



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral

“Desarrollo de Sistemas de Preconcentración "on-line" para Análisis de Muestras de Interés Biológico mediante Electroforesis Capilar”

Lic. Marcos Tascon

Director: Leonardo G. Gagliardi / Codirector: Fernando Benavente

2015

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Prof. Dr. Leonardo G. Gagliardi y la codirección del Dr. Fernando Benavente. El mismo se pone a consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al GRADO ACADÉMICO de DOCTOR de la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS.

AGRADECIMIENTOS

Esta página está destinada a expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar deseo agradecer especialmente al Dr. Leonardo G. Gagliardi por su dirección y por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo esta tarea, por su apoyo constante, sus consejos, su tiempo y sus enseñanzas y al Dr. Fernando Benavente por estar en todo momento y hacer que la distancia no sea un problema.

Asimismo quisiera reconocer a la Dra. Cecilia Castells por permitirme realizar este trabajo de tesis en el LIDMA, además del constante apoyo, consejos y sabiduría en todo momento.

También quisiera agradecer a la Dra. Victoria Sanz Nebot y al Dr. Jose Barbosa de la UB por abrirme las puertas del laboratorio y hacerme sentir uno más del grupo.

También me gustaría reconocer a mis compañeros (ya a esta altura amigos) del LIDMA: Juan, Agus, Jaiver, Sonia, Javi, Mario, Aspro, Rocío, Bibi, Emi, Fiore, Romi, Carlina, Giselle, Esther y Nico R K. Hicieron que den ganas ir a trabajar esas largas jornadas en el laboratorio. Disculpen por las bromas pesadas, pero las voy a seguir haciendo.

A mis otros compañeros, los de la UB, Fran, Silvia, Albert, Lorena, Elena, Laura, Ernest y Estela, gracias por los almuerzos (desayunos), por los cafecitos y por enseñarme un sinfín de palabras argentinas que tienen otro significado en la lengua española. Moltes gràcies!

A mis amigos de toda la vida, Leo, Luz, Mati y Nico, por más que no me crean, estaba escribiendo de verdad cuando decía que escribía. Gracias por el aguante.

A mi familia, viejos, Agus y Pili, por el eterno apoyo, desde ya que ni hubiese llegado a tomarme el tren para ir a la facu ese 31 de enero del 2005 si no fuese por ustedes.

Finalmente, y no menos importante, quería agradecer a vos Nadia, gracias por aguantarme en todo momento a lo largo de estos 5 años, por bancarte todos los viajes, los desayunos y las siestas con notebook, si... soy un pesado. Gracias en serio!

Seguramente me esté olvidando de mucha gente, quiero agradecer a todos los que fueron importantes en este trayecto y de alguna y otra forma aportaron un granito de arena.

Chau!!!

Publicaciones en revistas científicas

1- “A high performance system to study the influence of temperature in on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, L.G. Gagliardi

Analytica Chimica Acta, 2014, en prensa.

Editorial: Elsevier.

2- “Fast Determination of Harmala Alkaloids in Edible Algae by Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, L.G. Gagliardi

Analytical and Bioanalytical chemistry, en prensa.

Editorial: Springer.

3- “Development of a CE-UV Method for Fast Determination of Harmala Alkaloids. Application to Psychoactive Teas and Edible Algae”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, N.M. Vizioli, L.G. Gagliardi

Electrophoresis, enviado.

Editorial: Wiley.

4- “A global criterion for multi-objective optimizations in capillary electrophoresis. Application to separation of harmala alkaloids”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, C.B. Castells, L.G. Gagliardi

Journal of chromatography A, enviado.

Editorial: Elsevier.

5- “Analysis of β -carboline alkaloids by on-line solid-phase extraction to capillary electrophoresis-mass spectrometry”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L.G. Gagliardi

Manuscrito en preparación

Presentaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales

1- “Temperature on-line preconcentration in capillary zone electrophoresis. Application to carboxylic acids”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 36th International symposium on high-performance liquid phase separations and related techniques. Budapest (Hungría).

Fecha de realización del mismo: 6-2011

Modalidad: Poster (Con referato).

2- “Consideraciones y avances en métodos de preconcentración térmica “on-line” en electroforesis capilar para el análisis de aniones en capilares de sílice desnuda”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 6^{to} Congreso Argentino de Química Analítica. Santa Fe.

Fecha de realización del mismo: 11-2011

Modalidad: Poster (Con referato).

3- “Temperature mediated on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE) for analysis of opioid peptides”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and analyses. Ginebra (Suiza).

Fecha de realización del mismo: 2-2012

Modalidad: Poster (Con referato).

4- “Separation of Harmala alkaloids by CZE: Optimization, Calculation of Analytical Figures and Method Transfer between Different CE Instruments”.

Autores: M. Tascon, N. Vizioli, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 19th International Symposium, Exhibit & Workshops on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques. Maryland (Estados Unidos)

Fecha de realización del mismo: 10-2012

Modalidad: Poster (Con referato).

5- “Using Temperature to Improve the Limits of Detection in “on-line” SPE-CE Systems”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: COLACRO XIII. Congreso Latinoamericano de cromatografía. Florianopolis (Brasil).

Fecha de realización del mismo: 10-2012

Modalidad: Poster (Con referato).

6- “Using Temperature to Improve the Performance of SPE “on-line” Pre-Concentration for CE”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: LACE 18 (18th latinamerican symposium of capillary electrophoresis and microchip technology). Buenos Aires (Argentina).

Fecha de realización del mismo: 12-2012

Modalidad: Poster (Con referato).

7- “Determination of Harmala alkaloids in edible algae by capillary electrophoresis mass spectrometry”.

Autores: M. Tascon, L. G. Gagliardi, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot.

Nombre y lugar del evento: 39th international symposium of High-Performance Liquid-Phase separations and related techniques. Amsterdam (Holanda)

Fecha de realización del mismo: 6-2013

Modalidad: Poster (Con referato).

8- “La temperatura en sistemas de preconcentración mediante extracción en fase sólida “en línea” para electroforesis capilar (SPE-CE-UV) aplicado a la separación de péptidos opiáceos”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 1^{er} Congreso Argentino de cromatografía y técnicas afines. Buenos Aires (Argentina).

Fecha de realización del mismo: 10-2013

Modalidad: Oral (Con referato).

9- “Modelo para la Optimización de Separaciones mediante Electroforesis Capilar. Aplicación al Análisis de Harmanos en Algas por CE-MS”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 7^{mo} Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza (Argentina)

Fecha de realización del mismo: 11-2013

Modalidad: Oral (Con referato).

10- “A novel optimization method for separation of complex mixtures in CE. Application to the analysis of Harmala alkaloids in edible algae by CE-MS”.

Autores: M. Tascon, F. Benavente, L. G. Gagliardi.

Nombre y lugar del evento: 19th Latin-American symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. Lima (Perú)

Fecha de realización del mismo: 12-2013

Modalidad: Oral (Con referato).

Índice

ACRÓNIMOS	10
LISTA DE SÍMBOLOS.....	12
Objetivos Generales	13
Objetivos Específicos	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Electroforesis capilar	16
1.1.1. Breve reseña histórica	16
1.1.2. Modos de operación.....	17
1.1.3. Fundamentos de CZE.....	22
1.2. Estrategias para mejorar los límites de detección en CE	26
1.2.1. Métodos de preconcentración en línea	28
1.2.2. Detectores selectivos y sensibles: espectrómetros de masa	37
1.2.3. Estrategias combinadas.....	43
1.3. Influencia de la temperatura en CE.....	45
1.3.1. Efectos de la temperatura sobre las condiciones fisicoquímicas en CE.....	45
1.3.2. Cambios de temperatura internos por calentamiento de Joule	48
1.3.3. Cambios de temperatura externos.....	51
1.4. Metodología de optimización de la separación	54
1.5. Analitos y muestras de interés farmacéutico y biomédico	57
1.5.1. Alcaloides β -carbólicos	58
1.5.2. Péptidos opiáceos.....	59
1.5.3. Alga <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame).....	62
1.5.4. Planta <i>Peganum harmala</i> (ruda de Siria)	63
2. EXPERIMENTAL.....	64
2.1. Reactivos y materiales.....	65
2.2. Instrumentos	66
3. SEPARACIÓN DE β -CARBOLINAS POR CE-UV	67
3.1. Procedimientos: condiciones electroforéticas y tratamiento de muestra.....	68
3.2. Resultados y Discusiones.....	69
3.2.1. Optimización de las separaciones	69
3.2.2. Determinación de alcaloides de la familia de las β -carbólicas por CE-UV.....	81
3.2.3. Aplicación a muestras de <i>Undaria pinnatifida</i>	86
3.2.4. Aplicación a muestras de semillas de <i>Peganum harmala</i>	88

3.3. Conclusiones Parciales.....	91
4. SEPARACIÓN DE β -CARBOLINAS POR CE-MS.....	92
4.1. Procedimientos.....	93
4.1.1. Detección por espectrometría de masa	93
4.1.2. Pretratamiento de <i>Undaria pinnatifida</i>	94
4.2. Resultados y Discusiones.....	96
4.2.1. Optimización de la separación y detección por CE-MS	96
4.2.2. Optimización del pretratamiento de muestra.....	100
4.2.3. Análisis de β -carbolinas en muestras de <i>Undaria pinnatifida</i>	105
4.3. Conclusiones parciales.....	108
5. SPE-CE PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE PÉPTIDOS Y β -CARBOLINAS	109
5.1. Procedimientos.....	110
5.1.1. Separación de péptidos por CE-UV.....	110
5.1.2. Pretratamiento de plasma humano para el análisis de péptidos.....	110
5.1.3. Construcción de microcartuchos de extracción	111
5.1.4. Metodología general de SPE-CE	114
5.2. Resultados y Discusiones.....	118
5.2.1. Análisis de péptidos opiáceos por CE-UV y SPE-CE-UV	118
5.2.2. SPE-CE para la preconcentración de β -carbolinas.....	120
5.3. Conclusiones Parciales.....	141
6. EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA EN SPE-CE-UV	143
6.1. Procedimientos.....	144
6.1.1. Temperatura en CE-UV modificando la termostatización interna	144
6.1.2. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV con termostatización interna.....	145
6.1.3. Efecto de la temperatura en SPE-CE utilizando el mini baño termostático.	146
6.2. Resultados y Discusiones.....	147
6.2.1. Optimización de la temperatura en la separación en CE utilizando termostatización interna.....	147
6.2.2. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV utilizando termostatización interna.....	149
6.2.3. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV con sistemas de alta eficiencia (MBT).....	153
6.3. Conclusiones parciales.....	165
7. CONCLUSIONES.....	166
8. BIBLIOGRAFÍA	169

ACRÓNIMOS

ACE: Electroforesis capilar de afinidad en línea (*on-line affinity capillary electrophoresis*)

BGE: Electrolito soporte

CE: Electroforesis capilar

CEC: Electro cromatografía capilar

CE-UV: Electroforesis capilar con detección ultravioleta

CE-MS: Electroforesis capilar con detección por espectrometría de masa

CGE: Electroforesis capilar en gel

CIEF: Enfoque isoelectrico capilar

CITP: Isotacoforesis capilar

CZE: Electroforesis capilar en zonas

EACE *On-line enzyme affinity capillary electrophoresis*

EOF: Flujo electroosmótico

ESI: *Electrospray*

IACE: Electroforesis capilar de inmunoafinidad en línea (*on-line immunoaffinity capillary electrophoresis*)

Id: diámetro interno del capilar

LACE: *On-line lectin affinity capillary electrophoresis*

LIF: Fluorescencia inducida por laser

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MBT: Mini baño termostático

MEKC: Cromatografía electrocinética micelar

MIP: Polímeros molecularmente impresos

MS: Espectrometría de masa

Od: Diámetro externo del capilar

PEG: Polietilenglicol

RF: Radiofrecuencia

RSD: Desviación estándar relativa

T: Temperatura

Tris: *tris* (hidroximetil) aminometano

UV: Espectroscopia ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ : Constante dieléctrica

E : Campo eléctrico

η : Viscosidad

γ : Relación de velocidades electroforéticas

L : Longitud del capilar

L_T : Longitud total del capilar

L_d : Longitud a la ventana de detección del capilar

q : Carga de un ión

ρ : Resistividad

r : Radió de un ión

T : Temperatura

μ_a : movilidad aparente

μ_e : Movilidad electroforética

μ_{EOF} : movilidad del flujo electroosmótico

v : Velocidad

V : Voltaje aplicado

ζ : Potencial zeta

Objetivos Generales

Extender las prestaciones de los métodos de electroforesis capilar para el análisis de compuestos de interés en muestras biológicas complejas. Se trabajará, primeramente, en el desarrollo de métodos de optimización de las condiciones de separación que permitan seleccionar de manera más eficiente condiciones adecuadas de separación. En una segunda etapa se trabajará sobre la mejora de los límites de detección en base a dos estrategias: el desarrollo de métodos de preconcentración en línea, y el uso de detectores con selectividad y sensibilidad mejorada, concretamente, espectrometría de masa. El trabajo sobre ambas estrategias se llevará adelante en primera instancia por separado y luego combinando ambas. Los métodos desarrollados se aplicarán al análisis de compuestos de interés farmacéutico y biomédico, particularmente a un grupo de alcaloides de la familia de las β -carbolinas en algas y péptidos opiáceos en muestras de plasma humano.

Objetivos Específicos

- a. Desarrollar un criterio para la caracterización de la separación en electroforesis capilar (CE). Establecer un procedimiento para componer funciones multicriterio para optimizar las separaciones de mezclas de analitos por CE. Aplicarlo a la optimización del pH para la separación de un grupo de compuestos de una misma familia química, en este caso seis alcaloides de la familia de las β -carbolinas. Comparar los resultados que se obtienen empleando el pH optimizado mediante este método con los obtenidos por otros métodos de optimización.
- b. Desarrollar y validar un método de extracción y análisis de las β -carbolinas anteriores en muestras de alga de la especie *Undaria pinnatifida*, utilizando electroforesis capilar con detección UV (CE-UV). Estudiar la transferibilidad del método de separación en distintos instrumentos de distintas marcas comerciales. Aplicar este mismo método al análisis de β -carbolinas en muestras de semillas de *Peganum harmala*.
- c. Adaptar el método de CE-UV para la detección en línea por espectrometría de masa (CE-MS). Validar el método de CE-MS y caracterizar las β -carbolinas estudiadas mediante CE-MS/MS. Determinar su contenido en muestras de *Undaria pinnatifida*.

- d. Desarrollar un método para la preconcentración de β -carbolinas mediante extracción en fase sólida en línea con la electroforesis capilar utilizando fases estacionarias de C18 con detección UV y MS (SPE-CE-UV y SPE-CE-MS).

- e. Desarrollar un sistema para el control eficiente y rápido de la temperatura en los preconcentradores de SPE-CE, instalable en instrumentos comerciales con termostatación del capilar por convección forzada de aire, así como también en instrumentos termostatación por circulación de líquidos. Automatizar el control y optimizar la eficiencia de la velocidad de cambio de la temperatura. Utilizar el sistema anterior para evaluar el efecto de la temperatura en la preconcentración por SPE-CE. Utilizar como analitos modelo el grupo de alcaloides de la familia de la β -carbolinas y también un grupo de péptidos opiáceos. Utilizar como sorbente fases estacionarias de C18 y evaluar los factores de recuperación tanto en soluciones estándar como en muestras de plasma humano.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Electroforesis capilar

1.1.1. Breve reseña histórica

La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica moderna, la cual permite separar compuestos cargados de forma rápida y eficiente en volúmenes muy pequeños. La separación está basada en las diferencias de movilidades electroforéticas de especies cargadas en el campo eléctrico que se establece en el medio electroforético dispuesto en el interior de tubos de diámetro interno muy pequeño o tubos capilares.

A principios del siglo XVIII, se realizaron muchos intentos para poder lograr separaciones electroforéticas tanto en soluciones como en geles. Los primeros experimentos se realizaban en tubos de vidrio con forma de U con electrodos en los extremos a los cuales se le aplicaba una corriente continua y voltajes de hasta algunos centenares de voltios (V).

Debido a que la separación electroforética era llevada a cabo en tubos con diámetros internos considerablemente grandes y soluciones simples, los fenómenos convectivos por calentamiento Joule eran muy marcados. Estos fenómenos se originan por el paso de corriente a través de una solución, la cual constituye una resistencia eléctrica y como tal, disipa calor. Para poder superar este impedimento la primera solución encontrada fue minimizar estos fenómenos convectivos mediante la adición de estabilizantes físicos al medio de separación. Ejemplos típicos son el agar, gel de sílice y acrilamida.

Por otra parte, otro intento de minimización de estos efectos fue el uso de tubos de menor diámetro. Estos permitirían, dada la reducida sección transversal del tubo, una disipación más eficiente del calor generado por la solución. Bajo condiciones ideales, las muestras migran como un cilindro o tapón de longitud pequeña siendo las resoluciones limitadas sólo por la dispersión longitudinal por difusión. Por este motivo, se resalta a la CE como una técnica de alta eficiencia de separación.

La primera demostración del uso de un capilar y altos voltajes para realizar una separación electroforética fue realizada por Hjerten en 1967 [1]. Es decir, que si bien el efecto separativo era conocido desde principios del siglo XVIII, el avance de la tecnología no permitió el desarrollo de la técnica en su máximo potencial, lo cual ocurrió más de un siglo después con el advenimiento de los tubos de sílice de diámetro capilar.

En los años venideros, varios autores como Mikkers y Virtanen realizaron trabajos tratando de probar la alta eficiencia de la CE sin demasiado éxito [2,3]. El principal problema era la sobrecarga de la columna, debido a la imposibilidad de inyectar pequeños volúmenes de muestra y la poca sensibilidad de los detectores existentes en ese momento.

En 1981 Jorgenson y Lukacs fueron considerados los primeros en demostrar en la práctica, la alta eficiencia de las separaciones [4–6]. Esta serie de trabajos, implicaron el uso de tubos capilares de sílice de 100 µm de diámetro interno y la aplicación de campos eléctricos elevados. En este momento se sentaron los fundamentos básicos de la técnica y se establecieron teorías simples sobre los mecanismos de separación y dispersión de las bandas electroforéticas.

En los años subsiguientes, los cambios apuntaron a variaciones de la técnica manteniendo el núcleo de la misma prácticamente inamovible, ejemplos de las mismas pueden ser la electrocromatografía (CEC) o la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), las cuales conformaron nuevos modos de CE.

Ya hacia fines de los años '80 existían en el mercado los primeros instrumentos comerciales de CE, que permitieron un enorme avance en esta técnica durante la siguiente década. El desarrollo del instrumento en varios aspectos operativos fue notable además de su adaptación a una gran variedad de detectores. Se destacó la robustez y versatilidad de la técnica que permite analizar un amplio espectro de matrices y utilizar medios separativos, tanto acuosos como orgánicos. En esta época la CE se ubica una técnica complementaria a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Actualmente, la CE se utiliza en combinación con técnicas de concentración en línea para los analitos y detectores de alta sensibilidad y selectividad. Se aplica tanto al estudio de macromoléculas como de moléculas pequeñas, y que pueden estar presentes en matrices tan diversas como muestras inorgánicas, fluidos biológicos, extractos naturales de plantas, alimentos, fármacos, etc.

1.1.2. Modos de operación

Una de las principales ventajas de la CE es que sólo requiere instrumentación simple y robusta. En su esquema más básico está compuesto por una fuente de alto voltaje, dos reservorios para las soluciones amortiguadoras o simplemente electrólitos soporte (BGE), un capilar y un detector. El arreglo está descrito en la figura 1, donde se puede observar que, a diferencia de las técnicas cromatográficas convencionales donde la detección tiene lugar después de la columna de separación (*post column detection*) en una celda específica para la detección, en CE la zona de detección está en el mismo tubo o capilar (*on-column detection*). Esto acarrea como principal consecuencia un incremento de los límites de detección (LOD) debido a que las cantidades o volúmenes a detectar son muchos menores. Sin embargo, a su vez, la versatilidad que se obtiene es mucho mayor, pudiendo detectar en distintas zonas y con distintos tipos de detección por separado o en simultáneo.

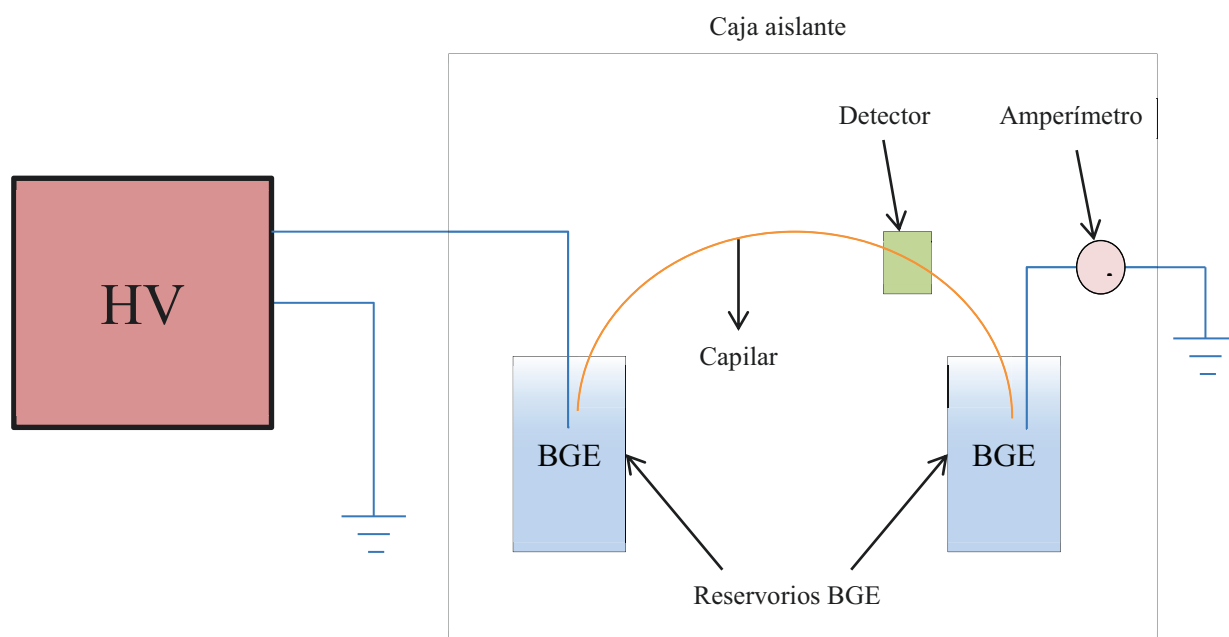


Fig. 1.1. Esquema de un equipo de CE convencional. En él se pueden distinguir la fuente de alto voltaje (HV), reservorios de BGE, capilar de separación y zona de detección.

Este esquema básico puede ser superado agregando accesorios que mejoren la automatización del sistema. Pueden ser mencionados, a modo de ejemplo, muestreadores automáticos, dispositivos de inyección múltiple, controladores de temperatura, fuentes de voltaje programables, interfases con plataformas informáticas, etc. Considerando la versatilidad de la CE, se desarrollaron varios modos que derivan directamente de esta y, en algunos casos fusionándose con fundamentos provenientes de la cromatografía, intentando resaltar las ventajas de cada una de las mismas en una sola técnica.

Entre los diversos modos existentes los más importantes y aplicados actualmente son los siguientes:

- Electroforesis capilar en zonas (CZE)
- Electroforesis capilar en gel (CGE)
- Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)
- Electro cromatografía capilar (CEC)
- Enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)
- Isotacoforesis capilar (CITP)

Se puede destacar el amplio uso de la CZE y, eventualmente de la MEKC, por sobre las demás. La CZE es el modo más simple en el que sólo se requiere un capilar relleno de BGE o solución reguladora, en cuyos extremos se aplicará el voltaje de separación. La denominación “en zonas” hace referencia específicamente a que los compuestos inyectados en el medio de separación continuo se separarán en bandas discretas, en otras palabras, migrarán en “zonas” características acorde a sus movilidades electroforéticas efectivas. Ejemplos de variantes de CZE en los cuales los medios de separación son continuos y permanecen constantes en el tiempo, pero que no son soluciones simples, son CGE (el medio es un gel), MEKC (se utilizan micelas por encima de la concentración micelar crítica) o CEC (se emplean una fase estacionaria). Cuando el medio de separación es continuo pero varía en función del tiempo, las movilidades de los analitos varían consecuentemente en función del mismo, de aquí surge otro de los modos más conocidos que es el CIEF. Finalmente, cuando el medio de separación es discontinuo y varía en función del tiempo podemos destacar la CITP como la alternativa más usada y estudiada. Los modos previamente nombrados serán descriptos brevemente en las secciones siguientes.

1.1.2.1. Electroforesis capilar en zonas (CZE)

La CZE es el modo más sencillo y más comúnmente usado en electroforesis capilar, que de aquí en adelante la llamaremos CE. Las separaciones están basadas en las diferencias de movilidades electroforéticas entre cada uno de los analitos. Estas diferencias resultan en distintas velocidades de migración y por tanto, en la separación de los mismos. Modificando las velocidades de migración de los analitos de diversas formas estaríamos afectando la selectividad entre ellos. Los factores que permiten modificar estos valores son, por un lado, el tamaño del soluto, el cual está estrechamente relacionado con la masa y el radio hidrodinámico del mismo y por otro su carga neta. Es decir que, por una parte, cualquier condición que afecte al tamaño de la esfera hidratada del analito modificará su velocidad de migración. Ejemplos de ello pueden ser la adición de complejantes, el cambio en la temperatura o el agregado de disolventes orgánicos. Por otra parte, la carga neta de la esfera hidratada del analito puede variar. Por ejemplo la variación del pH, o la asociación de otras especies cargadas, ya sea por complejación, formación de aductos, pares iónicos, etc., también modificarán la velocidad de migración, incluso hasta invertir su sentido. Otro elemento importante para la separación es la presencia del flujo electroosmótico (EOF) el cual se genera por la interacción electrostática de los iones presentes en el BGE y los grupos silanol ionizados de las paredes del capilar, que mediante la aplicación de un campo eléctrico generan un flujo adicional de todo el BGE

que es aditivo a las movilidades de los compuestos.

Estas características incrementan la complejidad pero también a la versatilidad de la técnica, debido a que proveen una gran variedad de opciones para variar la selectividad entre los compuestos.

1.1.2.2. Electroforesis capilar en gel (CGE)

En este modo el principal mecanismo de separación está dado por las diferencias de tamaños de los analitos debido a su migración diferencial a través de los poros del gel. Los geles son muy útiles para esta técnica porque agregan este nuevo mecanismo, el cual funciona como un tamiz molecular. Como ventajas adicionales vale la pena resaltar que al estar el capilar de sílice completamente relleno de gel los efectos convectivos debido a gradientes radiales de temperatura se ven minimizados y la dispersión es mínima, se minimizan los efectos de adsorción de los analitos en las paredes del capilar y se suprime el EOF. La CGE derivó de la tan conocida electroforesis en gel, la cual se sigue utilizando actualmente para el estudio de proteínas y otras biomoléculas [7]. Hjerten obtuvo los primeros resultados relleno de capilares con polímeros de agarosa y de acrilamida [7,8]. Como resultado se obtuvieron eficiencias de separación mucho más elevadas que en placas de gel y la posibilidad de utilizarla de forma preparativa separada del gel.

1.1.2.3. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

Un muy importante desarrollo en CE fue la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) implementada en 1984 por Terabe *et al.* [9–11]. En MEKC el mecanismo principal de separación está dado por la partición del analito entre las fases micelar y solución. Para poder lograr este propósito, se emplean surfactantes por encima de la concentración micelar crítica. Como principal ventaja, se puede observar que mediante este modo se pueden separar compuestos neutros, los cuales quedaban excluidos en las electroforesis convencionales. La elevada eficiencia de la técnica fue demostrada por Jorgenson *et al.* resolviendo completamente compuestos sustituidos a nivel isotópico [12]. Hoy en día sabemos que MEKC puede ser usado tanto con compuestos neutros como iónicos. Considerando ambos casos, los mecanismos que le otorgan selectividad al sistema vendrán dados por una combinación entre la relación carga/masa, la hidrofobicidad y las interacciones electrostáticas con las micelas. Además, con el paso de los años demostró ser un modo versátil, ya que no sólo queda limitada a la adición de surfactantes, sino que éstos pueden ser reemplazados con cualquier

aditivo que permita obtener micelas para emplearlas como pseudo-fases estacionarias. A modo de ejemplo, la adición de ciclodextrinas como aditivo puede funcionar para mejorar la selectividad entre compuestos quirales [13].

1.1.2.4. Electrochromatografía capilar (CEC)

En CEC, la columna de separación está empaquetada con fases estacionarias en las cuales los equilibrios de retención son los comúnmente conocidos en técnicas cromatográficas [14]. En CEC el BGE está en contacto con la sílice de las paredes del capilar y con las partículas de la fase estacionaria, lo que ocasiona un EOF un poco más inestable que el que se espera en tubos abiertos pero a su vez mucho más uniforme que el que se obtiene por flujos impulsados por presión. Esto trae como consecuencia un crecimiento de la eficiencia en comparación con por ejemplo HPLC y, por otra parte, la adición de un mecanismo de separación extra respecto de la CE para la mejora de la resolución.

1.1.2.5. Isoelectroenfoque capilar (CIEF)

En CIEF los analitos son separados en base a sus puntos isoeléctricos (pI) [15]. Si bien en placa de gel este modo ya era conocido, en tubos capilares el método fue implementado por Hjerten *et al.* recién hacia 1985. En este trabajo describía el CIEF de proteínas en un tubo capilar de sílice [16]. Para lograr este mecanismo de separación se debe generar un gradiente de pH a lo largo del capilar, el cual se alcanza colocando en el ánodo una solución ácida, mientras que en el cátodo una solución básica. En el momento de aplicar el voltaje, los protones migrarán hacia el cátodo mientras que los iones hidroxilos migrarán hacia el ánodo. Inyectando los analitos a separar, éstos migrarán a través del campo eléctrico y del gradiente de pH generado; en el momento que alcancen un pH igual a su pI se volverán neutros y dejarán de migrar en el campo. Una vez enfocados, los analitos son desplazados hasta el detector aplicando presión [16]. Como resultado, se pueden obtener picos muy estrechos, resueltos con diferencias de pI de hasta 0.01 unidades logarítmicas de pH y con una gran capacidad de pico debido a que se utiliza toda la columna capilar para realizar el enfoque [16].

1.1.2.6. Isotacoforesis capilar (ITP)

Uno de los aspectos fundamentales a conocer de este modo es que la separación se genera en un medio de separación discontinuo. El capilar se debe llenar con un electrólito líder o guía en un extremo. Este debe tener una gran movilidad, y debe ser mayor que la de los componentes a separar. Luego se introduce la muestra seguida del electrólito terminal, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra. La selección de los electrólitos guías y terminales depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del pK_a para todos los componentes de la muestra [17].

En ITP las bandas están siempre en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un BGE continuo.

A diferencia de los otros modos anteriormente nombrados, donde la concentración del analito es proporcional al área debajo del pico electroforético, en ITP la cuantificación viene dada por la medida del largo de la zona detectada la cual, sí respeta una proporcionalidad con la concentración del compuesto.

1.1.3. Fundamentos de CZE

La separación electroforética se basa en las diferentes velocidades de los analitos parcialmente o completamente cargados en un BGE dentro un campo eléctrico externo. La velocidad está dada por la siguiente expresión:

$$v = \mu_{\text{eff}} E \quad (1.1)$$

Donde μ_{eff} es la movilidad electroforética del analito, E el campo eléctrico aplicado y v la velocidad del ión. El campo eléctrico puede expresarse, suponiendo que todo el BGE del capilar es de composición constante, como un cociente entre el voltaje aplicado y la longitud del capilar, dos parámetros experimentalmente medibles:

$$E = V/L \quad (1.2)$$

Si se toma el voltaje aplicado V en voltios y la longitud del capilar L en cm, el campo eléctrico tendrá unidades de volts/cm. A su vez, la movilidad efectiva de un ión en un BGE determinado, es

una constante característica del ión y es directamente proporcional a la fuerza eléctrica (FE) e inversamente proporcional a la fuerza de fricción (FF) experimentada por el ión en el medio:

$$\mu_{\text{eff}} \propto FE / FF \quad (1.3)$$

Expresando la fuerza eléctrica a partir de las leyes de la electrostática como:

$$FE = q E \quad (1.4)$$

Donde q es la carga del ión. Aproximando la fuerza de fricción con la ecuación de Stokes-Einstein y considerando a los iones esféricos se alcanza la siguiente expresión:

$$FF = 6 \pi \eta r v \quad (1.5)$$

Donde η es la viscosidad de la solución empleada como BGE, v la velocidad del mismo y r el radio del ión, el cual se puede reemplazar por el radio de Stokes. Si se considera que durante la electroforesis se llega a un estado estacionario, en donde ambas fuerzas se encuentran balanceadas (iguales y opuestas):

$$q E = 6 \pi \eta r v \quad (1.6)$$

Y si se reemplaza la velocidad en esta expresión por la de la ecuación (1.1), se obtiene una expresión que describe la movilidad electroforética a partir de parámetros físicos:

$$\mu_{\text{eff}} = q / 6 \pi \eta r \quad (1.7)$$

Analizando esta ecuación puede verse que iones pequeños y de cargas elevadas tendrán movilidades altas. Así mismo, las μ_{eff} son independientes del campo eléctrico, y por lo tanto del voltaje aplicado y de la longitud del capilar.

1.1.3.1. Flujo electroosmótico

El EOF es un flujo neto del seno del líquido a lo largo del capilar como consecuencia del efecto del campo eléctrico sobre las cargas superficiales del interior del capilar que en general es de sílice. Este afecta al tiempo de migración de los analitos en el capilar, definiendo una movilidad aparente (μ_{app}) que involucra la μ_{eff} del analito, descripta anteriormente, y un nuevo componente que denominaremos como movilidad del EOF (μ_{EOF}). Por lo tanto, la movilidad aparente es:

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (1.8)$$

Por lo tanto, el EOF es un parámetro de gran importancia, ya que afecta directamente las movilidades de todas las especies y por lo tanto los tiempos de migración y la resolución de los compuestos.

La velocidad del EOF se puede describir a partir del modelo de doble capa cargada, definiéndose en función de la constante dieléctrica o permitividad de la solución ϵ , el potencial zeta de las paredes del capilar ζ , y la viscosidad de la solución η , según la ecuación siguiente:

$$v_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad (1.9)$$

Teniendo en cuenta la expresión anterior y en analogía con la ecuación número (1.1) se puede deducir fácilmente que:

$$\mu_{EOF} = \epsilon \zeta / \eta \quad (1.10)$$

Vale la pena destacar que el potencial zeta, en el caso de capilares de sílice, está determinado principalmente por la carga superficial de la pared y ésta, a su vez, por el pH (debido a la ionización de los grupos silanol de la superficie), por lo tanto la magnitud del EOF variará con el pH. A altos valores de pH, donde los silanoles se encuentran en su mayoría desprotonados, el EOF es significativamente mayor que a valores de pH bajos, donde los silanoles se hallan protonados. Según el pH en el que se trabaje se puede obtener diferencias en el EOF incluso superiores a un orden de magnitud. Por lo tanto, el pH es un parámetro fundamental en la separación electroforética que afecta al EOF y a la μ_{eff} de los analitos ionizables. Dado que el potencial zeta es dependiente de la fuerza iónica, esta también afecta al EOF. Al aumentar la fuerza iónica del medio, la doble capa eléctrica sufre una compresión, en consecuencia, existe una disminución en el potencial zeta. En otras

palabras, el EOF se ve reducido según aumente la fuerza iónica del BGE. Por otro lado, se debe considerar también el importante efecto de la viscosidad del BGE, la cual es considerablemente afectada por la temperatura, por lo que ésta constituye otro factor importante a controlar si se desea obtener una reproducibilidad aceptable. Todas las mencionadas son variables experimentales que siempre se deben tener en cuenta no sólo porque controlan del EOF sino porque también establecen las condiciones químicas de las especies a separar, la corriente que se establecerá y consecuentemente el calor generado y la pérdida de eficiencia, entre otros factores.

En el caso de las cromatografías, el flujo que se establece es hidrodinámico, es decir, que es establecido a partir de una diferencia de presión. El perfil de velocidades de este tipo de flujo, como fue esquematizado en la figura 2.b, es parabólico, lo cual produce un ensanchamiento longitudinal de las bandas cromatográficas debido a la diferencia de velocidades entre los distintos puntos de la sección transversal de los tubos. En cambio el EOF tienen como principal característica su perfil plano de velocidades (fig. 2a), comúnmente conocido como “flujo pistón”, y que, a diferencia de los flujos hidrodinámicos, produce una dispersión prácticamente nula de las bandas electroforéticas, lo cual constituye la base de la elevada eficiencia de las técnicas electroseparativas. Así, despreciando este efecto dispersivo, en CE el ensanchamiento de bandas quedaría definido fundamentalmente por la difusión longitudinal, con lo cual, se pueden alcanzar eficiencias que, en términos de número de platos teóricos, suele ser de entre 10 y 30 veces mayores que los alcanzados en HPLC.

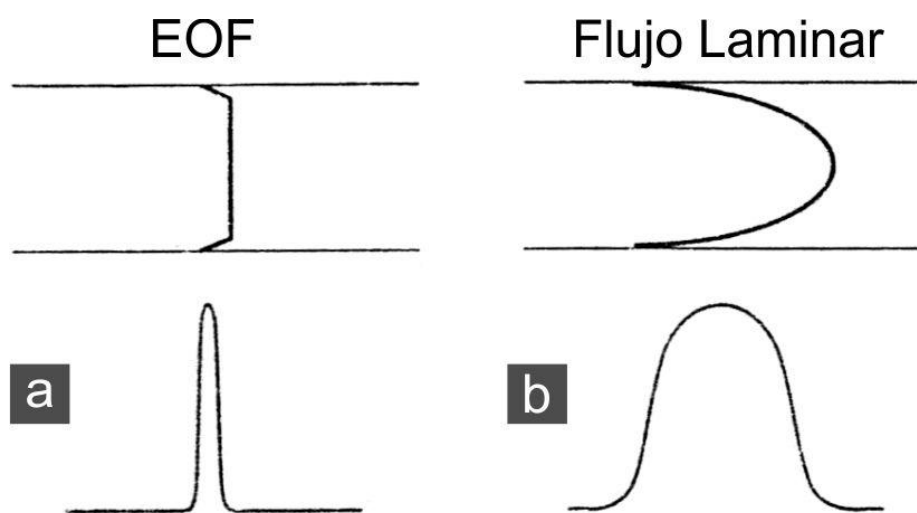


Fig. 1.2. Perfiles de velocidades e hipotética dispersión de un pico (arriba y abajo respectivamente) al ser detectado de a) flujo impulsado por una diferencia de potencial y, b) flujo impulsado por una diferencia de presión.

