) at a flow rate of 3 and 50 µL·min<sup>-1</sup> depending on the SPE step. The samples were injected into the SPE column with a loop of 250 µL placed in a Rheodyne 7010 valve (valve 1 in Figure 1) (Rhonert Park, CA, USA). Elution of the analytes from the SPE column was performed by a 426 nL loop placed in a VICI Cheminert C2-1006 (valve 2 in Figure 1 (VICI Ag/Valco International, Schenkon, Switzerland). To connect the SPE system to CE, an in-line valve interface was used (valve 3 in Figure 1) (model M-485, Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). Valve 3 was a 6-port valve with a port-to-port volumes of 35 nL. The internal pathways are manufactured from ceramics providing electrical insulation from the metal injector body. This allows high-voltage to be applied throughout the full analysis procedure. The final SPE-CZE system consisted of a capillary of 10 cm placed in a grounded vial and a separation capillary of 95 cm full length (55 cm effective length) placed in the high voltage vial (HV vial) inside the CE instrument. Bare fused-silica capillaries for CZE separation (75 µm ID \* 375 µm OD) were purchased from Polymicro (Polymicro Technologies, Phenix, AZ, USA).

The tubing connecting the LC pump a valve 1 was red PEEK (1/16 in OD, 0.030 in. ID) (Upchurch Scientific, Oak Harbor, WA, USA). The other connections were all done with the 75 µm ID fused silica capillary except for the loop in valve 2 which was made of fused silica capillary of 50 µm ID \* 375 µm OD) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Electrophoretic analysis were performed on an Hewlett-Packard <sup>3D</sup>CE capillary electrophoretic system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector working at 214 and 254 nm. HPChemStation (Agilent) version A:04:01 was used for CE instrument control, data acquisition and data analysis.

#### CZE procedure

In a so-called *normal* CZE analysis, a 105 cm length capillary (effective length 55 cm) was used. When the interface was added, the system consisted of a separation capillary of 95 cm length, the interface and a 10 cm length capillary. The detection window was placed at 55 cm from the end of the capillary close to the HV vial. Separation was performed with a potential of 25 kV applied to the HV vial, while the other end side is in a grounded vial. The background electrolyte (BGE) used for the CE separation was 25 mM ammonium acetate (pH 7.5).

Before use, the fused-silica capillary was washed with 1 M NaOH, water and BGE for 10 min each. A voltage

of 25 kV was then applied for 10 min. The capillary was conditioned every day before starting a sequence of runs by flushing for 5 min with 0.1 M NaOH, 5 min with water and 5 min with the BGE. It was then equilibrated with the BGE for 5 min applying the separation voltage of 25 kV. Between experiments, the capillary was rinsed with NaOH 0.1 M, water and BGE for 2 min each.

#### *LVSS procedure*

LVSS started after the introduction of the sample through of the HV end or by valve 3. Then a stacking voltage of -5 kV was applied in order to electroosmotically push the whole plug towards the HV end of the capillary. The stacking step was finished when 95% of the current normally obtained with a BGE-filled capillary was reached. At this point, the stacking voltage was stopped and the

separation voltage (25 kV) was applied in order to perform the CZE separation.

#### *Procedure for SPE-CZE with LVSS*

The complete SPE-CZE system and method including LVSS are outlined in Figure 1 and Table 1. First, the sample is introduced through valve 1 into the SPE column by pumping water as mobile phase at 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . After loading 250  $\mu\text{L}$  of sample, the trapped cephalosporins were desorbed by a plug of 426 nL of acetonitrile (3  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) by switching valve 2. After 20 s, the elution plug reached the interface and it was led for 50 s into the separation capillary by switching valve 3 to the inject position. Then, after 50 s more, valve 3 was changed to the load position so that voltage can be applied through the capillaries that are placed into the grounded and HV vials.

**Table 1.** Procedure used for the on-line SPE-CE

Time (min)	Flow ( $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ )	Valve 1	Valve 2	Valve 3	Voltage (kV)	Current ( $\mu\text{A}$ )	
	50	Load	Load	Load	0	0	Fill loop of valve 1
0	50	Inject	Load	Load	0	0	Injection of sample
8	3	Inject	Load	Load	0	0	Change pump flow Fill loop of valve 2
9	3	Inject	Inject	Load	0	0	Injection of elution solvent
9:20	3	Inject	Inject	Inject	0	0	Introduction of the elution plug into the CZE capillary
10:10	0	Inject	Inject	Load	0	0	Stop introduction of the elution plug into the CZE capillary
10:15	0	Inject	Inject	Load	-5	0	Start LVSS (-5 kV)
—	0	Inject	Inject	Load	0	$\approx 5.5$	Stop LVSS (-5 kV)
—	0	Inject	Inject	Load	25	$\approx 30$	Start CE analysis (25 kV)



The sorbent was daily conditioned by pumping H<sub>2</sub>O, ACN, H<sub>2</sub>O for five minutes each at a rate of 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . At the end of the day, the SPE system was washed for 10 min with water.

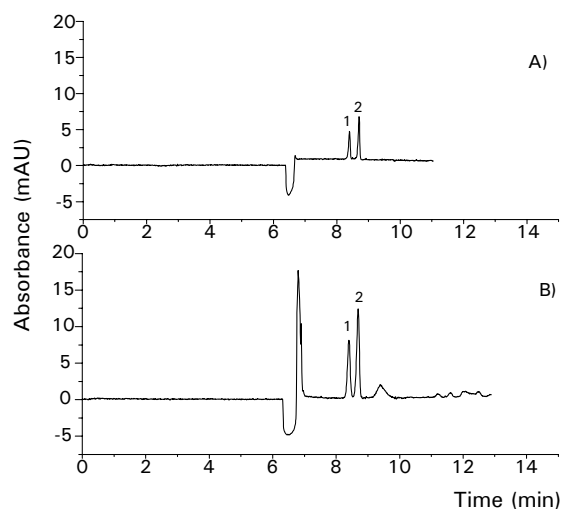
### 3 RESULTS AND DISCUSSION

The CZE separation and LVSS procedures were optimized under normal CZE conditions (system I) using a 105 cm length separation capillary (effective length, 55 cm). Then, the in-line valve was included (system II) and the sample introduction via the valve and the resulting CE performance was tested.

Finally, the SPE column was included and the complete SPE-CZE procedure including LVSS (system III) was investigated.

#### System I: CZE and LVSS

Normal CZE analysis of a mixture of cefoperazone and ceftiofur using conditions as described previously [13] resulted in a full separation ( $R_s > 1.5$ ) with an excellent efficiency (Table 2). The electropherogram of a standard sample which contains the cephalosporins at a concentration of 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  is shown in Figure. 2A.



**Figure 2.** CZE-UV of a mixture of cefoperazone (1) and ceftiofur (2). A) normal injection of 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in water and B) LVSS of 1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  in ACN. CZE conditions: BGE, 25 mM ammonium acetate (pH 7.5); normal injection, 50 mbar for 10 s; separation voltage, 25 kV; LVSS conditions: 50 mbar for 327 s, followed by stacking voltage of -10 kV until 95% of original current; capillary bare fused-silica of 105 cm (effective length, 55 cm) and 75  $\mu\text{m}$  ID; temperature, 25  $^{\circ}\text{C}$ ; detection wavelength, 214 nm.

LVSS of the cephalosporins was first tested using water as solvent. A volume of 1.5  $\mu\text{L}$  of the cephalosporin standard mixture was hydrodynamically injected at the HV end of the capillary by applying 50 mbar for 327 s. A stacking voltage of  $-10$  kV was then applied until a value of 95% of the current obtained during normal CZE operation was reached, which took about 5 min. The migration times obtained for the cephalosporins were stable and similar to the ones obtained with direct sample injection using normal CZE (Table 2). Cefoperazone and ceftiofur were separated with acceptable resolution. Nevertheless, some band broadening is observed leading to plate numbers for both compounds of about 50.000. Overall, the LVSS results in an improvement of the concentration sensitivity (based on peak area) of a factor of about 30 when compared with direct sample injection.

As acetonitrile is used to desorb the SPE column, LVSS was also tested with this solvent applying the same procedure as for the aqueous sample. Figure 2B shows the resulting electropherogram for a standard mixture of cephalosporins ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  each in acetonitrile). The time required for stacking (i.e. the time needed for the current to reach 95% of the current under normal CZE conditions) was now 8 min, which means that the total analysis time is increased when compared to using water as solvent. However, no significant differences were observed in the electrophoretic peak data when compounds were dissolved in water or in acetonitrile (Table 2). It is worth noting that, even with the stacking step, both solvents presented good intra-day precision in peak area ( $\leq 3.0\%$ ) and migration time ( $\leq 1.0\%$ ).

**Table 2.** Analytical data for the CZE analysis of cephalosporins (system I)<sup>a</sup>.

	Direct injection ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )		LVSS (water) ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ injected)		LVSS (acetonitrile) ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ injected)	
	CEFO	CEFT	CEFO	CEFT	CEFO	CEFT
<b>Migration time (min)<sup>b</sup></b>	8.37 (0.59)	8.66 (1.05)	8.54 (0.85)	8.86 (0.91)	8.38 (0.93)	8.67 (0.91)
<b>Peak area (mAU/min)<sup>b</sup></b>	14.48 (0.78)	21.53 (0.70)	43.05 (1.02)	67.34 (1.51)	46.27 (2.07)	71.26 (3.00)
<b>Plate number</b>	104736	118764	44944	51686	40199	44340
<b>Preconcentration factor (based on peak area)</b>	—	—	29.13	31.64	31.90	32.29

<sup>a</sup> Experimental conditions as Fig. 2.

<sup>b</sup> between brackets, % RSD (intra-day precision,  $n = 5$ )

### *System II: CZE and LVSS with the in-line valve*

System II was used to determine if the presence of the in-line valve (valve 3) and the introduction of sample through this valve affect the CE performance and analyte response. The 105 cm length capillary used in system I was cut in two parts (95 and 10 cm length, respectively) and connected to valve 3 as depicted in Figure. 1. Valve 2 and 3 were connected by a 75- $\mu\text{m}$  fused-silica capillary of 30 cm length.

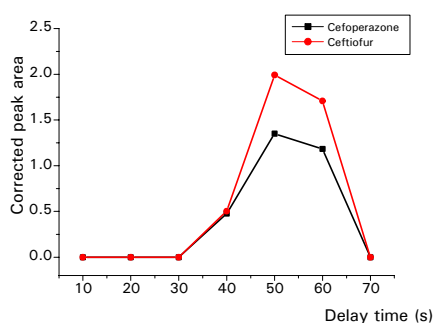
When LVSS was used for cefoperazone and ceftiofur ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), migration times (9.65 and 10.05 min) were higher than in system I. Despite this, the area values ( $48.58$  and  $72.22 \text{ mAU}\cdot\text{min}^{-1}$ ) were similar in both systems, which means that the influence of valve 3 is small. From these results it can be concluded that LVSS can be performed properly even if the valve is present in the system.

Next, the sample introduction into the separation capillary by valve 3 was studied. The loop on valve 2 (426 nL) was filled with cephalosporins dissolved in ACN and then the valve was switched and the loop content was transferred to valve 3 with water ( $3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). When the ACN plug reaches valve 3, it was switched to the inject position so that the sample flows into the separation capillary. The time between the subsequent switching of valve 2 and 3 is mentioned the delay time. The time that valve 3 is in the inject position is referred to as the total injection time.

Once the sample was injected into the separation capillary and valve 3 was switched back to the load position, two stacking options were considered: i) stacking of the analytes in the grounded end of the capillary, and ii) stacking the analytes in the HV end of the capillary. With the first option sometimes current breakdowns were observed, probably due to the presence of the stacking zone inside valve 3. Therefore, stacking in the HV end was preferred. In order to prevent from gas bubbles formation which led to breakdown of the electrophoretic separation process, the stacking voltage was changed from -10 to -5 kV. Stacking was applied until the current reached 95% of the value obtained when the capillary was filled with BGE. Then, the voltage was switched to 25 kV in order to separate the cephalosporins by CZE. It should be pointed out that water was used instead of BGE for transferring the ACN plug into the capillary. This way the low conductivity conditions needed for proper LVSS were maintained.

In principle, two different forms of moving or pushing the sample matrix from the valve 3 to the HV side can be used: hydrodynamically or electrokinetically. Hydrodynamically, the sample plug is pushed by pressure to the HV end and then a stacking voltage is applied to remove the sample solvent and preconcentrate the analytes. Electrokinetically, only a negative voltage is needed to simultaneously push the sample (by the electroosmotic flow), remove the sample solvent and stack the

analytes. For reasons of simplicity, we chose to push the sample by applying voltage. The resulting LVSS procedure was as follows: after introducing the elution plug in the separation capillary (by the pump flow), the valve was switched and an initial stacking voltage of -10 kV was applied until the current reached the 95% of the original value. Then, the voltage was switched to 25 kV in order to separate the cephalosporins by CZE.

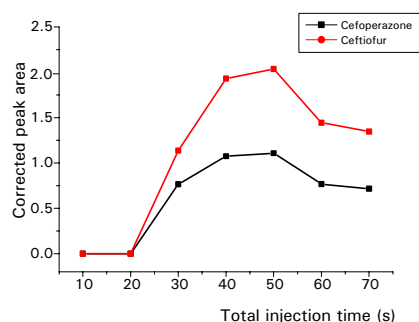


**Figure 3.** Corrected peak area of cefoperazone and ceftiofur ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) versus delay time obtained with the in-line injection valve-CE system (system II). Total injection time: 30 s. LVSS conditions: stacking voltage, - 5 kV until 95% of the original current. Other conditions as in Figure 2B.

The influence of delay time and the total injection time were investigated using system II applying LVSS. The delay time is important in order to start sample injection when the sample plug actually arrives at valve 3 and, thus, to avoid injection of plain solvent or loss of sample. The total injection time determines the volume of sample that actually is injected into the separation capillary. Both the delay and injection times were

optimized in order to maximize the method sensitivity (Figures 3 and 4). The delay time was evaluated in the 10-70 s range while using a fixed total injection time of 30 s. Figure 3 shows that maximum peak areas for the cephalosporins are found at a delay time of 50 s. The total injection time was optimized using a fixed delay time of 50 s. As expected, the peak areas for the cephalosporins increase with increasing total injection time, and then reach a plateau when the complete sample plug is injected (Figure 4). The decrease of peak area for total injection times larger than 50 s can be explained by the fact that the front of the sample plug has reached the capillary end and partly flows into the BGE vial. It is important to note that the use of larger injection times did not require longer times to perform LVSS. An electropherogram of the cephalosporin test mixture ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) using system II with LVSS and optimum delay and total injection times is depicted in Figure 5A showing that efficient LVSS can be achieved when the sample is delivered via valve 3. When comparing with system I, a slight increase of the cephalosporin migration times can be observed which most probably is due to the presence of valve 3 in the electrophoretic system. The method reproducibility in terms of intra-day precision of peak area and migration times was about 3% (Table 3) which would be sufficient to allow quantification of the compounds with an acceptable reliability. The obtained separation for the cephalosporins is still sufficient, although the plate numbers decreased when compared

to system I. Some extra band broadening occurs most probably because of the dead volume of the in-line valve and the backpressure of the valve which induces a disturbance of the flow profile.



**Figure 4.** Corrected peak area of cefoperazone and ceftiofur ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) versus injection time obtained with the in-line injection valve-CE system (system II). Delay time: 50 s. Other conditions as in Figure 3.

#### *System III: On-line coupling of SPE-LVSS-CZE system with the in-line valve*

Next the SPE column was introduced into the system (Figure. 1). SPE breakthrough volumes, desorption efficiency and elution volume of cefoperazone and ceftiofur have been studied previously [16]. The same SPE conditions were applied. In this way, 250  $\mu\text{L}$  of sample were loaded into the system and the analytes kept retained in the SPE column. After 9 min, the elution plug (426 nL of acetonitrile) was introduced in the continuous flow system and the analytes were eluted. Then, after a

delay time, valve 3 was switched and the plug was injected into the CE capillary. Once the complete eluate was introduced into the CE capillary, a voltage of -5 kV was applied in order to start with the LVSS step. While the solvent was flushed out of the capillary in the HV end, the current increased until it arrived to the 95% of the value corresponding to the normal CZE conditions. At this point, the CZE separation was started by applying 25 kV.

As the 30 cm capillary between valve 2 and 3 was now replaced by the SPE column and two 10 cm capillaries, the delay time and total injection time were optimized using 250  $\mu\text{L}$  of a mixture of cefoperazone and ceftiofur ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  each) in water which was loaded onto the SPE column. Taking a constant total injection time of 50 s, the delay time was varied from 10 to 70 s in intervals of 10 s. With a delay time of 20 s, maximum peak areas were obtained. Variation of the total injection volume while keeping the delay time 20 s, showed an increase of peak areas until a total injection time of 50 s. No further gain in sensitivity was observed when total injection times higher than 50 s were used. Figure 5B shows the result using a total injection time of 50 s, and starting injection 20 s after starting the desorption of the SPE column (i.e. the delay time). Intense cephalosporins peaks are observed which are well separated. The analytical data of the SPE-CE system with LVSS are summarized in Table 3.

Comparing electrophoretic parameters of system II and III in Table 3, we can see that migration times of the cephalosporins increased when the SPE step was included (system III). That led to a better separation of the cefoperazone and ceftiofur in system III compared with system II. The plate numbers decreased to about half of the values reported without SPE, but the separation was still sufficient. Moreover, due to the more complex procedure, the precision of the migration times and peak areas were worse in the system III. Improvement would be obtained by incorporating computer-controlled valve and voltage actuation instead of manual actuation.

Regarding to the preconcentration factors they significantly improved by the fact of introducing the SPE step. As it can be seen in Table 3, the preconcentration factors measured in system II due to the LVSS step are around 20 and in system III with the SPE and LVSS steps they were 8450

and 11450 for cefoperazone and ceftiofur, respectively. This means that the improvement of including the SPE step is around 500, more concretely, 512 and 575 for cefoperazone and ceftiofur, respectively. These results are coherent with the expected gain for SPE which is around 588 (ratio between loops of sample volume (250  $\mu\text{L}$ ) and elution solvent (426 nL). However, it should be noted that the reported preconcentration factors for the SPE-CE procedure are related to the fact of applying LVSS; otherwise, part of the eluate should be discarded to the waste in order to obtain an efficient CE separation.