1.2. Estrategias para mejorar los límites de detección en CE

Una de las mayores desventajas asociada a las técnicas analíticas que utilizan caudales que se encuentran en el orden de los pocos microlitros (μL) o nanolitros (nL) por minuto, son los elevados límites de detección en unidades de concentración que poseen, obteniendo mediante detectores convencionales valores en el orden de los $\mu\text{g/mL}$ (ppm). Entre ellas se pueden mencionar además de la CE, las separaciones en chip y técnicas cromatográficas como $\mu\text{-HPLC}$, HPLC-capilar y nano-HPLC. Este obstáculo a sortear se debe principalmente a las pequeñas cantidades de muestra que pueden ser analizadas. Para poder mejorar esta situación y avanzar de una forma sólida hacia la miniaturización de los sistemas, eso es tratando de hacer comparables los parámetros de calidad analíticos de las micro-técnicas de análisis respecto a las convencionales, se debe tener el objetivo de mejorar la relación señal-ruido (*signal to noise ratio*, S/N) de la sustancia a determinar. Esto se suele realizar de dos formas distintas (figura 3), la primera consiste en concentrar las sustancias que se desean determinar mientras que la segunda se enfoca en la utilización de detectores cada vez más sensibles y/o selectivos.

Como se puede apreciar en la figura 3, debido a la versatilidad de la CE, las estrategias de preconcentración son muy variadas y se pueden llevar a cabo tanto de forma *on-line* (en línea) como de forma *off-line* (fuera de la línea). Esta última es la forma más frecuente de preconcentrar, donde la preconcentración y el análisis por CE se hacen en dos pasos completamente separados (figura 1.4) [18–22].

En este último caso, los extractos deben ser transportados físicamente al equipo de CE, lo cual aumenta notablemente los tiempos de análisis y disminuye la reproducibilidad del sistema. Como solución parcial a este inconveniente surge la automatización del procedimiento. Estos sistemas se han denominado por varios autores como sistemas *at-line* [23,24], donde se mejoran notablemente ambos aspectos (figura 1.4).

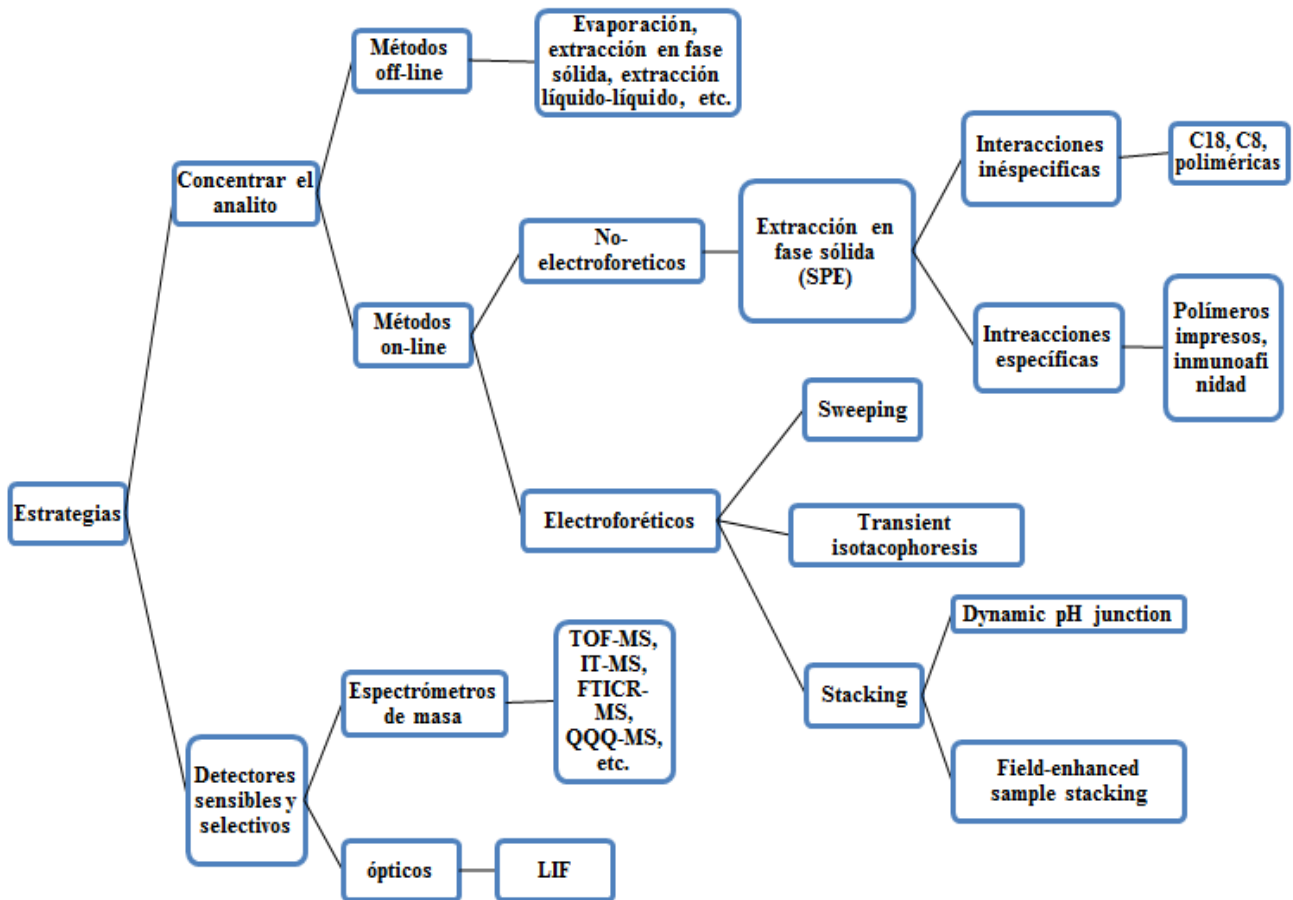


Fig. 1.3. Esquema de clasificación de las posibles estrategias para mejorar los límites de detección (LODs) en CE.

Por otra parte, entre los métodos de preconcentración *on-line*, que serán descritos con más detalle en las siguientes secciones, se encuentran un amplio espectro de posibilidades basados en distintos principios fisicoquímicos de concentración que a su vez pueden ser acoplados a la electroforesis capilar dentro de un sistema de flujo continuo, Lunte *et al.* [25] describen en uno de sus trabajos una revisión bastante completa.

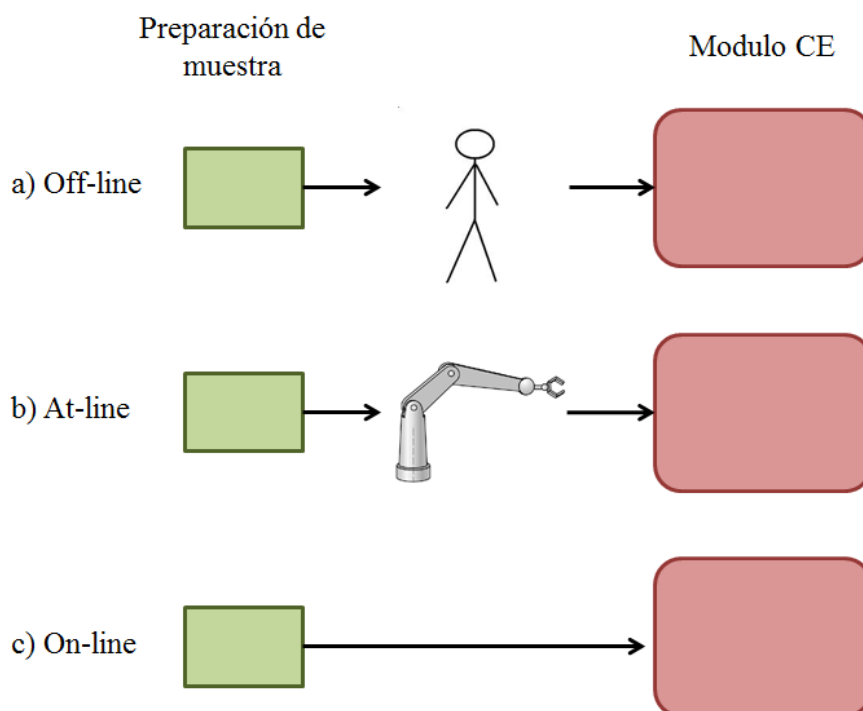


Fig. 1.4. Clasificación de los distintos grados de integración de la preconcentración, clean-up de muestra y el análisis por CE. a) *off-line*, b) *at-line* y c) *on-line*.

Vale la pena resaltar esta premisa como principal ventaja de estos métodos lo que da lugar a un abanico inmenso de posibilidades para la mejora de los LODs en el análisis por CE para un gran número de compuestos.

1.2.1. Métodos de preconcentración en línea

Los métodos de preconcentración *on-line* se pueden clasificar principalmente de acuerdo a los principios fisicoquímicos por el cual los analitos son concentrados. Es decir, por un lado estarán los métodos de preconcentración *on-line* basados en principios electroforéticos y, por otro lado, los basados en métodos no electroforéticos.

1.2.1.1. Métodos electroforéticos de preconcentración

Los métodos electroforéticos de preconcentración, están basados en principios tanto electroestáticos como dinámicos centrándose en la generación de distintas interfases dentro del medio de separación.

Como característica principal, y a diferencia de los métodos de preconcentración no electroforéticos, el proceso de concentración del analito se lleva a cabo dentro del capilar de separación sin la necesidad de emplear microcartuchos o reactores. En cuanto a desventajas, estos métodos dependen normalmente del campo eléctrico aplicado y de las movilidades efectivas de los analitos, lo cual dificulta la aplicación y reproducibilidad en muestras reales [26,27]

Dentro de este grupo, se pueden destacar como los más importantes por su efectividad y sus amplios usos sobre diversos analitos y muestras los siguientes:

- I. Isotacoforesis capilar transitoria (t-ITP): Como se mencionó anteriormente, la ITP es un modo de separación en CE, en el cual la muestra es introducida entre el BGE líder y el BGE terminal. En el momento de aplicar el voltaje de separación se produce una concentración de las bandas que se ajusta automáticamente y es determinada por la concentración del ion en la zona inmediatamente más próxima. Este principio puede ser perfectamente aplicado como paso previo a la separación por CE para preconcentrar los analitos y se conoce como t-ITP. Existen varias alternativas para realizar t-ITP, como por ejemplo, emplear un BGE con baja movilidad electroforética como una solución de borato con el cual se rellena el capilar, luego un BGE líder (Ej. Cloruro de Sodio) seguido de la inyección de la muestra. Otra alternativa es adicionando el BGE líder a la muestra obteniendo, de esta forma, los mismos efectos de t-ITP. La elección de los BGE líder y terminal es fundamental para tener una buena eficiencia en t-ITP. Para ello, son de gran ayuda el estudio de los mecanismos implicados y las simulaciones por computadora [17,28–31]. Por otra parte Shihabi demostró en sus trabajos que la adición de un solvente orgánico miscible en agua, como por ejemplo acetonitrilo, acetona o 2-propanol junto con sales como por ejemplo cloruro de sodio, pueden ser muy útiles para la preconcentración *on-line* de muestras mediante un fenómeno el cual el denominó como pseudo ITP [32–34]. En este caso el solvente orgánico actúa como BGE terminal y el cloruro como BGE líder.
- II. Concentración por campo amplificado (*Field-enhanced sample stacking, FESS*): El principio de este método de preconcentración es simple, y se lleva a cabo optimizando las conductividades eléctricas tanto de la muestra como del BGE para poder generar diferentes campos eléctricos que luego son los que van a permitir la preconcentración de los analitos. Sabiendo que la velocidad electroforética en una solución limpia v_{ep} cumple con la ecuación 1.1. Si se generan dos zonas con diferentes campos eléctricos (E), podemos deducir que como resultado los analitos tendrán distintas velocidades electroforéticas (v_{ep}) y éstas están íntimamente relacionadas con las conductividades de las soluciones de cada una de las zonas

en cuestión. Así, es fácil deducir que:

$$\gamma = (v_{ep1} / v_{ep2}) = (E_1 / E_2) = (\rho_1 / \rho_2) \quad (1.11)$$

Donde γ es la relación de velocidades electroforéticas y ρ es la resistividad de las zonas 1 y 2 respectivamente. A modo de ejemplo, si la muestra es preparada en una matriz con una gran resistividad, esto es teniendo una muy baja fuerza iónica, mientras que el BGE, contrariamente, posea una muy baja resistividad, es decir, una muy alta fuerza iónica, los analitos serán concentrados en la interfaz entre las dos zonas debido a la diferencia de velocidades.

La concentración final (C_{stacked}) estará relacionada con la relación de velocidades electroforéticas (γ) y la concentración de la muestra inyectada (C_{injected}) de la siguiente forma:

$$C_{\text{stacked}} = C_{\text{injected}} \gamma \quad (1.12)$$

Se han desarrollado muchas aplicaciones utilizando este método para distintos tipos de muestras [26,27].

- III. Interfases dinámicas de pH (*Dynamic pH junctions*): La elección del pH del BGE es muy importante en la optimización de las separaciones electroforéticas. El pH puede ser usado como una fuente de selectividad en analitos de características muy similares o bien para variar la velocidad del EOF y acortar los tiempos de análisis. De la misma manera, si se tiene un medio con zonas a distintos pH dentro del capilar de separación, se pueden generar cambios significativos en el grado de ionización de los analitos al cruzar de una zona a otra y de esta forma cambiar las velocidades de los mismos. El nombre de este método de preconcentración fue propuesto por McKibbin [35,36], aunque su fundamento ya había sido descrito previamente [37]. A modo de ejemplo, se puede considerar el caso de un analito el cual es un ácido débil disuelto en una matriz ácida. Si se inyecta un gran volumen de éste dentro de un capilar que inicialmente estaba lleno de un BGE alcalino, en el momento de aplicar un voltaje positivo sobre el extremo de inyección, la zona ácida será gradualmente titulada por el BGE alcalino y el analito se encontrará totalmente ionizado con carga negativa en la zona neutralizada. Debido a esta carga negativa, el analito migrará hacia el ánodo pero al entrar a la zona ácida volverá a protonarse y dejará de migrar nuevamente. Por lo tanto, el

analito resultará concentrado en la zona de neutralización.

- IV. Preconcentración por barrido (*Sweeping*): Esta técnica ha sido desarrollada originalmente para preconcentrar analitos neutros en MEKC [38]. En este caso, los analitos son retenidos y acumulados por una fase pseudoestacionaria (micelas) que penetran en la zona inyectada de muestra. El largo de la zona luego de ser “barrida” (l_{sweep}) viene dado por la siguiente expresión:

$$l_{\text{sweep}} = l_{\text{inj}} [1/(1+k)] \quad (1.13)$$

En donde l_{inj} es el largo del tapón de muestra inyectado y k es el factor de retención el cual está definido como la relación entre la cantidad de analito retenido dentro de la micela y la cantidad fuera de la misma. Por otra parte, la concentración de micelas que entran en la zona de la muestra es aproximado a la concentración micelar crítica (CMC) en el BGE. De esta forma, se puede analizar fácilmente que los analitos que posean interacciones muy fuertes con las micelas, es decir, su factor de retención o k sea muy elevado, tendrán factores de preconcentración muy elevados. Se ha comprobado experimentalmente que ubicar la zona de detección exactamente seguida del final de la zona de preconcentración permite obtener eficiencias y factores de preconcentración muy grandes ya que la dispersión de las bandas en esta técnica es mucho mayor que en las convencionales [39,40]. Además, se puede optimizar la composición de la matriz de la muestra con el fin de mejorar los resultados, esto puede ser por ejemplo, disminuyendo el contenido de solventes orgánicos o bien utilizar aditivos para mejorar la separación como pueden ser las ciclodextrinas. Éste método se ha demostrado eficaz también para analitos cargados (sin importar el número de cargas que posean) y en presencia de EOF sin importar su dirección [41].

1.2.1.2. Métodos no electroforéticos de preconcentración

Dentro de los métodos de preconcentración *on-line* basados en fenómenos no-electroforéticos podemos encontrar a los fundados en fenómenos retentivos. De este gran grupo podemos destacar, como la técnica de preconcentración más utilizada y en la cual nos enfocaremos a lo largo de esta tesis doctoral, a la extracción en fase sólida acoplada *on-line* a la electroforesis capilar (SPE-CE). La

integración del microcartucho de extracción con la separación por CE ofrece una disminución significativa en los tiempos de análisis, minimización de la manipulación de la muestra y consecuente disminución en las pérdidas de la misma en el proceso de pretratamiento y la posibilidad de automatizar el proceso de preconcentración y separación de manera completa y simple [23]. Además, se han reportado trabajos en los que se han introducido alrededor de 100 μL de muestra en capilares con volúmenes menores a 300 nL y volúmenes de elución del orden de 1nL, dando de esta forma, factores de preconcentración realmente elevados (hasta 10000 veces) [42].

Debido a que se utiliza muy poca cantidad de fase estacionaria en los microcartuchos que se preparan en el propio laboratorio y que prácticamente no es necesario el uso de equipamiento específico, esta técnica resulta ser muy económica. Vale la pena destacar que, debido a que el microcartucho se integra al inicio del capilar, el voltaje de separación es aplicado a través de la fase extractante a lo largo de todo el análisis. Además, existen distintos diseños de microcartuchos de SPE [18,43,44], entre ellos podemos identificar a los siguientes (fig.1. 5):

- a) Microcartuchos con capilares recubiertos con una fase estacionaria. Si bien la interposición de estos microcartuchos de SPE dentro del capilar de separación originaría las menores caídas de presión e interferencias en el campo eléctrico aplicado, el área expuesta para la retención es pequeña y los factores de preconcentración no son muy elevados, (fig.1.5-a).
- b) Microcartuchos rellenos con partículas de fase estacionaria o conteniendo un lecho permeable del tipo monolítico. En este caso la caída de presión y el cambio en el campo eléctrico de separación aplicado se verán afectados de manera significativa mientras que el poder retentivo del cartucho es mucho mayor debido al área expuesta a los analitos. En el caso de emplear partículas, se pueden preparar con fritas o sin fritas. (fig.1.5-b)
- c) Microcartuchos con membranas retentivas: Este último diseño consta de una fina membrana porosa y retentiva ubicada entre dos tramos de tubo capilar. (fig.1.5-c)

Como se puede observar en la figura 1.5, los tres esquemas implican anteponer un microcartucho de extracción en fase sólida en el capilar de separación. Estos tres casos poseen ventajas y desventajas entre ellos. Se puede deducir fácilmente que a mayor área efectiva de sorbente habrá mayor posibilidad de retención del analito y cuanto más fase estacionaria se pueda incluir mayor será la capacidad retentiva. Sin embargo, no se debe olvidar la elución ni la separación, que implican la recuperación cuantitativa del analito retenido y la estabilidad de la corriente eléctrica. Por lo tanto, nos encontramos en una situación de compromiso entre variables como el área efectiva del sorbente,

la cantidad de fase estacionaria, los volúmenes de inyección, las dimensiones y configuraciones del microcartucho de extracción, obteniendo valores óptimos y reproducibles según el contexto del problema a resolver.

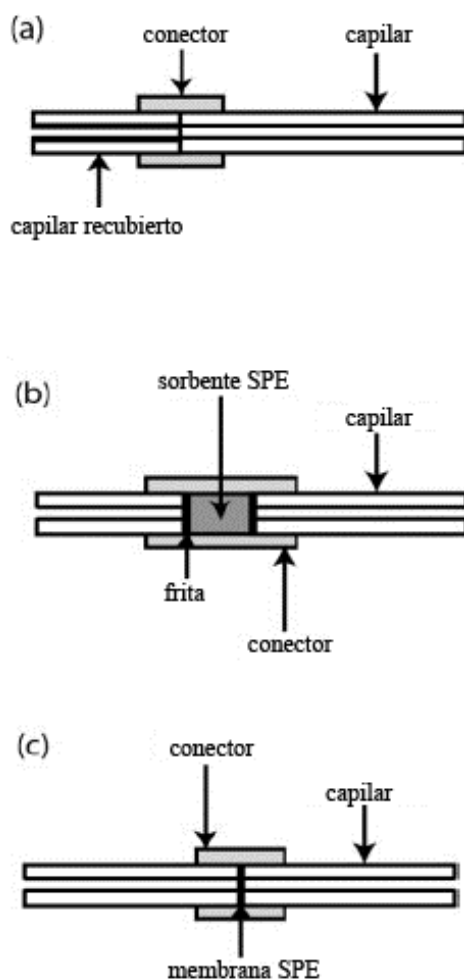


Fig. 1. 5. Tipos de diseño de preconcentradores de SPE-CE. a) Capilar recubierto con material sorbente, b) microcartucho relleno de partículas o monolitos SPE y c) membrana de SPE entre dos capilares.

Dentro de los microcartuchos rellenos con partículas de fase estacionaria encontramos dos tipos de diseños ampliamente usados:

i) Preconcentradores con fritas: En estos sistemas se utilizan principalmente capilares de

separación de 50 y 75 μm de diámetro interno. El microcartucho suele ser un capilar de alrededor de 7 mm de largo y un diámetro interno de 250 μm , y los capilares de sílice fundida más empleados tienen un diámetro externo de 365 μm . Los fragmentos del capilar de separación son ensamblados con el microcartucho, el cual poseerá en los extremos sendos dispositivos porosos o fritas para contener las partículas de fase estacionaria retentiva y así evitar la pérdida hacia el capilar de separación [45,46]. Este esquema se encuentra detallado en la figura 1.6-a.

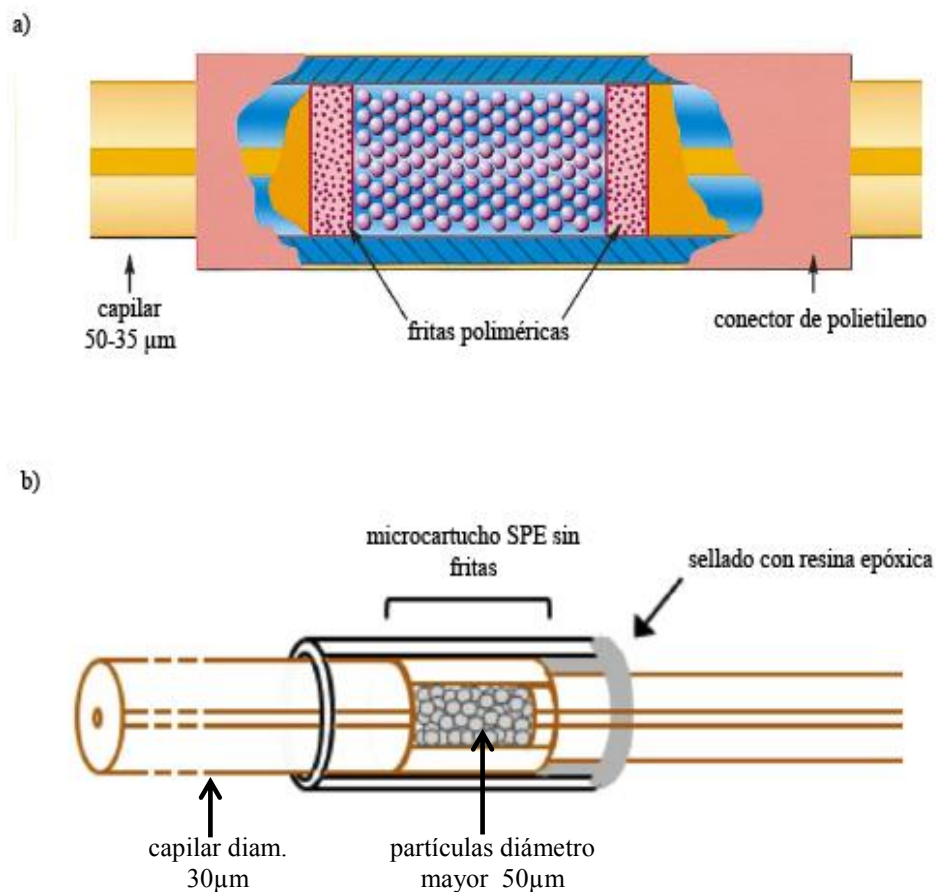


Fig.1.6. Tipos de diseño de preconcentradores con rellenos particulados o monolíticos. a) Preconcentradores con fritas y b) preconcentradores sin fritas (*fritless*).

- ii) Preconcentradores sin fritas: Para construir los preconcentradores sin fritas (*fritless*) fig.1.6-b), se utilizan capilares de separación de menor diámetro interno, entre 30 y 50 μm , mientras que el diámetro preferido para los preconcentradores es de alrededor de 150 μm de diámetro interno. En este caso las partículas de fase estacionaria deben ser tamizadas para seleccionar las de diámetro de partícula mayor a 50 μm . De este modo, por impedimento físico las partículas no podrán pasar al capilar de separación evitando de esta forma el uso de fritas [47,48]

En esta tesis doctoral se emplearon microcartuchos rellenos con partículas y doble frita, con los cuales se han obtenido los mejores resultados hasta la actualidad [49,50].

Respecto a las fases estacionarias, éstas pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado, las fases estacionarias con mecanismos de retención inespecíficos, entre ellas podemos destacar fases estacionarias como C18 y C8, mientras que por el otro lado se encontrarían las que poseen mecanismos de retención específicos, por ejemplo las fases estacionarias de inmunoafinidad. Además, se deben cumplir ciertos requisitos para que la fase pueda resultar apta para preconcentrar tanto en sistemas *off-line* como *on-line* de SPE. Las mismas fueron reportadas por Fritz [51] y son descriptas a continuación:

(a) Una gran proporción del analito debe ser retenida de forma reproducible.

(b) El soluto debe ser fácilmente eluído de forma completa.

En otras palabras, el proceso de sorción debe ser idealmente reversible, además de poseer poros con una gran área superficial, estar libre de impurezas lixiviables, ser estable frente tanto a soluciones de muestra como de eluyente, y por último, que exista una excelente superficie de contacto entre el sólido y la solución para favorecer el intercambio.

Fases estacionarias inespecíficas

La retención en este tipo de fases estacionarias es debida a los mecanismos de absorción (partición), adsorción electrostática superficial, de intercambio iónico y por reacción química con la fase estacionaria [19,20,52–54]. A pesar de diferenciar estos fenómenos retentivos inequívocamente, en la mayoría de las fases estacionarias no existe un mecanismo puro de retención, sino que coexisten

varios, pudiendo haber uno o más preponderantes. Estas interacciones son de carácter inespecífico ya que no poseen una selectividad apreciable hacia algún analito, familia de analitos, grupos funcionales, etc. en particular.

Las fases estacionarias más estudiadas y aplicadas en SPE-CE fueron las clásicamente usadas por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RPLC), que se han utilizado ampliamente en los cartuchos de SPE *off-line* [55]. Estas están constituidas por hidrocarburos enlazados covalentemente a partículas de sílice. Entre ellas se pueden destacar las partículas de octadecil sílice (C18) y octil sílice (C8), que son las utilizadas con más frecuencia en por su robustez y universalidad [46,48,49,56–61]. Adicionalmente, también se han empleado fases estacionarias basadas en cadenas hidrocarbonadas más cortas (C4 y C2) [62] o variaciones respecto a las anteriores [58]. Por otra parte, también se han aplicado con éxito fases estacionarias de base polimérica [58]. Es así que diversos autores han reportado trabajos utilizando fases poliméricas con mecanismos de retención mixtos (hidrófobicos y de intercambio) SDB, SDB-XC, Oasis HLB, ENV y Strata-X para una amplia gama de analitos, entre ellos podemos destacar péptidos y compuestos farmacéuticos en distintos fluidos biológicos así como en efluentes naturales [47,50,58,63,64]. También se han descrito aplicaciones usando fases estacionarias de intercambio iónico [58,65] y con mecanismos mixtos en los que se combinan estos últimos con los fenómenos retentivos propios de fases reversas [58,66,67]. En los últimos años, se han utilizado monolitos como materiales sorbentes, sus ventajas residen en evitar la necesidad de las fritas, en la poca caída de presión que poseen respecto a los lechos particulados y la posibilidad de funcionalizarlos con distintos grupos químicos [68–73]. Con el fin de mejorar la superficie activa de la fase estacionaria se han descrito otro tipo de fases estacionarias basadas en interacciones inespecíficas producidas por nanopartículas, donde pocos trabajos utilizando nanotubos de carbono [74] y nanopartículas de oro [75] como fase estacionaria han sido reportados.

Como se puede apreciar a lo largo de esta sección, se han utilizado numerosas fases estacionarias con distintos mecanismos inespecíficos de retención. Tanto con estándares como con muestras reales. En la mayoría de los casos, uno de los principales problemas que se puede apreciar, es la fácil saturación de los microcartuchos cuando se analizan muestras reales, lo que resulta en un empeoramiento notable de los LODs respecto al análisis de estándares. Este hecho, abre un panorama muy grande para el campo de las fases estacionarias con interacciones específicas, las cuales tienen el potencial de mejorar enormemente los factores de preconcentración para un analito o un grupo de analitos en muestras reales respecto a las fases estacionarias inespecíficas convencionales en muestras reales.

Fases estacionarias específicas

Las fases estacionarias específicas poseen la ventaja de ser selectivas a un analito o a un grupo de analitos en particular con características similares entre sí. Esto mejora no solo la señal del mismo sino que elimina todo tipo de interferentes que existan en la muestra disminuyendo, de esta forma, el ruido que existe y mejorando de forma directa los LODs y la fiabilidad de la determinación analítica. Los sorbentes más destacados en este campo son los basados en interacciones de afinidad (ACE: *on-line affinity capillary electrophoresis*) en los que se pueden destacar los siguientes tipos: IACE (*on-line immunoaffinity capillary electrophoresis*) en la que se utiliza un anticuerpo inmovilizado como fase estacionaria para preconcentrar su antígeno [76]; LACE (*on-line lectin affinity capillary electrophoresis*) en el cual la fase estacionaria está compuesta por lectinas y los compuestos a preconcentrar son hidratos de carbono o biomoléculas sustituidas con azúcares (Ej. Glicopéptidos) [77]; y EACE (*on-line enzyme affinity capillary electrophoresis*) que se utiliza para cuantificar la conversión del sustrato en producto y para evaluar la cinética de la reacción más que a fines de preconcentrar [78]. Kasicka *et al.* publicaron en 1983 los principios de adsorción de proteínas selectivamente sobre un inmunosorbente y su electrodesorción isotacoforética [79], mientras que subsecuentemente, fue descrito para IACE por Guzman *et al.* [80] y otros autores [80–82]. En la actualidad, IACE es la alternativa que presenta mayor potencial para preconcentrar y aislar selectivamente compuestos de interés biológico en muestras complejas, como por ejemplo la eritropoyetina [83,84]. Entre otros usos también fue aplicada para preconcentrar cierto tipo de biomoléculas en fluidos biológicos [76,85–88]. Por último, también han sido reportadas fases estacionarias específicas basadas en polímeros molecularmente impresos (MIP), los cuales retienen selectivamente grupos de familias de analitos que se tienen en cuenta para su preparación, incluso en muestras reales. Lara J. y colaboradores optimizan la separación y preconcentración de un grupo de atrazinas SPE-CE-UV utilizando MIPs como sorbente para realizar un *clean-up* de las muestras de orina con muy buenos resultados [89]. Además compara los resultados frente a una fase estacionaria inespecífica polimérica (Oasis HLB), observándose claramente las ventajas de los MIPs.

1.2.2. Detectores selectivos y sensibles: espectrómetros de masa

Otra alternativa para poder mejorar los LODs en CE es mediante el uso de detectores selectivos y sensibles de última generación. Los más importantes a destacar en este apartado son los fundados en

la espectrometría de masa (MS), la cual provee la posibilidad de identificar con un alto grado de confianza (dependiendo del espectrómetro) compuestos desconocidos. Por lo tanto, combinando una técnica de separación de alta eficiencia como puede ser la CE con un sistema de detección por MS se obtiene una herramienta importantísima para el análisis de muestras complejas. Sin embargo, el acoplamiento no resulta trivial, ya que se requiere de una interfaz que genere, por un lado, el contacto eléctrico necesario para cerrar el circuito electroforético de separación y, a la vez, la volatilización e ionización eficiente del BGE y el analito para obtener una sensibilidad y reproducibilidad óptima en la detección.

La interfaz de ionización actualmente más utilizada en MS es la de ionización por *electrospray* (ESI). Fue desarrollada bajo los fundamentos descritos por Fenn J. en 1993 [90]. En la interfaz de ESI la corriente de líquido a presión atmosférica atraviesa un electrodo con forma de aguja en cuyo extremo se aplica una diferencia de potencial de aproximadamente 3 kV. Al pasar por este extremo, el líquido comienza a estar cargado y el solvente se va evaporando, dejando un spray de pequeñas gotas pulverizadas altamente cargadas. Los iones formados dentro de las gotas son desorbidos espontáneamente de la misma, o bien estas pequeñas gotas experimentan explosiones coulombicas que producen gotas cada vez más pequeñas tendiendo a las dimensiones de un ion libre [91]. Este proceso se suele asistir con un gas, en general, nitrógeno y se puede observar esquematizado en la fig.1.7. Debido a que el ESI produce especies policargadas, y los espectrómetros de masa detectan la relación masa-carga (m/z) de las especies, se pueden no sólo observar los iones moleculares monocargados sino que también especies policargadas de moléculas más grandes, esto permite la detección de sustancias de elevada masa molecular (>100000 Da), en espectrómetros de masa con intervalos de barrido convencionales (50-3000 m/z).

Hoy en día existen dos tipos de interfases comúnmente utilizadas para acoplar la CE a los espectrómetros de masa: la interface que utiliza líquido auxiliar (*sheathflow*) y la interfaz sin líquido auxiliar (*sheathless*). Cada una con distintas ventajas y desventajas cuya mayor diferencia radica en la forma de cerrar el circuito eléctrico de separación y establecer una diferencia de potencial en la punta de la aguja [92,93].

Interfaz con líquido auxiliar: Es la interfaz de CE-MS más antigua y mayormente empleada, la cual fue desarrollada por Smith *et al.* en 1988 [94]. La característica principal se centra en la utilización de un líquido auxiliar coaxial para aumentar el caudal proporcionado por el capilar de la CE y al mismo tiempo, cerrar el circuito eléctrico a la salida del capilar de separación (fig.1.8-a) [95,96]. Generalmente, la nebulización es asistida con nitrógeno como en las interfases ESI

convencionales. Asimismo, la composición del líquido auxiliar es el factor a optimizar dependiendo del problema, ya que su variación afecta sensiblemente a la ionización. Al operar en modo positivo, es conveniente emplear soluciones con solventes hidroorgánicos (50-80% v/v) y ácidos orgánicos volátiles como aditivos (0.05-0.5% v/v) tales como el ácido acético [97]. Como ventajas, vale la pena destacar la reproducibilidad, robustez, la fácil implementación y la versatilidad a la hora de optimizar los métodos de CE-MS. Éstos se encuentran disponibles comercialmente desde hace más de 15 años. La desventaja de utilizar líquido auxiliar es que en algunos casos los LODs no son tan bajos como los que se obtienen con las interfases *sheathless* debido a que el líquido auxiliar produce la dilución de los analitos. Además el líquido auxiliar puede llegar a producir ensanchamiento de los picos electroforéticos o alterar la separación debido a la diferencia en las propiedades respecto al BGE.

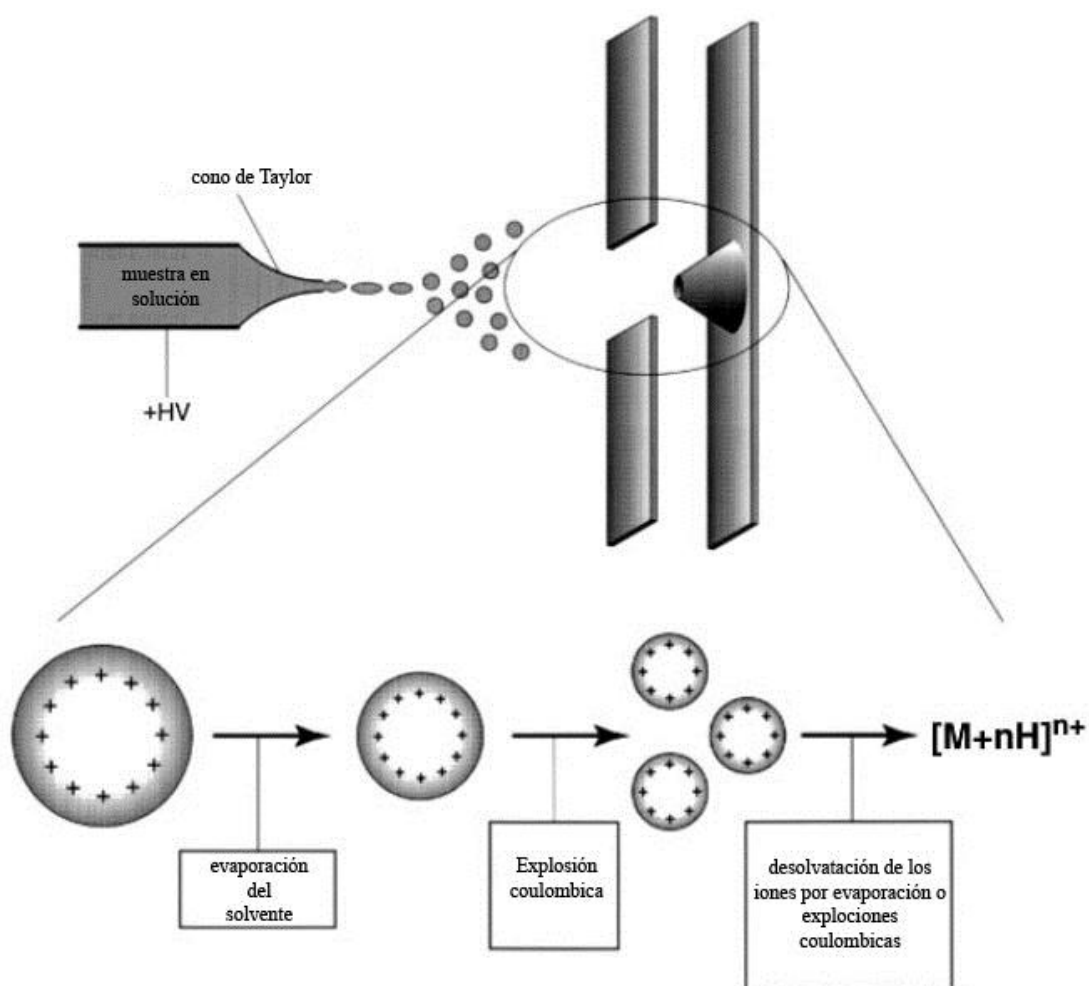


Fig.1.7. Producción de iones en la interfaz ESI. Se puede observar en una primera instancia la formación del pulverizado de la solución y en la segunda etapa la reducción del diámetro de la gota por explosiones coulombicas o por evaporación del solvente.

Interfaz sin líquido auxiliar: Las interfases de CE-MS sin líquido auxiliar (*sheathless*) suelen ser fuentes de nano-ESI en los que el contacto eléctrico es establecido directamente con el BGE antes o después de abandonar el capilar de separación (figura 1.8 b-e) [96–101]. La principal ventaja que presentan es que no se presenta dilución de los analitos, lo que permitiría obtener una mayor sensibilidad respecto a las anteriores. Se han desarrollado diversos tipos de diseños sin utilizar líquido auxiliar. La mayoría de ellos utilizan en el extremo de salida del capilar de separación o bien un recubrimiento conductor (figura 1.8-b) o bien un microelectrodo inserto en la salida (figura 1.8 c-d). Desafortunadamente los tiempos medios de vida de estos recubrimientos son limitados. Los mismos se deterioran con el uso por los elevados voltajes y el contacto con los componentes del BGE.