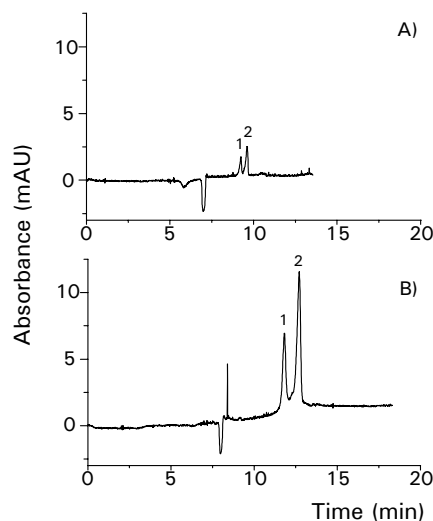
The performance of the complete SPE-CE system with LVSS was tested and the results are given in Table 4. The calibration curves (based on the migration-time corrected peak area) were made for concentrations between 0.5 and 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and good linearities were obtained with

**Table 3.** Analytical data for the CZE (system II) and SPE-CZE (system III) analysis of cephalosporins<sup>a</sup>.

	System II: V3-CZE (1 mg·L <sup>-1</sup> injected)		System III: SPE-CZE (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ injected)	
	CEFO	CEFT	CEFO	CEFT
<b>Migration time (min)<sup>b</sup></b>	9.25 (3.01)	9.61 (3.25)	11.82 (8.70)	12.72 (9.20)
<b>Peak area (mAU/min)<sup>b</sup></b>	10.57 (2.66)	19.55 (2.75)	68.97 (3.57)	148.57 (3.04)
<b>Plate number</b>	26616	21413	11045	13913
<b>Preconcentration factor (based on peak area)</b>	16.5	19.9	8450	11450

<sup>a</sup> Experimental conditions as Fig. 5.

<sup>b</sup> between brackets, % RSD (inter-day precision, n = 5)



**Figure 5.** CZE-UV of a mixture of cefoperazone (1) and cefotiofur (2) using A) LVSS of 426 nL sample ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (system II), and B) on-line SPE (system III) of 250  $\mu\text{L}$  of sample ( $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and LVSS. Delay time: A) 50 s and B) 20 s. Total injection time: A) and B) 50 s. Other conditions as in Figure 3.

correlation coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.995. The limit of detection for both cephalosporins, based on a signal-to-noise ratio of 3, was  $0.2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This implies a factor of 50 gain in sensitivity when compared with a recently reported on-line SPE-CZE system using a T-split interface but no LVSS (LODs  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [16].

Repeatability of the results was examined by performing five replicate measurements of the  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mixture of cefoperazone and ceftiofur using the SPE-CE procedure with LVSS for one day (intra-day precision) and for five days (inter-day precision). Good precision with RSD's lower than 3.6 was obtained.

**Table 4.** Linearity, calibration curves, repeatability (RSD), and detection limits (LODs) of the on-line SPE-CZE with LVSS method.

Compound	Range ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Calibration curves	$R^2$	Intraday precision (RSD)(*)	Interday precision (RSD)(*)	LODs ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<i>CEFO</i>	0.5-10	$y = 0.5944x + 0.3154$	0.9968	2.01	3.57	0.2
<i>CEFT</i>	0.5-10	$y = 1.0312x + 0.5914$	0.9958	2.55	3.04	0.2

(\*) RSD of peak area determined at a concentration of  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $n=5$ ); Other conditions as in Figure 5.

The results obtained for the determination of ceftiofur by on-line SPE-CZE with LVSS have been compared with other SPE-CE systems. In Table 5, the parameters for the various methods are listed. It can be seen that the sample volumes needed for the preconcentration are relatively low, in the order of hundreds of  $\mu\text{L}$ . On-line SPE-CE with T-split interface presents the shortest total analysis time (25 min), but the other in-line and on-line methods are still well within 1 hour (~50 min). Regarding sensitivity, in-line SPE-CE and on-line SPE-CE with LVSS appear to be the most sensitive methods with detec-

tion limits equal or lower than  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . These two systems are very similar in performance and results. However, with the in-line method the sample flushes through the CE capillary, which can lead to unwanted adsorption of matrix compounds to the capillary walls if complex samples are analyzed, in the on-line SPE-LVSS-CE method the sample matrix is removed through the SPE step. Regarding to the inter-day precision, the three options did not present significant differences, although on-line SPE columns were commercially available and the in-line ones were home-made.

**Table 5** Results reported in the literature for the determination of ceftiofur and/or cefoperazone using SPE-CE systems.

Compound	In-line SPE-CE [14]	On-line SPE-CE T-split interface [16]	On-line SPE-LVSS-CZE Valve interface
<i>Matrix</i>	Standards	Standards	Standards
<i>Sample volume</i>	265 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$
<i>RSD (%)</i>	8.9	<11.5	<9.2
<i>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	0.25	10	0.2
<i>Total analysis time</i>	45 min	25 min	50 min

#### 4 CONCLUSIONS

The use of LVSS has been proposed as a method to further increase the sensitivity of on-line SPE-CE. By combining sample stacking techniques and SPE, the complete SPE eluate could be injected into CE system. In this way, sensitivity was improved and cephalosporins presented detection limits of  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This limit of detection is 50 times lower than that obtained without LVSS. In this way,

results are coherent with results previously presented in an on-line SPE-CE system with T-split in which only 2.5% of the total elution plug of  $1.8 \mu\text{L}$  could be injected in the CE capillary and the other part of the eluate were discarded to waste [16]. The comparative study among different preconcentration protocols has shown that SPE-CZE with LVSS provides comparable results in terms of sensitivity gain, efficiency, and reproducibility. Moreover, it solves the



problem of the sample flushing through the separation capillary in the in-line mode and it improves the sensitivity of the on-line option with a T-split interface. The on-line SPE-LVSS-CZE presented here, has demonstrated potential for the determination of cephalosporins. Next studies will involve application of the method to real samples. The system can be used with other on-line sample treatments and detection modes that require the outlet end to be grounded (e.g. electrochemical, mass spectrometry, and conductivity detection). Although only LVSS was investigated in this study, other on-column stacking techniques could be applied for the sensitivity improvement of on-line SPE-CE coupling.

#### **Acknowledgments**

This study was financially supported by the Dirección General de Investigación of the Ministry of Science and Technology, project CTM2005-01774.

#### **5 REFERENCES**

- [1] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis* 21 (2000) 2768.
- [2] X. Z. Wu, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 48.
- [3] S. Sentellas, L. Puignou, M. T. Galceran, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 975.
- [4] B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem* 22 (2003) 605.
- [5] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 234.
- [6] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Chromatographia* 62 (2005) 603.
- [7] J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 339.
- [8] N. Maeso, A. Cifuentes, C. Barbas, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 147.
- [9] N. Guzman, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 197.
- [10] J. C. M. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingeman, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 21 (2000) 2851.
- [11] J. Ruiz-Jiménez, J. M. Mata-Granados, M. D. Luque de Castro, *Electrophoresis* 28 (2007) 789.
- [12] G. Hempel, *Electrophoresis* 21 (2000) 691.
- [13] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Chromatographia* 65 (2007) 501.
- [14] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 208.
- [15] F. W. A. Tempels, J. Teeuwsen, I. Kyriakou, G. Theodoridis, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263.
- [16] P. Puig, F. W. A. Tempels, M. Calull, C. Aguilar, F. Borrull, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *J. Chromatogr. B* (2007) in press.
- [17] T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J. C. M. Waterval, A. Bult, G. J. de Jong, W. J. M. Underberg, *Electrophoresis* 25 (2003) 8971.

- [18] N. F. C. Visser, M. Harmelen, H. Lingeman, H. Irth, J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 451.
- [19] E. Bonneil, K. C. Waldron, Talanta 53 (2000) 687.
- [20] F. W. A. Tempels, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, Anal. Chem. 76 (2004) 4432.
- [21] F. W. A. Tempels, G. Wiese, W. J. M. Underberg, G. W. Somsen, G. J. de Jong, J. Chromatogr. B 839 (2006) 30.
- [22] T. Stroink, P. Schravendijk, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J. C. M. Waterval, A. Bult, G. J. de Jong, W. J. M. Underberg, Electrophoresis 24 (2003) 1126.

### **3. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

#### ***RESULTS & DISCUSSION***

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

Encara que els resultats de la part experimental de la present Tesi Doctoral han estat discutits individualment en els diferents apartats del capítol 2, en aquest capítol es discuteixen de manera global els resultats més importants. Aquesta discussió se centra fonamentalment en la comparació dels límits de detecció dels diferents mètodes desenvolupats, i dels factors de preconcentració obtinguts a través dels diferents estudis com a resultat d'aplicar alguna de les diferents estratègies per a millorar la sensibilitat de la tècnica d'CE. Aquestes estratègies inclouen tècniques de preconcentració electroforètiques i una tècnica de preconcentració cromatogràfica, l'SPE, en diferents combinacions amb l'CE: *off-line*, *in-line* i *on-line*. En tots els casos, els factors de preconcentració s'han calculat a través de la relació de l'àrea dels pics obtinguda quan s'utilitza una tècnica de preconcentració i l'obtinguda en la injecció hidrodinàmica convencional aplicant una pressió de 50 mbar durant un temps de 5 o 10 s segons el cas.

L'estudi s'ha realitzat amb dos grups de compostos, tots ells antibiòtics  $\beta$ -lactàmics: penicil·lines i cefalosporines. A continuació es discuteixen els principals resultats per a cada família d'antibiòtics.