En el caso de utilizar microelectrodos, (figura 1.8.d), la aplicación de altos voltajes puede favorecer la generación de burbujas dentro del capilar reduciendo, de esta forma, la estabilidad del contacto eléctrico. En la actualidad, se han diseñado interfases que constan con la particularidad de poseer como extremo de salida del capilar de separación una superficie porosa. En este innovador diseño (figura 1.8 e), esta superficie porosa permite el contacto eléctrico pero no el transporte de materia, con un líquido conductor que circula coaxialmente envolviendo esta última parte del capilar [48,102].

A través de esta superficie polar se produce el cierre del circuito electroforético sin dilución de los analitos. A diferencia de las interfases convencionales en la que se utilizan capilares de 50 o 75 μm de id y 365 μm de od, estas deben trabajar con capilares mucho más estrechos, de 30 μm id y 150 μm od donde se incorpora el nebulizador de alta sensibilidad con punta porosa (HSPS) en el extremo de la salida. Si bien estas interfases se han comenzado a comercializar recientemente, existen resultados publicados en los últimos años [48,100,103–109].

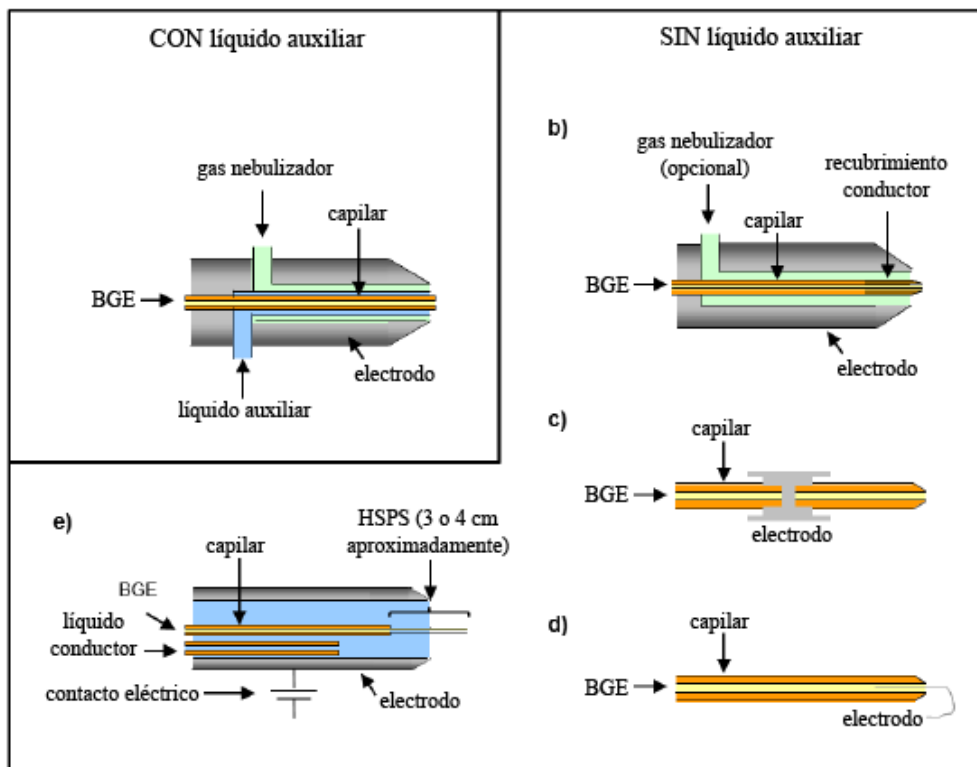


Fig.1.8. Representación esquemática de las distintas interfases de CE-MS. En las cuales a) representa a la interfaz convencional con líquido auxiliar, b), c), d) y e) son distintas conformaciones sin uso de líquido auxiliar.

1.2.2.1. Analizadores de MS

A menudo, los espectrómetros de masa se identifican por su analizador de masas. Existen diferentes tipos como veremos a continuación. Sus diferentes prestaciones no solo radican en las diferencias de sensibilidad, el intervalo dinámico de trabajo, la velocidad de barrido de espectros y la exactitud sino también la resolución espectral entre dos iones con m/z distintas y contiguas. La exactitud en la medida de la masa se expresa en ppm y se calcula como el error asociado a la medida. De esta forma, para un ion de m/z teórica exacta de 500.0000 donde experimentalmente se observa una m/z de 500.0020, la exactitud de la medida de la masa es de 4 ppm. La resolución de un pico, según IUPAC, es la relación de masas del pico (M) y la anchura del mismo (ΔM) a cierta altura ($M/\Delta M$) [110]. La manera más común de expresar la resolución es la FWHM (*full-width at half maximum*), que se calcula con el valor del ancho del pico a media altura. También, se puede definir ΔM como la diferencia de masas entre dos picos adyacentes de alturas similares y separados por un valle que no supera un 10% de su altura. En la tabla 1 se indican los valores de exactitud y resolución de masas

(FWHM) que se obtienen al analizar compuestos de masa molecular pequeña para una variedad de espectrómetros de masas disponibles comercialmente en la actualidad.

A lo largo de los años se han utilizados diversos espectrómetros de masa acoplados a la electroforesis capilar, entre los cuales se pueden destacar el cuadrupolo (Q), la trampa de iones (IT), el tiempo de vuelo (TOF) y el Q-TOF, los cuales se han comercializados en varias combinaciones como sistemas totalmente integrados (Tabla 1.1).

Analizador	Exactitud de la medida	Resolución (FWHM)
Cuadrupolo (Q)	10-40	1000-5000
Trampa de iones (IT)	10-40	1000-5000
Tiempo de vuelo (TOF)	2-5	10000-50000
Orbitrap	1-2	100000-200000
Resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FTICR)	<1-2	100000-1300000

Tabla 1.1. Tabla en la cual se describe la exactitud y resolución de las masas en función a los distintos tipos de analizadores más utilizados en MS.

En la figura 1.9 se pueden observar los esquemas de los tres analizadores más comúnmente usados en CE-MS. Los primeros equipos en comercializarse fueron con analizador de cuadrupolo (Q) (fig. 1.9.a), los cuales si bien poseen buenas prestaciones a costos razonablemente bajos, tiene bajas velocidades de barrido, una sensibilidad limitada y no permiten realizar medidas de MS/MS. Los analizadores de trampa de iones (IT) (fig. 1.9.b) poseen mayor velocidad de adquisición de espectros y permiten realizar experimentos de masas en tándem (MS/MS y MS_n) lo cual proporciona mucha información estructural de la molécula, sin embargo poseen un intervalo dinámico bastante estrecho debido a la limitada capacidad de la trampa de iones [95,96,111]. Además, ambos analizadores resultan poco adecuados para la caracterización de compuestos de elevada masa molecular, dado que sus límites superiores de barrido son pequeños.

En la última década, la espectrometría de masa ha evolucionado considerablemente gracias a la implementación de espectrómetros con analizadores de elevada exactitud y resolución de masas (tabla 1.1), entre ellos el más utilizado en CE-MS es el analizador de tiempo de vuelo (TOF) (fig. 1.9.c). Además, vale la pena resaltar la notable mejora en la sensibilidad y los intervalos dinámicos permitiendo determinar simultáneamente componentes de la muestra de masas muy distintas a

distintos niveles de concentración [112,113]. Sin embargo, una de las desventajas principales de los analizadores TOF, es la imposibilidad de realizar experimentos de MS/MS. Una alternativa moderna es el uso de analizadores híbridos de triple cuadrupolo (QQQ) o de cuadrupolo y tiempo de vuelo (Q-TOF), los cuales poseen una sensibilidad más alta respecto a la IT pero son mucho más costosos que un TOF convencional.

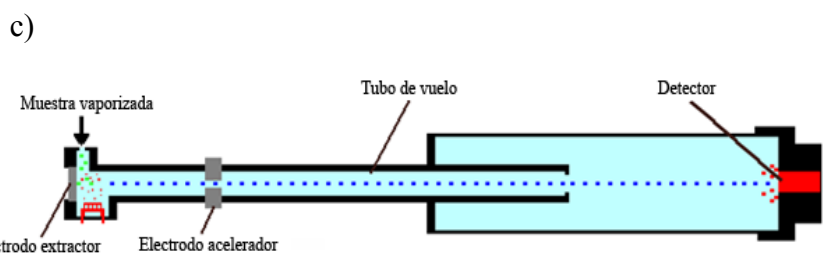
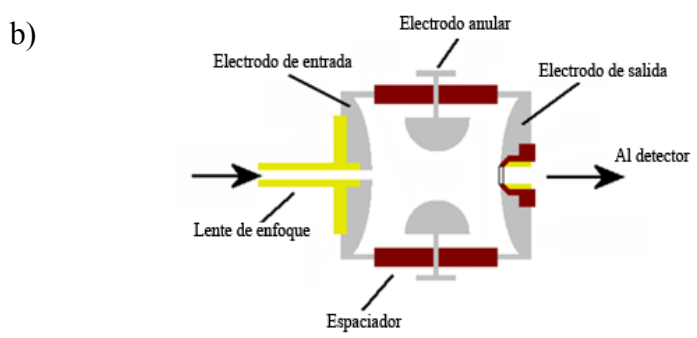
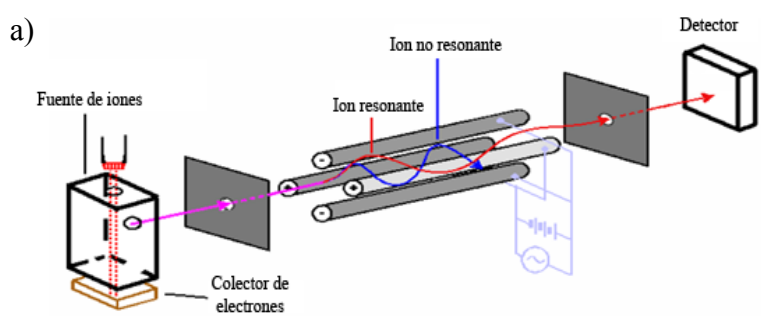


Fig.1.9. Representación esquemática de tres analizadores comúnmente utilizados en CE-MS. a) cuadrupolo, b) IT y c) TOF.

1.2.3. Estrategias combinadas

La combinación de dos o más de las estrategias anteriores pueden resultar de utilidad para mejorar

los LODs en CE, ya sea utilizando preconcentración por técnicas electroforéticas [17,27,114], no electroforéticas [23,45,115] o utilizando detectores sensibles y selectivos [92,100]. Sin embargo, no siempre existe la posibilidad de compatibilizar las condiciones entre ellas, ya sea por los solventes utilizados, por los recubrimientos de los capilares o por la naturaleza de los analitos o la matriz de la muestra. Es por ello, que realizar una combinación de varias estrategias para mejorar los LOD no es una tarea menor.

Los primeros métodos de preconcentración en ser combinados fueron los electroforéticos entre sí, debido a que son los más simples de desarrollar y compatibilizar, o bien, ocurrir en distintos lugares del capilar de separación. Una de las primeras combinaciones consistió en acoplar FESI (*field-enhanced sample injection*) y *sweeping*, la cual permitió aumentar la cantidad de muestra inyectada y enfocarlos, consiguiendo una mejora de los LOD de cerca de un millón de veces utilizando CE-UV [116]. Estos métodos se aplican a compuestos básicos con micelas de SDS como fase pseudoestacionaria en condiciones ácidas o bien, a compuestos ácidos con surfactantes catiónicos como el cloruro de cetiltrimetilamonio empleando capilares recubiertos para suprimir el EOF [117]. Otro tipo de preconcentración electroforética en línea es la de uniones de pH dinámicas, la cual se puede utilizar solamente con analitos débilmente ionizados cuyas movilidades varíen según el pH del BGE. Se puede deducir, que el método es menos exitoso para analitos de baja movilidad y, en la mayoría de los casos, no funciona para especies neutras [118]. La combinación de uniones dinámicas de pH con preconcentración por barrido (*Sweeping*) permite analizar especies neutras y especies de baja movilidad, debido a que mejora la eficiencia del enfoque comparado con cualquiera de los dos métodos de forma independiente, consiguiéndose aumentos de hasta 1200 veces la sensibilidad para derivados de la flavina [119]. Esta combinación de estrategias fue también muy eficiente para el análisis de alcaloides pirrolozidínicos en hierbas medicinales de China, donde se consiguió un aumento de aproximadamente 90 veces llegando a LODs que rondaron los 30 ng/mL [120]. De la misma manera, la ITP se ha combinado con, por ejemplo, FESI originando la denominada *electrokinetic supercharging* (EKS), que permite mejorar más de 3000 veces los LODs [121,122].

Otra posibilidad, consiste en combinar métodos electroforéticos con no electroforéticos. Este tipo de combinaciones es un poco más complicada debido a que los aditivos (surfactantes, solventes, etc.) que se deben utilizar para el método electroforético no deberían interferir en la retención de los analitos en la fase estacionaria a emplear en el método no electroforético. Una de las combinaciones más utilizadas es la de tITP con SPE-CE. La tITP se genera en el momento de eluir los analitos del microcartucho. De esta forma, se puede realizar una compresión o enfoque de las especies eluidas en un pico electroforético mucho más estrecho y, consecuentemente, mejorar la sensibilidad. El

potencial de la combinación de estas dos técnicas con detectores como UV y LIF ha sido rigurosamente evaluado por diversos autores [24,79,123–126]. Además, permite emplear MS como sistema de detección (SPE-tITP-CE-MS), lo que implica la combinación de, no dos, sino tres estrategias diferentes para mejorar los LODs respecto a la CE convencional. Es fácil deducir que a medida que aumentan el número de estrategias combinadas, más exigentes son los requerimientos para compatibilizarlas, en consecuencia, es mucho menor la diversidad y cantidad de trabajos reportados para estas condiciones. [123,124]. Recientemente Wang *et al.* y Medina-Casanellas *et al.* han descrito trabajos de SPE-tITP-CE-MS empleando una interfaz de CE-MS sin líquido auxiliar y con líquido auxiliar, respectivamente [59,127].

1.3. Influencia de la temperatura en CE

A lo largo de esta sección se describirá minuciosamente el efecto que provocan los cambios de temperatura, tanto los intencionales como los intrínsecos del sistema, en las principales variables operativas y, consecuentemente, las implicaciones que éstas tienen tanto sobre las separaciones electroforéticas como sobre las metodologías de preconcentración en línea. De esta forma podremos evidenciar la manera de utilizar la temperatura como variable de optimización, basándonos principalmente en el conocimiento del comportamiento del sistema a estudiar.

Si consideramos los efectos de la temperatura en CE, debemos considerar principalmente dos tipos de fuentes, una intrínseca, debido al calentamiento de Joule ocasionado por el paso de una corriente eléctrica a través del BGE que ofrece resistencia a la misma (BGE) [91], y otra externa, ya sea por convección forzada de aire [128], de un fluido [129,130] o por conducción por contacto con un sólido termostático [131]. La aplicación externa es la que podemos utilizar intencionalmente para estudiar los efectos y optimizar tanto las separaciones como la preconcentración.

1.3.1. Efectos de la temperatura sobre las condiciones fisicoquímicas en CE

Los cambios de temperatura (T), tanto los intrínsecos del sistema como los aplicados externamente, poseen grandes influencias en la CE, por lo tanto se debe tener un profundo conocimiento de esta variable tanto como para utilizarla como herramienta de optimización en las separaciones, como para trabajar isotérmicamente.

Si bien los efectos de la T sobre las variables fisicoquímicas más importantes en CE son bien

conocidos desde principios del siglo XX [91,128,132–135], otros fueron elucidados en los últimos años [136]. Hoy en día, estos mecanismos, siguen siendo tema de estudio tanto por su importancia a la hora de obtener las medidas experimentales, como por su influencia en los procesos electroforéticos de EOF y las movilidades efectivas de los analitos.

Sin duda, el efecto más importante y más evidente de los cambios de T se produce sobre la viscosidad. En general, debido a que comúnmente se utilizan muestras y BGE muy diluidos, se suele considerar que estos poseen la viscosidad del agua pura. Tomando ésta como referencia se conoce que la misma decrece con el aumento de la T [137]. Además, en el rango de T comprendido entre 20 y 100 °C podemos describir la dependencia mediante la ecuación de Andradé, la cual relaciona la T con la viscosidad (η) de la siguiente forma [133]:

$$\eta = 2.761 \times 10^{-3} e^{\left(\frac{1713}{T}\right)} \quad (1.14)$$

En donde η se expresa en centipoise (cp) y T en grados kelvin (K) y el error en la estimación es de alrededor de un 2%.

Luego con menor influencia en los sistemas electroforéticos, ya que es menos sensible a la temperatura que la viscosidad, se encuentra el efecto sobre la constante dieléctrica (ϵ_r). La cual también disminuye exponencialmente con el aumento de la T [138].

$$\epsilon_r = 305.7 \times e^{-\left(\frac{T}{219}\right)} \quad (1.15)$$

En la cual ϵ_r es la constante dieléctrica del BGE acuoso diluido y T es la temperatura expresada en K. En caso de que no sea factible realizar esta aproximación, se pueden encontrar en literatura valores y ecuaciones semiempíricas para diversos solventes y mezclas de ellos [139].

Finalmente, si bien los estudios pioneros desarrollados en la década del '60 por Hjerten [1] y apoyados por Knox [133,134] en las décadas siguientes, sugieren la independencia con la temperatura del producto entre la constante dieléctrica (ϵ_r) del medio y el potencial zeta (ξ) entre la superficie del capilar y el BGE con la temperatura. Este concepto fue refutado con el avance de la precisión con la que se pueden medir los cambios de T ocasionados por el calentamiento de Joule [133,140–143], estudiándose detalladamente su comportamiento como función de la T, utilizando la siguiente expresión:

$$\xi = -\frac{2RT}{F} \sinh^{-1} \left(\frac{\sigma_w}{8RT\epsilon_0\epsilon_r c^{1/2}} \right) \quad (1.16)$$

Donde R es la constante universal de los gases, T es la temperatura en K, F la constante de Faraday y σ_w , ϵ_0 , ϵ_r y c son la densidad de carga de la superficie interna del capilar, la constante dieléctrica en el vacío, la constante dieléctrica del BGE (asumiéndola igual a la del agua) y la concentración del electrólito que forma parte del BGE, respectivamente. De esta manera se reportaron variaciones de alrededor de un 0.39 % del potencial zeta por cada °C, independizando el valor respecto al producto ($\xi \cdot \epsilon_r$) el cual no permanece constante, sino que varía alrededor de un 0.07 % por °C [136].

Adicionalmente, una propiedad fisicoquímica que está directamente vinculada a la η y a la T, y que es de vital importancia en técnicas de separación es el coeficiente de difusión (D). El mismo posee valores grandes para moléculas de tamaño pequeño y disminuye a medida que aumenta el tamaño, encontrándose los valores típicos entre 10^{-9} y 10^{-10} m²s⁻¹ para la difusión en líquidos. A pesar de que existen muchas ecuaciones teóricas que describen los D en líquidos y consideran las propiedades tanto de los solutos como del solvente, se suele adoptar por simplicidad y eficacia la ecuación de Stokes-Einstein, para moléculas de peso molecular de entre 90 y 400 Da:

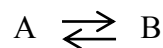
$$D = \frac{KT}{6\pi\eta r_i} \quad (1.17)$$

Donde K es la constante de Boltzmann y r_i el radio de la molécula que difunde. Reemplazando la ecuación 1.14 en la 1.17 obtenemos D en función exclusivamente de la temperatura:

$$D = \frac{2.701 \times 10^{-19}}{a_s} T e^{-\left(\frac{1713}{T}\right)} = C T e^{-\left(\frac{1713}{T}\right)} \quad (1.18)$$

Donde C es una constante.

Así mismo, otro tipo de efectos que puede producir la temperatura radica en el desplazamiento de los equilibrios químicos. Supongamos un equilibrio químico cuyo reactivo es A el cual da como producto B, el sistema alcanza su equilibrio y en consecuencia, podemos definir la reacción:



Donde fácilmente podemos deducir su constante de equilibrio termodinámica (K_{AB}), la cual se

encuentra relacionada con las actividades de los productos, a_B , y reactivos, a_A , presentes en la reacción química se expresa como:

$$K = \frac{a_B}{a_A} \quad (1.19)$$

Considerando que las entalpías y entropías estándar asociadas al equilibrio químico son independientes de la T en la que se realizará el estudio y que los coeficientes de actividad para las sustancias presentes en la reacción permanecen prácticamente constantes, la variación de las constantes de K en función de la T puede ser descripta por la ecuación de Van't Hoff:

$$-R \frac{d \ln K}{d (1/T)} = \Delta H^0 \quad (1.20)$$

Donde K es la constante termodinámica de equilibrio, T es la temperatura en grados Kelvin (K), R es la constante universal de los gases y ΔH^0 es la entalpía estándar asociada al equilibrio correspondiente. Resolviendo esta integral definida cuyos límites serán las temperaturas T y T_r se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln K_T - \ln K_{T_r} = -\left(\frac{\Delta H^0}{R}\right) (T^{-1} - T_r^{-1}) \quad (1.21)$$

En el cual, K_T y K_{T_r} son los valores de las constantes a las temperaturas T y T_r , respectivamente; ΔH^0 es el valor de la entalpía estándar entre los límites de integración. Reijenga *et al.* [144] publicaron uno de los trabajos basales en lo que respecta al efecto de la T en los equilibrios químicos como herramienta para mejorar la selectividad en CE.

1.3.2. Cambios de temperatura internos por calentamiento de Joule

Si bien una de las ventajas de usar tubos capilares para realizar la CE radica en la reducción de los efectos por calentamiento Joule debido a la mejor eficiencia en la disipación del calor, éste sigue siendo un problema cuando la corriente es elevada ya que los gradientes radiales de temperatura dentro del capilar serán mayores y, consecuentemente, también se generarán perfiles de viscosidades, conductividades eléctricas y campos eléctricos, produciendo fuertes ensanchamientos de los picos

[132–134,145]. Esto también afectará de la misma forma a las movilidades electroforéticas, produciendo, que las moléculas de la zona que migren por el centro del capilar irán a una velocidad mayor que las moléculas de la zona que migren más cerca de las paredes del capilar, teniendo como resultado un perfil parabólico y un aumento en la anchura del pico. Por esta razón, mientras que las ecuaciones teóricas más simples para calcular la eficiencia en CE postulan que a mayor campo eléctrico mayor calidad de la separación, el calentamiento Joule impone límites a esta afirmación muy evidentes en la práctica.

Para simplificar, imaginemos al calentamiento Joule como el calentamiento generado por la circulación de una corriente eléctrica a través de una resistencia. Los cambios de temperatura del capilar dependen de la potencia disipada por la resistencia, la cual estará vinculada a las dimensiones del capilar, la conductividad del BGE y el voltaje aplicado. Por lo tanto, se producirá un aumento de las temperaturas cuando la generación de calor supere a la velocidad de disipación. Un intervalo típico de potencia es entre 0.5 y 5 W/m. Debido a que la disipación del calor se produce a través de la pared del capilar, el gradiente de temperatura tendrá un máximo en el centro del capilar y descenderá radialmente hasta el extremo del capilar (fig. 1.10).

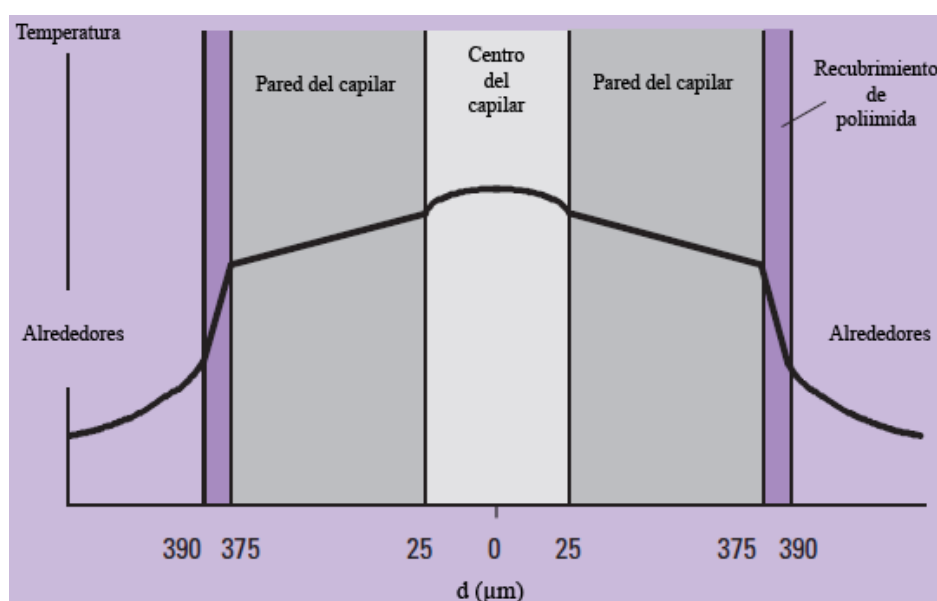


Fig.1.10. Esquema del gradiente de temperatura que se produce por el calentamiento de Joule desde el centro del capilar hasta los alrededores.

La magnitud de la diferencia de temperatura entre el centro y el extremo del capilar depende del radio interno del capilar, del ancho de la pared del capilar y del recubrimiento de poliimida, y por

último, del coeficiente de transferencia de calor hacia los alrededores. Analíticamente se puede expresar de la siguiente manera:

$$\Delta T_T = \frac{Qr^2}{2} \left[\frac{1}{k'_1} \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) + \frac{1}{k'_2} \ln \left(\frac{r_3}{r_2} \right) + \frac{1}{r_3} \left(\frac{1}{h} \right) \right] \quad (1.22)$$

Donde Q es la densidad de potencia, r_1 , r_2 y r_3 son el radio interno del capilar, el radio externo del capilar y el radio externo de la poliimida, respectivamente, k' es la conductividad térmica y h es la velocidad de transferencia de calor desde el capilar.

Se puede deducir fácilmente de la ecuación 1.22 que cuanto más pequeño es el radio interno del capilar y mayor el externo, se beneficiará la disipación de calor disminuyendo, de esta forma, el gradiente de temperaturas del capilar. Físicamente se puede adjudicar a que tener volúmenes pequeños de BGE genera menos calor, además de que aumenta considerablemente la relación área-volumen, lo cual beneficia la disipación de calor.

1.3.2.1. Efectos e implicaciones en CE

Sin duda la elevación de la T del capilar y el consecuente gradiente radial generado por la disipación del calor ocasionado por el calentamiento Joule en CE llevó el foco de atención de las investigaciones prácticamente desde la creación de la técnica misma, y existen distintos tipos de modelos que lo describen [1,132–135,140,145–147]. También es sabido que este fenómeno no se puede evitar, pero que se puede controlar y minimizar. A principios de la década del '90 Knox estableció que a las concentraciones convencionales de electrolito utilizado como BGE sumado a los diámetros internos típicos de capilar (entre 25 y 75 μm) y empleando convección forzada o natural para disipar el calor, el gradiente radial de T que se originaba, no contribuía en gran proporción al ensanchamiento total de los picos [133]. Además, se ha de tener en cuenta, que el aumento promedio de la T en el capilar genera un aumento en la dispersión longitudinal debido a que modifica parámetros tales como el coeficiente de difusión (véase 1.3.1). Un control deficiente del calentamiento Joule puede traer como consecuencia, además del ensanchamiento de los picos comentado anteriormente, pérdidas en la repetitividad y reproducibilidad.

1.3.3. Cambios de temperatura externos

Los cambios externos de T del capilar de separación son originados intencionalmente, ya sea con fines separativos [131,144], para desnaturalizar y/o cambiar la conformación de macromoléculas [148] o por otros motivos [149]. Estos cambios de T deben a su vez tener buena disipación de calor para evitar los gradientes radiales de temperatura y generar una termostatación homogénea a lo largo del capilar. Así, es muy importante tener la mayor parte del capilar termostatación para no tener interfases o escalones de temperatura a lo largo del tubo, que generen gradientes de concentración de BGE y, consecuentemente, inestabilidades en la línea de base y aparición de picos que no corresponden a respuestas analíticas esperadas [150].

1.3.3.1. La temperatura como herramienta de selectividad

El empleo de la T para aumentar la resolución entre compuestos o reducir los tiempos de análisis radica en aplicar estos cambios de temperatura selectivamente a fin de diferenciar alguna propiedad que conlleve a modificaciones relativas de sus movilidades y/o alterar la movilidad del EOF.

Sobre el EOF se puede realizar una detallada descripción del efecto de la T, comenzando con la expresión más simple que define su velocidad como v_{eof} :

$$v_{eof} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \xi E}{\eta} \quad (1.23)$$

En la cual ϵ_0 y ϵ_r son la constante dieléctrica en el vacío y en el BGE, mientras que η y ξ son la viscosidad y el potencial zeta entre el BGE y la superficie del capilar, respectivamente

Dividiendo la ecuación (1.23) por el campo eléctrico E se obtiene la movilidad electroosmótica (μ_{eof}), la cual es independiente del campo eléctrico aplicado.

$$\mu_{eof} = \frac{v_{eof}}{E} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \xi}{\eta} \quad (1.24)$$

Donde el único término independiente de la T es ϵ_0 mientras que las demás variables dependen directamente de la T (véase ecuaciones 1.14, 1.15 y 1.16). Experimentalmente se ha comprobado que

el cambio provocado por un aumento de la T va a estar ponderado entre la disminución de la η , el aumento del ξ , y la disminución de ϵ_r . Esto da como resultado un crecimiento en la μ_{EOF} de un 2.22 % por °C elevado [136]. Así, en caso de que el aumento de T no afecte negativamente las selectividades de los analitos a separar, se podría aumentar considerablemente la movilidad del EOF y los tiempos de análisis en CE cuando se analizan cationes sin modificar el campo eléctrico aplicado o el pH.

Análogamente, ocurre para la μ_{eff} de los analitos. Se sabe que el valor absoluto de la misma es inversamente proporcional a la η (sección 1.1.3. ecuación 1.7), por lo cual, un aumento de la T conllevaría un aumento considerable, y consecuente reducción en los tiempos de análisis en CE de cationes. Esto de nuevo es una ventaja, pero la T es también una variable que afecta la selectividad del sistema, como se explica a continuación.

La variable que provoca los mayores cambios de selectividad en CE para analitos ionizables es el pH. De esta forma, podemos expresar a la μ_{eff} de la siguiente manera:

$$\mu_{eff} = \mu_{act}\alpha \quad (1.25)$$

Donde μ_{act} es la denominada movilidad actual, que no es más que la movilidad electroforética del analito totalmente ionizado, mientras que α es el coeficiente de distribución del analito, el cual depende de la constante de disociación del mismo (K_a) y del pH del BGE. La expresión se puede definir en términos de los coeficientes o funciones de distribución (α) de las especies ionizadas presentes en el equilibrio. Para el caso de un analito ácido monoprótico el coeficiente de distribución de la especie protonada puede expresarse como:

$$\alpha_0 = \frac{1}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad (1.26)$$

Reemplazando el coeficiente de distribución (ecuación 1.26) en la ecuación que define a la μ_{eff} (ecuación 1.25) se obtiene una expresión para analitos aniónicos (ácidos débiles, HA) parcialmente ionizados en función de su pK_a y del pH del medio:

$$\mu_{eff, HA} = \frac{\mu_{act,HA}}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad (1.27)$$

Y una expresión equivalente que se obtendrá para cationes (bases débiles, HB⁺) es descripta a continuación:

$$\mu_{eff, HB^+} = \frac{\mu_{act,HB^+}}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad (1.28)$$

Basándonos en esta expresión y considerando con la ley de Van't Hoff (ecuación 1.21) se puede inferir fácilmente que analitos con grandes ΔH^0 de disociación poseerán cambios de pK_a considerablemente grandes y por ende verán modificado su grado de disociación a un pH del BGE dado con un cambio de T. Esto alterará la μ_{eff} del analito de acuerdo a la concentración de las especies presentes en solución. Esta herramienta imparte selectividad extra al sistema debido a que las entalpías de disociación varían entre distintas sustancias y las mismas son muy marcadas para ciertos grupos funcionales ionizables [144,151,152]. De la misma manera, los cambios de T podrán afectar al pK_a de la sustancia que se utilizará como BGE, lo cual se verá traducido en un cambio del pH. Este cambio, modificará de forma indirecta el grado de ionización del analito y cambiará instantáneamente su μ_{eff} suponiendo que no haya modificaciones en su pK_a.

El estudio de estos equilibrios en función de la T, ayuda a predecirlos para poder aplicar la temperatura como criterio de optimización en las separaciones por CE [151–155] análogamente a como se hace en HPLC [156–159].

1.3.3.2. La temperatura en preconcentración

Ya que la posibilidad de emplear la T para preconcentrar los analitos es intrínseca exclusivamente de la CE, la cantidad de estudios fundamentales y demostrativos es mucho menor comparado con los que se encuentran sobre su influencia sobre la selectividad. La mayoría de las aplicaciones sobre preconcentración *on-line* radican en la generación de interfaces de T. El estudio teórico de interfaces de T fue abordado por Gaš *et al.* [150] que probaron que se generaban gradientes de concentración del BGE no constantes en las inmediaciones de las interfaces. Carrilho *et al.* presentaron

posteriormente algunos trabajos de preconcentración en interfaces de T con factores de preconcentración en el mejor de los casos de dos o tres veces. En éstos trabajos se preconcentraban analitos con entalpías de disociación altas, empleando BGEs cuyas entalpías de disociación eran bajas y viceversa, en presencia o no de EOF [129,130].

Por otra parte, Ross *et al.* publicaron una serie de trabajos que consistían en la aplicación de gradientes de T a lo largo del capilar para preconcentrar por gradiente de temperatura en combinación con otras técnicas de preconcentración *on-line* electroforéticas, incluso aplicándolo para preconcentrar compuestos quirales [149,160–162].

Alternativamente, en esta tesis doctoral, nos centraremos en el estudio de la influencia de la temperatura sobre la preconcentración *on-line* por métodos no electroforéticos, concretamente en SPE-CE. En este campo de estudio no se han encontrado trabajos en publicaciones científicas, solamente en una patente publicada por Guzman N. del año 2011 donde recomienda el uso de la termostatación del microcartucho de extracción en IACE [163].

1.4. Metodología de optimización de la separación

Dentro de la optimización de un método de separación, asegurar la resolución completa de los analitos, pudiendo además, acortar tiempos de análisis, disminuir los residuos de solvente, disminuir los volúmenes de inyección, mejorar los LOD, entre otros, son requisitos a considerar al momento de llevar a cabo este proceso exitosamente.

Considerando las técnicas separativas, cromatográficas y electroforéticas se pueden enumerar un gran número de variables a optimizar [128,164]. Obviamente, las mismas difieren sensiblemente entre técnicas y su influencia también es diferente. A modo de ejemplo podemos citar la fuerza iónica, que en las técnicas electroforéticas resulta fundamental mientras que en las técnicas cromatográficas, si bien es una variable a optimizar, su influencia en la separación es prácticamente nula. Centrándonos en las técnicas electroforéticas, más precisamente en la CE, la cantidad de variables a optimizar es muy grande, y pueden ser clasificadas en dos grandes grupos, las variables discretas y las variables continuas de optimización [91,165].

Respecto a las variables discretas, las cuales no poseen un dominio continuo de optimización, necesitan ser optimizadas experimentalmente por prueba y error. Esto puede ser a modo de ejemplo, la naturaleza del BGE, del surfactante, del selector quiral o del solvente orgánico utilizado como aditivo. En este caso resulta imprescindible durante la optimización apoyarnos en la experiencia propia y la bibliografía para evitar la realización de un excesivo número de experimentos.

Contrariamente, las variables continuas pueden ser optimizadas en un dominio continuo, lo cual permite estudiar su comportamiento por medio de ecuaciones fundamentales, semiempíricas o en última instancia diseño de experimentos. Entre estas variables continuas podemos encontrar a las comúnmente optimizadas en CE, una vez establecidas las variables discretas, son el pH, la proporción de aditivo orgánico, la T, el voltaje, la fuerza iónica, la concentración de surfactante o de selector quirral, etc.

En un segundo paso, se debe fijar los criterios de calidad que se deben utilizar para optimizar algún aspecto, en este caso la separación, y de qué variables operacionales dependerá este criterio. Estos criterios pueden ser clasificados en, por un lado, los que describen la separación de un solo par de analitos en todo el dominio continuo como parámetros simples, entre ellos podemos encontrar a la selectividad (α), la resolución (R_s), etc. [13,166,167] y análogamente, aquellos que integran a muchos analitos dentro de una función de respuesta dependiente de una o más variables operacionales [168]. Vale la pena resaltar, a diferencia de lo que ocurre con las técnicas cromatográficas donde se puede medir y predecir fácilmente la eficiencia de los picos, los cuales están directamente asociados con parámetros como la HETP (altura equivalente de plato teórico) y la resolución, en cambio, en CE no es tan fácil predecirlos debido a la fuerte influencia de la naturaleza química de los constituyentes del medio de separación [169–171]. Si bien existen modelos teóricos que la describen, basados en la dispersión longitudinal y de electrodispersión de las bandas electroforéticas, éstos no son del todo precisos [132]. Por este motivo es recomendado optimizar en función de variables que si sean predecibles en la técnica para conferirle mayor confianza a los resultados obtenidos, en el caso particular de CE variables basadas en la selectividad entre compuestos.

Las funciones de respuesta anteriores pueden ser resueltas de diferentes formas, ya sea de forma empírica, semiempírica o teórica. Por lo tanto, es razonable pensar, que cuanto más cerca de una resolución totalmente teórica del problema, menor serán el número de experimentos a realizar y el tiempo invertido en optimizar la separación. En el caso totalmente empírico, una forma de solucionar parcialmente el problema es mediante el uso de diseño de experimentos, en el cual se reduce considerablemente el número de los mismos, sin embargo, las cifras se mantienen muy superiores respecto a las formas semiempíricas y teóricas [168,172–176]. Además, una de las desventajas más importantes que el diseño de experimentos presenta es la falta de conocimiento fundamental del comportamiento del sistema, teniendo que realizar una optimización completamente nueva frente a pequeños cambios en el sistema inicial a separar.

El primer factor de respuesta propuesto para cualificar las separaciones por CE fue reportado por

Giddings, quien propuso el término de selectividad (p), el cual es directamente proporcional a la diferencias de velocidades, ΔU , de los dos analitos dividido la velocidad media entre ambos (\bar{U}) [166]:

$$p = \frac{\Delta U}{\bar{U}} \quad (1.29)$$

Tiempo después, Gebauer empleó una expresión análoga utilizando la movilidad del ión en vez de la velocidad, independizándose, de esta forma, del campo eléctrico aplicado. Este parámetro fue utilizado para la predicción de la separación de iones por isotacoforesis [167],

$$p = \frac{\Delta\mu_{eff}}{\bar{\mu}_{eff}} \quad (1.30)$$

Donde p sigue siendo la selectividad y, $\Delta\mu_{eff}$ y $\bar{\mu}_{eff}$, son la diferencia de movilidades entre dos analitos y la movilidad promedio entre ambos respectivamente. Multiplicando y dividiendo la ecuación de Giddings (1.29) por el campo eléctrico se alcanza la ecuación de Gebauer (1.30), por lo tanto, ambas son equivalentes y poseen las mismas limitaciones matemáticas a la hora de optimizar la separación como función de la variable operativa que suele ser el pH. Las limitaciones son, -1- la imposibilidad de considerar analíticamente los cambios en el orden de migración de los iones, en otras palabras, cuando la diferencia velocidades o movilidades se vuelve negativa la separación puede ser buena pero el valor de la función no reflejaría esta situación y, -2- la expresión no contempla la separación entre los analitos respecto a un supuesto marcador de EOF o a los compuestos neutros que suelen estar presentes en una muestra real. Esto último, matemáticamente se vería reflejado en que el término p sería grande cuando una de las movilidades de los analitos tendiera a cero, lo cual indicaría una separación entre ambos pero no de los compuestos que se desplazan con el EOF, impidiendo la determinación de los mismos.