Pel que fa a la família de penicil·lines, en la present Tesi Doctoral es van seleccionar vuit d'aquests antibiòtics, concretament els més emprats en medicina veterinària que estan regulats per la Unió Europea. Per aquests compostos, en primer lloc, es va estudiar la seva separació emprant diferents tècniques electroforètiques com la MEKC i la MEEKC. Els resultats més importants obtinguts es mostren a la Taula 3.1. En general, tant el sistema micel·lar com el de microemulsió van oferir una bona selectivitat per a la separació de les penicil·lines. En el cas de MEKC, el temps d'anàlisi va ser superior i conseqüentment es va millorar la resolució. Un dels aspectes que va contribuir a aquest fet va ser la diferent longitud dels capil·lars emprats en cada cas (64 i 45 cm per MEKC i MEEKC, respectivament) i a més, la resolució també està afectada per la diferent selectivitat dels dos modes de separació. En MEKC, la separació estava dominada per micel·les amb una càrrega negativa degut a la presència de SDS de manera que les

mobilitats que intervien en la separació van ser la mobilitat electroosmòtica i les electroforètiques tant de la micel·la com dels analits (tots amb càrrega negativa). Per a MEEKC, les gotes de la microemulsió tenien caràcter amfotèric ja que es va emprar un surfactant zwitteriònic, el Brij 35. D'aquesta manera, la gota no tenia mobilitat electroforètica i les principals forces electrocinètiques que van intervenir en la separació van ser el flux electroosmòtic i la mobilitat electroforètica dels analits.

**Taula 3.1.** Condicions i resultats obtinguts en la separació i preconcentració de penicil·lines en solucions estàndard.

	MEKC	MEEKC
<b>Ordre d'elució</b>	AMOX, PENG, AMP, OXA, PENV, CLOXA, NAF, DICLO	DICLO, NAF, CLOXA, OXA, PENV, PENG, AMP, AMOX
<b>Capil·lar</b>	75 µm ID, 64 cm llargada	75 µm ID, 45 cm llargada
<b>Temps d'anàlisi</b>	20 min	12 min
<b>Injecció hidrodinàmica</b>	50 mbar 10 s	50 mbar 5 s
<b>Tècnica de preconcentració</b>	REPSM: 50 mbar 360 s (2450 nL)	REPSM: 50 mbar 270 s (1988 nL)
<b>Factor de preconcentració</b>	11-27	26-41
<b>LODs (µg·L<sup>-1</sup>)</b>	5-25	10-25

Un cop optimitzades les condicions de separació, es va introduir en els dos casos una etapa de preconcentració electroforètica, concretament la REPSM, amb la finalitat de millorar la sensibilitat. Com a conseqüència de l'aplicació d'aquesta tècnica que es fonamenta en la introducció d'un gran volum de mostra, els LODs obtinguts en els dos casos van ser del mateix ordre, de baixos µg·L<sup>-1</sup>. Tot i que els factors de preconcentració indicats a la Taula 3.1 ens mostren uns valors més elevats en MEEKC, això no significa que la preconcentració en aquest mètode sigui més eficaç, la diferència prové de les diferents condicions emprades en cada cas per dur a terme la injecció hidrodinàmica convencional, ja que per MEKC s'injecta el doble de volum per que MEEKC i cal tenir en compte la influència d'aquest paràmetre.

Aquest feu es deu a l'optimització de la injecció hidrodinàmica per tots dos modes ja que cal tenir en compte l'eficàcia dels pics electroforètics que depèn tant del mode de separació com de la longitud del capil·lar.

L'altre grup d'antibiòtics  $\beta$ -lactàmics estudiats en la present Tesi Doctoral són la família de les cefalosporines. Per a la separació de cefalosporines es van desenvolupar diferents mètodes basats en l'ús de la CZE i MEEKC com a tècniques electroforètiques de separació. Per tal d'obtenir LODs més baixos es va avaluar la introducció de tècniques de preconcentració. Concretament, es van aplicar tant tècniques de preconcentració electroforètiques com cromatogràfiques i els resultats obtinguts es mostren a la Taula 3.2.

En el cas de les tècniques de preconcentració electroforètiques, tal com es mostra a la taula, es van aplicar tècniques basades en la introducció hidrodinàmica d'un gran volum de mostra. Així, es van estudiar la LVSS per CZE i la REPSM i la SRMP per MEEKC en medi a pH bàsic i àcid, respectivament. La diferència entre la tècnica LVSS i REPSM radica en el mode de separació emprat ja que en totes dues, després de la introducció de la mostra, aquesta és eliminada pel EOF quan s'aplica un potencial de preconcentració de signe contrari al de la separació. Pel que fa a l'SRMP, com que la separació es realitza a pH àcid en condicions de supressió del EOF, no és necessari invertir el potencial ja que tant la preconcentració com la separació es realitzen amb l'aplicació del mateix voltatge. En la separació per MEEKC, la diferència més notable d'emprar una microemulsió a pH àcid o bàsic es troba en la pròpia separació electroforètica. Així, en la separació a pH bàsic els tres compostos migren en una finestra de temps de tan sols mig minut mentre que en la separació a pH àcid la diferència del temps de migració entre el primer i el darrer compost és d'aproximadament tres minuts i per tant, la resolució es veu afectada ja que és més gran en el cas d'emprar pH àcid. Tot i així, el temps d'anàlisi és lleugerament inferior quan la separació es realitza a pH àcid. Per a tots els casos, els límits de detecció van ser del mateix ordre.

En general, els límits de detecció obtinguts en aplicar les tècniques de preconcentració electroforètiques suposen un increment, aproximadament, d'un ordre de magnitud en la sensibilitat dels mètodes desenvolupats respecte a la injecció hidrodinàmica convencional. No obstant, aquest increment de la sensibilitat està limitat pel volum de mostra introduït en el capil·lar que depèn, principalment, del volum del capil·lar de separació. Amb la finalitat d'incrementar el volum de mostra que pot ser preconcentrat i per tant disminuir encara més els límits de detecció, es van estudiar diferents estratègies basades en la utilització de la tècnica d'SPE. Els resultats més importants estan inclosos a la Taula 3.2.

Es van avaluar diferents combinacions entre l'SPE i l'CE. La primera opció que es va escollir va ser el mode *off-line* per la seva senzillesa i versatilitat respecte a altres combinacions. No obstant, hi ha alguns inconvenients entre els que es troben la gran manipulació de la mostra i l'elevat temps d'anàlisi associat, principalment, al gran volum de mostra tractat i a que el solvent d'elució s'evapora a sequedat per tal de millorar el factor de preconcentració.

El principal objectiu de la combinació *off-line* entre l'SPE i l'CE va ser dur a terme el pretractament de la mostra prèviament a l'aplicació d'altres sistemes de preconcentració tant electroforètics com cromatogràfics. Així doncs, la seva aplicació es va realitzar exclusivament per al tractament de mostres reals, tema en el que s'aprofundirà més endavant.

Es va estudiar l'acoblament *in-line* SPE-CE basat en introduir una petita quantitat de sorbent, en aquest cas C<sub>18</sub>, a l'inici del capil·lar de manera que la retenció dels analits i la posterior elució es realitzen dintre del capil·lar de separació. En l'anàlisi d'estàndards, el volum de mostra que es va preconcentrar va ser de 265 µL, considerablement més gran que en el cas de les tècniques electroforètiques en les que es va preconcentrar un volum màxim de 2.1 µL.



**Taula 3.2.** Condicions i resultats obtinguts en la determinació de cefalosporines emprant diverses tècniques de preconcentració tant en estàndards com en mostres reals.

**Estàndards**

<i>Estratègia per a disminuir els LODs</i>	<i>Compostos</i>	<i>Volum de mostra</i>	<i>RSD (%)*</i>	<i>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	<i>Temps d'anàlisi</i>	<i>Temps total</i>
<b>LVSS (CZE)</b>	CEFT	2138 nL (50 mbar 270 s)	3.4 (100)	25	7 min	18 min
	CEFO, CEFT	1500 nL (50 mbar 327 s)	< 3 (1000)	—	8 min	18 min
<b>REPSM (MEEKC)</b>	CEFO, CEFAZO, CEFA	1936 nL (50 mbar 200 s)	< 12.0 (100)	30-40	8 min	19 min
<b>SRMP (MEEKC)</b>	CEFO, CEFAZO, CEFA	484 nL (50 mbar 50 s)	< 10.0 (100)	40-50	7 min	18 min
<b>SPE-CE IN-LINE</b>	CEFT	265 $\mu\text{L}$ (930 mbar 30 min)	8.9 (25)	0.250	5 min	45 min
<b>SPE-CE ON-LINE T-split</b>	CEFO, CEFT	250 $\mu\text{L}$	< 11.5 (100)	10	12 min	25 min
<b>SPE-CE ON-LINE valve</b>	CEFO, CEFT	250 $\mu\text{L}$	< 9.2 (10)	0.200	12 min	50 min

**Mostres reals**

<i>Estratègia per a disminuir els LODs</i>	<i>Compostos</i>	<i>Volum de mostra</i>	<i>Tipus de mostra (pretractament addicional)</i>	<i>RSD (%)*</i>	<i>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	<i>Temps d'anàlisi</i>	<i>Temps total</i>
<b>LVSS</b>	CEFT	500 mL	Aigua de riu (SPE <i>off-line</i> )	7.4 (0.3)	0.1	6 min	~ 3 h
<b>SPE-CE OFF-LINE</b>	CEFO, CEFT, CEFAZO, CETRIL	500 mL	Aigua de riu	< 10.5 (0.3)	3-5	5 min	~ 4 h
<b>SPE-CE IN-LINE</b>	CEFT	25 mL	Aigua de riu (SPE <i>off-line</i> )	11.2 (0.3)	0.01	7 min	~ 3 h
<b>SPE-CE ON-LINE T-split</b>	CEFO, CEFT	1 mL	Plasma (desproteïnitació)	< 11.9 (0.3)	100	12 min	35 min

\* % RSD en termes de precisió entre dies a la concentració indicada entre parèntesis expressada com  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Aquest fet va suposar una disminució del límit de detecció del mètode en 2 ordres de magnitud, aproximadament, en comparació amb els valors obtinguts amb les tècniques de *sample stacking*. No obstant, cal remarcar que quan es compara el temps d'anàlisi total que involucren els mètodes que empen una tècnica de *sample stacking* o el que es va desenvolupar basat en l'acoblament *in-line* SPE-CE, el valor es va veure incrementat notablement ja que en aquest cas va ser necessari un temps de 45 minuts.