Otra alternativa, fue propuesta considerando el análogo en cromatografía de selectividad para dos analitos utilizando el cociente de μ_{eff} en vez del factor de capacidad [13].

$$\alpha = \frac{\mu_{eff,1}}{\mu_{eff,2}} \quad (1.31)$$

En este caso, la expresión falla nuevamente cuando una de las movilidades tiende a cero, ya que la

selectividad tiende a infinito, dando como resultado en la realidad una separación nula entre el compuesto y las sustancias neutras.

En 1994, Clark propuso el uso de la movilidad diferencial (d) [177], la cual considera solamente la diferencia entre las movilidades de los dos analitos a separar,

$$d = \mu_{eff,2} - \mu_{eff,1} \quad (1.32)$$

De manera similar, las limitaciones que se pueden resaltar de esta expresión son por un lado que no se tiene en cuenta la posible inversión en el orden de movilidades a lo largo de todo el intervalo de pH y la maximización del parámetro cuando uno de los compuestos tiende a ser neutro dando falsas zonas de separación completa.

Sólo, Jorgenson *et al.* señalaron la importancia de la presencia del EOF adicionando un término en el denominador representando a la movilidad electroosmótica [178]. La forma de la expresión puede ser expresada de la siguiente forma:

$$p' = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\mu_{eof} + \mu_2} \quad (1.33)$$

Sin embargo, esta ecuación de nuevo no resuelva el problema de la inversión del orden de migraciones y además requiere el conocimiento de la dependencia del EOF con el pH, tema que hasta el día de hoy es motivo de estudio. Además de los descriptos en esta sección hasta el momento, varios autores han desarrollado diferentes parámetros de respuesta para cualificar la selectividad de los sistemas electroforéticos con desenlaces similares [179,180]. Por lo cual, todas las expresiones anteriormente descritas, aunque muy útiles en muchas aplicaciones, poseen poco éxito a la hora de utilizarlas para optimizar las separaciones empleando como variable operacional el pH. He aquí que naturalmente surge la necesidad de desarrollar un parámetro para cualificar la separación de dos o más analitos mediante funciones de respuesta utilizando el pH como variable operativa, que pueda ser empleada para la optimización sistemática y teórica de las separaciones en CE. Este tema se abordará en uno de los capítulos de esta tesis doctoral.

1.5. Analitos y muestras de interés farmacéutico y biomédico

1.5.1. Alcaloides β -carbolínicos

Los harmanos (HAlks) son una familia de alcaloides que poseen en común un núcleo β -carbolínico (9H-pyrido [3,4-b] indol) con pequeñas diferencias en algunos sustituyentes y/o insaturaciones (Figura 1.11) [181,182]. Estos son especialmente conocidos por sus propiedades como fármacos antidepresivos debido a que son fuertes inhibidores de la enzima monoamina oxidasa tipo A (MAO-A), la cual cataliza la desaminación oxidativa de aminas biogénicas y neurotransmisores [183–185]. Además, es conocida su presencia en altas concentraciones en diversas familias de plantas, a modo de ejemplo podemos nombrar la *Peganum harmala* (ruda de Siria) [185–187], la *Banisteriopsis caapi* [188–190] y la *Passiflora incarnata* [191]. La harmina, harmalina, harmol y harmalol son las β -carbolinas más importantes de la *Ayahuasca*, una bebida que se prepara a partir de la *B. caapi* y de la *Psychotria viridis* que posee efectos psicotrópicos debido a la triptamina. Estos extractos naturales fueron originalmente utilizados en rituales de tribus amazónicas, pero hoy en día su uso recreativo se ha extendido por el mundo, existiendo países que están comenzando a tomar medidas al respecto [188–190,192]. Algunos de estos alcaloides, como el harmano y el norharmano, también fueron encontrados a muy bajas concentraciones en café, chocolate, bebidas alcohólicas, carnes vacunas o de pescado con un exceso de cocción y humo de cigarrillo [191,193–195]. Por otra parte, el harmano puede estar también presente como un constituyente endógeno en un gran número de tejidos y fluidos humanos, habiéndose descrito su posible uso como biomarcador de ciertas enfermedades, como por ejemplo, la enfermedad de Parkinson [191,196]. De todas formas, comparado con la exposición exógena que tienen los seres humanos a estos alcaloides, la formación endógena parece ser despreciable. Los límites de exposición por medio de ingesta estimados rondan en un máximo de 1 y 4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal por día para el harmano y norharmano, respectivamente [191]. Sin embargo, hoy en día no existen regulaciones para los harmanos en alimentos, ni siquiera para la difusión de éstos extractos con fines recreacionales que contengan grandes concentraciones de los mismos, especialmente los preparados a partir de las especies de *P. Harmala* y *B. Caapi* [187,189,194,197].

Debido a las similitudes existentes entre los harmanos, su separación es un verdadero desafío analítico. Además, existe una gran variedad de campos en los que su determinación y cuantificación son de gran importancia, desde la industria farmacéutica, pasando por ciencias toxicológicas, seguridad alimentaria, e incluso en medicina y en ciencias forenses. Es por ello que en esta tesis doctoral se aborda el desarrollo de un método analítico eficiente, rápido y sensible para la determinación de estos alcaloides. Naturalmente surge HPLC como primera opción, incluso

acoplado a detectores sensibles y selectivos como los de LIF o MS, con los cuales ya hubo antecedentes reportado en diversas matrices como alimentos, bebidas y fluidos biológicos [186–188,190,193,198–200]. Sin embargo, al tratarse compuestos ionizables, la CE es una gran alternativa, dada las ventajas que presenta frente a HPLC [181,182,201]. Empleando CE, se han reportado un número mucho menor de trabajos [192,202–204]. En la mayoría de ellos se aborda únicamente la optimización de la separación, y empleando estándares o muestras sencillas con elevada concentración de los analitos. Además, vale la pena destacar que la separación de los seis compuestos no se ha conseguido de forma exitosa hasta el día de la fecha utilizando BGEs acuosos convencionales [192,202,204].

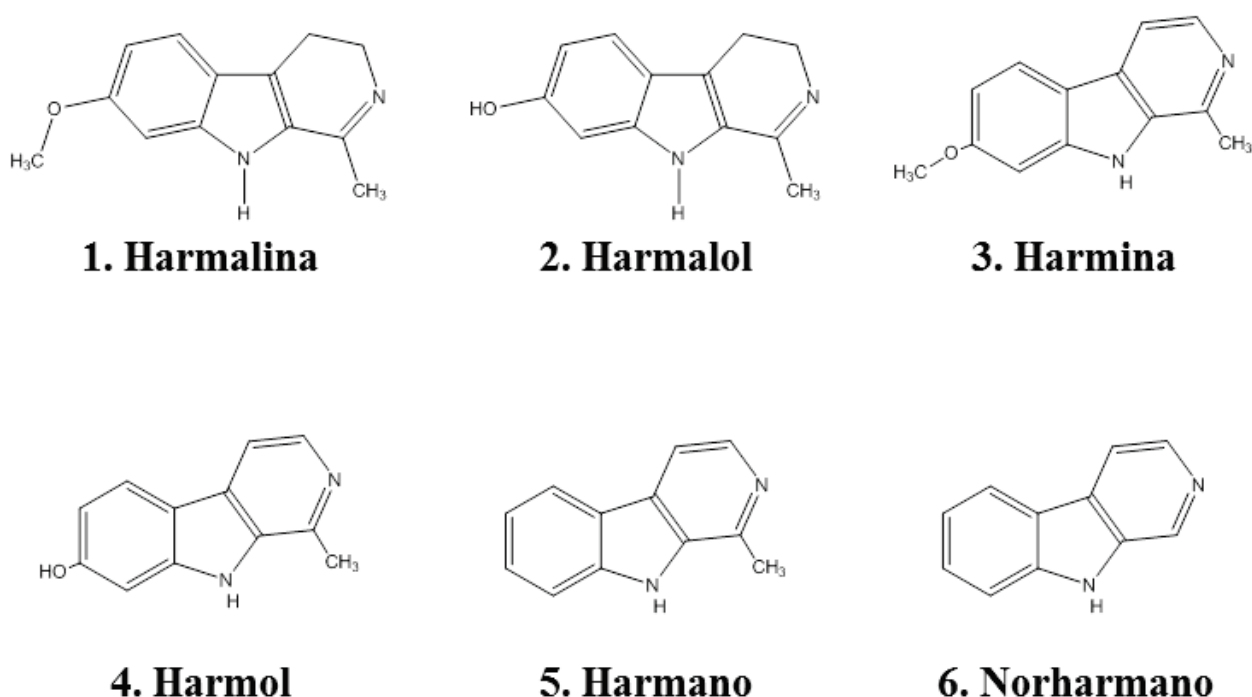


Fig.1.11. Estructura de los alcaloides de la familia de las β -carbolicinas que se estudiaron en el trabajo.

1.5.2. Péptidos opiáceos

Los neuropéptidos constituyen la familia de mensajeros del sistema nervioso central más numerosa y actúan como neuromoduladores o neurotransmisores. Además, están involucrados en la regulación de emociones, la percepción del dolor, la formación de tumores, la demencia senil y un sinfín de patologías de las más diversas [205]. Se pueden clasificar en cinco categorías: hormonas

hipotalámicas, péptidos hipofisarios, péptidos gastrointestinales, péptidos opiáceos y una categoría en la cual se ubican los que no se pueden clasificar en las anteriores [206].

A su vez, los péptidos opiáceos endógenos se clasifican en cuatro familias: encefalinas, endorfinas, dinorfinas y endomorfinas [205,207,208]. Las primeras familias en ser identificadas fueron las encefalinas, las endomorfinas y las dinorfinas, las cuales presentan cierta similitud estructural. Los péptidos pertenecientes a estas familias tienen la misma secuencia de aminoácidos en su extremo N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe-). Las endomorfinas, las cuales fueron descubiertas posteriormente, constan de una secuencia de aminoácidos N-terminal diferente a las otras familias (H-Tyr-Pro-Phe/Trp-). En la figura 1.12 se muestran las estructuras y los nombres de los péptidos opiáceos estudiados en esta tesis doctoral: Dinorfina A (1-7) (DynA), Endorfina 1 (End1) y Met-enkefalina (Met).

El nombre de péptidos opiáceos se debe a que sus efectos en los seres vivos es similar al producido por los analgésicos derivados del opio, como la morfina, pero sin los efectos adictivos que genera su consumo. Están ubicados principalmente en la zona del encéfalo, más precisamente en la glándula pituitaria, la médula adrenal y en las neuronas peptidérgicas. Se sintetizan como parte de un precursor hormonal más complejo que se fragmenta para dar como producto los péptidos opiáceos por un lado, mientras que por el otro resulta en otras hormonas con funciones completamente diferentes.

Los péptidos opiáceos endógenos juegan un papel crítico en la modulación de funciones sensoriales, emocionales y cognitivas. A modo de ejemplo, se cree que tienen el poder de aliviar el dolor, sensaciones de euforia, disfrutar los sabores de los alimentos o afectar y modificar ciertos comportamientos como el consumo de alcohol [208–212]. La determinación de péptidos opiáceos en muestras biológicas resulta especialmente importante en el diagnóstico y tratamiento de patologías como los tumores pituitarios, desórdenes neurológicos y dolores crónicos. Por ejemplo, el péptido Met-enkefalina-Arg-Phe (Meap) está siendo estudiado como un posible biomarcador en la fibromialgia ya que se ha encontrado en concentraciones elevadas en enfermos respecto de personas sanas [213,214]. Adicionalmente, se ha demostrado que las endomorfinas están implicadas en procesos inflamatorios como la artritis reumatoide y la osteoartritis [215], y en la diabetes [216]. También se han relacionado los niveles de β -endorfina, Met-enkefalina (Met) y Leu-enkefalina con tumores pituitarios [217,218]. En este contexto, el análisis de péptidos opiáceos en fluidos biológicos no sólo es un tema interesante, sino desafiante debido a sus bajos niveles de concentración, alcanzando valores subnanomolares dentro de estas matrices complejas ($<0.1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, dependiendo del neuropéptido y del fluido (plasma, líquido cerebro espinal, etc.)).

Tradicionalmente, después de un tratamiento de muestra apropiado los péptidos se analizan por inmunoensayo enzimático (EIA) o por radioinmunoensayo (RIA) las cuales son técnicas que proporcionan una selectividad y una sensibilidad suficientes para su determinación [205,213]. Fundamentalmente, la técnica de detección por excelencia es RIA, sin embargo presenta ciertas dificultades, como las reacciones cruzadas, la falta de confirmación estructural o de masas de las sustancias detectadas, la poca precisión en la cuantificación, el uso de materiales radioactivos y los altos costos operativos. Alternativamente, se han descrito metodologías utilizando HPLC, CE y MS [24,205,219–222].

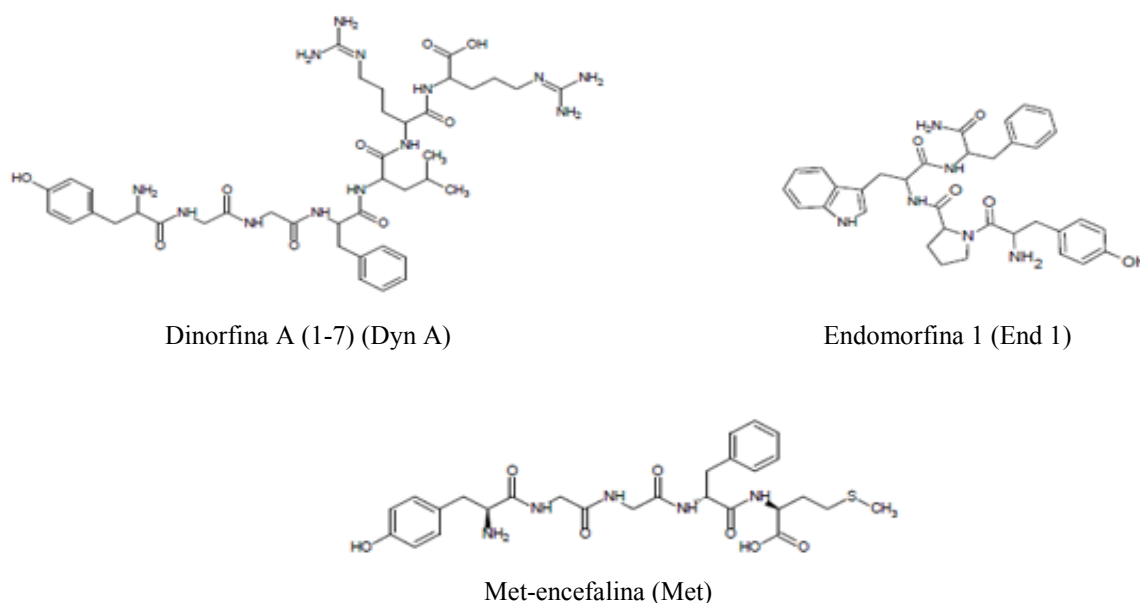


Fig.1.12. Estructura de los péptidos opiáceos estudiados en este trabajo.

Entre las metodologías de HPLC y CE, las más destacadas utilizan detectores electroquímicos (EC), de LIF o el propio RIA para conseguir los mejores LOD. Si bien la MS no proporciona los LOD deseados, permite la selectividad necesaria para la identificación prácticamente inequívoca de los compuestos. En CE-MS, la incorporación de una etapa de preconcentración y purificación *on-line* con métodos no electroforéticos, como puede ser la SPE (SPE-CE-MS) empleando fases estacionarias cromatográficas convencionales o de inmunoafinidad y/o en combinación con diversos métodos de preconcentración electroforéticos de preconcentración *on-line* han permitido mejorar hasta los LODs obtenidos por CE-MS [24,43,49,56,96,123,124,223,224].

1.5.3. Alga *Undaria pinnatifida* (Wakame)

Undaria pinnatifida (Wakame) es una macroalga parda, comestible y con usos medicinales, originaria del este de China, Corea, Japón y sureste de Rusia, que ha invadido las costas de la Patagonia argentina, la costa atlántica de España y Francia. Concentrándonos en el territorio argentino, desde su detección en Puerto Madryn en 1992, se ha dispersado y actualmente se encuentra formando densas praderas submarinas desde el Golfo San José (norte del Chubut) hasta Puerto Deseado (norte de Santa Cruz). Considerando el impacto que puede generar esta especie sobre valiosos recursos costeros (pesqueros, turísticos o ecológicos), la provincia de Chubut ha implementado diferentes medidas con el fin de controlar la dispersión y de generar conocimiento acerca de su interacción con el ecosistema costero.

El ciclo de vida de la *Undaria pinnatifida* incluye una fase esporofítica macroscópica y anual (crece, esporula y muere en periodos de 6 a 9 meses) y una fase gametofítica microscópica que es capaz de funcionar como un banco de semillas. Los intervalos térmicos de supervivencia son amplios para esta especie (entre -1 y 30°C) aunque la esporulación sólo ocurre después de períodos de 10 días con temperaturas superiores a 14°C y la maduración de los gametofitos solo ocurre por debajo de los 20°C. La capacidad de dispersión natural reportada para la especie es de 1 a 10 km por año aproximadamente aunque algunos vectores de origen humano (por ejemplo el transporte náutico y algunas actividades relacionadas con la acuicultura) pueden transportarla en escalas de centenares o miles de km. La especie se ha dispersado muy rápidamente hacia el norte de su punto de introducción en los últimos 4 años, llegando actualmente hasta Playas Doradas (Río Negro). Sobre la base de sus intervalos térmicos de tolerancia y de los registros térmicos de diferentes localidades de la costa Argentina, esta alga podría invadir las costas de Buenos Aires y potencialmente también las de Uruguay. Considerando su amplia distribución actual, su alta fertilidad y la persistencia de sus estructuras reproductivas, su erradicación de las costas Argentinas se considera imposible [225].

Por ello el análisis de distintos tipos de principios activos en estas algas es de gran importancia en la industria farmacéutica y la alimentaria, ya que para su explotación comercial permitiría controlar su población de manera efectiva. Vale la pena destacar, que ésta alga, conocida como wakame, se comercializa en todo el mundo como alimento natural y puede ser adquirida en muchos mercados no necesariamente especializados. En la actualidad no solo se comercializa para el consumo humano en Japon o China, sino también en el resto del mundo. Así diversos países como España y Francia cuentan con una floreciente industria ligada a la explotación y comercialización de wakame, entre otras algas.

1.5.4. Planta *Peganum harmala* (ruda de Siria)

Peganum harmala es una planta de la familia de las *Nitrariaceae* autóctona en las regiones comprendidas entre el este del Mediterráneo e India. También es conocida como "ruda siria", nombre que induce a confusión al no guardar esta planta relación con la ruda.

Esta planta se ha usado tanto con fines medicinales como constituyente de brebajes psicotrópicos en el Mediterráneo a lo largo de la historia, y lo es hoy en la cultura occidental moderna. La harmalina, que es uno de los alcaloides mayormente presentes en *Peganum harmala*, es uno de los principios activos en la ayahuasca, poderoso enteógeno sudamericano. Es por ello, que se suele utilizar como sustituta de *B. caapi* para preparar la llamada ayahuasca europea. La ruda siria se usa en Turquía e Irán como protección talismánica contra el mal de ojo. En Irán es costumbre muy extendida y frecuente desde tiempos preislámicos quemar las semillas secas, en ocasiones combinadas con otros ingredientes, a modo de incienso.

En los países del occidente europeo se comienza a extenderse con fines recreativos para la preparación de brebajes psicotrópicos y es posible encontrar semillas en los llamados *grow shops*. Las semillas de *P. harmala* tienen una gran concentración de alcaloides β -carbólicos (harmalina, harmina y tetrahydroharmina), aproximadamente un 4%. Se han descrito diversas metodologías utilizando HPLC, CE y MS para la determinación de estos alcaloides tanto en extractos de semillas como en fluidos biológicos [190,192]. Las semillas se usan también en tinturas, como remedio medicinal, y hasta como afrodisiaco.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reactivos y materiales

Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada MilliQ[®] (Millipore, Bedford, MA, USA). El metanol, etanol, acetonitrilo, ácido fórmico (98-100%), ácido acético (glacial), amoníaco (25%), ácido clorhídrico (25%), dihidrogeno fosfato de sodio, hidróxido de sodio (NaOH) (Merck, Darmstadt, Germany) y el isopropanol (Sigma, Saint Louis, USA) utilizados eran de grado HPLC o superior.

Los analitos harmano, norharmano, harmalol ácido clorhídrico dihidrato, harmina y harmalina fueron adquiridos en Aldrich (Steinheim, Germany). Las soluciones individuales de cada alcaloide se prepararon disolviendo el sólido en metanol a una concentración de 100 µg/mL, las cuales fueron almacenadas a 4 °C. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo con agua y se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0.22 µm antes de ser utilizadas.

La Met-enkefalina (Met, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, 573.23 Da) y la endomorfinina 1 (End, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 610.29 Da) fueron suministradas por Sigma (St. Louis, MO, USA). La dinorfina A (1-7) (DynA, Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 867.47 Da) fue adquirida en Bachem (Bubendorf, Switzerland). Se prepararon soluciones madres de cada péptido a concentraciones de 2500 µg/mL y se conservaron a -18°C. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo en agua y se filtraron a través de filtros de membrana de nylon de 0.22 µm antes de ser utilizadas.

Los filtros de corte por peso molecular de 3 kDa (Amicon[®] Ultra-0.5) fueron suministrados por Millipore (Bedford, MA, USA). Los capilares de sílice fundida para CE y SPE-CE fueron obtenidos en Polymicro Technologies Inc. (Phoenix, AZ, USA). Para la construcción del microcartucho de SPE convencional y para el resistente a altas temperaturas se utilizaron diversos materiales, entre ellos distintos tubos: Tygon[®] (0.25 mm id, Cole-Parmer, Vernon Hills, USA), polietileno (0.25 mm id, Cole-Parmer, Vernon Hills, USA), silicona (0.3 mm id, Colmic, Italia) y silicona (0.2 mm id, Stonfo, Italia). Se probaron también varios pegamentos, entre ellos cabe mencionar: pegamento base Silicona Fastix[®] (Akapol S.A.), Artic[®] Silver adhesivo resistente a la electricidad y conductor del calor (Artic Silver, USA), Nural[®] 25 (Pattex, Barcelona, España) y una resina epóxica resistente a altas temperaturas (Araldit[®] alta temperatura, Ceys, L'Hospitalet de Llobregat, España).

Las muestras de plasma humano fueron provistas por el Banc de Sang i Teixits (Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona) pertenecientes a donantes sanos. La sangre venosa fue recolectada de 16

voluntarios en viales de uso clínico estándar seguido de su almacenamiento en hielo. El plasma se separó de las células de la sangre, y se recolectaron como una única muestra de plasma. Se almacenaron en tubos de polietileno a una temperatura de -20°C.

Las muestras de *Undaria pinnatifida* (wakame) fueron adquiridas en un mercado local del área de secos y envasados al vacío. Dos de los proveedores eran provenientes de la zona de Galicia, Algamar[®] (Galicia, España) y Porto Muiños[®] (Galicia, España), mientras que el tercero procedió de las costas de Bretaña, Bord & Bord[®] (Bretaña, Francia).

Las semillas de *Peganum harmala* fueron compradas en un *Grow shop* de Barcelona (España). Para su conservación, las semillas (10 g) se molieron en un molinillo eléctrico de café y se almacenaron en un ambiente seco y en ausencia de luz para evitar el deterioro de los alcaloides.

2.2. Instrumentos

Los instrumentos utilizados a lo largo de este trabajo de tesis fueron: un equipo de CE Agilent Technologies HP^{3D}CE system (Waldbronn, Alemania) con detector de arreglo de diodos y acoplado a un espectrómetro de masas de IT (MSD Ion Trap, Agilent Technologies). La interfase de ESI con líquido auxiliar y arreglo ortogonal utilizada en CE-MS fue la G1603A de Agilent Technologies. El líquido auxiliar se bombeaba por infusión mediante una bomba de jeringa modelo KD Scientific 100 Series (Holliston, MA, USA). También, se utilizó la misma CE junto con el resto de los accesorios pero acoplada a un espectrómetro de masa TOF (6220 oa-TOF LC/MS, Agilent technologies). Para algunos experimentos de CE-UV, se utilizó un equipo de CE Lumex Capel 105M con detector UV de longitud de onda fija (LUMEX Ltd., St. Petersburg, Rusia) y un P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), equipado con un detector con arreglo de diodos.

Las medidas de pH se realizaron mediante un electrodo combinado de vidrio Schott BlueLine 11-pH (Mainz, Alemania) y otro Crison 52-03 (Barcelona, España).

La incubación de las muestras se realizó en un agitador con control de la temperatura de incubación TS-100 (Biosan, Warren, USA).

Las centrifugaciones fueron llevadas a cabo mediante una centrifuga termostatazada Rotanta 460 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemania).

3. SEPARACIÓN DE β -CARBOLINAS POR CE-UV

En este capítulo se obtuvo teóricamente el pH óptimo para la separación de los seis alcaloides β -carbolínicos de la familia de los harmanos (fig. 1.11). Esto se realizó mediante el uso de un nuevo criterio de optimización basado en una nueva función de respuesta que tiene en cuenta al pH como variable operacional y al EOF. Posteriormente, para comprobar la validez de los resultados, se utilizó el valor de pH teórico y se realizó un pequeño ajuste experimental por CE-UV en un intervalo comprendido en ± 0.3 unidades de pH.

Una vez seleccionadas las mejores condiciones de separación, el método fue validado con soluciones estándar empleando distintos equipos de CE. Además, fue utilizado para la determinación de estos alcaloides en semillas de *Peganum harmala* y algas de *Undaria pinnatifida*.

3.1. Procedimientos: condiciones electroforéticas y tratamiento de muestra

Todos los análisis fueron llevados a cabo en capilares sílice fundida de 60 cm de largo total (L_t) y 75 μm de diámetro interno (id) termostatzados a 25°C. Las ventanas de detección UV están situadas a una distancia desde la entrada del capilar (L_d) de 50, 51 y 52.5 cm para los equipos P/ACE MDQ, Lumex Capel 105M y HP3D CE respectivamente.

Todos los lavados del capilar fueron realizados en modo de alta presión (aprox. 1000 mbar). Los capilares, previo a su uso, fueron activados realizando lavados con NaOH 1M por veinte minutos, seguido por un lavado de agua por 15 minutos y finalmente, un lavado con el BGE de separación durante unos 30 minutos. Entre análisis, la secuencia de lavados constó de un enjuague inicial de 1 minuto de NaOH 0.1M, seguido de 1 minuto de agua y 1 minuto de BGE. La inyección de la muestra fue realizada hidrodinámicamente, a 30 mbar por 3 s, y la separación fue realizada con polaridad normal (cátodo en la salida) a 20 kV. En condiciones óptimas, el BGE empleado fue un tampón Tris/HCl pH=7.8 fuerza iónica 50 mM 20% metanol (v/v). La longitud de onda de detección fue 254 nm, a no ser que se indique otro valor.

En cuanto a la preparación de las muestras de *Undaria pinnatifida*, la muestra comercial una vez retirada del envoltorio de plástico, fue secada en estufa a 40°C durante 24 hs y luego se molió en un molino de discos. A continuación, el polvo se tamizó con un tamiz de 200 μm y se almacenó a 4°C. En condiciones óptimas, se pesaron 0.1g de polvo, al cual se le adicionaron 500 μL de metanol y 500 μL de HCl 3.5 M. La mezcla se homogeneizó con un vortex durante 30 segundos. La misma fue

incubada por seis horas a 80°C en un agitador a unas 9000 rpm. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 g por 15 minutos. El sobrenadante se ultrafiltró con filtros de corte molecular de 3KDa a 25°C por 15 minutos a 16000 g. Estos filtros fueron pasivados con una solución de polietilenglicol (PEG) al 5% v/v por 24 horas antes de usarse para evitar pérdidas de analito por adsorción a la superficie del mismo [58,226]. Para evitar quedaran en el residuo del filtrado alcaloides, se le agregaron dos etapas posteriores de lavado adicionando cada vez 50 µL de agua y centrifugando a 12000 g por 10 minutos. Finalmente, se adicionó al conjunto de filtrados que contenían los alcaloides, el agua necesaria para llegar a un volumen final de 250 µL, obteniendo el extracto que posteriormente será analizado. Para mayor detalle sobre la optimización del pretratamiento ver capítulo 5 de este trabajo de tesis.

La preparación del té de semillas de *P. harmala* consistió en moler 10 gramos de éstas en un molinillo eléctrico de la cual se separaron 0.5 g del polvo para realizar la extracción. El sólido se mezcló con 10 mL de agua y se calentó hasta romper hervor con un mechero Bunsen. La mezcla se centrifugó por 10 minutos a 8000 g y se separó el sobrenadante. Este proceso se repitió dos veces más, y todos los sobrenadantes se unieron en un solo extracto acuoso, el cual fue llevado a un volumen de 50 mL con agua desionizada. La muestra fue luego filtrada con filtros de nylon de 0.22 µm seguido de una dilución 1:250 v/v con BGE. Las muestras diluidas se analizaron por triplicado y la longitud de onda de detección fue, a diferencia de la optimización con estándares y con muestras de *Undaria pinnatifida*, a 200 nm.

3.2. Resultados y Discusiones

3.2.1. Optimización de las separaciones

Para lograr optimizar teóricamente la separación de un sistema compuesto por distintas sustancias ionizables es necesario obtener información confiable y precisa de los valores de movilidad de las sustancias totalmente ionizadas y sus constantes de disociación (K_a). En el caso de los seis alcaloides de la familia de las β -carbolinas se midieron primero las μ_{act} de cada uno. Esta determinación se realizó mediante el análisis de una solución estándar de 10 µg/ml de cada alcaloide que además, contenían una pequeña cantidad de metanol como marcador de EOF. El BGE a utilizar para estas medidas debe ser de al menos dos unidades de pH por debajo del pKa del grupo más ácido de todas

las sustancias, y así, de esta forma, asegurar ionizaciones mayores al 99%. En este contexto, se eligió un BGE de pH= 3.5 con ácido acético 50 mM y ácido fórmico 50 mM ajustado a pH con amoníaco. Los resultados fueron obtenidos a través de quintuplicados para tener el máximo de fiabilidad en la medida.

Paralelamente, se determinaron los pK_a de los seis compuestos analizando las mismas soluciones con BGEs a cinco pH distintos y manteniendo la fuerza iónica constante en las distintas condiciones. La expresión general de la μ_{eff} para compuestos ionizables tiene la siguiente forma:

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{act}}\alpha \quad (3.1)$$

En donde α es el coeficiente de distribución y depende del pH del BGE. Si utilizamos la expresión del coeficiente de distribución en función del pH del BGE y los pK_a del analito, la μ_{eff} queda definida para el caso de una base débil monoprótica y su catión [HB⁺] como:

$$\mu_{\text{eff,HB}^+} = \frac{\mu_{\text{act,HB}^+} 10^{(pH-pK_a)}}{1+10^{(pH-pK_a)}} \quad (3.2)$$

Este sería el caso de la harmalina, harmina, harmano y norharmano (figura 1.11). Una función equivalente puede ser obtenida para el caso de ácidos débiles monopróticos y sus aniones [A⁻]:

$$\mu_{\text{eff,A}^-} = \frac{\mu_{\text{act,A}^-}}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad (3.3)$$

Además, teniendo en cuenta las estructuras del harmol y del harmalol, en las cuales ambos poseen dos grupos funcionales ionizables, esto es un grupo amino y un grupo alcohol. La expresión es un poco más compleja y resulta de la suma algebraica de las μ_{eff} que aportan cada uno de los grupos funcionales. La misma es descripta a continuación:

$$\mu_{eff} = \frac{\mu_{act,HB^+} 10^{(pH-pK_a)}}{1+10^{(pH-pK_a)}} - \frac{\mu_{act,A^-}}{1+10^{(pK_a-pH)}} \quad (3.4)$$

Como se puede observar en la figura 3.1, se realizaron regresiones no lineales sobre los puntos experimentales obtenidos. Con círculos negros se pueden ver los 5 niveles experimentales de pH que fueron medidos por duplicado. La línea continua color negro denota la regresión no lineal, mientras que la línea continua azul representa las bandas de error con un 95% de confianza. Los ajustes son buenos con coeficientes de correlación superiores a 0.99 y las %RSD de predicción en los valores de pK_a no superaron el 1.3%.

Los valores de pK_a obtenidos a partir de los ajustes se pueden contrastar con aquellos obtenidos en la literatura (tabla 3.1). Como se puede observar los valores experimentales no distaron mucho de los bibliográficos, salvo algunas pequeñas diferencias de alrededor de 0.4 unidades de pK_a para el caso particular de la primer ionización del harmol, en el cual se evidenciaban diferencias en las movilidades experimentales cuando se utilizaban los datos de bibliografía (Tabla 3.1).

HAlk	pKa ₁		pKa ₂		Referencias	Técnica
	Experimental	Bibliografía	Experimental	Bibliografía		
1.Harmalina	9.5 (±0.1)	9.55	-	-	[182]	UV
2.Harmalol	8.6 (±0.05)	8.62	11.3 (±0.1)	11.30	[182]	UV
3.Harmina	7.56 (±0.06)	7.45	-	-	[182]	UV
4.Harmol	7.45 (±0.05)	7.86, 7.90	9.52 (±0.07)	9.51, 9.47	[182][181]	UV
5.Harmano	7.3 (±0.1)	7.34	-	-	[201]	UV-Fluo
6.Norharmano	6.71 (±0.06)	6.76	-	-	[227]	CE

Tabla 3.1. Compara los pK_a obtenidos experimentalmente en este trabajo por CE-UV y los reportados en la bibliografía con sus respectivas referencias y la técnica mediante fueron determinados. UV representa espectroscopia ultravioleta, CE electroforesis capilar y Fluo, espectroscopia de fluorescencia ultravioleta.

Una vez medidas las μ_{act} y determinados los valores más confiables posibles de pK_a para los distintos alcaloides, se representaron las curvas teóricas de μ_{eff} en función del pH.

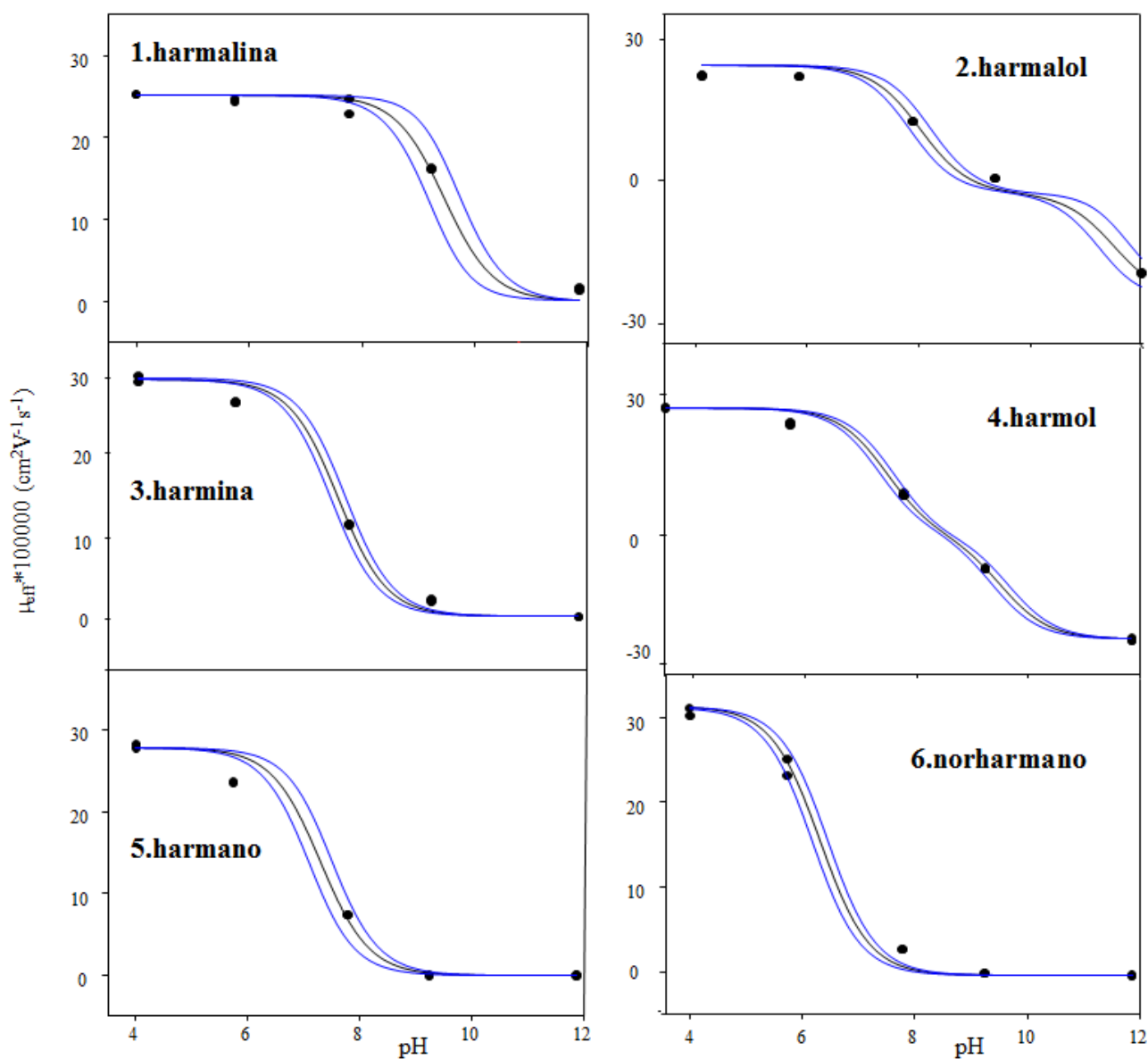


Fig. 3.1. Regresiones no lineales de datos experimentales (círculos negros) a pH 4.0 (formiato de amonio I=50mM), 5.75 (acetato de amonio I=50mM), 7.77(fosfato ácido / fosfato diácido I=50mM), 9.23 (Borax 50mM) y 11.85 (trietilamina I=50mM) por duplicado para harmalina, harmano, norharmano, harmina, harmalol y harmol. La línea negra continua representa la regresión y la línea azul continua representa a las bandas de error. Instrumento Capel 105M.

El comportamiento teórico de las μ_{eff} en función del pH puede ser observado en la figura 3.2 para los seis alcaloides en cuestión. Se puede observar claramente que a pH ácidos, donde todos se encuentran totalmente cargados, las μ_{eff} son muy similares entre sí, lo cual traería supuestas

dificultades al momento de separarlos si las eficiencias de pico no son suficientes. Estas diferencias son, si se consideran diferentes pares de compuestos, en el peor de los casos (harmol/harmalol y harmina/harmalina), de alrededor de un 0.5%, mientras que en los casos más optimistas (norharmano/harmalina) rondan alrededor de un 20%.