Tot i els bons resultats aconseguits amb l'acoblament *in-line* SPE-CE, aquest presenta dues problemàtiques importants. La primera radica en que en l'etapa de retenció dels analits en el sorbent cromatogràfic, la matriu de la mostra travessa el capil·lar de separació, la qual cosa pot donar lloc a possibles modificacions de la paret interna del capil·lar i, conseqüentment, pot modificar el EOF. En segon lloc, cal esmentar que sovint el volum del solvent d'elució de l'SPE és més gran que els volums introduïts a través de la injecció hidrodinàmica convencional en CE, cosa que es tradueix en una baixa eficàcia en l'anàlisi electroforètica.

L'acoblament *on-line* SPE-CE és una alternativa que solventa, en molts casos, les dues limitacions esmentades. Per una part, emprant aquest acoblament entre l'SPE i l'CE és possible l'anàlisi de mostres complexes amb un mínim pretractament de la mostra ja que aquesta no entra en contacte amb el capil·lar de separació. Per una altra part, només una petita part de l'eluat procedent de l'SPE s'introdueix en el capil·lar d'CE, la qual cosa també permet l'optimització del volum d'elució de l'SPE sense que aquest sigui una limitació com en el cas de l'acoblament *in-line*.

Així doncs es va estudiar la combinació *on-line* entre l'SPE i l'CE emprant un sistema de flux continu. La connexió entre l'SPE i l'CE es va realitzar mitjançant una interfície de tipus peça T de manera que el volum de l'eluat procedent de l'SPE es divideix i solament una petita part d'aquest (2.5% aproximadament) s'injecta en el capil·lar de separació de manera que aquest és de l'ordre de baixos nL, fet que proporciona al sistema electroforètic una

bona eficàcia en la separació. S'ha de tenir en compte però, que l'anàlisi electroforètica de només una petita part de l'eluat afecta als factors de preconcentració aconseguits ja que una part important d'aquest s'elimina cap a residus. Aquest fet queda reflectit en els resultats aconseguits ja que, en preconcentrar un volum de mostra molt similar tant en el sistema *in-line* com en l'*on-line*, els límits de detecció per al segon cas van ser considerablement més elevats. Tanmateix però, el fet d'emprar un sistema de flux continu en l'acoblament *on-line* va fer que el temps necessari per a la càrrega de mostra fos inferior i això va suposar un temps d'anàlisi total d'aproximadament la meitat respecte del necessari per a realitzar l'anàlisi per *in-line* SPE-CE.

Degut als bons resultats aconseguits amb el mètode basat en l'acoblament *on-line* SPE-CE emprant una peça T com a interfície, es va estudiar el potencial de combinar tècniques de preconcentració electroforètiques amb cromatogràfiques per tal d'aconseguir la introducció de grans volums de mostra en el capil·lar de separació sense que això afectés a l'eficàcia de la separació i poder obtenir d'aquesta manera factors de preconcentració superiors.

La principal modificació del nou sistema respecte a l'emprat inicialment va consistir, principalment, en el canvi d'interfície. En aquest sentit, es va emprar una interfície de tipus vàlvula que va permetre la introducció del 100% de l'eluat procedent de l'SPE en el capil·lar de separació. Un altre dels avantatges d'emprar aquesta interfície va ser que el sistema electroforètic era un circuit tancat de manera que es va evitar la presència de fuites de corrent en aplicar la tècnica de preconcentració electroforètica. La tècnica de *sample stacking* que es va utilitzar va ser la LVSS de manera que, posteriorment a la introducció de tot l'eluat en el capil·lar, en aplicar un voltatge, el EOF va eliminar el solvent d'elució per un extrem del capil·lar d'CE. L'eficàcia d'aquest mètode, que involucra una tècnica de preconcentració cromatogràfica i una electroforètica, es demostra quan es comparen els límits de detecció obtinguts respecte dels del mètode en què

s'emprava la interfície de peça T. Concretament, quan es va emprar la vàlvula, els valors de LODs van ser dos ordres de magnitud més baixos. No obstant, el fet d'introduir la tècnica LVSS va suposar un increment del temps total d'anàlisi que va ser d'uns 50 minuts.

Els resultats obtinguts pel sistema *on-line* SPE-CE amb la vàlvula, són coherents amb els presentats pel mètode basat en l'acoblament *in-line* ja que com que en ambdós mètodes tot el volum d'eluat resultant de l'SPE s'analitza per CE i no es rebutja cap fracció, els límits de detecció es mantenen en el mateix ordre, 0.20 i 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  pels modes *on-line* i *in-line* SPE-CE, respectivament.

Pel que fa a l'aplicació a mostres reals, es van analitzar dos tipus diferents de mostres, aigües mediambientals i un fluid biològic. En tots els casos, les mostres van ser preconcentrades emprant alguna tècnica de les ja esmentades. Per una banda es va analitzar aigua de riu per CZE emprant diferents tècniques de preconcentració: la tècnica de *sample stacking* LVSS i la tècnica d'SPE combinada a l'CE en els modes *off-line* i *in-line*. En el cas del sistema basat en *off-line* SPE-CE també es va demostrar l'aplicabilitat del mètode desenvolupat a través de l'anàlisi d'aigua d'aixeta i d'aigua residual procedent d'un hospital. Per una altra banda, emprant l'acoblament *on-line* SPE-CE amb una interfície de tipus T es va analitzar plasma de vaca.

La primera estratègia que es va desenvolupar per a l'anàlisi de mostres reals va ser la combinació SPE-CE *off-line* per a l'anàlisi d'aigües mediambientals. Per una banda es va demostrar el potencial de preconcentració del mètode desenvolupat amb els baixos límits de detecció obtinguts amb valors d'entre 3 i 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Per altra banda, es va mostrar la capacitat de neteja de la mostra emprant l'SPE en l'aplicació del mètode a l'anàlisi d'aigua residual procedent d'un hospital, ja que, es van eliminar gran part de les substàncies interferents.

Degut als avantatges presentats per l'SPE en mode *off-line* en l'anàlisi d'aigua de riu per CE en l'aplicació de les tècniques de preconcentració LVSS i SPE *in-line*, es va decidir afegir una etapa addicional d'*off-line* SPE per tal de netejar la mostra i disminuir els límits de detecció dels mètodes. D'aquesta manera, els factors de preconcentració es van millorar substancialment. En el cas de LVSS degut al gran volum de mostra que es va analitzar (500 mL), els límits de detecció es van disminuir de 25 a 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i en *in-line* SPE van passar de ser 0.250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a 0.010  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En l'anàlisi de plasma de vaca per SPE-CE *on-line* emprant una interfície de peça T, també va ser necessària una etapa prèvia de tractament de la mostra. En aquest cas, però el principal objectiu va ser el de netejar la matriu de la mostra, molt més complexa que les aigües mediambientals, ja que la presència de determinades substàncies presents en el plasma, fonamentalment proteïnes, dificultaven la seva anàlisi. Així doncs, es van estudiar dos tipus de tractaments: diferents dilucions amb aigua i una desproteïnitació amb un medi àcid. Tot i que diluint la mostra es va aconseguir una neteja important, es va observar un augment de la contrapressió del sistema de flux continu emprat per a l'SPE en mode *on-line*. Els millors resultats es van obtenir quan es va realitzar una desproteïnitació amb àcid perclòric al 10%. En aquest cas però els límits de detecció no es van millorar sinó que van augmentar un factor de 10 respecte al mètode desenvolupat per estàndards. Això va ser degut a que el procés de desproteïnitació va implicar una dilució de la mostra. Així doncs, analitzant tan sols 1 mL de mostra els límits de detecció obtinguts van ser 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  amb un temps total d'anàlisi de 35 minuts, essent aquests resultats comparables amb els que s'obtenen a la bibliografia per HPLC-UV.

Tots aquests resultats obtinguts durant la realització de la Tesi Doctoral encoratgen a aprofundir en l'estudi de les diferents tècniques de preconcentració aplicades a l'CE per tal de disminuir els límits de detecció. Entre les diferents opcions es destaquen l'estudi de noves tècniques de preconcentració electroforètiques que permetin l'anàlisi de mostres reals

amb matrius complexes a baixos nivells de concentració. Pel que fa als diferents acoblaments entre l'SPE i l'CE, els dos grans aspectes a millorar són la utilització de diferents sorbents que augmentin la selectivitat en el procés d'extracció com per exemple la utilització d'immunosorbents o MIPs, i el desenvolupament de noves interfícies que millorin la connexió entre les dues tècniques.