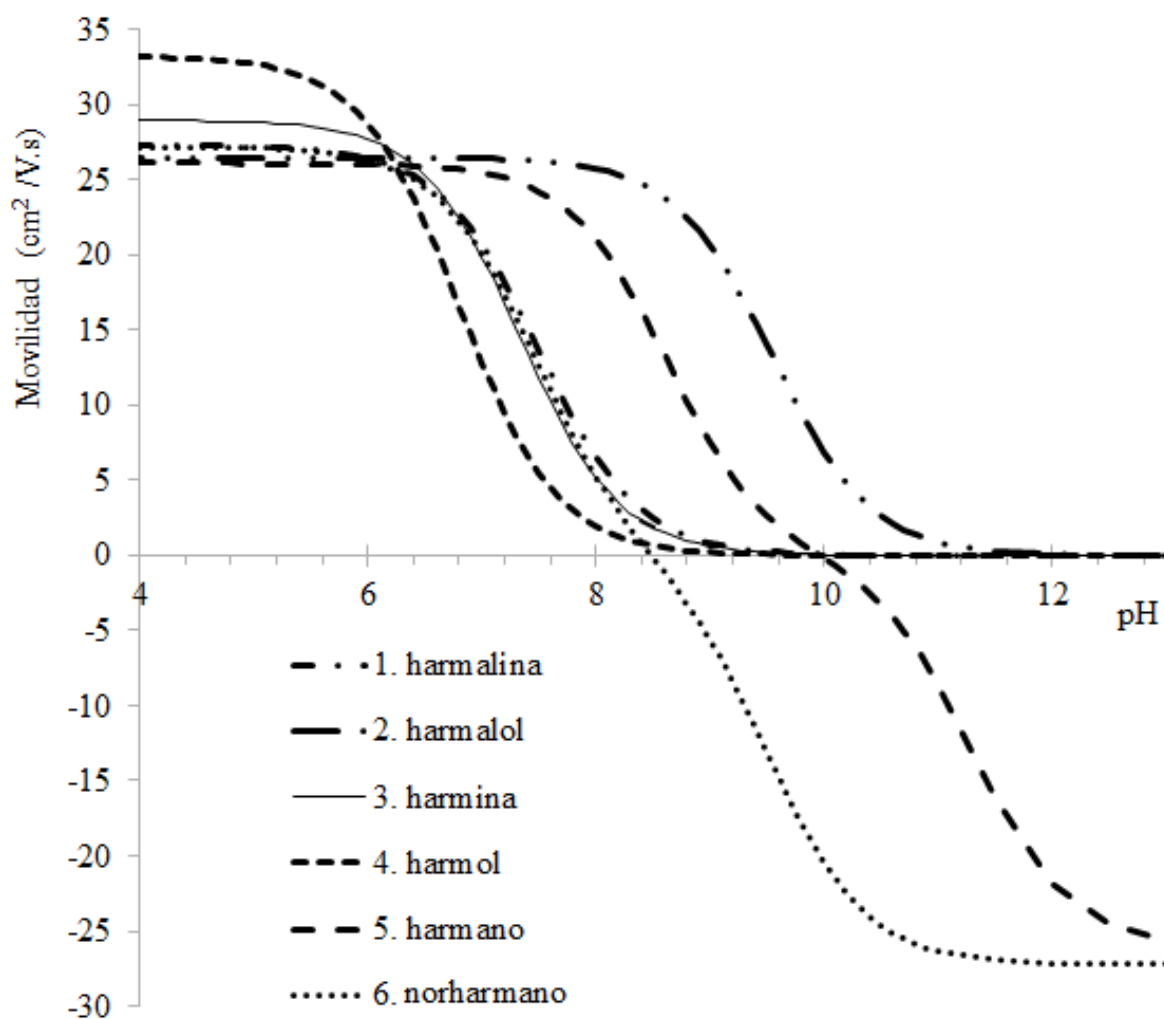


Figura 3.2. Gráfico de μ_{eff} teóricas en función del pH para los seis alcaloides estudiados.

Además, se puede observar que en la zona de pH mayor a 9 las μ_{eff} de algunos de los compuestos tienden a ser cercanas a cero, lo cual implica una mala separación entre los compuestos y a su vez la incapacidad de separarse respecto a posibles compuestos neutros que migran con el EOF, cuya presencia es frecuente en muestras reales. Por lo tanto se observa sólo una zona entre pH 6 y 9 donde

deberían separarse el mayor número de compuestos. Ya que esta optimización es difícil de realizar a simple vista, es necesario establecer un parámetro de respuesta adecuado que permita seleccionar el pH óptimo para la separación de manera sistemática, rápida y sencilla.

Los resultados de la optimización empleando los parámetros de respuesta típicos anteriormente mencionados en la introducción se compararon con los obtenidos con el parámetro de respuesta diseñado en este trabajo de tesis. Para ello, debemos explicar en qué consistió el mismo y cuáles son sus ventajas.

Como ya se comentó en la introducción de esta tesis doctoral, un parámetro de respuesta en CE debe cumplir ciertas condiciones que lo hagan conveniente para ser usado en la optimización de separaciones. Si consideramos dos compuestos, una de éstas condiciones debe ser que su valor aumente a medida que la separación aumenta, es decir, que cuanto más diferentes sean sus respectivas μ_{eff} en unas condiciones determinadas, mayor debe ser su el valor. Otro requisito a cumplir es que éste parámetro tenga una aplicación prácticamente universal, siendo útil tanto para cationes como para aniones. Adicionalmente, el parámetro debe considerar no sólo la separación entre los dos analitos, sino también la separación de cada uno respecto a los compuestos neutros o marcadores de EOF. Esta condición restringe indirectamente la velocidad de la separación debido a que cuanto mayor es la movilidad de cada uno de los analitos a separar, mayor será el valor del parámetro, y a su vez mayor será la velocidad global de la separación. Finalmente, este parámetro no debe discriminar los cambios en el orden de migración de dos compuestos cuando se optimiza todo el intervalo de pH, sino que debe mantenerse siempre en valores positivo, considerando el valor absoluto de las diferencias entre las μ_{eff} .

De acuerdo a estas condiciones se desarrolló un nuevo parámetro de respuesta, el cual cumple con todos los requisitos mencionados en los párrafos anteriores. El parámetro se denominó t' y puede ser aplicado para cualquier par de sustancias en todo el intervalo de pH. La expresión del mismo tiene la siguiente forma:

$$t' = [(\mu_{eff,2} - \mu_{eff,1})\mu_{eff,2} \cdot \mu_{eff,1}]^2 \quad (3.5)$$

En la cual $\mu_{eff,2}$ y $\mu_{eff,1}$ son las movilidades efectiva de los compuestos 1 y 2. En la figura 3.3 se esquematiza el sentido físico de cada factor que compone el producto.

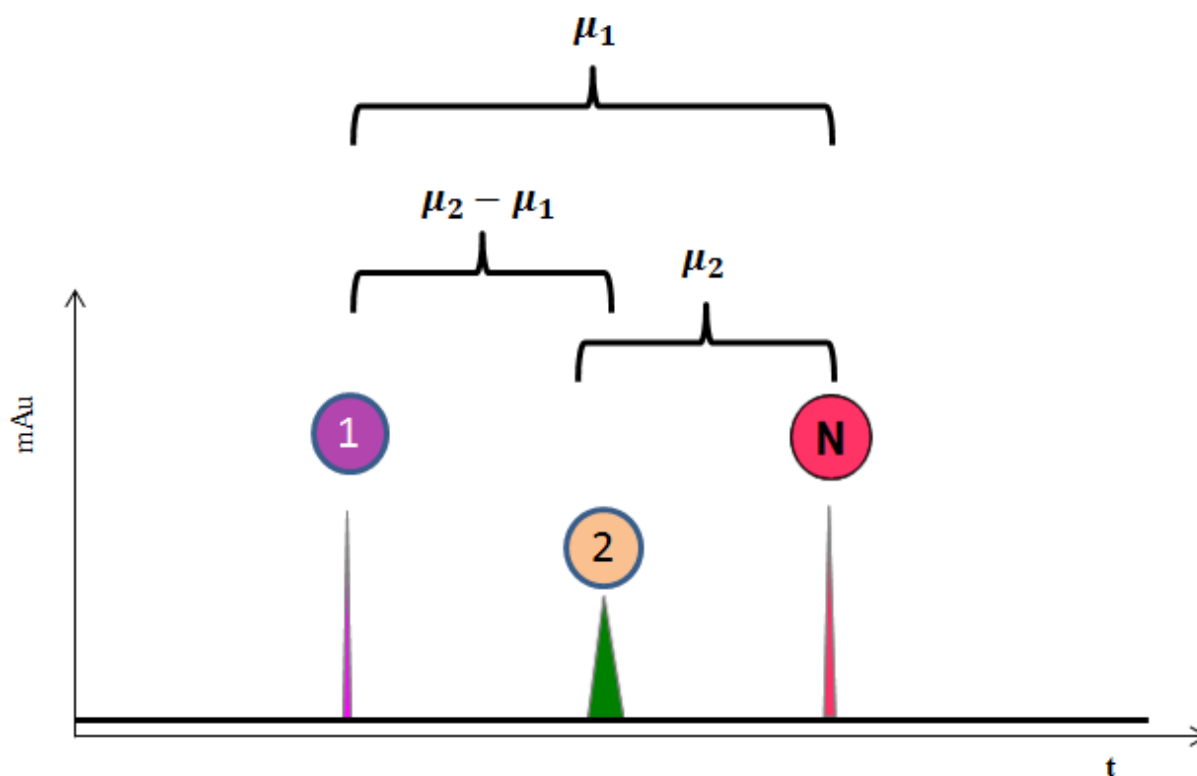


Figura 3.3. Esquema de interpretación de las consideraciones elegidas para el parámetro de respuesta en el caso particular del estudio de la separación de un par de analitos (1 y 2) y la presencia de compuestos neutros (N).

La diferencia entre las μ_{eff} , $(\mu_{eff,2} - \mu_{eff,1})$, cualifica la calidad de la separación entre ellos en función del pH mientras que, el producto individual de sus μ_{eff} es una medida de cuán grandes son éstas y cuán separados de los compuestos neutros que migran con el EOF se encuentran. Además, al elevarla al cuadrado se obtienen valores siempre positivos.

En la figura 3.4 se representan frente al pH del BGE algunos de los parámetros de respuesta típicamente utilizados en trabajos anteriores y descritos en la sección 1.4 (α y $\Delta\mu$) junto con el parámetro diseñado en este trabajo de tesis (t') para los alcaloides estudiados de a pares, es decir, evaluados cada uno respecto a los 5 restantes. Esto da como resultado 15 pares de analitos de las cuales se grafican sus funciones de respuesta en una misma figura en todo el intervalo de pH.

En la figura 3.4-a se representa la selectividad (α) de los 15 pares de analitos en función del pH del BGE. El parámetro selectividad α que es el cociente entre las μ_{eff} de los compuestos considerados, es el más empleado en CE, igual que en LC lo es su análogo empleando factores de retención. Se puede observar que en este caso el par crítico en la separación es, por un lado, en la zona de pH menor a 8, el par hermano/ harmol (3-6, celeste), mientras que en la zona mayor a pH 8 el par más difícil de separar es el norhermano/harmol (4-6, verde claro). Por lo tanto, existe una zona de optimización entre pH= 6.5 y pH= 8 en la que todos los analitos deberían separarse ya que cada uno posee un máximo de selectividad con los restantes.

También se puede distinguir una zona entre pH 8 y 9 (justo después de que el par hermano/harmol tome el valor 1), la cual es muy estrecha y concuerda con la necesidad de medir de forma muy precisa los pK_a de los analitos para tener una cierta certeza de los límites de la zona de separación óptima.

Además, una gran zona donde las selectividades se hacen muy grandes es la que se encuentra a pH mayor a 11. Intuitivamente se puede elegir esta zona debido a que no se requerirá una gran precisión en la medida del pH a la hora de preparar el BGE. Sin embargo, en esta zona se ha probado experimentalmente que no hay separación de los compuestos, arrojando una de las falencias más importantes de este parámetro, el cual tiende a infinito en la medida que la movilidad que se encuentra en el denominador tiende a cero (Ver fig. 3.2), por ende en zonas donde uno de los analitos no está cargado la separación se considera erróneamente máxima. Esta indeterminación si bien no constituye un problema en cromatografía si presenta un inconveniente grave en CE, donde es habitual la presencia de marcadores de EOF o compuestos neutros en muestras reales.

Otros inconvenientes que trae la utilización de esta función radican principalmente en que por sí sola no puede utilizarse en todo el intervalo de pH para un par de analitos que invierten su orden de migración. En esta situación los valores de selectividad tienden a ser menores que uno, y por ende los valores pierden el sentido deseado de cualificar la separación. Ídem si nos referimos al caso en el cual uno de los compuestos se ioniza negativamente a un pH en particular, arrojando valores negativos del cociente de movilidades efectivas. Para solucionar ello y crear un gráfico que puede solucionar parcialmente algunos de estos inconvenientes, se graficó el valor absoluto del parámetro y se introdujeron funciones lógicas que invirtieran el cociente cuando había una inversión en el orden de migración de cada par estudiado.

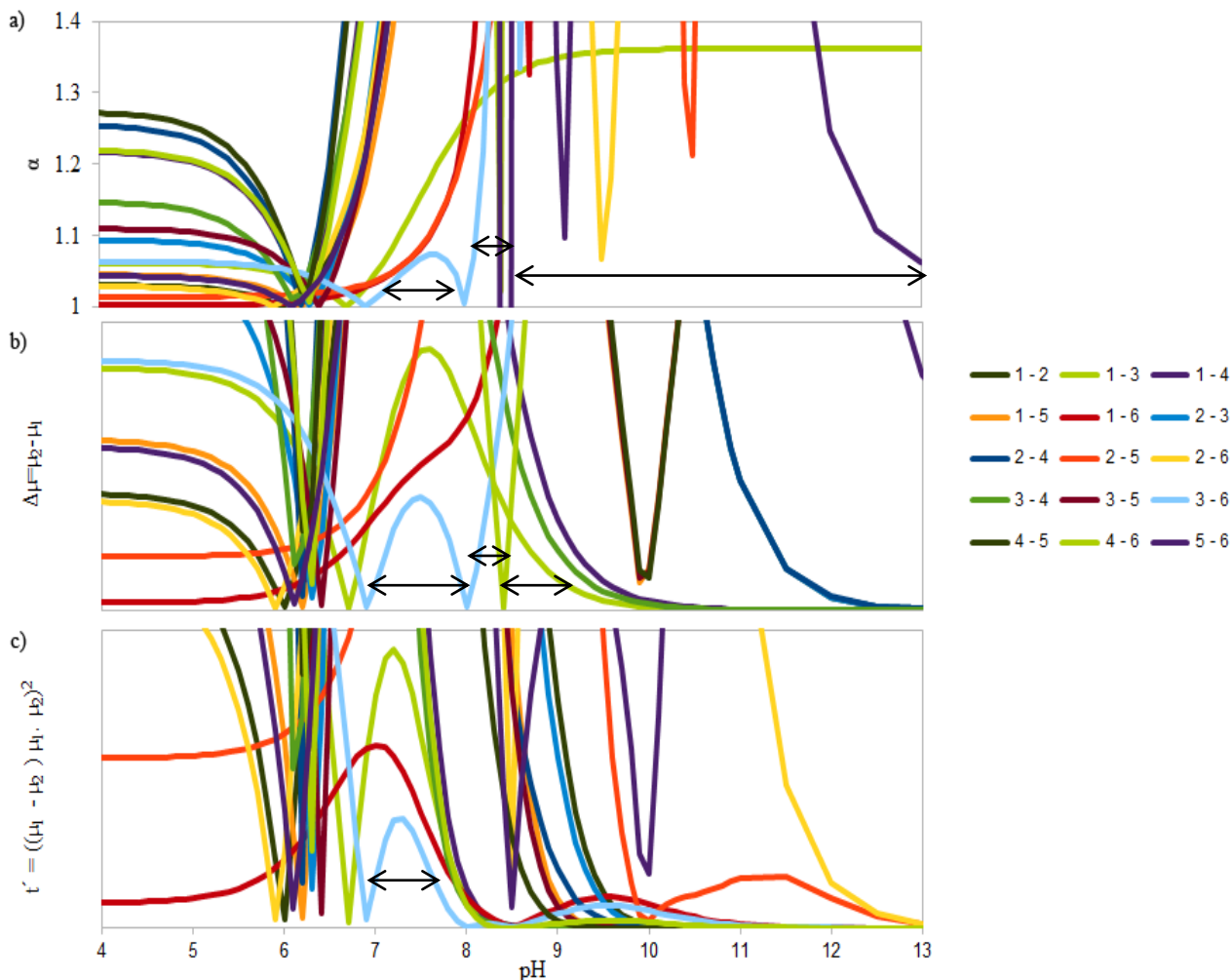


Figura 3.4. Gráficos de distintos parámetros respuesta a) valor absoluto de la selectividad ($\alpha = \mu_2 / \mu_1$), b) valor absoluto de la diferencia de movilidades ($\Delta\mu = \mu_2 - \mu_1$) y c) $t' = ((\mu_1 - \mu_2) / \mu_1 \mu_2)^2$ para los compuestos: 1- harmina, 2-harmalina, 3-harmano, 4-norharmano, 5-harmalol y 6-harmol. Los segmentos marcados con líneas negras muestran las regiones donde se deberían obtener las mejores condiciones de separación.

Por otra parte, en la figura 3.4.b, se evaluó la diferencia de μ_{eff} ($\Delta\mu$) en función del pH para todos los pares de analitos. Los resultados fueron similares, Existe prácticamente un continuo entre los pH 7 y 10 en donde los analitos deberían encontrarse separados. Sin embargo, como se apuntó anteriormente, experimentalmente se evidenció que a pH mayor que ocho no existe separación completa de los mismos.

A diferencia de la selectividad, esta función anula las zonas a pH mayores de 11 en las que las movilidades de muchos analitos tienden a cero. De nuevo, para poder graficar apropiadamente los datos y facilitar su interpretación, los datos graficados son los del valor absoluto de la diferencia. La necesidad de utilizar este recurso matemático advierte de nuevo la principal falencia del parámetro de respuesta, el cual no permite que exista una inversión en el orden de migración de ninguno de los pares estudiados. Esto se suma a que la función dará máximos en las condiciones en que uno de los dos analitos presentes tienda su movilidad a cero.

Finalmente, al abordar la figura 3.4.c, en el que se grafica el parámetro de respuesta desarrollado en este trabajo para todo el intervalo de pH, podemos observar que la zona de pH que indica como óptima, es la comprendida entre pH 7 y 8. Se puede observar que los pares críticos harmano/harmol (3-6, celeste) y norharmano/harmol (4-6, verde claro) coinciden con los de las gráficas a y b de la figura 3 denotando que una parte de la información cualitativa extraída sigue siendo similar. La diferencia radica en el resto de zonas que antes apuntaban como óptimas, donde experimentalmente no se observaba separación. Así, en la zona de pH mayor a 11 el parámetro t' decae en relación a la figura 3.3.a, debido a que la mayoría de los compuestos, menos harmol y harmalol que se encuentran cargados negativamente, tiene μ_{eff} alrededor de cero, por ende no pueden ser separados respecto a compuestos neutros. Además vale la pena resaltar que para evaluar t' no hizo falta aplicar ni el valor absoluto de la función ni variables lógicas para invertir el orden de los compuestos, ya que la misma no depende ni del signo de la carga, ni de que exista inversión en el orden del par de compuestos. Por otra parte, se puede extender el parámetro de respuesta evaluado para un par a una ecuación completa que comprenda la mezcla de todos los analitos considerados de a pares. De esta forma, se observa sólo un valor de t'_n en función del pH, cuyo máximo será el pH teórico de optimización en el que la separación debería ser la mejor posible sin contemplar las eficiencias de los picos electroforéticos. La expresión para una mezcla de n compuestos ionizables es la siguiente:

$$t'_n = \left[\prod_i^n \mu_i \prod_{(i,j)(j<i)}^{n,n-1} \Delta\mu_{(i,j)} \right]^2 \quad (3.6)$$

En donde t'_n el parámetro para n compuestos, μ_i es la μ_{eff} del i -ésimo analito y $\Delta\mu_{(i,j)}$ es la diferencia entre las μ_{eff} de los analitos i y j , respectivamente. Este máximo representa el balance entre ambos productos, los factores de las movilidades tienden a maximizar los valores absolutos de las mismas

mientras que el factor que posee la diferencia tiende a hacer lo propio con las diferencias entre cada par, dando una ponderación entre la velocidad de separación y μ_{eff} por una parte, y la separación entre los mismos.

En la figura 3.4 se puede observar el comportamiento de la función de respuesta (t_n') para el caso particular de la separación de los seis alcaloides. Como puede ser fácilmente observado, se alcanza un máximo teórico a pH 7.75, donde debería existir una separación completa de los mismos con μ_{eff} suficientes para poder separarse eficazmente de un hipotético marcador de EOF o compuestos neutros que puedan llegar a estar presentes en la muestra real. De todos modos, este máximo es bastante estrecho y abarca un intervalo específico donde la separación debería ser probable, esto es entre pH 7.4 y pH 7.8.

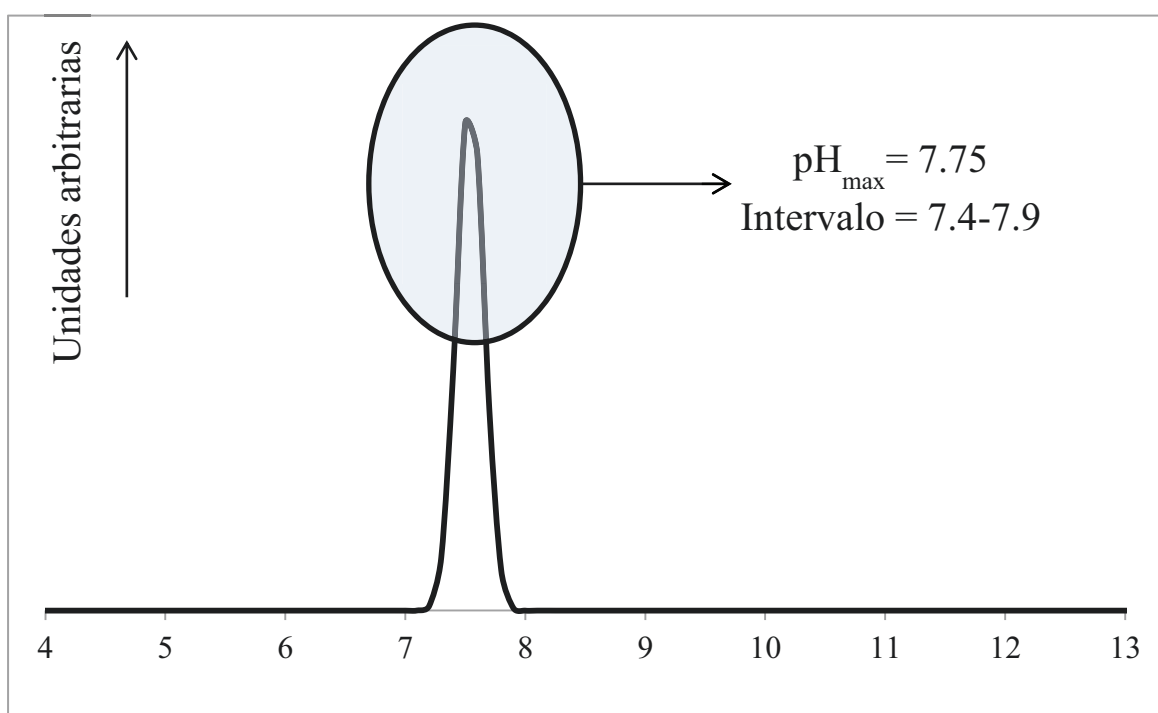


Figura 3.5. Gráfico de la función predictiva de respuesta para el caso particular de la mezcla de los 6 alcaloides de la familia de los harmanos.

Una vez establecido el valor óptimo de pH teórico, se recomienda realizar una pequeña optimización experimental para corroborar su validez. Cuanto mayor es la exactitud con la cual se obtuvieron los pK_a y las μ_{act} de los compuestos considerados, mayor será la fiabilidad del pH teórico establecido, lo que requerirá estudiar un intervalo menor de pH y un menor número de experimentos. En este caso

particular, se realizó en un intervalo de ± 0.3 unidades de pH, obteniendo la mejor separación a pH 7.8. En la figura 3.6.a se observa la separación completa a pH 7.8 mientras que en la figura 3.6.b se puede observar una separación a pH 9.0 donde se resuelven solo tres alcaloides de los seis.

Vale la pena resaltar que la condición de pH 9 es una zona de pH en la cual los otros parámetros consideraban separación completa de los compuestos, lo que refuerza aún más la validez tanto del parámetro de respuesta diseñado como de la función predictiva que contempla la mezcla de todos los analitos.

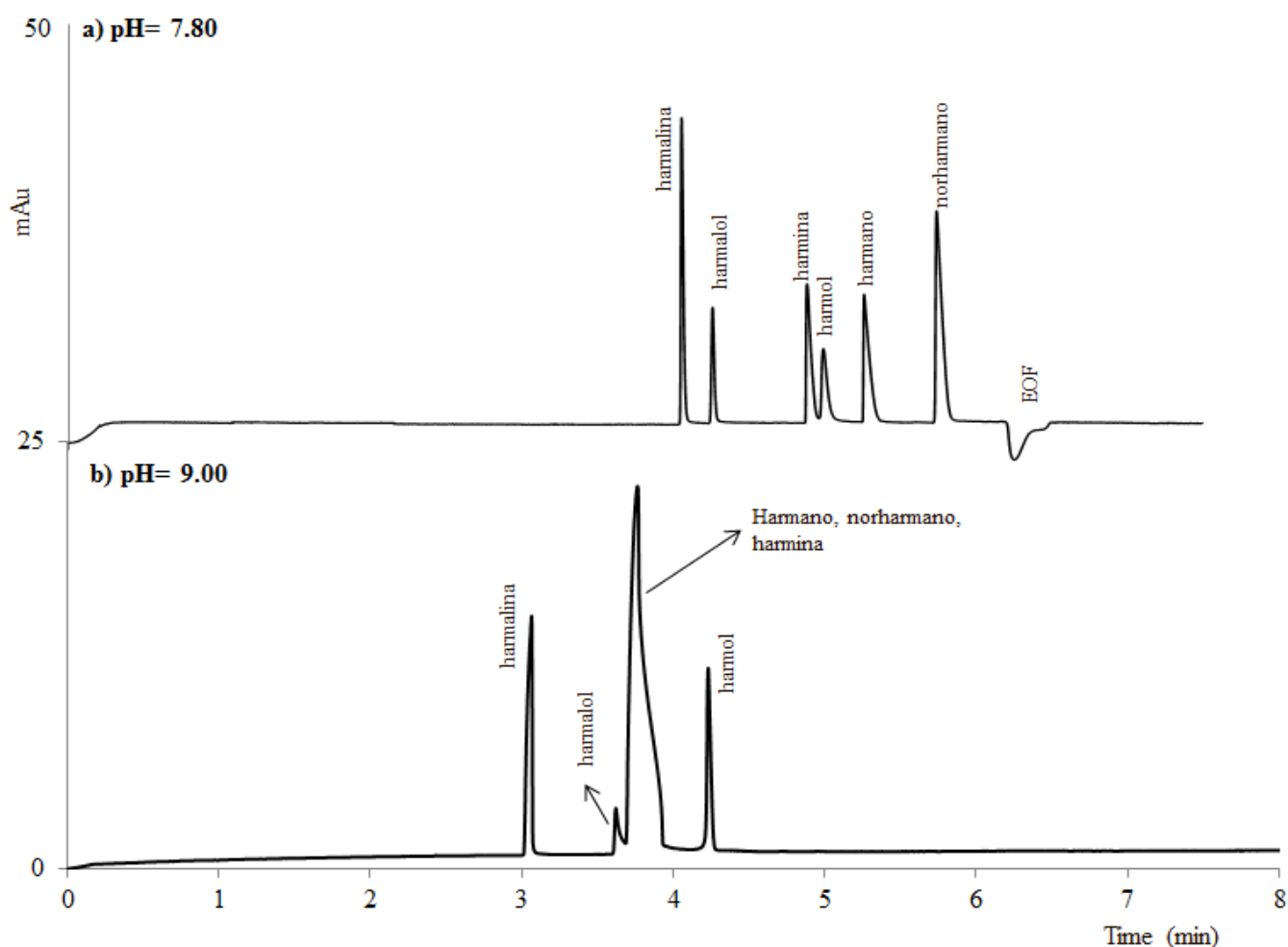


Figura 3.6. Electroferogramas de la mezcla de alcaloides en dos condiciones de pH diferentes. a) Tris pH 7.8 20% v/v de metanol y, b) Borax pH 9.0. Ambos BGE están a la misma fuerza iónica de 50 mM. Separación a 25 KV, inyección hidrodinámica 30 mbar x 3 s, longitud de onda de detección 254 nm. Instrumento: Lumex Capel 105 M.

3.2.2. Determinación de alcaloides de la familia de las β -carbolinas por CE-UV

La optimización de la separación consistió en varios pasos, que van desde la elección del pH óptimo de la separación hasta la elección de algún aditivo hidroorgánico para mejorar la eficiencia de los picos electroforéticos.

La primera etapa, como se mencionó anteriormente, fue la optimización del pH, la cual se realizó teóricamente como se describió en la sección anterior.

La segunda etapa consistió en la elección de la naturaleza del BGE, el cual resulta ser crítico para elegir el que mejor eficiencia de pico ofrezca. Para ello se evaluaron tres BGE diferentes a pH 7.8, con acetato de amonio (AcNH_4), *tris* (hidroximetil) aminometano clorohidrato (Tris/HCl) y fosfato. En la figura 3.7 se muestran los resultados obtenidos cuando la fuerza iónica era 50 mM. Como se puede observar en la figura 3.7, utilizando cualquiera de los BGE propuestos no se obtienen eficiencias y formas de picos aceptables para la harmina y el harmol (3 y 4), mientras que para el BGE de acetato de amonio (fig. 3.7.b)) esta condición se extiende también para los alcaloides harmano y norharmano (5 y 6). En consecuencia la elección del BGE ideal es fundada en que si bien para el BGE Tris/HCl (fig. 3.7.c)), las eficiencias y formas de pico no son las mejores para los dos analitos anteriormente nombrados, se obtiene una separación prácticamente completa de todos los componentes. Caso contrario, en el BGE fosfato (figura 3.7.a) los analitos parecerían no tener picos tan anchos pero la separación entre el par harmina/harmol es prácticamente inexistente.

Una vez elegido un BGE de Tris/HCl, se realizaron pruebas a distintas fuerzas iónicas, dando como resultado una pequeña mejora en la eficiencia de la separación en general a fuerzas iónicas de 50 mM. Sin embargo, estas mejoras fueron leves (fig. 3.7-c), por lo tanto insuficientes. Por tal motivo se requirió la adición de un modificador orgánico como aditivo para mejorar sustancialmente la eficiencia de los picos electroforéticos y, de esta forma, mejorar la resolución entre ellos.

En consecuencia, se realizaron pruebas utilizando metanol y acetonitrilo como aditivos orgánicos en distintas proporciones entre 0% y 20% v/v en el BGE. Si bien ambos modificadores orgánicos arrojaron mejoras significativas en la separación, el metanol fue superior. En la figura 3.8 se puede observar las mejoras al cambiar la composición de metanol en el BGE. Cabe aclarar que utilizando bajas concentraciones de metanol (inferiores al 20% v/v) nos aseguramos de no provocar cambios en la selectividad del sistema por adición de metanol debido, principalmente, a que no modificamos las constantes de disociación del BGE y, por ende, no modificamos el pH del medio de separación.

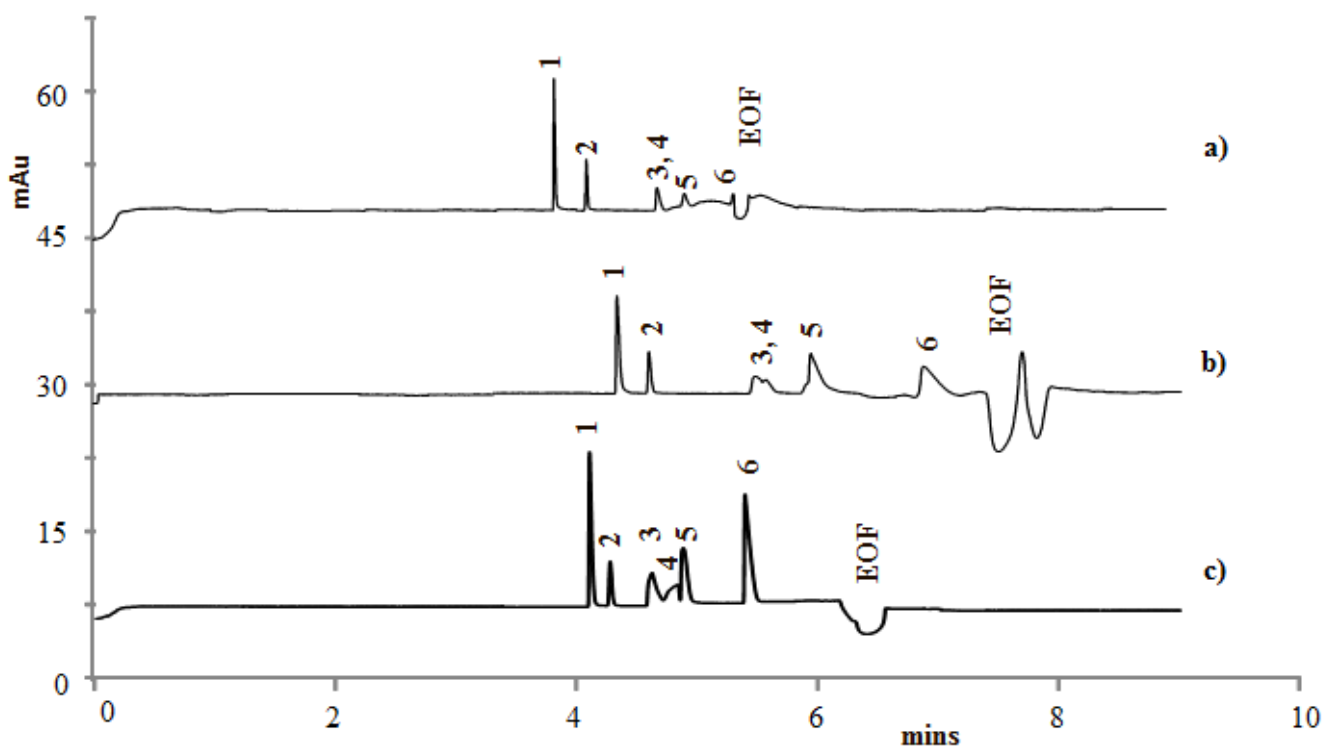


Figura 3.7. Separación de 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y 6) norharmano a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. El voltaje de separación fue de 20 KV. La detección de los compuestos se ha realizado a 254 nm. Inyección hidrodinámica: 30mbar, 3s. $L_t=58.8$ cm y $L_d=51$. La separación fue desarrollada para distintos BGE al mismo pH (7.8) y misma fuerza iónica (50mM), para a) $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, b) AcNH_4 y c) Tris/HCl . Instrumento: Lumex Capel 105M.

Además conociendo que el grupo funcional principal de estos compuestos es un amino o un amino y un alcohol, esta aproximación también es válida para los analitos en cuestión. Esto se puede contrastar fácilmente con trabajos recientes de nuestro grupo de investigación en los que se evidencian que la adición de metanol a un tampón Tris/HCl no modifica significativamente el pH ni el pK_a de los grupos amino en un amplio intervalo de composiciones [152]. Trabajos similares se pueden encontrar en literatura con los grupos alcohol. La adición de un 10 % v/v de metanol mejora significativamente la eficiencia y la forma de los picos (fig. 3.8.b)) aunque los mejores resultados se aprecian claramente utilizando una composición de un 20% v/v de metanol como modificador orgánico (figura 3.8.c)). Por lo tanto el BGE que se utilizará para la separación de este grupo de alcaloides en CE-UV será el de Tris/HCl a pH 7.8 con fuerza iónica 50 mM y metanol 20% v/v.

A continuación, se procedió a evaluar la metodología optimizada en tres equipos de CE de distintas marcas comerciales, dos con sistemas de detección por arreglo de diodos ($\text{HP}^{3\text{D}}\text{CE}$, Agilent y P/ACE MDQ , Beckman) y el restante con detector UV onda fija (Capel 105M, Lumex). Las curvas de

calibración para cada alcaloide se obtuvieron a cinco niveles de concentración por triplicado. A modo de ejemplo se observan en la figura 3.9 las obtenidas para el harmano y norharmano para los tres equipos en cuestión.

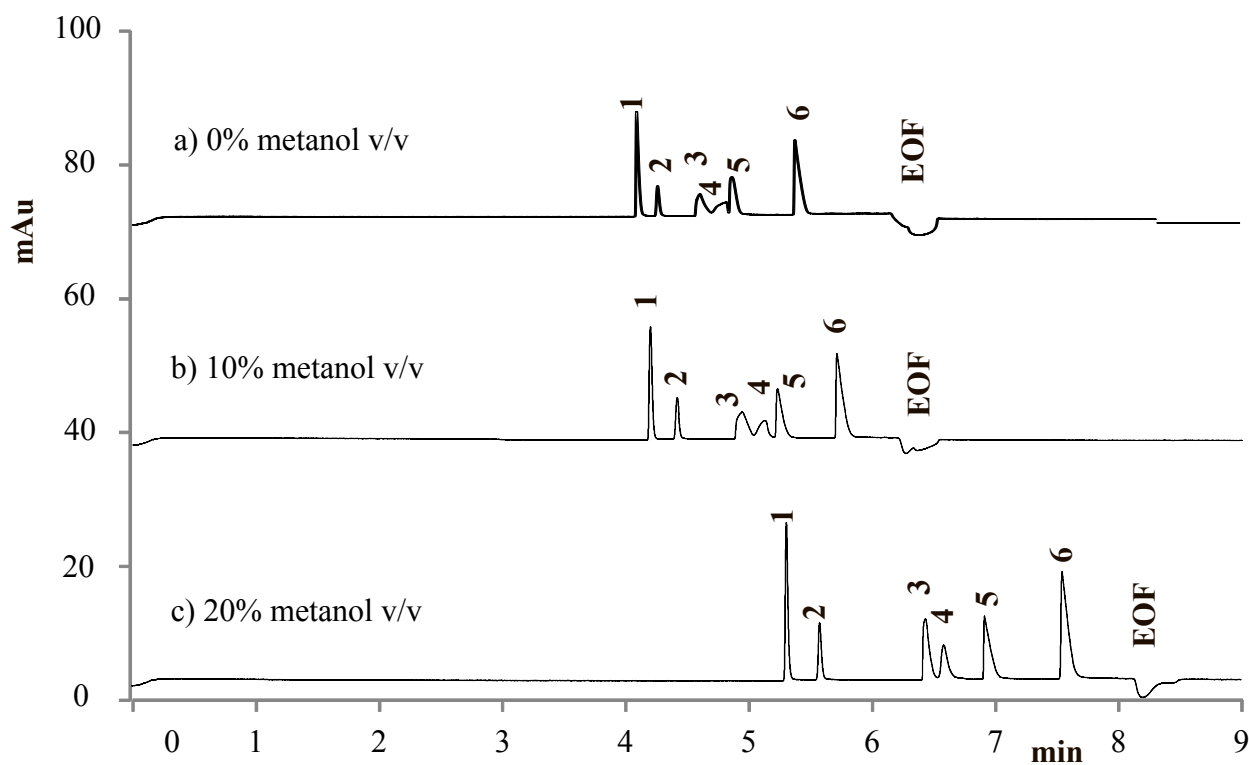


Figura 3.8. Separación de 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y 6) norharmano a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. El voltaje de separación fue de 20 KV. La detección de los compuestos se ha realizado a 254 nm. Inyección hidrodinámica: 30mbar, 3s. $L_t=58.8$ cm y $L_d=51$. BGE Tris/HCl pH 7.8 I=50 mM. con metanol a) 0%, b) 10% y c) 20%. Instrumento Lumex Capel 105M.