Una altra línia de treball molt prometedora i en la que cal investigar més està lligada amb la combinació de diferents tècniques de preconcentració electroforètiques i/o cromatogràfiques ja que aquesta opció presenta un gran potencial en la millora de la sensibilitat en les anàlisis electroforètiques tal com ha quedat reflectit en un dels estudis realitzats en la present Tesi Doctoral.

Although the results of the experimental part of the thesis have been discussed above in individual sections of chapter 2, the present chapter discusses the most important results as a whole. The discussion compares the detection limits of the various methods developed and the preconcentration factors achieved as a result of applying a strategy to improve the sensitivity of CE. In this thesis, we studied some electrophoretic preconcentration techniques and one chromatographic preconcentration technique (SPE) combined in different ways with CE: off-line, in-line and on-line. In all the cases, the preconcentration factors were calculated using the ratio between the peak area obtained with the preconcentration technique and the peak area obtained with conventional hydrodynamic injection by applying a pressure of 50 mbar for 5 or 10 s, depending on the case.

The studies were carried out with two different groups of compounds, all of which were  $\beta$ -lactam antibiotics: penicillins and cephalosporins. The main results for each antibiotic family will be discussed below.

This thesis has also studied eight penicillins, in particular those that are most commonly used in veterinary medicine and which are regulated by the European Community. First, we focused on how to separate them with such electrophoretic modes as MEKC and MEEKC. The most important results are shown in Table 3.1. In general, both the micellar and the microemulsion systems provided good selectivity. However, when MEKC was performed, the total analysis time increased and, consequently, the resolution improved. One of the reasons for this behaviour was the capillary length (64 and 45 cm for MEKC and MEEKC, respectively). The resolution was also affected by the different selectivity of the two separation modes since the micelles and the microemulsion droplets were charged differently. In MEKC, the micelles based on SDS were negatively charged and the separation mobilities were the electroosmotic one from the system and the electrophoretic ones from both the micelle and the analytes (all negatively charged). When MEEKC was used, the microemulsion droplets were amphoteric because of the zwitterionic surfactant used, Brij 35. In this

way, the droplets had no electrophoretic mobility and the main electrokinetic forces in the separation were the electroosmotic flow and the electrophoretic mobility of the analytes.

**Taula 3.1.** Conditions and results from the separation and preconcentration of penicillins in standard solutions.

	MEKC	MEEKC
<b>Elution order</b>	AMOX, PENG, AMP, OXA, PENV, CLOXA, NAF, DICLO	DICLO, NAF, CLOXA, OXA, PENV, PENG, AMP, AMOX
<b>Capillary</b>	75 $\mu\text{m}$ ID, 64 cm length	75 $\mu\text{m}$ ID, 45 cm length
<b>Analysis time</b>	20 min	12 min
<b>Hydrodynamic injection</b>	50 mbar 10 s	50 mbar 5 s
<b>Preconcentration technique</b>	REPSM: 50 mbar 360 s (2450 nL)	REPSM: 50 mbar 270 s (1988 nL)
<b>Preconcentration factor</b>	11-27	26-41
<b>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	5-25	10-25

Once the separation conditions had been optimized, an electrophoretic preconcentration step was introduced to improve the sensitivity of both separation modes. The preconcentration technique was REPSM. As a result of this technique, which injects a large volume of sample into the capillary, the LODs in both cases were of the same order (in the range of a few  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Although the preconcentration factors in Table 3 were higher for MEEKC, this was not because the preconcentration was more efficient: in this case the difference can be attributed to the conventional hydrodynamic injection used in both modes to calculate these factors, since in MEKC the sample volume injected is twice that of the volume injected in MEEKC. In both methods, the conventional hydrodynamic injection was optimized taking into account the efficiency of the electrophoretic peaks, which depends on the separation mode and the capillary length.

The second group of  $\beta$ -lactam antibiotics studied in the present PhD thesis were cephalosporins. We developed various separation methods based on CZE or MEEKC separation electrophoretic modes. With the aim of



decreasing the LODs of these methods, we also evaluated the use of preconcentration techniques. In particular, we applied electrophoretic and chromatographic techniques and the main results are shown in Table 3.2.

When electrophoretic preconcentration techniques were used (see table), we applied techniques based on the hydrodynamic injection of a large sample volume. In this way, we studied LVSS for CZE and REPSM and SRMP for MEEKC under alkaline pH and acidic pH conditions, respectively. The difference between LVSS and REPSM techniques lies in the separation mode because the preconcentration principles are the same and after the sample is injected, it is removed by EOF when a preconcentration potential with a different polarity from that of the separation potential was applied. When SRMP was used, the separation was performed under acidic conditions, which suppressed EOF, so the polarity of the potential did not have to be changed because the preconcentration and the separation both took place under negative polarity. In the separation by MEEKC, the main difference in using an acidic or alkaline medium is in the separation itself. When an alkaline pH medium was used, the three compounds migrated in the same way and the detection time window was only half a minute. When an acidic pH medium (SRMP) was used, on the other hand, the difference in the migration time from the first to the last compound was approximately three minutes, thus giving a better resolution. However, the analysis time was slightly shorter when the separation was carried out under acidic conditions. In all cases, the detection limits were similar.

In general, the detection limits obtained when electrophoretic preconcentration techniques were used increased by about one order of magnitude, compared with those obtained when no preconcentration techniques were used (that is to say, by conventional hydrodynamic injection). However, it should be pointed out that the improvement in sensitivity is limited by the volume of sample injected, which mainly depends on the separation capillary volume. In order to increase the volume of sample that can be preconcentrated and consequently to decrease the

detection limits even more, we studied several strategies that used SPE as a chromatographic preconcentration technique. The main results are shown in Table 3.2.

Various combinations of SPE and CE were evaluated. The first one was the off-line mode because it is the easiest and the most versatile combination. However, it has numerous disadvantages, the most obvious of which are that the sample requires a considerable amount of handling and that the large sample volume means that the analysis time is long. Moreover, this combination frequently includes an additional step in which the solvent eluate is totally evaporated until dryness to improve the preconcentration factor. Despite all these drawbacks, this off-line combination has several advantages: for example, it is a good preconcentration tool and it can also be used to clean up the sample. Because of this, this off-line mode was used for sample pretreatment before other electrophoretic and chromatographic preconcentration techniques. So, SPE was applied in the off-line mode only for treating real samples (see below).

We studied the in-line SPE-CE coupling in which the SPE column is placed inside the CE capillary and the sample and the elution solvent both pass through the whole CE system. In our case, the sorbent, which was C<sub>18</sub>, was placed at the beginning of the capillary.

When standard solutions were analysed, the sample volume preconcentrated was 265  $\mu\text{L}$ , which is considerably higher than the volumes usually used with sample stacking techniques (in these cases a maximum volume of 2.1  $\mu\text{L}$  was injected). The higher sample volumes led to a decrease in the method detection limit of about two orders of magnitude, approximately, compared with the values obtained for sample stacking techniques. Despite this, it should be pointed out that the total analysis times were longer when the chromatographic preconcentration technique was in-line SPE (analysis

**Table 3.2.** Conditions and results obtained from cephalosporin determination by using different preconcentration techniques in standards and real samples.

<b>Standards</b>							
<i>Strategy to decrease LODs</i>	<i>Compounds</i>	<i>Sample volume</i>	<i>RSD (%)*</i>	<i>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	<i>Analysis time</i>	<i>Total time</i>	
<b>LVSS (CZE)</b>	CEFT	2138 nL (50 mbar 270 s)	3.4 (100)	25	7 min	18 min	
	CEFO, CEFT	1500 nL (50 mbar 327 s)	< 3 (1000)	—	8 min	18 min	
<b>REPSM (MEEKC)</b>	CEFO, CEFAZO, CEFA	1936 nL (50 mbar 200 s)	< 12.0 (100)	30-40	8 min	19 min	
<b>SRMP (MEEKC)</b>	CEFO, CEFAZO, CEFA	484 nL (50 mbar 50 s)	< 10.0 (100)	40-50	7 min	18 min	
<b>SPE-CE IN-LINE</b>	CEFT	265 $\mu\text{L}$ (930 mbar 30 min)	8.9 (25)	0.250	5 min	45 min	
<b>SPE-CE ON-LINE T-split</b>	CEFO, CEFT	250 $\mu\text{L}$	< 11.5 (100)	10	12 min	25 min	
<b>SPE-CE ON-LINE valve</b>	CEFO, CEFT	250 $\mu\text{L}$	< 9.2 (10)	0.200	12 min	50 min	
<b>Real samples</b>							
<i>Strategy to decrease LODs</i>	<i>Compounds</i>	<i>Sample volume</i>	<i>Sample matrix (additional pretreatment)</i>	<i>RSD (%)*</i>	<i>LODs (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</i>	<i>Analysis time</i>	<i>Total time</i>
<b>LVSS</b>	CEFT	500 mL	River water (SPE off-line)	7.4 (0.3)	0.1	6 min	~ 3 h
<b>SPE-CE OFF-LINE</b>	CEFO, CEFT, CEFAZO, CETRIL	500 mL	River water	< 10.5 (0.3)	3-5	5 min	~ 4 h
<b>SPE-CE IN-LINE</b>	CEFT	25 mL	River water (SPE off-line)	11.2 (0.3)	0.01	7 min	~ 3 h
<b>SPE-CE ON-LINE T-split</b>	CEFO, CEFT	1 mL	Plasma (deproteinization)	< 11.9 (0.3)	100	12 min	35 min

\* % RSD in terms of precision between days at the concentration in brackets as  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

time of approximately 45 minutes) and not a sample stacking preconcentration technique.