Las figuras de mérito obtenidas para los tres equipos comerciales en estos experimentos se resumen en la tabla 3.2. Las desviaciones estándar relativas (%RSD) de las repetitividads en tiempos de migración y áreas de pico son buenas y muy similares en los distintos instrumentos. Sin embargo, si observamos los datos relacionados a los límites de detección y de cuantificación (LOD y LOQ) podemos corroborar que los valores son mejores, desde dos veces hasta más de diez veces inferiores, en el equipo Lumex Capel 105 M. Esto era esperable ya que, si bien el detector UV de longitud de onda fija es menos versátil que un detector de arreglo de diodos, el primero posee mucha mayor

sensibilidad ya que los fototubos son más sensibles que los diodos. Adicionalmente, el detector del instrumento Lumex cuenta con un juego de lentes que enfoca el haz incidente en el lumen del capilar, mientras que los otros instrumentos sólo utilizan una rendija para restringir el paso de luz al lumen del capilar pero sin enfoque. Por otra parte, si se desea realizar trabajos de tipo cualitativo y tomar espectros de los compuestos durante los análisis, el detector que permite hacerlo con mayor facilidad es el de arreglo de diodos. Los dos equipos con este tipo de detector poseen LODs y LOQs similares, lo que concluye en que ninguno de los posee un mejor desempeño a la hora de la detección.

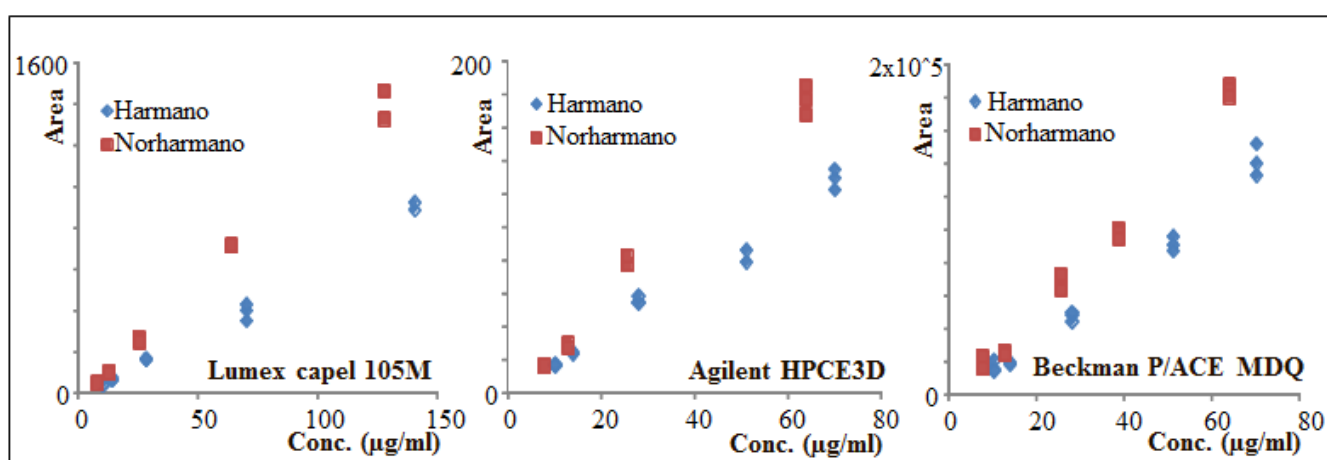


Figura 3.9. Curvas de calibración de harmano y norharmano para los tres equipos CE-UV comerciales.

HAlk	Instrumento																	
	Lumex capel 105M						Agilent HPCE3D						Beckman P/ACE MDQ					
	Int. lineal ($\mu\text{g/ml}$) ($R^2>0.99$)	Regresión lineal ($Y=a*C+b$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	RSD % tiempo (n=10)	RSD % Area (n=10)	Int. lineal ($\mu\text{g/ml}$) ($R^2>0.99$)	Regresión lineal ($Y=a*C+b$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	RSD % tiempo (n=10)	RSD % Area (n=10)	Int. lineal ($\mu\text{g/ml}$) ($R^2>0.99$)	Regresión lineal ($Y=a*C+b$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	RSD % tiempo (n=10)	RSD % Area (n=10)
Harmalina	0.2-120	$1.4*C+2.1$	0.06	0.2	1.2	8.2	4.8-70	$0.4*C-1$	1.2	4.8	1.2	6.5	0.6-70	$262*C-80$	0.2	0.6	1.3	8.2
Harmalol	0.4-120	$0.8*C+1.64$	0.12	0.4	1.2	2.4	8.3-70	$0.2*C+0.3$	2.1	8.3	1.2	2.2	1.1-70	$142*C-27$	0.3	1.1	1.3	3.3
Harmina	0.05-120	$5.7*C+3.2$	0.02	0.05	1.4	8.3	1.2-70	$1.7*C+1.2$	0.3	1.2	1.4	6.3	0.1-70	$1705*C-200$	0.03	0.1	1.6	7.5
Harmol	0.1-120	$4.7*C-0.8$	0.02	0.1	1.4	6.9	1.3-70	$1.5*C-3.2$	0.3	1.3	1.2	5.3	0.1-70	$1428*C-286$	0.03	0.1	1.3	4.9
Harmano	0.05-120	$6.1*C+3.5$	0.01	0.05	1.4	5.2	1.1-70	$1.8*C-0.7$	0.3	1.1	1.0	5.4	0.1-70	$1891*C-20$	0.02	0.1	0.9	5.4
Norharmano	0.03-120	$10.9*C+3.8$	0.01	0.03	1.5	2.4	0.7-70	$2.8*C-2$	0.2	0.7	0.8	3.5	0.1-70	$2746*C-80$	0.02	0.1	1.1	5.1

Tabla 3.2. Resumen de los intervalos lineales, límites de detección (LOD, $\mu\text{g/ml}$), límites de cuantificación (LOQ, $\mu\text{g/ml}$) y la desviación estándar relativa para tiempos y áreas en patrones de los seis alcaloides a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ (n=10) (%RSD). Estas figuras de mérito fueron evaluadas para tres equipos disponibles comercialmente (Lumex capel 105M, Agilent HPCE3D and Beckman P/ACE MDQ).

3.2.3. Aplicación a muestras de *Undaria pinnatifida*

El extracto de *Undaria pinnatifida* fue analizado por CE-UV utilizando las condiciones óptimas de separación establecidas. En la figura 3.10-a, se muestra un electroferograma de un extracto de alga fortificada a una concentración de 10 µg/ml de cada uno de los alcaloides antes del pretratamiento de muestra y otro sin fortificar (3.10-b). Como puede observarse, no fue posible detectar ninguno de los seis alcaloides en la muestra sin fortificar, debido a que se encuentran por debajo de los LOD de este método de CE-UV.

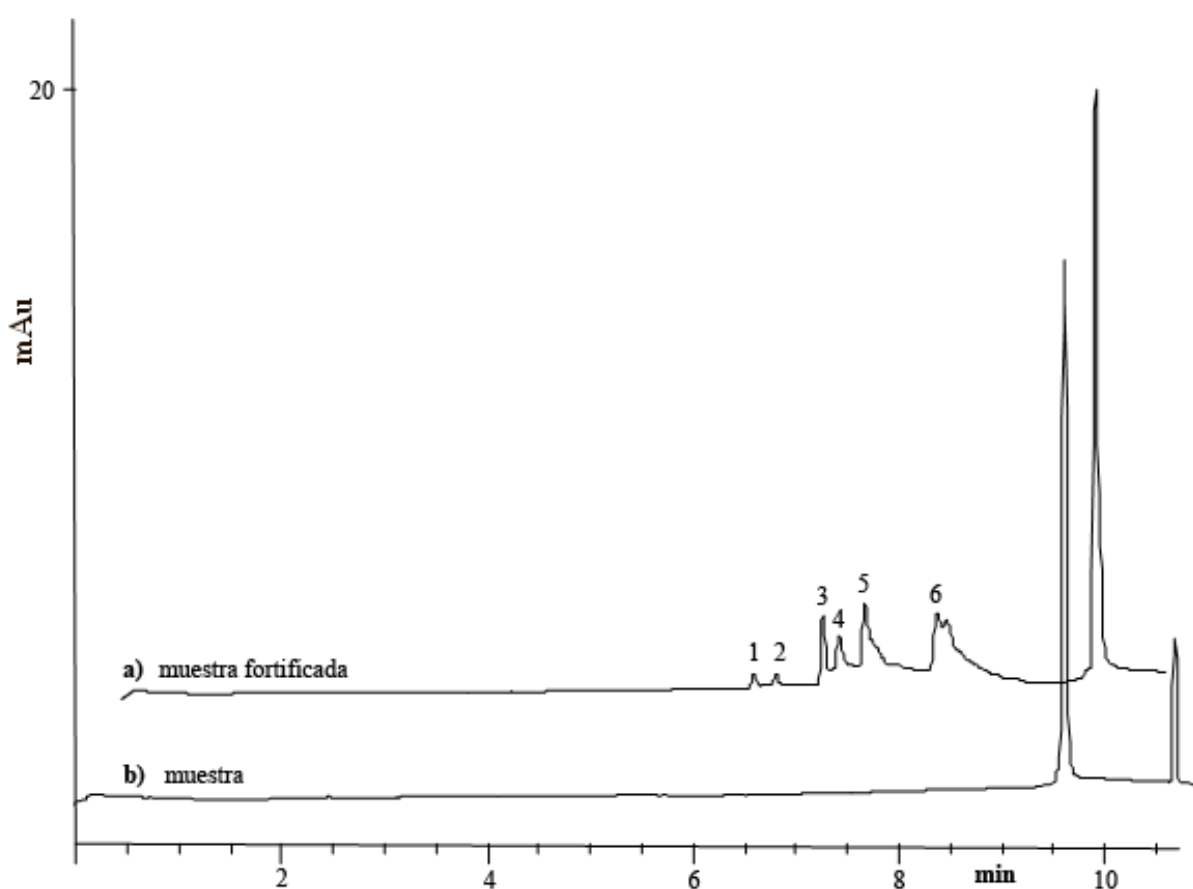


Figura 3.10. Separación de 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y 6) norharmano en a) un extracto de *Undaria pinnatifida* fortificado a una concentración de 10 µg/ml y b) un extracto de *Undaria pinnatifida* sin fortificar. El voltaje de separación fue de 20 KV. La detección de los compuestos se realizó a 254 nm. Inyección hidrodinámica: 30mbar, 3s. $L_t=58.8$ cm y $L_d=51$. BGE Tris/HCl pH=7.8 I=50 mM 20 % MeOH v/v. Agilent HP^{3D}CE.

Con el objetivo de evaluar el efecto de matriz, tanto sobre la intensidad de la señal como sobre la forma de los picos, y los LODs en este tipo de muestras, se analizaron muestras de algas fortificadas con los alcaloides a diferentes niveles de concentración. Los LODs fueron determinados mediante exploración empírica (LOD experimental), mediante el análisis de muestras fortificadas a concentraciones cada vez menores, hasta que los picos correspondientes dejaron de diferenciarse respecto a la línea de base. En todos los casos la relación señal/ruido a las concentraciones correspondientes a los LODs fue siempre superior a 3. Los resultados para cada una de las β -carbolinas se resumen en la tabla 3.3. Además también se incluyen los datos de repetitividad tanto para tiempos de migración como para áreas de pico obtenida de los resultados de diez replicados de una muestra fortificada a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos datos están expresados como RSD %. Como puede observarse, respecto a los valores obtenidos para los patrones en los diferentes instrumentos, la repetitividad es inferior en los tiempos de migración que en las áreas y los LODs muy superiores. Una primera solución a ambos problemas se describirá en la próxima sección, donde por un lado se describirá la mejora del acondicionamiento del capilar entre inyecciones para evitar contaminación cruzada y baja repetitividad y, por otro lado, el uso de un detector de MS para mejorar la sensibilidad y la selectividad, y así, los LODs.

Compuesto	LOD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	relación S/N	Repetitividad (n=10)	
			%RSD tiempo	% RSD Area
Harmalina	10	6	2.3	17.3
Harmalol	10	4	2.3	18.4
Harmina	6	4	2.2	16.7
Harmol	6	3	2.2	18.4
Harmano	6	6	2.1	15.2
Norharmano	6	6	2	18.4

Tabla 3.3. Se observan los LODs y a las relaciones S/N que fueron medidos para los seis alcaloides en muestras de *Undaria pinnatifida* fortificadas. Además, se muestra la repetitividad expresada en desviación estándar relativa (n=10) para las áreas y tiempos de migración obtenidos para una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Instrumento Agilent HP^{3D}CE.

3.2.4. Aplicación a muestras de semillas de *Peganum harmala*

Para poder comprobar los alcances del método desarrollado para el análisis de estos alcaloides por CE-UV y debido a que en la determinación de estos analitos en muestras de *Undaria pinnatifida* no se obtuvieron los LODs deseados y, en consecuencia, los mismos no fueron detectados, se analizó un extracto acuoso, a modo de té, preparado a partir de la decocción de semillas de *Peganum harmala*. Las mismas son conocidas por sus altos contenidos de harmalina, harmina y, en algunos casos, harmol y harmalol [185–187].

En la figura 3.11 se observan los electroferogramas obtenidos para una muestra de té (1:250) a longitudes de onda de 200 nm y 254 nm. A 200 nm (figura 3.11-i) se pudieron identificar con facilidad la harmalina (1), harmina (3) y harmol (4) comprobando su presencia tanto con muestras fortificadas con estándares como con experimentos separados por CE-MS. Por otra parte, a 254 nm (figura 3.11-ii) la determinación no podía realizarse debido a fuertes interferencias de la matriz en las señales analíticas de los compuestos pudiéndose observar simplemente la presencia de harmina (3).

A 200 nm (figura 3.11-i), además de los alcaloides de interés, se detectó otro compuesto muy abundante en estas semillas a tiempos de migración de alrededor de 3 minutos. Este compuesto, en concordancia con Frison y col. [187] se trataría posiblemente de un alcaloide quinazolinico denominado peganina [187,192]. Su presencia fue confirmada en otros experimentos por CE-MS. Para poder cuantificar los alcaloides β -carbolínicos a esta nueva longitud de onda, se realizaron curvas de calibración externa a 200 nm. El intervalo lineal de trabajo fue 4-100 $\mu\text{g/ml}$, $R^2 > 0.99$, y las rectas de calibrado obtenidas fueron para harmalina, $S = 5.1 \cdot C + 2.9$, para harmina, $S = 4.8 \cdot C + 2.8$ y para harmol $S = 5.5 \cdot C + 0.16$, donde S es la señal analítica y C es la concentración del analito expresada en $\mu\text{g/mL}$. La cuantificación de los mismos dio como resultado concentraciones de harmalina, harmina y harmol en el té sin diluir de 53 (± 2), 24.3 (± 0.4) y 16.4 (± 0.7) $\mu\text{g/mL}$, que en las semillas expresados en % m/m resultan 0.32 (± 0.01), 0.151 (± 0.004) y 0.098 (± 0.004)%, respectivamente. Estos valores, junto con la relación de concentraciones de harmina/harmalina (0.46 en nuestro caso), estuvo en concordancia con gran variedad de valores encontrados en la literatura empleando incluso otras técnicas analíticas [185–187,228].

Considerando las cantidades de alcaloides en esta decocción preparada con agua, es lógico encontrar valores sustancialmente diferentes a los que se obtienen a partir de una extracción exhaustiva con solventes orgánicos, dependiendo de las condiciones de extracción y la cantidad de muestra

empleada. Además, la cantidad total y relativa de los distintos alcaloides en estas semillas cambia drásticamente entre diferentes estados de crecimiento, condiciones climáticas e incluso origen geográfico. Está ampliamente aceptado que la cantidad total de alcaloides en semillas de *P. harmala* varían entre 2%-7% (m/m) [185–187]. Sin embargo, existe poca información sobre la caracterización de infusiones preparadas a partir de estas semillas. G. Frison y col., encontraron en un extracto orgánico de semillas de *P. harmala* cantidades de 12.00 y 7.20 mg/mL de harmalina y harmina, respectivamente [187]. En cambio, brebajes como la ayahuasca, los cuales son preparados también en forma de infusiones o decocciones acuosas, han sido caracterizados ampliamente. Se han reportado concentraciones entre 0.003–0.2 y 0.07– 1.70 $\mu\text{g/mL}$ para harmina y harmalina, respectivamente, en diversos análisis de éstos tés preparados de distintos modos [187,188,229].

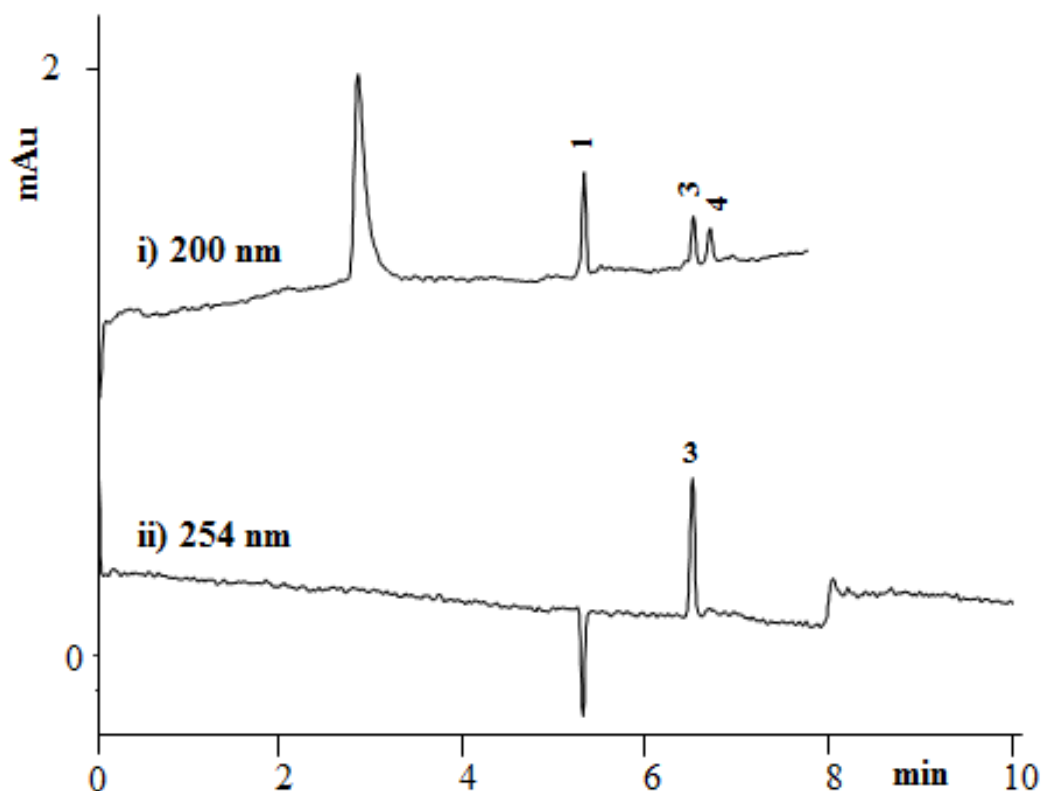


Figura 3.10. Análisis de semillas de *P. Harmala* por CE-UV detectado a i) 200 nm y a ii) 254 nm. Voltaje de separación +20 KV. BGE tris/HCl pH=7.8 I=50 mM 20 % metanol v/v. 1) harmalina, 3) harmina, 4) harmol. Instrumento Agilent HP^{3D}CE.

Contrariamente al caso de la harmalina y la harmina, no hay un consenso sobre la concentración de harmol en las semillas de *Peganum harmala*, el cual es uno de los principales metabolitos de la harmina. Sólo en algunos de los trabajos revisados se encontró harmol como compuesto minoritario, mientras que en otros apuntan a que se trata de un compuesto mayoritario, esto puede estar íntimamente relacionado al tipo de preparación del extracto, la cual puede degradar en distintos grados a la harmina y, consecuentemente, producir cantidades variables de harmol [185–187,192]. En nuestro caso en particular del té, preparado a partir de las semillas contenía concentraciones de harmol de alrededor de la mitad de los niveles de harmina.

3.3. Conclusiones Parciales

- Se ha diseñado exitosamente un nuevo parámetro de respuesta para la optimización del pH de separación entre pares de analitos por CE considerando no sólo la diferencia de movilidades entre los analitos sino también considerando la separación de cada uno respecto a los compuestos neutros que migran con el EOF.
- Se ha compuesto una función de respuesta basada en este parámetro que se puede aplicar a una mezcla de muchos analitos, obteniendo un máximo al pH en el cual se produce la mejor separación de los compuestos entre ellos y respecto a una sustancia que migra junto con el EOF.
- Esta función se ha aplicado de manera exitosa a la optimización de la separación de seis alcaloides β -carbólicos estructuralmente muy similares y difíciles de separar mediante otro tipo de optimizaciones, obteniéndose un pH óptimo de 7.8.
- Además del pH, se optimizaron diversas variables como la naturaleza del BGE, la fuerza iónica, la composición y naturaleza del solvente, obteniendo la mejor separación para el análisis por CE-UV utilizando un BGE *Tris/HCl* pH=7.8 I=50 mM 20 % metanol v/v.
- Se evaluó el método desarrollado en tres instrumentos comerciales obteniendo rectas de calibrado, LODs, LOQs, repetitividad y reproducibilidad en área y tiempos de migración para los seis compuestos en cuestión. Se encontró que el detector de UV con longitud de onda fija posee mejores LODs y LOQs que los detectores DAD.
- El método desarrollado se aplicó en extractos de *Undaria pinnatifida* donde los LODs no fueron suficientes para detectarlos debido al importante efecto de matriz. Sin embargo, se analizaron muestras fortificadas evaluando los LOD que se alcanzan, además de la repetitividad y reproducibilidad de las determinaciones.
- Por último, se aplicó el método desarrollado a un té de semillas de *Peganum harmala*, donde se pudo detectar y cuantificar harmina, harmalina y harmol. Tanto sus concentraciones, así como la relación de concentraciones entre la harmina y la harmalina, fueron congruentes con los valores encontrados en literatura.

4. SEPARACIÓN DE β -CARBOLINAS POR CE-MS

En este capítulo se compatibilizó el método obtenido en la sección anterior empleando CE-UV con la detección por MS. Para ello se debió optimizar el BGE, la composición del líquido auxiliar en la interfase de CE-MS, además de todos los parámetros de detección del MS. Una vez encontradas las condiciones óptimas se validó la metodología para la determinación de los seis alcaloides, obteniendo de esta forma todas las cifras de mérito asociadas a la misma. También se estudiaron sus espectros de MS/MS. Luego, se aplicó el método de CE-MS a muestras de *Undaria pinnatifida*. Para ello, se optimizó un procedimiento de extracción con solvente orgánico. A continuación, se evaluó la presencia de efectos de matriz para cada uno de los compuestos para, finalmente, detectar, caracterizar y cuantificar adecuadamente los alcaloides presentes en las muestras.

4.1. Procedimientos

4.1.1. Detección por espectrometría de masa

Los análisis fueron llevados a cabo en un capilar de sílice fundida de 60 cm L_T , 75 μm id y 360 μm od, a 25°C. Todos los lavados del capilar fueron realizados a una presión de 930 mbar. Los capilares sin usar tuvieron una activación inicial que constaba de un lavado con NaOH 1M (20 min), agua (15 min) y BGE (30 min). Vale la pena resaltar que todos los lavados fueron realizados fuera del equipo para evitar la contaminación innecesaria del MS debido al uso de NaOH. Una vez insertado el capilar en el cartucho e instalada la interfase de CE-MS, el último paso fue equilibrar el capilar con el BGE aplicando el voltaje de separación. Entre jornadas de trabajo, el capilar fue acondicionado circulando metanol (5 min), agua (5 min) y BGE (15 min). Entre análisis, el acondicionamiento que resultó más adecuado y con el cual se obtuvo la mayor repetitividad y reproducibilidad en los resultados fue el siguiente: metanol (1 min), agua (1 min) y BGE (2 min). El tipo de inyección utilizada fue la hidrodinámica, introduciendo la muestra a una presión de 35 mbar durante 3 segundos. La separación se realizó a una temperatura de 25°C bajo polaridad normal a 20 kV. Entre jornadas, el capilar fue almacenado lleno de BGE y para periodos más extensos se lavó con agua y luego aire durante 5 minutos para evitar cristalización de sales en su interior.

A continuación se describen las condiciones para la detección en línea por MS en ESI modo positivo. El líquido auxiliar óptimo fue una mezcla isopropanol/agua 60/40 v/v, con 0.05% v/v de ácido fórmico como aditivo, a un caudal de 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Además, se optimizó tanto el caudal del gas de secado (N_2) como su temperatura, siendo las condiciones óptimas las de 5 L/min y 250°C,

respectivamente. La presión de gas nebulizador (N_2) fue de 5 psi. Respecto a los parámetros del MS en particular, el potencial de ESI fue de 4000 V, mientras que los voltajes a la salida del capilar y del *skimmer* fueron 145 y 47 V. Los voltajes de los octopolos fueron 7.5 y 1.25 V. Los parámetros relacionados con la trampa, la RF en el octopolo y las lentes 1 y 2 tomaron los valores de 94.5, 93.5, -14 y -100 V respectivamente. Los espectros adquiridos en el intervalo de m/z entre 100 y 500 resultaron del promedio de siete barridos.

Respecto a la detección por MS-MS, todas las variables que afectaban a la fragmentación del ión molecular detectado para cada alcaloide fueron optimizadas para cada uno por separado. Se obtuvieron los patrones de fragmentación MS/MS (MS^2) y MS^n para todos los compuestos. Su identidad en muestras reales se confirmó sólo con el espectro de MS/MS por motivos de sensibilidad. Las variables obtenidas para cada uno de los analitos individualmente, se promediaron para el análisis de las muestras. Este hecho no arrojó diferencias significativas en la detección debido a la similitud estructural de los compuestos y su consecuente semejanza en las condiciones de fragmentación. Las fragmentaciones fueron inducidas por colisión con moléculas de Helio, el intervalo de m/z para el aislamiento de los iones de ésta fue de 4 m/z y la energía de colisión fue de 1 V. Los espectros de masas MS/MS fueron adquiridos como promedio de 7 barridos de m/z entre 100 y 500.

4.1.2. Pretratamiento de *Undaria pinnatifida*

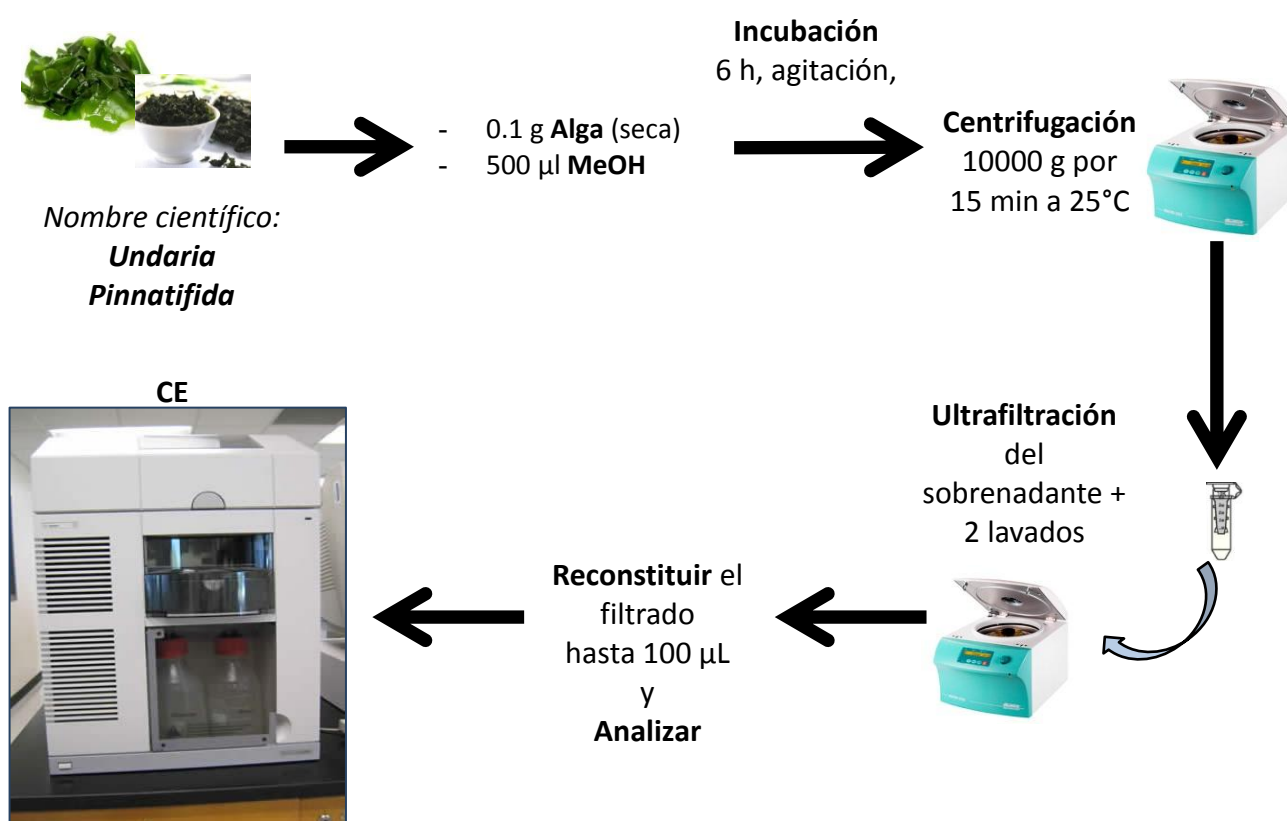
Las muestras de *Undaria pinnatifida* (wakame) fueron obtenidas en supermercados del área de Barcelona de tres marcas comerciales distintas. En dos de los casos, las algas eran originarias de la costa atlántica de Galicia (España) mientras que el restante era originario de la costa atlántica de Bretaña (Francia). Todas las muestras fueron secadas en estufa a una temperatura de 40°C por 24 hs, luego fueron cuidadosamente molidas en un molino de discos. Finalmente, el polvo resultante fue tamizado con un tamiz cuyo diámetro de orificios es de 200 μm , posteriormente fueron almacenadas a 4°C y fuera del contacto de la luz.

El pretratamiento optimizado consistió en realizar una extracción sobre 0.1 g del polvo tamizado de algas utilizando como extractante una mezcla de 500 μL de metanol con 500 μL de HCl 3.5 M. La mezcla de polvo y solvente hidroorgánico de extracción fue incubada durante 6h a 80°C en un agitador termostatzado (Ver figura 4.1). Luego de este paso, las muestras se agitaron en un *vortex* durante 30 s y luego se centrifugaron a 10000 g por 15 min a una temperatura de 25°C.

Luego de recoger el sobrenadante, este se ultrafiltró con un filtro de corte por peso molecular de 3 KDa por 15 minutos a 16000 g y 25°C.

Finalmente, se debe lavar con una alícuota de 50 µL de agua el residuo y centrifugar nuevamente a 12000 g por 10 minutos para minimizar las pérdidas de compuestos de bajo peso molecular, entre ellos los alcaloides buscados. Este paso de lavado debe realizarse dos veces, y recuperar los filtrados, antes de llevar a un volumen final de 250 µL con agua.

Vale la pena destacar, que los filtros empleados deben ser pasivados para obtener los mejores factores de recuperación para los compuestos en cuestión. El tratamiento se debe realizar antes del primer uso de los filtros y consiste en la adición de una solución de PEG al 5% (v/v) [226].



4.2. Resultados y Discusiones

4.2.1. Optimización de la separación y detección por CE-MS

En la sección anterior, se describió el BGE óptimo para la separación de los alcaloides por CE-UV (Tris pH 7.8 I=50 mM 20% v/v de metanol). En CE-MS, los componentes del BGE deben ser volátiles para poder generar un electroespray estable, reproducible y eficiente, evitando depósitos de sales en la entrada del espectrómetro de masas, supresión de la ionización o inestabilidad de la corriente de ESI o electroforética [192,226,230,231]. Los BGEs ácidos con acético, ácido fórmico y cantidades moderadas de amoníaco, si es necesario ajustar el pH, suelen ser en general los que mejores resultados dan para análisis por CE-MS en modo positivo. También se han obtenido resultados aceptables utilizando BGEs volátiles débilmente básicos a base de acetato de amonio, debido a que el uso de líquidos auxiliares hidroorgánicos ácidos permite ajustar el pH de la solución a nebulizar promoviendo la ionización eficiente de los analitos de modo positivo. Por lo tanto, para optimizar la detección se han de considerar las características tanto del BGE como del líquido auxiliar [232]. Para ello, la composición del BGE debe ser adaptada, conservando características asociadas a la selectividad de la separación, como puede ser el pH pero reoptimizando otros aspectos como la naturaleza del BGE, la fuerza iónica y el contenido de aditivo orgánico.

Se seleccionaron distintos BGE de pH=7.8 basados en acetato de amonio y dihidrogenofostato de amonio/ hidrogenofostato de amonio a distintas fuerzas iónicas (entre 10-50 mM) y distintas proporciones de metanol como modificador orgánico (entre 0 y 20% v/v). En el caso de los BGE de fosfato de amonio, la fuerza iónica se trató de mantener lo más baja posible (máximo 25 mM) para asegurar una volatilidad apropiada.

A pesar de que la mejor separación se obtuvo utilizando como BGE fosfato de amonio pH= 7.8, fuerza iónica 25 mM y 10% v/v de metanol, y en segundo lugar el acetato de amonio a pH= 7.8, fuerza iónica 25 mM y 10% v/v de metanol, la sensibilidad de la detección fue diez veces mayor para el caso del BGE de acetato de amonio debido a su mayor volatilidad. Por lo tanto, si bien la separación no fue tan buena como con el primer BGE considerado, se utilizó por su mayor eficiencia de ionización de los analitos. Se deben tener ciertas precauciones debido a que el BGE de acetato no es una solución amortiguadora a estos valores de pH. Por lo tanto, el BGE fue renovado después de cada análisis para evitar cambios en el pH de separación.

Una vez seleccionado el BGE, se optimizó la detección por MS estudiando las condiciones del líquido auxiliar. Se emplearon distintos caudales (de 1 a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$), distintos modificadores orgánicos en diferentes proporciones, como pueden ser isopropanol y metanol (desde 60% a 100% v/v), empleando distintos aditivos ácidos (ácido acético y fórmico) a distintas concentraciones (desde 0.05 a 1% v/v). La mejor sensibilidad y estabilidad de señal en ESI+ fue obtenida para un líquido auxiliar compuesto por una mezcla 60:40 v/v isopropanol : agua y 0.05% v/v de ácido fórmico a un caudal de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En la figura 4.1-a se puede observar el electroferograma de iones totales (TIE) de una mezcla de patrones a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada alcaloide. A diferencia de la separación efectuada en CE-UV, en donde todos los analitos se separan completamente a este valor de pH, aquí quedan sin resolverse completamente los picos 3 y 4 correspondientes a la harmina y el harmol (la resolución aproximada es de $R_s=0.5$). Esto es probablemente debido al efecto de aspiración que produce el gas nebulizador que se utiliza para asistir la formación del spray, que induce un flujo laminar positivo hacia la salida del capilar que acorta los tiempos de análisis y disminuye la eficiencia de la separación. Los electroferogramas de iones extraídos (EIE) para cada alcaloide se muestran en la figura 4.1-b, muestran que los diferentes compuestos pueden separarse exitosamente según las relaciones m/z de los iones moleculares detectados en cada caso.

En base a las condiciones optimizadas, el método fue sujeto a una validación, primeramente realizando una calibración externa con patrones, seguido de ensayos de repetitividad y de reproducibilidad. Las figuras de mérito se encuentran resumidos en la tabla 4.1. De acuerdo con sus similitudes estructurales, los harmanos arrojaron intervalos de linealidad, LODs y LOQs similares entre sí. Respecto a los LODs obtenidos, se encontraban entre 5.9 ng/mL (harmol) y 1.2 ng/mL (harmina, harmano y norharmano). No se han encontrado publicaciones reportando los LOD para alcaloides de esta familia de β -carbolinas utilizando CE-MS, ya que los trabajos se suelen centrar en el desarrollo de metodologías analíticas de tipo cualitativo [192,202–204,230]. Sin embargo, estos valores son similares a los obtenidos para otros alcaloides por CE-MS, como por ejemplo la estricnina (0.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la brucina (0.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [233], la hiosciamina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y la scopolamina (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [234]. Varios autores también han reportado que normalmente los LOD que se obtienen por CE-MS para este tipo de alcaloides son normalmente diez veces menores a los obtenidos por CE-UV (alrededor de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [233,235,236].

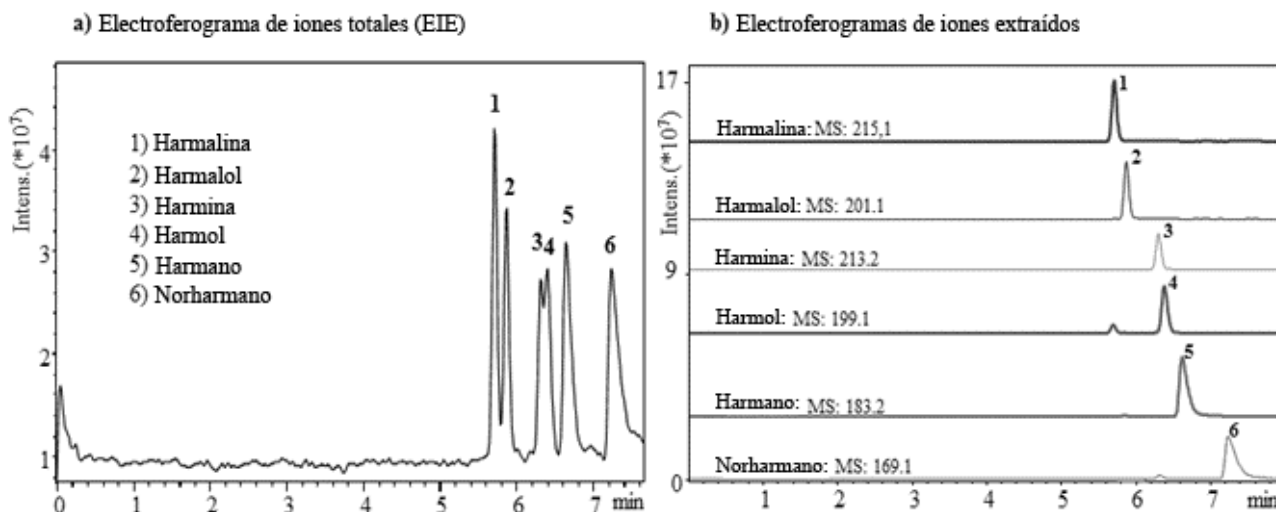


Figura 4.1. a) Electroferogramas de iones totales (TIE) de una mezcla estándar de los alcaloides a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$. b) Electroferogramas de iones extraídos (EIE) de los iones moleculares correspondientes a cada alcaloide. 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y 6) norharmano. Voltaje de separación +20kV. L_r :60.0 cm. Instrumento: HP^{3D}CE acoplado a Agilent MSD Trap.