Despite the quite promising results obtained with the in-line SPE-CE coupling, there are two important problems. The first one is the analyte retention step in the chromatographic sorbent, in which the sample matrix flows through the separation capillary thus modifying the capillary wall and, consequently, the EOF. The second one is related to the solvent elution volume which is sometimes higher than the conventional hydrodynamic volumes introduced in CE. This can lead to lower electrophoretic efficiency.

On-line SPE-CE coupling is an alternative that usually solves these two limitations. On the one hand, this new coupling between SPE and CE means that more complex samples can be analyzed with minimum sample pretreatment because the sample matrix is not flushed through the separation capillary. Moreover, only a small part of the eluate from SPE is injected into the CE capillary, so the elution volume can be optimized so that it will not be a system drawback as it is in the in-line SPE-CE system.

So, we studied an on-line combination between SPE and CE using a continuous flow system. The SPE and CE were connected by a T piece interface in such a way that the eluate volume from SPE split and only a small part (2.5% approximately) was injected into the separation capillary. The volume injected into the CE capillary is in the order of a few nL which provides the electrophoretic system with good separation efficiency. It should be taken into account that the electrophoretic analysis of only a small part of this eluate is directed to waste. This explains why the detection limits obtained for the on-line SPE-CE coupling are rather higher than the limits reported for the in-line SPE-CE combination. However, less time was needed to introduce the sample into the on-line coupling than in the in-line case because of the continuous flow system. In this way, the total analysis time was reduced by about half.

Because of the good results of the on-line SPE-CE coupling when a T piece interface was used, we studied the potential of combining electrophoretic and chromatographic preconcentration techniques so that large sample volumes could be injected into the separation capillary with no decrease in efficiency, thus improving the preconcentration factors.

The main difference between the new on-line SPE-CE system and the initial one was the interface. We used a valve interface to inject 100% of the eluate from the SPE into the separation capillary. An additional advantage of using this interface was that the electrophoretic system was a closed circuit, which prevented current leaks when the sample stacking technique was applied. The sample stacking technique used was LVSS and, once all the eluate had been injected into the CE capillary, a voltage was applied and the EOF removed the elution solvent from one end of the CE capillary. The efficiency of this method, which combines a chromatographic and an electrophoretic preconcentration technique, can be seen by comparing the detection limits with those obtained when the T piece interface was used: the values were two orders of magnitude lower with the new method. However, when the second preconcentration technique (LVSS) is included, the total analysis time increased and the whole method lasted about 50 minutes.

The results obtained in the on-line SPE-CE coupling with the valve interface are coherent with the results reported for the in-line coupling because in both methods the whole eluate is analyzed by CE so the detection limits are of the same order: 0.20 and 0.25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for the *on-line* and the *in-line* SPE-CE, respectively.

Two different real samples were analyzed: an environmental sample and a biological fluid. In both cases, the samples were preconcentrated by using one of the strategies reported. River water was analysed with different preconcentration techniques: the sample stacking technique LVSS and the SPE technique combined with CE in the off-line and in-line modes. In the

system based on off-line SPE-CE we demonstrated that the method developed for river water could be used to analyse tap water and waste water from a hospital. Moreover, cow plasma was analyzed by using the SPE-CE on-line coupling with a T piece interface.

The first strategy developed for analysing real samples was the off-line SPE-CE combination for environmental waters. We demonstrated that the method developed had considerable preconcentration potential because the detection limits reported by this combination between 3 and 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . On the other hand, the clean-up capacity of SPE was shown by using the method to analyse waste water from a hospital: the interfering substances were removed to a large extent.

Because of the advantages of off-line SPE, when river water was analyzed by CE with in-line LVSS and SPE as preconcentration techniques, we decided to add an off-line SPE step to clean-up the sample and decrease the detection limits of the methods. In this way, the preconcentration factors improved considerably for both strategies. With LVSS, and because of the high sample volume treated (500 mL), the detection limits decreased from 25 to 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and when in-line SPE was used the detection limits changed from 0.250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for standards to 0.010  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for river water samples.

When analyzing cow plasma by on-line SPE-CE with a T piece interface a previous sample treatment step was also needed. In this case, the main aim was the sample clean-up since the matrix is considerably more complex than environmental waters because of the presence of some interfering compounds which hindered the analysis of the biological fluid. We studied two treatments: several dilutions with water and a deproteinization with an acidic medium. Although the dilution cleaned up the sample quite considerably, the backpressure of the continuous system used for SPE in the on-line mode increased. The results were best when a deproteinization was carried out with perchloric acid. However, in this case, the detection limits increased by a factor of 10 in comparison to the method developed for

standards. This was because the deproteinization methodology involved a sample dilution. So, when only 1 mL of plasma was analysed the detection limits obtained were  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and the total analysis time was 35 min. These results are comparable with those obtained in the literature by HPLC-UV.

All these results were obtained during the PhD thesis and encourage us to continue studying the preconcentration techniques applied in CE to decrease the detection limits. Of particular importance for future study are new sample stacking techniques that can determine various analytes at low concentrations in more complex samples by CE. Future research into SPE coupled with CE will focus on using more selective sorbets such as immunosorbents or MIPs and developing new interfaces that improve the connection between the two techniques.

Another field in which more research is required is the combination between different electrophoretic and chromatographic preconcentration techniques, since this has considerable potential for improving the sensitivity of electrophoretic analysis, as has been demonstrated by one of the studies in this PhD thesis.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007



#### 4. CONCLUSIONS

##### *CONCLUSIONS*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

Les conclusions derivades dels estudis realitzats en la present Tesi Doctoral són les següents:

1. Les tècniques electroforètiques estudiades, com l'CZE, la MEKC i la MEEKC han permès la separació dels diferents antibiòtics  $\beta$ -lactàmics estudiats.
2. Els límits de detecció presentats per la tècnica d'CE, que són de l'ordre de centenars de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  emprant la injecció hidrodinàmica convencional, s'han millorat amb l'aplicació tant de tècniques de preconcentració electroforètiques que es basen en la introducció d'un gran volum de mostra en el capil·lar de separació, com de tècniques de preconcentració cromatogràfiques en les que s'ha utilitzat la tècnica d'SPE. D'aquesta manera, ha estat possible la determinació de  $\beta$ -lactames a nivells d'entre baixos  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  i centenars de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en solucions estàndard.
3. En l'aplicació de la tècnica electroforètica de preconcentració REPSM per a la determinació de penicil·lines tant per MEKC com per MEEKC, els límits de detecció obtinguts són, en tots dos casos del mateix ordre, entre 5 i 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Els dos factors més importants a tenir en compte en aquesta tècnica de preconcentració són el volum de mostra injectat en el capil·lar i la diferència de conductivitat entre el medi de separació i la matriu de la mostra.
4. No s'observen diferències significatives entre els LODs de totes les tècniques de preconcentració electroforètiques (LVSS, REPSM i SRMP) aplicades a la determinació de cefalosporines en els diferents modes electroforètics de separació, tot i que el volum de mostra injectat en el capil·lar en el cas de SRMP és una quarta part de l'injectat en LVSS i en REPSM.

5. La tècnica de preconcentració cromatogràfica d'SPE en totes les seves combinacions amb l'CE (*off-line*, *in-line* i *on-line*) té menys dependència de la matriu de la mostra que les tècniques de preconcentració electroforètiques.
6. L'acoblament *in-line* SPE-CE presenta un gran potencial en la disminució dels límits de detecció de l'CE. Tot i els grans factors de preconcentració que s'obtenen emprant aquest sistema, l'anàlisi per CE presenta una baixa eficàcia dels pics electroforètics degut a la presència del sorbent en el propi sistema d'CE i a l'elevat percentatge de solvent orgànic en el solvent d'elució.
7. L'acoblament de l'SPE a l'CE en mode *on-line* emprant una interfície de peça T és una alternativa molt interessant per a millorar els LODs en CE. En aquest acoblament, l'SPE es realitza de forma independent a la separació electroforètica i això fa que la influència de l'SPE sobre l'CE sigui menor que en el cas del mode *in-line*. Tot i això, els factors de preconcentració no són tan elevats perquè en el mode *on-line* SPE-CE emprant la interfície de tipus peça T només s'analitza per CE una petita part de l'eluat de l'SPE.
8. El canvi de la interfície de peça T per una interfície de tipus vàlvula ha permès l'aplicació d'una tècnica de preconcentració electroforètica (LVSS) de forma que s'ha aconseguit la injecció en el capil·lar de separació de tot l'eluat procedent de l'SPE sense disminuir l'eficàcia dels pics electroforètics i addicionalment els LODs han disminuït a valors de centenars de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Amb aquest sistema es demostra el potencial de la combinació entre les tècniques de preconcentració electroforètiques i cromatogràfiques per tal de millorar les limitacions dels diferents acoblaments entre l'SPE i l'CE.
9. En l'anàlisi de mostres reals, és necessària una etapa prèvia de pretractament per netejar la mostra i, en alguns casos, obtenir un factor

de preconcentració addicional dels analits. Així, l'SPE-CE en el mode *off-line* s'ha emprat per al pretractament de mostres d'aigua de riu prèviament a la tècnica de preconcentració electroforètica LVSS i a la tècnica cromatogràfica de preconcentració en l'acoblament *in-line* SPE-CE, obtenint LODs de l'ordre de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

10. En l'anàlisi de mostres biològiques per *on-line* SPE-CE emprant una interfície de tipus peça T els resultats es milloren utilitzant un pretractament previ que consisteix en la desproteïnitació de la mostra amb àcid perclòric (10%). D'aquesta manera, s'ha aconseguit la determinació per *on-line* SPE-CE de dues cefalosporines, ceftiofur i cefoperazona, en mostres de plasma de vaca a nivells de centenars de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

The conclusions drawn from the various studies of the present thesis can be summarized as follows:

1. The electrophoretic techniques CZE, MEKC and MEEKC enabled the  $\beta$ -lactam antibiotics studied to be separated.
2. The detection limits of the CE technique, which are in the order of hundreds of  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  when a conventional hydrodynamic injection is used, were improved by injecting a large sample volume into the separation capillary and also by using chromatographic preconcentration techniques based on SPE. In this way,  $\beta$ -lactam antibiotics were determined at concentrations between low  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and hundreds of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  in standard solutions.
3. When the electrophoretic preconcentration technique REPSM was used to determine penicillins by MEKC and MEEKC, the detection limits obtained were similar in both cases (between 5 and 25  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The two main factors to consider when REPSM is used are the sample volume injected into the capillary and the conductivity difference between the separation medium and the sample matrix.
4. When cephalosporins were determined by CZE and by MEEKC, there were no significant differences in the LODs obtained when different preconcentration techniques (LVSS, REPSM and SRMP) were used even though the sample volumes injected were different.
5. The chromatographic preconcentration technique, SPE, in combination with CE (off-line, in-line and on-line) is less matrix dependent than electrophoretic techniques.
6. The in-line coupling between SPE and CE has considerable potential for decreasing the detection limits of CE. Despite the high preconcentration factors obtained with this system, the electrophoretic analysis is not

very efficient since the SPE sorbent is placed in the same capillary and the content of organic solvent in the elution plug is high.

7. The on-line combination of SPE and CE by using a T-piece interface is an interesting alternative for improving the LODs of CE. In this mode, SPE is independent of the electrophoretic separation so the influence of SPE does not have as much influence on CE as the in-line mode. However, the preconcentration factors are not as good as in the in-line mode since only a small part of the eluate is analyzed.
8. Changing the T piece interface for a valve interface enabled an electrophoretic-based technique, LVSS, to be applied in such a way that all the eluate from SPE was injected into the separation capillary without decreasing peak efficiency. The LODs also decreased to values of hundreds of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . This new system shows the potential of combining electrophoretic and chromatographic techniques which do not have the same limitations as SPE and CE couplings.
9. When real samples were analyzed, a pretreatment step was needed to clean up the sample and, in some cases, achieve an additional preconcentration factor. So, the SPE-CE system in the off-line mode was used to treat river-water samples prior to the electrophoretic preconcentration technique LVSS and in-line SPE-CE. Under these conditions the LODs achieved were in the order of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .
10. When biological samples were analysed by on-line SPE-CE with a T piece interface, the results improved if a pretreatment was performed. This consisted of deproteinizing the sample with perchloric acid (10%). So, two cephalosporin compounds—ceftiofur and cefoperazone—were determined by on-line SPE-CE in cow plasma samples at concentration levels of  $100\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

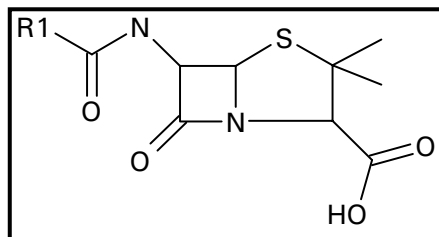
**ANNEXOS**



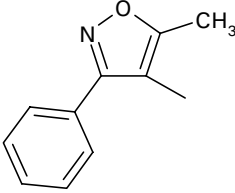
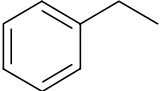
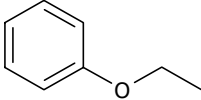
UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007

## ANNEX I

Estructura química i acrònim de les penicil·lines estudiades:

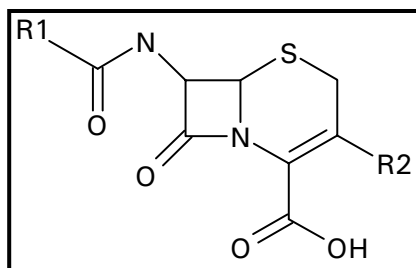


Nom	Acrònim	R1
Amoxicil·lina	AMOX	
Ampicil·lina	AMP	
Cloxacil·lina	CLOXA	
Dicloxacil·lina	DICLO	
Nafcil·lina	NAF	

Nom	Acrònim	Estructura
Oxacil·lina	OXA	
Penicil·lina G	PENG	
Penicil·lina V	PENV	

## ANNEX II

Estructura química i acrònim de les cefalosporines estudiades:



Nom	Acrònim	R1	R2
Cefacetril	CETRIL		
Cefalexina	CEFA		CH <sub>3</sub>
Cefazolina	CEFAZO		
Cefoperazona	CEFO		
Ceftiofur	CEFT		

### ANNEX III

Abreviacions utilitzades en la present Tesi:

ACN	acetonitril
CE	electroforesi capil·lar
CEC	electrocromatografia capil·lar
CG	cromatografia de gasos
cITP-CE	acoblament ITP-CE
CZE	electroforesi capil·lar per zones
C <sub>2</sub>	etilsilica
C <sub>4</sub>	butilsilica
C <sub>8</sub>	octilsilica
C <sub>18</sub>	octadecilsilica
EOF	flux electroosmòtic
ESI	ionització d'electrosprai
DETA	dietilentriamina
FAEP	<i>field-amplified sample injection with matrix removal using the EOF pump</i>
FASI	<i>field-amplified sample injection</i>
FESI	<i>field-enhanced sample injection</i>
HPLC	cromatografia de líquids d'alta resolució
ID	diàmetre intern
ITP	isotacoforesi capil·lar
LLE	extracció líquid-líquid
LVSEP	<i>large volume sample stacking using the EOF pump</i>
LVSS	<i>large volume sample stacking</i>
LOD	límit de detecció
L <sub>T</sub>	longitud total
MEEKC	cromatografia capil·lar de microemulsió electrocinètica
MEKC	cromatografia capil·lar micel·lar electrocinètica
MeOH	metanol
MS	espectrometria de masses

MS/MS	MS en tàndem
NSAIDs	antiinflamatoris no esteroidals
PEEK	poli-éter-éter-cetona
PTFE	politetrafluoroetilè p
PVA	alcohol polivinílic
REPSM	<i>reversed electrode polarity stacking mode</i>
RMM	<i>reverse migrating micelles</i>
RMP	<i>reverse migrating pseudostationary phase</i>
SDS	sulfat de dodecil sòdic
SPME	microextracció en fase sòlida
SPE	extracció en fase sòlida
SRMM	<i>stacking with reversed migrating micelles</i>
SRMP	<i>stacking with reversed migrating pseudostationary phase</i>
SRW	<i>stacking using reverse migrating micelles and a water plug</i>
tITP	<i>transient ITP</i>
Tris	(hidroximetil)aminometà
$\mu_{\text{eph}}$	mobilitat electroforètica efectiva
$\mu_{\text{EOF}}$	mobilitat electrosmòtica

## ANNEX IV

Els treballs que han sorgit de la present Tesi Doctoral, inclosos en els capítols 1 i 2, que s'han publicat o estan pendents de publicació en revistes científiques, són els següents:

- P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Recent advances in coupling between solid phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE)*, Trends Anal. Chem., (en premsa) (apartat 1.4))
- P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Sample stacking for the analysis of eight penicillin antibiotics by micellar electrokinetic capillary chromatography*, Electrophoresis 26 (2005) 954 (apartat 2.1.1)
- P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography*, J. Chromatogr. B 831 (2006) 196 (apartat 2.2.1).
- P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Strategies for analyzing cephalosporins by microemulsion electrokinetic chromatography*, Chromatographia 62 (2005) 603 (apartat 2.2.2).
- P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *CE analysis of cephalosporins in environmental waters*, Chromatographia 65 (2007) 501 (apartat 2.3.1).
- P. Puig, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, C. Aguilar, *Improving sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques*, Anal. Chim. Acta 587 (2007) 208 (apartat 2.4.1).



- P. Puig, F. W. A. Tempels, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, G. W. Somsen, G. J. de Jong, *On-line coupling of solid-phase extraction and capillary electrophoresis for the determination of cefoperazone and ceftiofur in plasma*, J. Chromatogr. B (en premsa) (apartat 2.5.1).
  
- P. Puig, F. W. A. Tempels, G. W. Somsen, G. J. de Jong, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Use of stacking principles in on-line solid-phase extraction—capillary electrophoresis for improved sensitivity*, Electrophoresis (enviat) (apartat 2.6.1).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI  
TÈCNiques DE PRECONCENTRACIÓ COMBINADES AMB L'ESPECTROFORESI  
CAPIL·LAR PER A LA DETERMINACIÓ D'ANTIBIÒTICS B-LACTÀMICS  
Patricia Puig Guiral  
ISBN: 978-84-691-0374-6/DL: T.2192-2007