En nuestro caso, tenemos mejoras de entre 10 y 100 veces dependiendo del instrumento respecto al método CE-UV. De todos modos, los mismos siguen siendo sensiblemente mayores que los obtenidos para algunos alcaloides por HPLC con detección por fluorescencia y por MS, entre ellos podemos destacar a los publicados para la harmina, harmalina, harmol y harmalol de 0.3 ng/mL para harmina y de 0.5 ng/mL para el resto [188,190]. Los LODs elevados es una de las principales desventajas de las técnicas microseparativas como la CE debido a las pequeñas cantidades de muestra empleadas. Las principales ventajas en este caso en concreto respecto a HPLC son la reducción a la mitad de los tiempos de análisis y el ahorro de solventes y reactivos, debido a su bajísimo consumo. Además, es importante destacar que la repetitividad y la reproducibilidad alcanzada es similar a aquellas obtenidas por otros autores para el análisis de β -carbolinas por HPLC [190]. Las repetitividades expresadas en %RSD tanto para áreas de pico como para tiempos de migración fueron buenas y rondaron entre el 2.5 % y el 10 % para áreas de pico y entre 0.9 % y 1.3 % para tiempos de migración, los cuales son valores típicos para determinaciones por CE-MS [20,237,238]. Además, los valores de reproducibilidad también fueron satisfactorios con %RSD entre 9.1 % y 12 % para áreas de pico, mientras que para tiempos de migración se encontraron entre 2.9 % y 4.5 %.

Calibración externa								
Compuesto	Linealidad		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Repetitividad % RSD (n=10)		Reproducibilidad % RSD (n=10, 3 días)	
	Intervalo (µg/ml)	Y=a+bx (r ² >0.99)			t _m	Area	t _m	Area
Harmalina	0.008-10	3.4x10 ⁷ x - 2.8x10 ⁴	2.5	8.0	1.3	10	3.1	12
Harmalol	0.006-10	6.0x10 ⁷ x - 1.8x10 ⁶	1.8	6.0	1.1	7.3	2.9	10
Harmina	0.004-10	5.2x10 ⁷ x + 1.5x10 ⁵	1.2	4.0	1.1	2.5	3.2	9.7
Harmol	0.020-10	5.4x10 ⁷ x - 1.2x10 ⁶	5.9	20	0.9	6.4	3.6	9.1
Harmano	0.004-10	5.4x10 ⁷ x + 4.2x10 ⁴	1.2	4.0	1.0	8.9	3.8	9.9
Norharmano	0.004-10	5.8x10 ⁷ x - 3.3x10 ⁵	1.2	4.0	1.0	9.9	4.5	12
Adición de estándar								
Compuesto	Linealidad		LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)	Repetitividad % RSD (n=10)		Reproducibilidad RSD% (n=10, 3 días)	
	Intervalo (µg/ml)	Y=a+bx (r ² >0.99)			t _m	Area	t _m	Area
Harmalina	0.014-16	3.4x10 ⁶ x - 2.8x10 ⁶	5.1	14.1	1.2	12	3.4	12
Harmalol	0.013-16	5.2x10 ⁶ x - 1.2x10 ⁶	4.0	13.0	1.1	10	2.5	11
Harmina	0.007-16	7.9x10 ⁶ x + 7.9x10 ⁵	2.3	7.0	1.0	9.3	2.6	12
Harmol	0.033-16	4.9x10 ⁶ x - 1.2x10 ⁴	10.0	33.3	0.8	9.1	3.35	10
Harmano	0.006-16	8.7x10 ⁶ x + 2.8x10 ⁵	1.8	6.0	1.1	9.1	3.2	10
Norharmano	0.005-16	1.3x10 ⁷ x - 5.3x10 ⁵	1.5	5.0	1.0	6.7	3.3	8.1

Tabla 4.1. Parámetros de calidad analítica obtenidos para la calibración externa y para la calibración por el método de adición de estándar, además de repetitividad (n=10) y reproducibilidad (n=10) para tres días distintos y empleando capilares nuevos, a una concentración de 1µg/ml, para los seis alcaloides estudiados.

4.2.2. Optimización del pretratamiento de muestra

Para poder determinar los alcaloides β -carbolínicos en las muestras de *Undaria pinnatifida* se optimizó un pretratamiento de muestra adecuado. Es conocido que los alcaloides son compuestos básicos que pueden ser fácilmente extraídos en medio ácido y con solventes polares bajo su forma protonada, o bien en medio altamente básico con solventes no polares bajo su forma neutra [185,239]. En este caso, dos de los alcaloides, más precisamente harmol y harmalol, poseen un grupo hidroxilo que a pH básico se encontraría ionizado y no podrían extraerse eficientemente empleando solventes no polares. Por este motivo, se eligió la extracción en medio ácido con solventes polares como método de extracción.

Después de la extracción, dada la complejidad de la matriz, antes del análisis por CE-MS fue también necesario eliminar los compuestos de elevado peso molecular utilizando filtración por centrifugación con filtros de corte por peso molecular de 3KDa. El motivo principal radica en la eliminación de los interferentes, pero también prevenir la falta de reproducibilidad debido a la adsorción de estos componentes de la matriz en las paredes internas del capilar de sílice fundida. Su presencia producirá variaciones en el EOF e inestabilidades en el espray que generarán variabilidad en la señal, y pérdidas del contacto eléctrico [226].

En primera instancia se evaluaron las recuperaciones en la etapa de filtración por centrifugación utilizando soluciones estándar, las cuales arrojaron valores en torno al 100% para todos los alcaloides estudiados. Los factores de recuperación para la filtración fueron evaluados como un paso independiente del pretratamiento y la metodología utilizada para probar la validez de su uso consistió en la comparación de las áreas de los picos obtenidos por CE-MS para una muestra estándar de los seis alcaloides a una concentración intermedia de 1 $\mu\text{g/mL}$ con y sin ultrafiltración. Además también se realizaron las pruebas pertinentes para comprobar las diferencias entre filtros pasivados y sin pasivar. Una mayor discusión del efecto de la pasivación puede ser encontrada en el trabajo de Pont *et al.* [226]. Los factores de recuperación obtenidos en el proceso de filtrado empleando filtros pasivados también fueron excelentes.

Una vez corroborada la eficiencia en este paso se estudiaron otras variables que podían afectar la extracción de los alcaloides directamente desde las muestras de algas, entre ellas la temperatura de extracción, el tiempo de incubación, el tipo de ácido y su concentración, el tipo de solvente orgánico polar, y su proporción en la mezcla con agua.

La temperatura de extracción fue evaluada entre 50°C y 90°C, los mejores resultados, en término de recuperaciones de los alcaloides fueron obtenidos a 80°C. En cuanto a la naturaleza del solvente orgánico, se probaron etanol y metanol el cual el último dio resultados superiores. Una vez seleccionado el metanol como solvente se procedió a optimizar su composición entre 40 y 70% v/v. Si bien los valores no fueron muy distintos entre sí, se observó una leve mejora en las recuperaciones para la composición de metanol 50% v/v.

Para mejorar la extracción se evaluaron diferentes tipos de ácido, entre los que podemos nombrar ácido fórmico, ácido acético y ácido clorhídrico a concentraciones 1 M, 3 M y 10 M para los dos ácidos débiles y 1M y 3.5 M para el ácido fuerte. En la figura 4.2 se puede observar las recuperaciones para los seis alcaloides para tres concentraciones distintas del ácido acético.

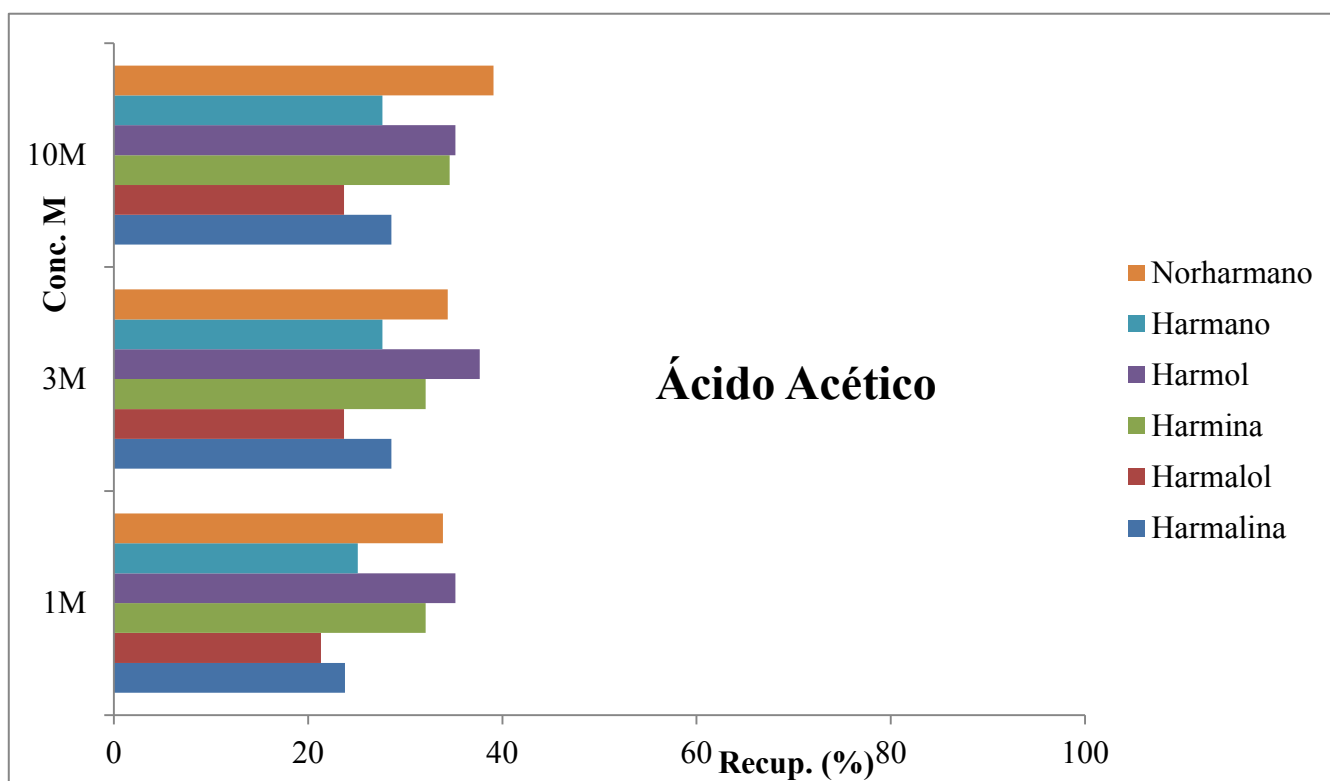


Figura 4.2. Representa las recuperaciones porcentuales a distintas concentraciones de ácido acético para los seis alcaloides de estudio.

Como se puede observar, las recuperaciones resultaron bajas para todas las concentraciones del ácido que, si bien variaron entre 1 y 10 M, la acidez de la extracción no cambiaba sustancialmente (1.9-2.4) y por ende no se observan grandes diferencias entre las condiciones experimentales.

A continuación, se procedió a realizar el mismo procedimiento de optimización para el ácido fórmico. Los resultados se pueden observar en la figura 4.3.

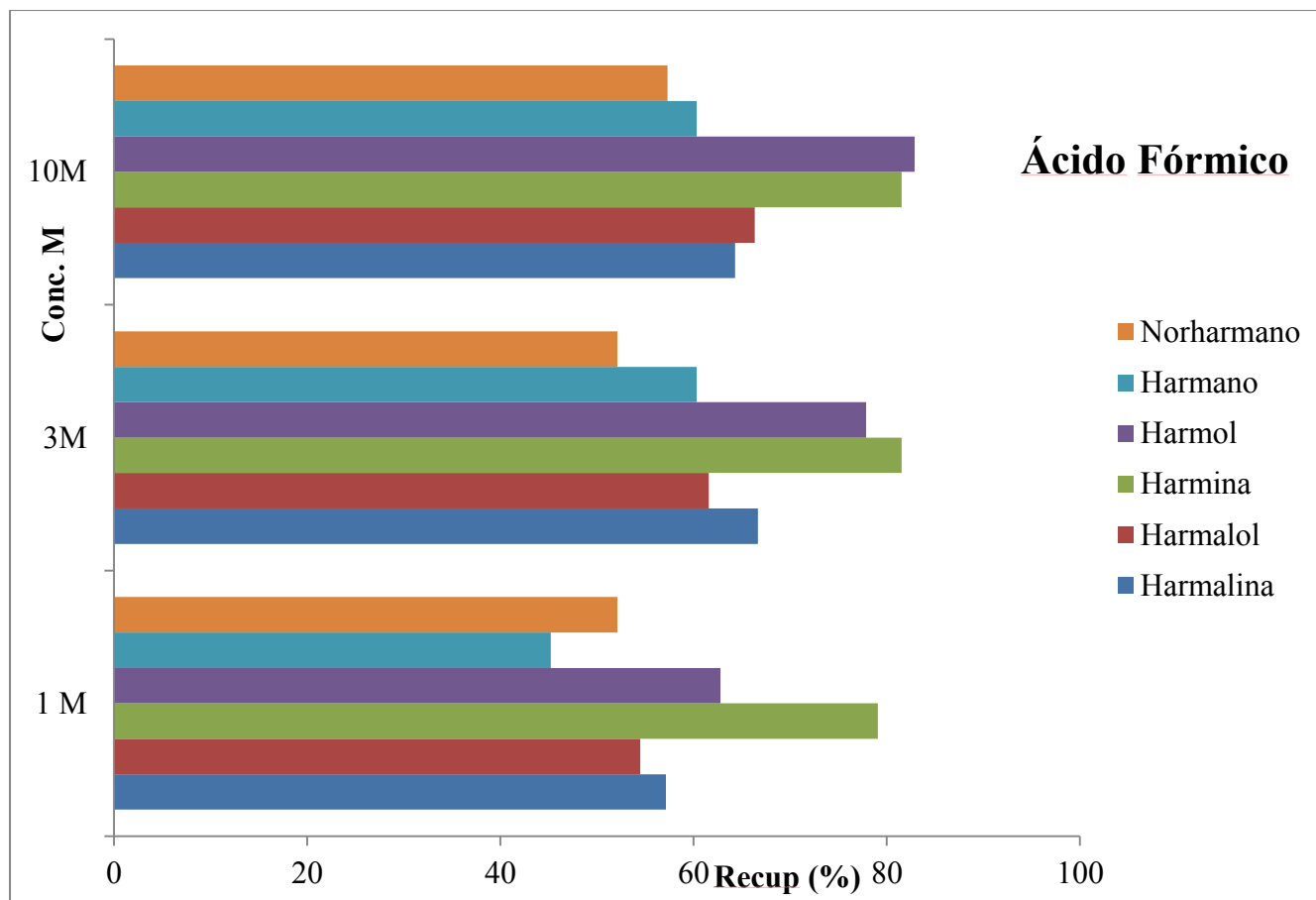


Figura 4.3. Representa las recuperaciones porcentuales a distintas concentraciones de ácido fórmico para los seis alcaloides de estudio.

Las recuperaciones son en general mejores respecto a las obtenidas con ácido acético, lo cual puede asociarse a que el valor de pKa del ácido fórmico (3.74) es más bajo que el del ácido acético (4.75), o sea que el pH de las distintas soluciones a las mismas concentraciones era más bajo (1.3-1.9). Además, aquí sí se puede observar que al incrementarse la concentración de ácido en el extractante se produce un leve aumento en las recuperaciones. Esto es más notable en el caso de harmalol, harmina, harmol y harmalina, mientras que para harmano y norharmano aunque muestran una tendencia creciente, la misma no resulta tan evidente.

El último ácido utilizado fue el ácido clorhídrico, el cual arrojó claramente los mejores resultados. Se evaluaron a dos concentraciones distintas y los resultados se muestran en la figura 4.4.

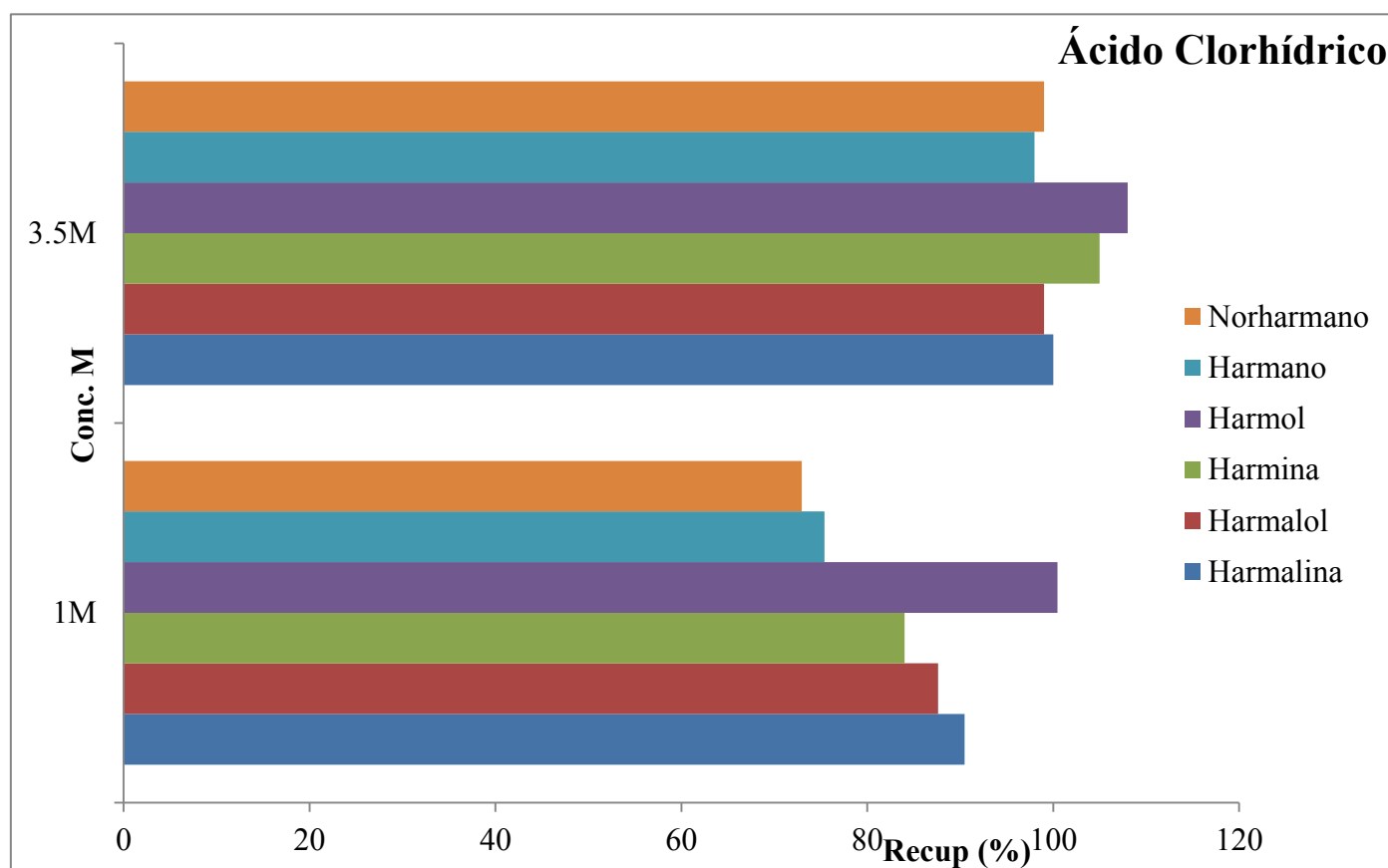


Figura 4.4. Representa las recuperaciones porcentuales a distintas concentraciones de ácido clorhídrico para los seis analitos de estudio.

En este caso y en consonancia con la tendencia marcada en los estudios con los dos ácidos anteriores, se observa que cuanto más ácido es el medio, mejores son las recuperaciones, por ello los mejores resultados se tienen con el HCl más concentrado. Con la mayor de las concentraciones evaluadas (3.5 M) las recuperaciones ya rondan el 95% para todos los analitos, lo cual ya resulta satisfactorio. Para evitar hidrólisis de componentes en la matriz, evitar acidez extrema en la muestra a inyectar, y por cuestiones de seguridad se optó por no aumentar más la concentración de HCl. Cabe mencionar que, a pesar de que el HCl genera mayores rendimientos, luego, durante el análisis se obtuvieron corrientes mucho más homogéneas al analizar los extractos de ácido acético y ácido fórmico. Con los extractos de HCl los perfiles de corriente eran perfectamente reproducibles pero, los mismos decaían y volvían a aumentar durante el análisis hasta estabilizar generando un perfil de corriente parabólico.

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas para la mezcla de extracción (metanol 50% v/v HCl 3.5 M, 80°C), se procedió a evaluar, como última etapa los tiempos de contacto. Para ello se obtuvieron las recuperaciones para tiempos de contacto entre 40 minutos y 24 horas. En la figura 4.5 se pueden apreciar las diferencias en las recuperaciones para los compuestos estudiados a distintos tiempos.

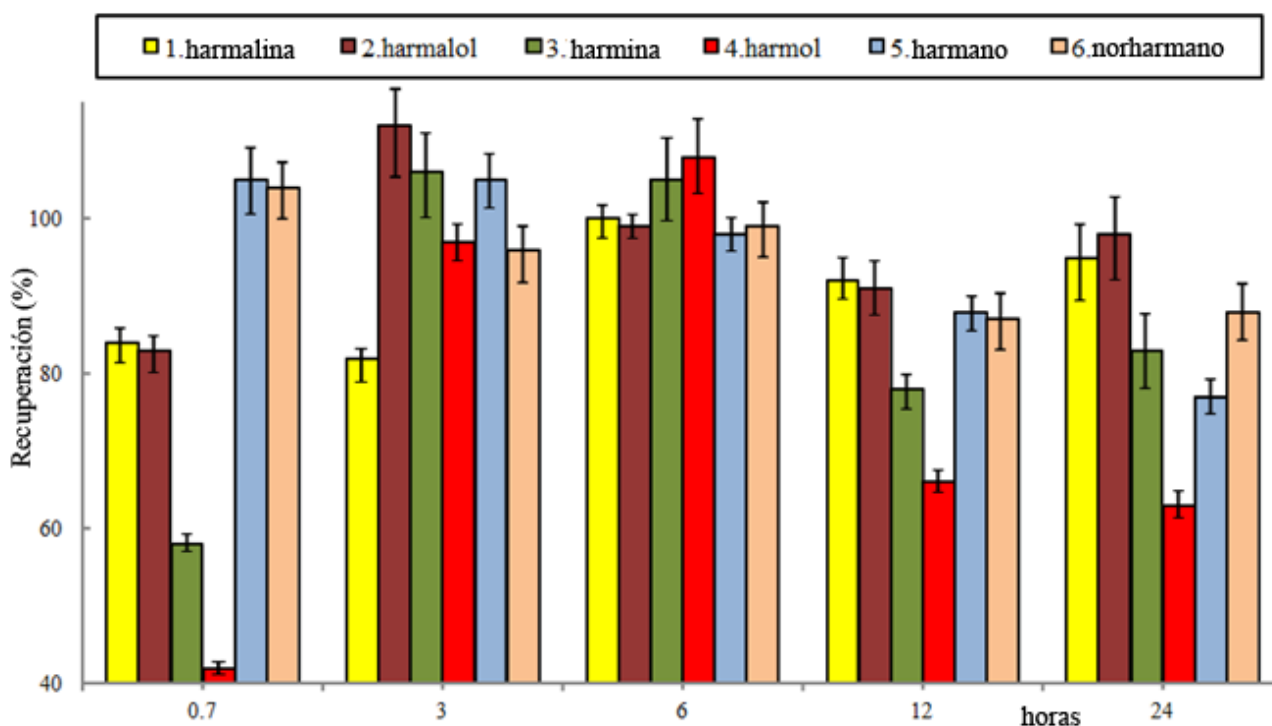


Figura 4.5. Recuperaciones porcentuales a distintos tiempos de contacto para los seis analitos estudiados. Condiciones de extracción: metanol:agua 50% v/v, HCl 3.5 M, 80°C. La desviación estándar entre replicados para cada compuesto se ha indicado con barras verticales.

Como se puede ver en la figura, a medida que aumenta el tiempo de contacto las recuperaciones tienden a incrementarse alcanzando un máximo (95-100%) para todos los alcaloides a las 6 horas. Para 40 minutos los valores de recuperación obtenidos son los más bajos, siendo para el caso del harmol de alrededor de un 40%, para harmina un 60%, para harmalina y harmalol rondan en un valor promedio del 80 %, y únicamente para los casos del harmano y norharmano (>100%) no presentan prácticamente modificaciones frente al resto de los tiempos de contacto. Luego de las seis horas, específicamente para 12 y 24 horas, las recuperaciones decaen significativamente en todos los casos. Además, como se puede ver en la figura 4.5, un tiempo de contacto de 6 horas, aparte de

proveer una muy buena recuperación también posee muy buena repetitividad de acuerdo a los pequeños valores de la desviación estándar, que se evidencian con las barras de error ubicadas en la parte superior para cada compuesto en cada una de las condiciones.

4.2.3. Análisis de β -carbolinas en muestras de *Undaria pinnatifida*

Para la determinación de los alcaloides en *Undaria pinnatifida* por CE-MS se siguieron una serie de pasos para la identificación de los compuestos a cuantificar. A modo de ejemplo en la siguiente figura se muestra el caso del harmalol, el cual fue detectado y cuantificado en las muestras (figura 4.6).

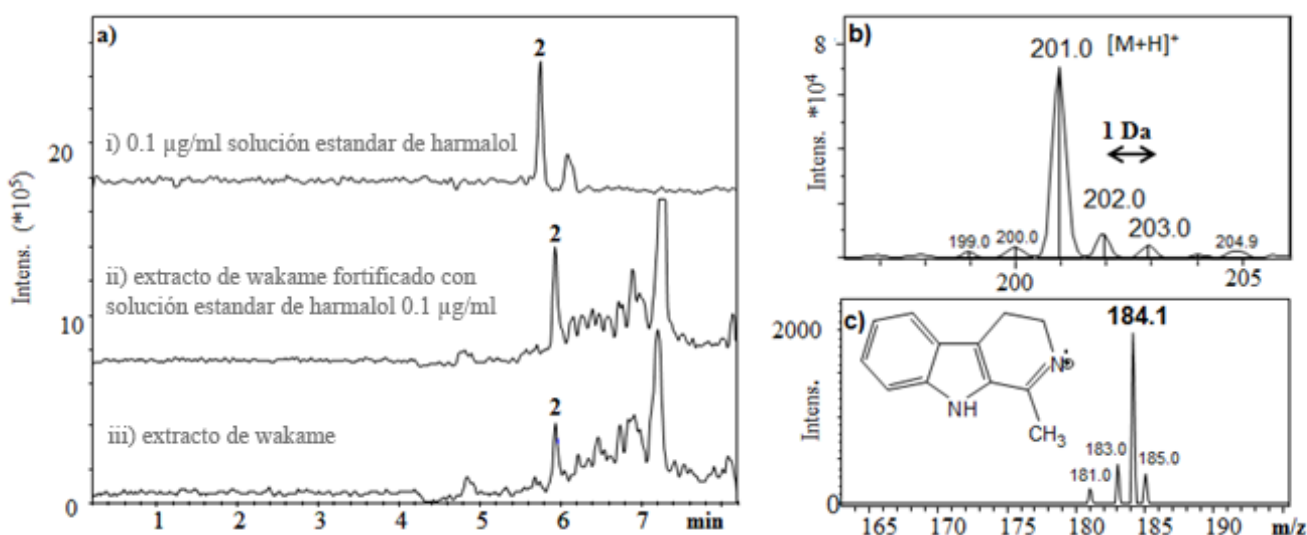


Figura 4.6. EIE del harmalol (201.0 m/z) para: i) solución patrón de los 6 alcaloides en agua a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$, ii) extracto de wakame (*Undaria pinnatifida*) fortificado con mezcla estándar de concentración 0.1 $\mu\text{g/mL}$ y iii) extracto de *Undaria pinnatifida*. b) espectro de masas del pico y, c) espectro MS-MS del ión molecular del alcaloide, ambos extraídos del extracto de *Undaria pinnatifida* sin fortificar. Las transiciones MS-MS para todos los alcaloides son (en m/z): (1) harmalina 215.1>173.9, (2) harmalol 201.0>184.1, (3) harmina 213.2>198.0, (4) harmol 199.1>171.0, (5) harmano 183.2>167.1, (6) norharmane 169.1>N/D.

En la figura 4.6-a se pueden observar los electroferogramas de ión extraído (EIE) del harmalol (figura 4.6-a)), el cual corresponde a una relación m/z de 201.0, analizando i) una solución estándar una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno, donde se puede fácilmente ver que no hay ningún tipo de interferencias debido a que la masa que muestra el EIE es la específica del harmalol. En segundo lugar, figura 4.6-a-ii), se puede observar el extracto de *Undaria pinnatifida* fortificado a una concentración final de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno y, finalmente, en la figura 4.6-a-iii) se observa

simplemente el extracto de *Undaria pinnatifida* sin fortificar. Relacionando los tiempos de migración y las alturas de los picos electroforéticos de estos tres electroferogramas se puede deducir la presencia de harmalol en la muestra. Para confirmar la identidad del harmalol basta con examinar los espectros de MS y MS-MS del pico señalado con el número 2 (figuras 4.6.b) y c)). Estos espectros muestran tanto el ion molecular del harmalol como su fragmentación MS-MS característica, apareciendo un ión fragmento con m/z 184.1. Este análisis confirma la identidad del pico señalado y, por ende, la certeza de su presencia en la muestra de alga, antes de su cuantificación.

Para poder cuantificar los alcaloides en las muestras de algas, además de la calibración externa se realizó una calibración por el método de adición de estándar para, de esta forma, estudiar la existencia de efecto de matriz. Por otra parte, también se realizaron ensayos de repetitividad y de reproducibilidad, los cuales fueron caracterizados por sus desviaciones estándares. En el primer caso se realizaron diez replicados, mientras que en el segundo se realizaron diez replicados para tres días diferentes utilizando capilares nuevos. Los resultados para los seis analitos se muestran en la tabla 4.1. Se puede observar que los LODs y LOQs obtenidos fueron alrededor de dos veces mayores a los obtenidos con los patrones realizando la calibración externa. También se observan diferencias en la sensibilidad de los métodos (pendiente de la recta). Estas últimas, a fin de encontrar la presencia de efecto de matriz para los analitos, se sometieron a una comparación estadística mediante el test de comparación de medias con un grado de significancia de 95%. Este test arrojó diferencias significativas entre las pendientes de las dos rectas de calibrado para los seis analitos. Se observaron depresiones de la señal analítica debido a la matriz para todos los analitos, con valores relativos de -150%, -90%, -55%, -51%, -28% y -6% para harmalina, harmalol, harmina, harmol, harmano y norharmano, respectivamente. Con respecto a las repetitividades y reproducibilidades en las áreas de pico y los tiempos de migración, las %RSD obtenidos para las áreas de pico en un día (repetibilidad intra-día) variaron en un intervalo de entre 6.7 % y 12 %, mientras que la repetitividad inter-día como medida de la reproducibilidad varió entre 8.1 % y 12 % en término de áreas de pico. Para el caso de los tiempos de migración, la %RSD intra-día varió entre 0.8 % y 1.2 %, mientras que inter-día se obtienen valores entre 2.5 % y 3.4 % (ver Tabla 4.1). Si bien, tal como lo mencionamos anteriormente, existe un efecto de matriz, este no interfirió en la reproducibilidad de las medidas lo cual se puede constatar comparando los valores mencionados con los obtenidos para las rectas de calibrado externas con estándares (ver Tabla 4.1).

La cuantificación de los seis harmanos en las muestras de *Undaria pinnatifida* de tres productores distintos, dos de la zona de Galicia (España) (1-2) y uno de la zona de Bretaña (Francia) (3), fue

realizada con la recta de calibración por adición estándar, teniendo en cuenta los efectos de matriz. Como resultado se pudieron detectar y cuantificar tres de los seis alcaloides en las muestras de algas, estos son el harmalol, la harmalina y la harmina. Solamente el harmalol fue encontrado en niveles similares en las tres muestras de los distintos productores (c_{promedio} (s.d.): 24 (2), 24 (1) and 22 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alga seca). En cambio, la harmalina (17 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ alga seca) y la harmina (7 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ alga seca), sólo fueron detectadas en las distintas muestras de la costa de Galicia. Las concentraciones determinadas coinciden con la imposibilidad de detectar los harmanos por medio de CE-UV, al encontrarse por debajo de los LODs de esta técnica.

Los resultados señalan diferencias entre los contenidos de estos alcaloides en las muestras. Además, es conocido que harmol y harmalol son los metabolitos principales de la harmina, harmalina y harmano [188,199,200]. De todas formas, las concentraciones de harmalol, harmalina y harmina encontrada en wakame distan enormemente de aquellas encontradas en las semillas de *Peganum harmala* (ruda de Siria) (0.6 harmalol % m/m, 0.003 harmol % m/m, 5.6 % m/m harmalina y 4.3% m/m harmina) [185] o en el te de Ayahuasca (0.06 mg/mL para harmalina y 0.90 mg/mL para harmina) [188]. Debido a esto, y sumado a que los fabricantes recomiendan una ingesta diaria máxima de algas de alrededor de 1-2 g (debido a otros componentes bioactivos o contaminantes como ioduro, metales pesados, arsénico, etc.), el contenido de estos alcaloides en wakame resulta inofensivo para adultos.

Estas concentraciones encontradas en algas son menores que las medioambientales y las relacionadas con la exposición ocasionada por consumir cigarrillos o tomar café pero, por otro lado, las mismas son mayores a las generadas por exceso de cocción de carnes y otros alimentos. Concretamente, se puede encontrar valores de hasta 9.34 y 1.41 $\mu\text{g}/\text{g}$ para harmano y norharmano, en plantas y café instantáneo, respectivamente, o hasta 9 y 3 $\mu\text{g}/\text{g}$, para cigarrillos también para harmano y norharmano [191,195]. En extracto de carnes, las concentraciones solamente alcanzaron valores de unos pocos cientos de ng/g [191]. Sin embargo, hasta el momento no se han definido niveles seguros de exposición para estos alcaloides pero la ingesta máxima diaria de harmano y norharmano ha sido estimada en 4 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masa corporal, respectivamente [194].

4.3. Conclusiones parciales

- Se ha compatibilizado la metodología optimizada para CE-UV con la detección por MS, empleando el uso de BGE volátiles y optimizando todas las condiciones de separación y detección con el fin de obtener la mejor separación sensibilidad y reproducibilidad.
- Se han analizado tanto los espectros de MS, como los espectros de MS-MS en soluciones estándar de alcaloides para estudiar sus fragmentaciones características y de esta forma realizar una identificación en muestras reales mucho más confiable.
- El método de CE-MS optimizado fue validado obteniendo las cifras analíticas de mérito más importantes, además, se compararon las pendientes de la recta de calibración externa con las pendientes de la recta realizada por el método de adición de estándar evidenciando la presencia de efectos de matriz para todos los compuestos a determinar.
- Se optimizó el pretratamiento de muestra para la extracción de estos alcaloides en el alga *Undaria pinnatifida*. Se evaluaron las recuperaciones individualmente en todos los pasos y en el proceso completo, alcanzando recuperaciones mayores al 95% en todos los casos bajo las condiciones óptimas.
- Se detectaron, identificaron y cuantificaron el harmalol, (c_{promedio} (s.d.): 24 (2), 24 (1) y 22 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alga seca), la harmalina (17 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ alga seca) y la harmina (7 (1) $\mu\text{g}/\text{kg}$ alga seca) en muestras de tres productores distintos de *Undaria pinnatifida*. Las concentraciones determinadas coinciden con la imposibilidad de detectar los harmanos por medio de CE-UV en las algas, ya que se encuentran a por debajo de los LODs del método establecido anteriormente en este trabajo de tesis.

5. SPE-CE PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE PÉPTIDOS Y β -CARBOLINAS

Dentro de lo comprendido en este capítulo, se estudiará la SPE-CE tanto para la preconcentración de péptidos opiáceos como para alcaloides β -carbolínicos. En el caso de los péptidos, se evaluará y optimizará la preconcentración en línea utilizando detección UV (SPE-CE-UV), la cual se aplicará a muestras de plasma humano. Para el caso de los alcaloides β -carbolínicos, se hará lo mismo tanto para detectores UV como de MS (SPE-CE-UV y SPE-CE-MS). Una vez obtenidas las condiciones óptimas en patrones, el método se validará para finalmente aplicarlo a muestras de *Undaria pinnatifida*.

5.1. Procedimientos

Todos los experimentos de CE-UV y CE-MS se llevan a cabo mediante un instrumento de CE Agilent HP^{3D}CE y un espectrómetro de masa Agilent 6220 oaTOF.

5.1.1. Separación de péptidos por CE-UV

Para la separación de los péptidos opiáceos se utiliza un capilar de sílice fundida de 58.5 cm de L_t , 50 cm de L_d , 75 μm id y 365 μm od. Los capilares se activaron por primera vez mediante lavados sucesivos a 930 mbar con NaOH 1M (20 min) y BGE (30 min). El BGE optimizado en trabajos previos del grupo de investigación estaba formado por una mezcla de ácido acético 50mM y ácido fórmico 50mM ajustado a un pH de 3.5 con amoníaco [58]. Entre análisis el capilar se lavaba a 930 mbar con NaOH 0.1M (2 min), agua (4 min) y BGE (4 min). La inyección fue realizada de forma hidrodinámica a 30 mbar por 5 segundos. La separación se llevó a cabo mediante la aplicación de 25 kV (polaridad normal) y la longitud de onda de detección fue de 214 nm. Además, debido a que estos compuestos fueron analizados a elevadas temperaturas, se les realizaron pruebas de estabilidad térmica analizando, mediante CE-UV, muestras patrón de los mismos a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes y después de someterlos a una temperatura de 95°C durante 1 hora.

5.1.2. Pretratamiento de plasma humano para el análisis de péptidos

Se descongelaron diferentes alícuotas de plasma a temperatura ambiente. El plasma descongelado,

fue pretratado para eliminar las sales y los compuestos de elevado peso molecular (ej. proteínas) antes de ser analizados por CE-UV o SPE-CE-UV. Este pretratamiento consiste en una precipitación con acetonitrilo seguida de una filtración por centrifugación. En el paso de precipitación con acetonitrilo, las condiciones óptimas fueron establecidas en trabajos previos de nuestro grupo de investigación [226]. Las cuales constaron de una adición de 1200 μL de acetonitrilo frío a 200 μL de muestra de plasma. La mezcla fue homogeneizada en un *vortex* por 30 s y luego se dejó reposar por 1h a una temperatura de -20°C . Luego de retirarla, se sometió a una centrifugación a 3000 rpm por 8 min. El sólido remanente se lavó con 100 μL de acetonitrilo y se recogió el sobrenadante, seguido de una nueva centrifugación, pero esta vez, a 4000 rpm por 8 min. El sobrenadante se agregó al anterior. Finalmente, la punta de la micropipeta se enjuagó con 100 μL de acetonitrilo y este volumen se combinó con los anteriores con el fin de perder la menor cantidad posible de péptidos. Posteriormente, la solución se evaporó hasta sequedad a temperatura ambiente bajo corriente de aire, y el residuo sólido se reconstituyó con un volumen de 100 μL de agua. Esta solución se sometió a una filtración por centrifugación a temperatura ambiente utilizando filtros de corte por peso molecular de 3 kDa a una velocidad de 12000 rpm por 10 minutos. Para ello, anteriormente, los filtros debieron ser lavados con agua Milli-Q por 15 min cuyo filtrado fue descartado. A continuación la muestra se centrifugó como se mencionó anteriormente, se recolectó el filtrado y se lavó tres veces el residuo con 50 μL de agua por 10 min a 12000 rpm. De nuevo, todos los filtrados se combinaron en una solución única y se ajustó con agua a un volumen final de 200 μL . Las recuperaciones de cada péptido fueron estimadas por comparación entre las áreas de los picos obtenidos por CE-UV para el análisis de muestras de plasma fortificado a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes y después de todo el pretratamiento.

Los filtros de corte por peso molecular fueron pasivados previamente con PEG 5% v/v para obtener las mejores recuperaciones [226]. El procedimiento consistió en agregar un volumen de 500 μL de la solución dentro del filtro, tapar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 24 h. Luego, se destapa y se enjuaga mediante sucesivos lavados con agua del grifo seguido por agua destilada. Se añade agua Milli Q y se centrifuga por 30 min a 12000 rpm. El resto de agua remanente dentro del filtro se elimina disponiendo los depósitos de forma invertida y centrifugando por 2 min a 2000 rpm.

5.1.3. Construcción de microcartuchos de extracción

El diseño del microcartucho de extracción acorde al tipo de detección (UV o MS) sólo difiere en que al primero debe hacerse una ventana para la detección a una longitud característica de la salida del

capilar mientras que para el segundo tipo la salida se conecta a la entrada del espectrómetro de masas. Para llevar a cabo la construcción se debe cortar un capilar de sílice fundida de unos 57.5 cm de L_T , 75 μm de id y 360 μm de od. Previamente el capilar se activa utilizando la misma secuencia de lavados anteriormente mencionados en el capítulo anterior. Una vez realizado este proceso, el capilar se corta en dos partes, una de 7.5 cm y otra de 48 cm. Entre ellas se inserta el microcartucho. Vale la pena resaltar que todo el proceso de fabricación se monitoriza bajo una lupa binocular (100x).

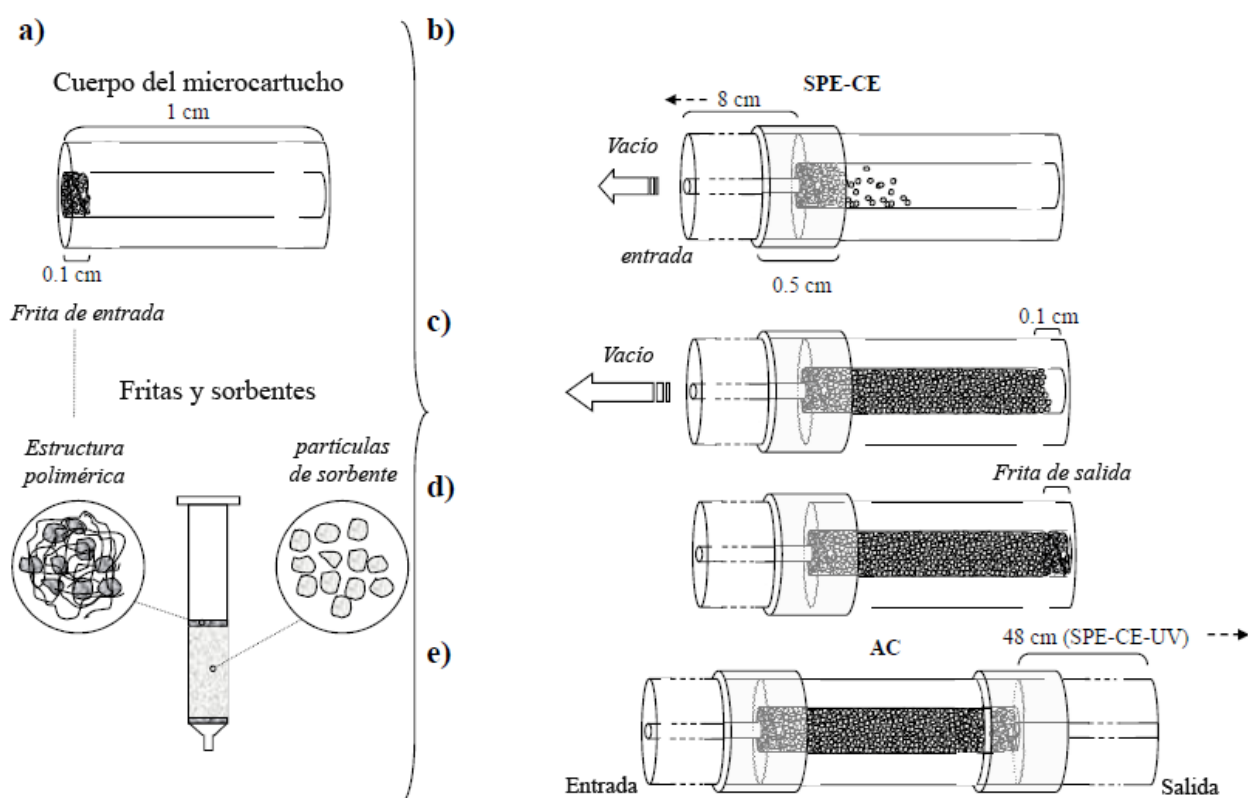


Fig. 5.1. Esquema de la construcción de un microcartucho preconcentrador de SPE-CE-UV (o SPE-CE-MS). a) cuerpo del microcartucho y frita del cartucho original de SPE, b) y c) empalme del microcartucho y llenado mediante la aplicación de vacío, d) colocación de la frita de salida y finalmente, e) empalme del microcartucho con el capilar de separación [46].

En la primer parte de la preparación (fig 5.1-a), se debe cortar una pequeña pieza de capilar (7mm x 250 μm id x 360 m od) en el cual debe insertarse una frita polimérica de aproximadamente 0.1 cm de largo, las mismas se obtienen de un cartucho original de SPE. En esta tesis doctoral se emplearon cartuchos Sep-Pak[®] C-18 (Waters) Una vez insertada, el cuerpo del microcartucho debe ser acoplado al capilar de 7.5 cm de largo mediante el uso de un tubo de Tygon[®] de aproximadamente

unos 0.5 cm de largo (250 μm id x 610 mm od).

Una vez realizada la conexión, se puede rellenar el microcartucho con las partículas de sorbente obtenidas del cartucho de SPE original de forma fácil mediante la aplicación vacío en el extremo de entrada del capilar (fig. 5.1-b-c). Al momento en el que la pieza se encuentra casi completamente llena se detiene la aplicación de vacío y se le coloca una segunda frita de polietileno en la salida del mismo (0.1 cm) (fig. 5.1-c-d). A continuación se acopla el otro tramo de capilar de 48 cm utilizando nuevamente un tubo de Tygon® como conector (fig. 5.1-e). Esta parte del capilar es la parte en la cual ocurrirá la separación de los analitos retenidos. Como las juntas ajustan de manera muy precisa, no es necesario el uso de adhesivos, lo cual permite reemplazar el microcartucho una vez que este se haya deteriorado y reemplazarlo por uno nuevo sin desechar los dos extremos de capilar. Las conexiones entre capilar y microcartucho deben tener un corte limpio y homogéneo para no generar volúmenes muertos que provoquen pérdidas en la eficiencia de la separación y propicien fugas o cortes de corriente. La posición del microcartucho a 7.5 cm de la entrada del capilar de separación fue seleccionada con el fin de poder adaptarlo al cassette comercial, del instrumento HP^{3D}CE. Esta disposición puede ser apreciada en el la figura 5.2, donde se muestra el caso en el que la detección es por MS. Debido a que este equipo de CE tiene termostatación por convección forzada de aire, el microcartucho no debería sufrir ningún tipo fuga de corriente ni desgaste. Al contrario, en equipos que utilizan termostatación por convección forzada de líquidos, es recomendable agregar un recubrimiento a los microcartuchos para evitar este tipo de inconvenientes.

El capilar de SPE-CE se debe probar antes de insertarlo en el cassette haciendo fluir agua a través de él y verificando, de esta forma, si existe alguna restricción al flujo que pueda generar caídas de presión demasiado grandes o bien la imposibilidad de establecer una corriente eléctrica separación.

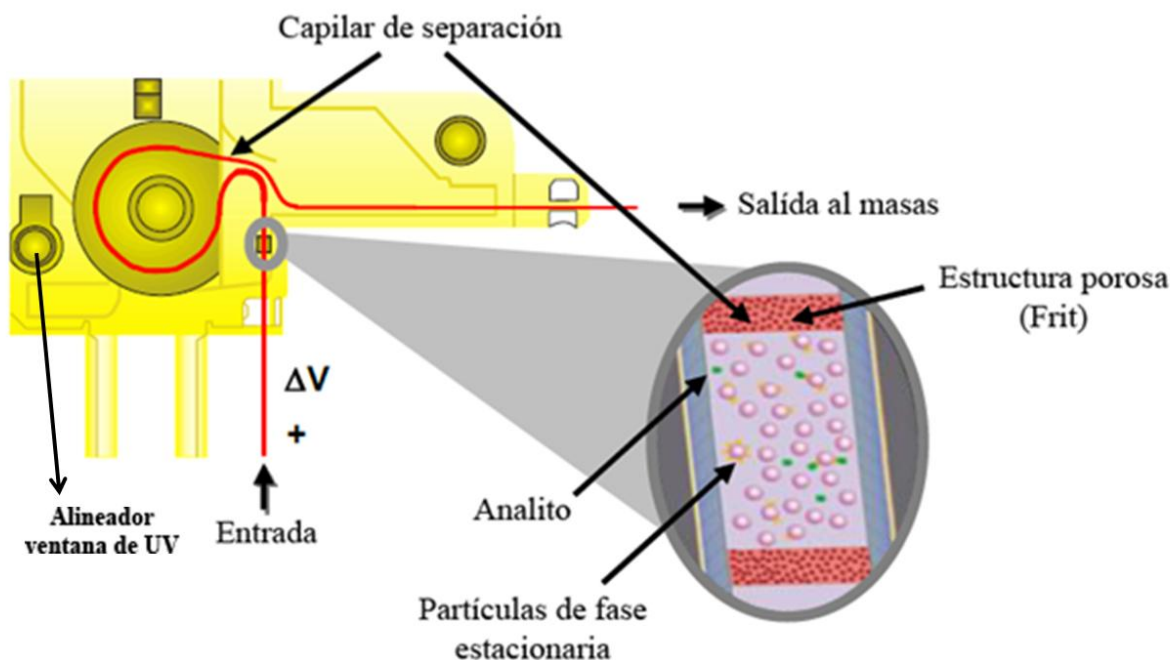


Fig. 5.2. Esquema que describe la disposición del capilar de SPE-CE-MS dentro del cassette comercial del instrumento HP^{3D}CE. Para SPE-CE-UV, la disposición es similar solo que al capilar se le debe crear una ventana de detección la cual debe pasar por el alineador metálico que pasa por la ventana de UV ubicada en la parte izquierda del cassette.

5.1.4. Metodología general de SPE-CE

Una vez construido el capilar de SPE-CE y colocado dentro del cassette del instrumento, los pasos a seguir para realizar con éxito el proceso de preconcentración y *clean-up* en línea, los cuales se realizarán automáticamente, van desde el acondicionamiento del sorbente hasta la separación y detección de los mismos (fig.5.3).

La primera etapa, tal como sucede con los cartuchos convencionales de SPE, consiste en el acondicionamiento y el equilibrado del sorbente. Esto se hace lavándolo con diversos solventes, cuya naturaleza dependerá fuertemente del sorbente. Así, pueden variar desde el diclorometano para el caso de carbon activado, al metanol para el caso de fases estacionarias de sílice recubiertas de compuestos hidrocarbonados (C₁₈, C₈, C₂).

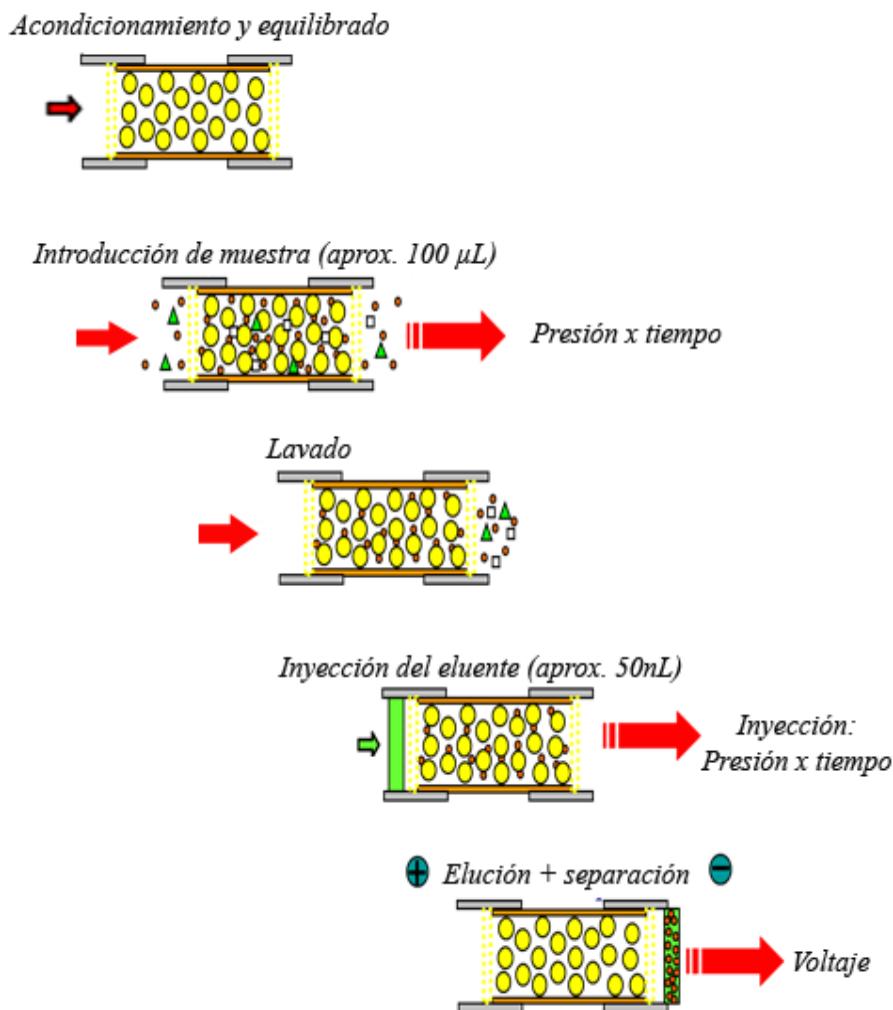


Fig. 5.3. Metodología general para la preconcentración, elución, separación y detección en línea de compuestos por SPE-CE.

Una vez acondicionado el preconcentrador, el paso siguiente es la introducción de muestra. Esta etapa se suele realizar hidrodinámicamente, aunque algunos autores prefieren la introducción electrocinética [240]. La introducción hidrodinámica suele dar mejores resultados a presiones elevadas (930 mbar) porque se favorece el acceso de la muestra a toda la superficie activa del sorbente, que suele ser porosa. La otra variable a optimizar es el tiempo, como veremos a lo largo de este capítulo. Normalmente los volúmenes de introducción rondan entre los 60 y 100 µL de muestra, lo que equivale a unos 10 minutos a 930 mbar en un capilar de las dimensiones empleadas en esta tesis.

Al finalizar la etapa de introducción de muestra, se debe realizar un lavado del microcartucho (*clean-*

up) para desorber impurezas y sustancias poco retenidas que luego interferirán en la separación y detección de los compuestos de interés. Esta etapa se suele realizar también a alta presión y puede ser optimizada variando los tiempos de lavado y la naturaleza de la solución de lavado, por ejemplo, lavando con mezclas de solventes de cada vez mayor fuerza eluotrópica. Esto debería permitir eliminar la mayor cantidad de interferentes sin desorber los deseados. A veces el compromiso entre ambos objetivos no es sencillo. Además, se ha de tener en cuenta que el último lavado de esta etapa se ha de hacer con el BGE para llenar el capilar antes de la elución y la separación. En esta instancia ya se debe optimizar la naturaleza, pH, fuerza iónica y los aditivos del BGE. A continuación se debe inyectar un pequeño volumen de eluyente, que constará de un solvente o mezcla de ellos, con una gran fuerza eluotrópica tal que sea suficiente como para desorber los analitos de interés. El tamaño de esta inyección debe ser estudiado, pero los valores normales se encuentran entre los 10 y 50 nL (aproximadamente 1000 veces menor a los volúmenes de muestra inyectados). Inmediatamente se aplica un voltaje de separación entre los extremos del capilar, el eluyente viaja a la velocidad del EOF y eluye el contenido del cartucho cuyos componentes comienzan a separarse a lo largo del capilar. En esta instancia se debe tener en cuenta de nuevo el BGE junto con el voltaje óptimo de separación y las condiciones de detección. Después de cada inyección se puede lavar con otros solventes para prevenir la contaminación cruzada (*carry-over*) entre análisis.

Metodología de SPE-CE-UV y SPE-CE-MS para alcaloides

Previo al armado del microcartucho y antes de cortarlo, el capilar fue activado en el instrumento de CE haciendo pasar NaOH 1M (15 min) y agua (15 min). Las dimensiones del capilar de SPE-CE-UV incluyendo el preconcentrador fueron de 57,5 cm L_T , 50,0 cm L_d y 75 μ m de id. Todos los lavados e introducción de muestra se realizaron a 930 mbar. El capilar de SPE-CE-UV fue acondicionado por sucesivos lavados con MeOH (2 min), H₂O (2 min) y BGE (4 min). Seguido a esto, se introdujo la muestra durante 10 minutos. La etapa del *clean-up* o lavado fue efectuada con BGE durante 1 minuto. Los analitos retenidos en el microcartucho fueron eluidos mediante la inyección hidrodinámica de una solución 60:40 v/v metanol/H₂O con 50mM de HAc y 50mM de HFor a una presión de 50 mbar por 30 segundos. La separación se realizó con polaridad normal a 20 kV con un BGE de acetato de amonio 10% metanol v/v pH 7.8, I= 20 mM, a una temperatura de 25 °C. Luego del análisis el sistema fue lavado con H₂O (2 min) y MeCN (2 min), con el fin de evitar que hubiera quedado retenido algún compuesto en el microcartucho y de esta forma evitar contaminación cruzada

en los subsiguientes análisis. En este caso en particular, no se requirió la regeneración del capilar de separación con NaOH 0.1M ya que en ningún momento se evidenció pérdida en la reproducibilidad tanto en las áreas como en los tiempos de migración observados. En caso de ser necesario, debería regenerarse el capilar desmontando el microcartucho para evitar que el sorbente de C18 entre en contacto con soluciones de pH extremo y pierda su capacidad retentiva.

Cuando el capilar SPE-CE-UV no estaba en uso, se almacenaron rellenos con MeCN. La detección se realizó a 200 y 254 nm simultáneamente para obtener información de los alcaloides (254 nm) y del marcador de EOF (200 nm), que en este caso era el metanol.

En el caso de SPE-CE-MS, el BGE usado fue de nuevo acetato de amonio pH 7.8, fuerza iónica de 20 mM, y 10% v/v de metanol. Las condiciones fueron idénticas a las empleadas en SPE-CE-UV. Respecto a las condiciones específicas relacionadas con la detección en línea por MS. En este caso concreto se empleó el espectrómetro de masa de TOF y fueron las siguientes: fragmentador 217 V, el *skimmer* 61.5 V, los octupolos 1 y 2 a 259 V y 25.3 V respectivamente. En lo que respecta a la interfase ESI, la temperatura y caudal del gas de secado fue 200°C y 4 L/min y la presión del gas nebulizador (N₂) fue de 5 psi. La adquisición de los datos se realizó en un intervalo de m/z entre 100 y 500, promediando siete espectros tomados con alta resolución.

Metodología de SPE-CE-UV para péptidos

Antes de su uso, el capilar fue previamente activado de manera externa. Las dimensiones del capilar de sílice incluyendo el preconcentrador fueron de 57,5 cm L_T, 50,0 cm L_d y 75 µm de id. Todos los lavados y la introducción de muestra se realizaron a 930 mbar. El capilar de SPE-CE-UV fue acondicionado por sucesivos lavados con MeOH (2 min), H₂O (2 min) y el BGE de separación (4 min). Seguido a esto, se introdujo la muestra durante 10 minutos. La etapa del *clean-up* o lavado fue efectuada con BGE durante 2 minutos. Los analitos retenidos en el microcartucho fueron eluidos mediante la inyección hidrodinámica de una solución de metanol/H₂O 60:40 v/v con 50mM de HAc y 50mM de HFor a una presión de 50 mbar por 40 segundos. La separación se realizó a 25 kV, aplicando una presión de 15 mbar para disminuir los tiempos de análisis, y a una temperatura de 25 °C. Luego del análisis el sistema fue lavado con H₂O (2 min) y MeCN (2 min). De nuevo no se requirió la regeneración del capilar de separación con NaOH 0.1M.

Cuando no estaban en uso, los mismos fueron almacenados rellenos con MeCN. La detección se realizó a 200 y 214 nm simultáneamente para obtener información de los péptidos (214 nm) y del

metanol como marcador de EOF (200 nm).

Estos estudios de SPE-CE-UV utilizando C18 como fase estacionaria constituyeron el punto de partida para la investigación de la influencia de la temperatura, que se tratará en el capítulo 6 de esta tesis doctoral.

5.2. Resultados y Discusiones

5.2.1. Análisis de péptidos opiáceos por CE-UV y SPE-CE-UV

Las condiciones de separación del grupo de péptidos opiáceos estudiados fue previamente optimizada por nuestro grupo de investigación [241–243]. En la figura 5.4 se puede observar un electroferograma de la separación de los tres péptidos opiáceos por CE-UV empleando un BGE de ácido acético 50 mM y ácido fórmico 50 mM ajustado a pH 3.5 con amoníaco. Este BGE tiene la característica de ser volátil y por lo tanto compatible con CE-MS.

Debido a las bajas concentraciones a las que estos péptidos se encuentran, tanto en plasma como en líquido cerebroespinal, resulta imposible determinarlos por CE-UV o CE-MS debido a sus LODs limitados (Ej. 1µg/mL para estos péptidos opiáceos por CE-UV). Por tal motivo, como se propuso anteriormente, un-a de las estrategias posibles para mejorar estos LODs consiste en emplear SPE-CE. En base a los trabajos previos del grupo de investigación la fase estacionaria utilizada fue la de C18 [49,56,58,226].

En las condiciones óptimas, mencionadas en la sección experimental, se encontraron para soluciones estándar factores de preconcentración de alrededor de 1000 veces para los tres péptidos, mientras que para el caso de muestras de plasma los factores de preconcentración fueron de unas 100 veces. Los LODs resultaron peores en plasma respecto a los estándares dado a que los “sitios activos” de la fase estacionaria no selectiva (si es que cabe esta consideración) pueden ser ocupados no solo por los analitos sino también por el resto de los componentes del plasma, dejando un menor número de sitios libres disponibles para los analitos que nos interesa retener.

En la figura 5.5.a se puede observar el análisis por SPE-CE-UV de una solución estándar de los tres péptidos a una concentración 100 veces menor al de los LOD obtenido en análisis CE-UV directo. Los tres péptidos son perfectamente detectables, aunque la separación y los tiempos de análisis son ligeramente diferentes respecto a CE-UV (fig. 5.4-a). Esto es debido al proceso de preconcentración en línea y a la aplicación de 15 mbar durante la separación.

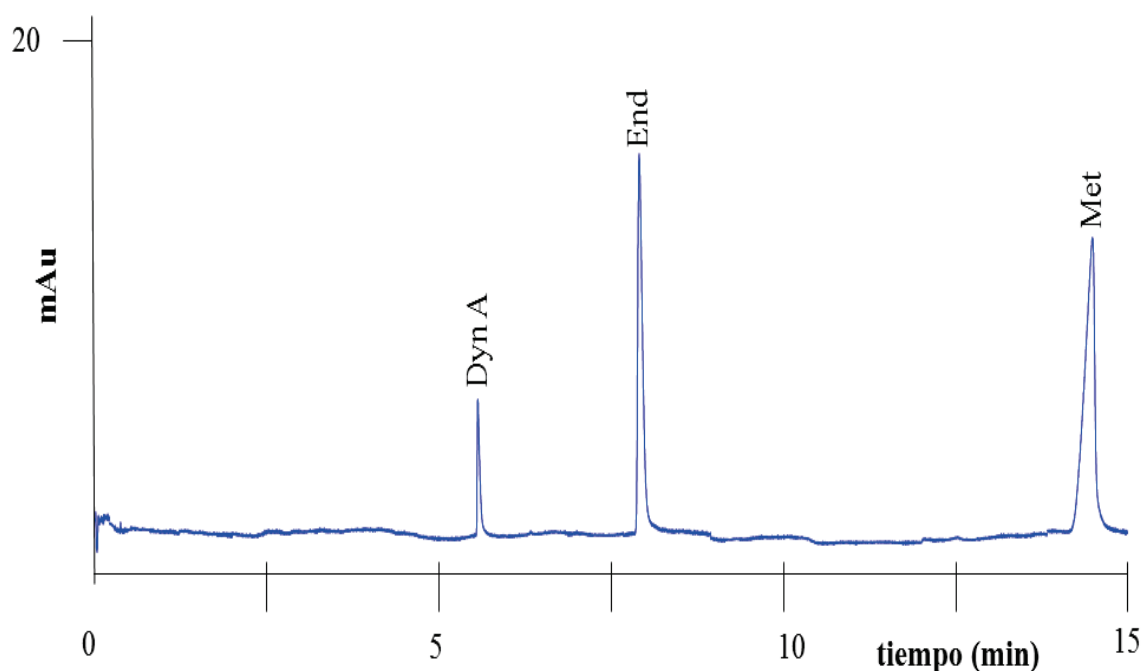


Fig. 5.4. Electroferograma CE-UV de dinorfina A (Dyn A), endomorfin (End) y met-enkefalina (Met) a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$. Voltaje de separación 25 kV, longitud de onda de detección a 214 nm. BGE: ácido acético 50 mM y ácido fórmico 50 mM pH= 3.5 ajustado con amoníaco.

Se puede observar por comparación directa entre los electroferogramas 5.5 a y b que además de las diferencias en los LODs más pobres (las concentraciones de los péptidos en la muestra de plasma fortificada son 10 veces mayores), se encuentran diferencias en la relación de las intensidades de los diferentes péptidos. Esto es debido a que los factores de recuperación del pretratamiento de la muestra (precipitación con acetonitrilo seguido de filtración por centrifugación) son diferentes para cada uno de ellos. Los resultados obtenidos están en concordancia con trabajos previos del grupo de investigación donde se realiza un estudio más profundo de éste pretratamiento de muestra. En el caso de la Dyn A, el pico electroforético en el plasma es mucho menor debido a que el factor de recuperación en este caso es menor, tomando un valor de alrededor del 26% [226].

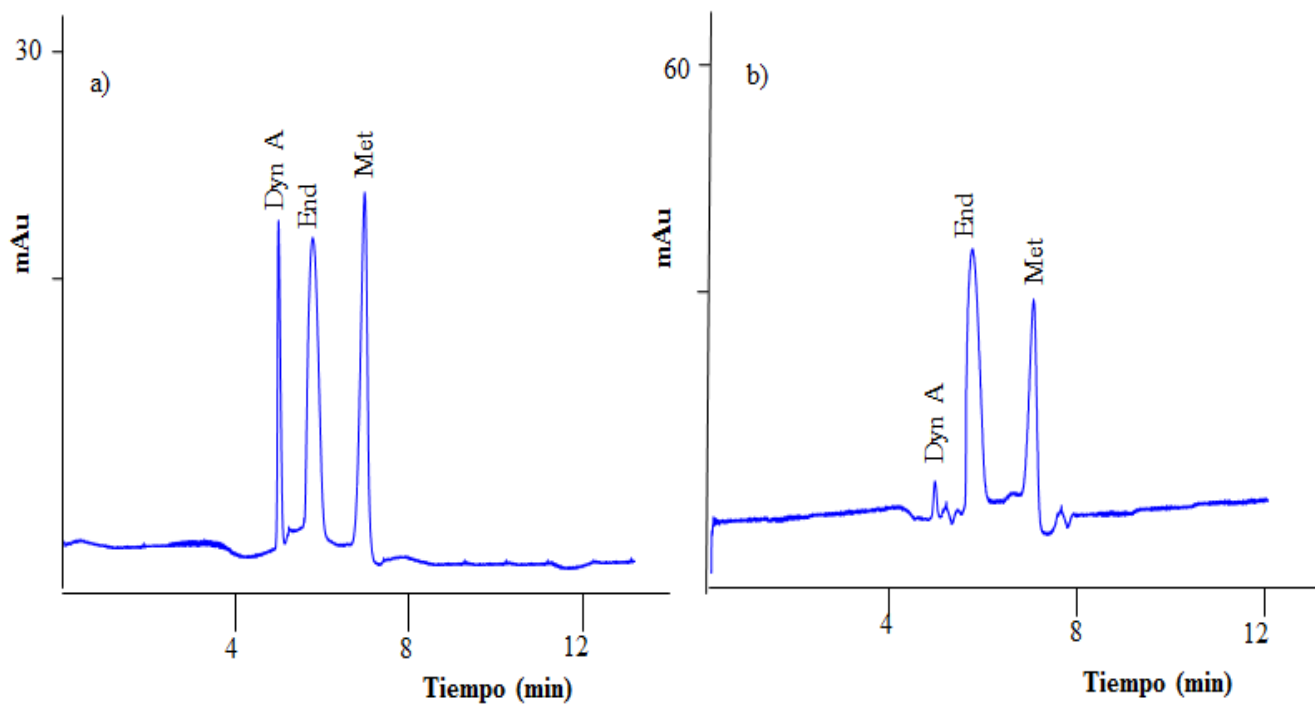


Fig. 5.5. Electroferogramas obtenidos mediante SPE-CE-UV de a) mezcla estándar de Dyn A, End y Met a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ y b) muestra de plasma fortificada antes del pretratamiento de muestra con Dyn A, End y Met a una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Voltaje de separación +25kV + 15mbar y longitud de onda de detección 214 nm. BGE: ácido acético 50 mM y ácido fórmico 50 mM pH 3.5 ajustado con amoníaco.

5.2.2. SPE-CE para la preconcentración de β -carbolinas

Dado que por CE-UV los LODs no son suficientemente bajos como para determinar estos alcaloides a las concentraciones a las que se encuentran en la *Undaria pinnatifida* (Ver tabla 3.3) y, a su vez, para tratar de detectar la presencia de alguno de los que no podían detectarse por CE-MS (Ver Tabla 4.1), se requiere utilizar una estrategia para mejorar la sensibilidad. En esta tesis doctoral se decidió evaluar la preconcentración mediante SPE-CE debido a sus excelentes prestaciones. Además, hasta el día de la fecha, no se han publicado trabajos similares sobre el análisis por SPE-CE de estos alcaloides en este tipo de muestras.

5.2.2.1. Optimización de la preconcentración en SPE-CE-UV

En la etapa de optimización se realizaron numerosos ensayos para obtener las mejores condiciones para la preconcentración. Para ello, empleando una mezcla de tres alcaloides, se optimizaron variables tales como la cantidad de muestra introducida en el microcartucho, la naturaleza del electrólito en el BGE, el tiempo de lavado y composición de la disolución en la etapa de lavado, y el volumen y composición del eluyente. El sorbente seleccionado, debido a la gran afinidad que posee hacia compuestos aromáticos de baja polaridad como los alcaloides y las buenas recuperaciones que proporcionan, fue un C18 [23,115].

Los BGE que se evaluaron en primera instancia, fueron aquellos que mejores resultados dieron en la optimización de la separación por CE-UV (sección 3.2.1). Los BGE fueron: buffer fosfato de amonio 10 mM pH 7.8 en metanol 10% v/v, tris/HCl 50 mM pH 7.8 en metanol 20% v/v y acetato de amonio 25 mM pH 7.8 en metanol 10% v/v. En cuanto a eficiencia y áreas de pico a partir de mezclas patrón, los mejores resultados no se obtuvieron con el BGE que produce la mejor separación, sino que se lograron con el de acetato de amonio (Tabla 5.1).

	Tris/HCl		Acetato de amonio		Fosfato de amonio	
	Area	N	Area	N	Area	N
harmalina	3.8 (±0.1)	153000 (±1000)	22.7 (±0.8)	54500 (±500)	9.8 (±0.2)	3740(±80)
harmina	82 (±2)	7500 (±100)	85 (±1)	55700 (±400)	34 (±2)	4700(±100)
norharmano	96 (±2)	6200 (±200)	106 (±3)	27400 (±100)	52 (±5)	15100(±200)

Tabla 5.1. Áreas y platos teóricos luego de preconcentrar mediante SPE-CE-UV utilizando distintos BGE. $N=5.54*(t/w_{1/2})^2$. Todos los valores se encuentran por triplicados (±s.d.).

En la figura 5.6 se pueden observar los tres análisis con distintos BGE, en los que se encuentra el tris/HCl (i) donde las áreas de los analitos son aceptables para harmina y norharmano pero con muy bajas eficiencias de pico (N). Contrariamente, en el caso de la harmalina, sus áreas son muy bajas pero la eficiencia de los picos son grandes. En el caso del acetato de amonio (ii), vemos que tanto las áreas como las eficiencias de los picos son excelentes para los tres compuestos analizados. Se obtienen, además, buenas separaciones y líneas de base, así como pocas interferencias que también están presentes en el blanco. Se puede observar en la tabla 5.2 que con el BGE de acetato de amonio, se obtiene una buena repetitividad y reproducibilidad tanto en tiempos de migración como en áreas

de pico para todos los alcaloides. Sin embargo, para obtener estos buenos resultados con este BGE, se deben tener ciertas precauciones, debido a su limitada capacidad amortiguadora a estos valores de pH. El BGE debe renovarse después de cada análisis para evitar cambios en el pH de separación.

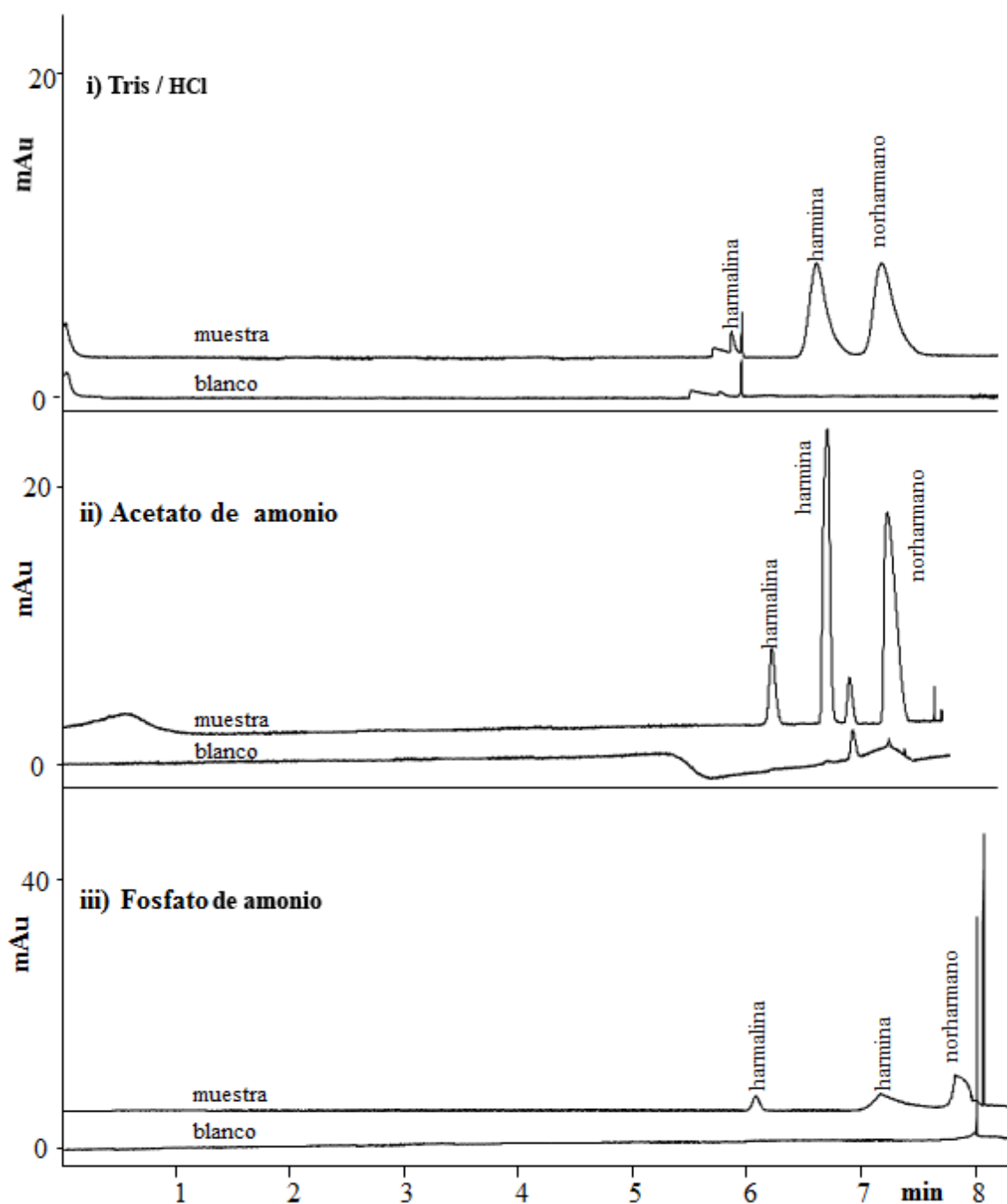


Figura 5.6. SPE-CE-UV utilizando distintos BGE: i) tris/HCl 50 mM pH 7.8 en metanol 20% v/v , ii) acetato de amonio 25 mM pH 7.8 en metanol 10% v/v y, iii) fosfato de amonio 10 mM pH 7.8 en metanol 10% v/v. Concentración de harmalina, harmina y norharmano 0.01 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno. Introducción de muestra 10 min a 930 mbar. Lavado BGE (2 min). Elución 60:40 v/v metanol/agua con ácido fórmico 50 mM y ácido acético 50 mM 50 mbar x 40 segs. Voltaje +20 kV y detección realizada a 254 nm.

	Repetitividad RSD%(n=10)		Reproducibilidad RSD%(n=10,3 días)	
	tm	Area	tm	Area
Harmalina	0.6	3.9	1.3	7.8
Harmalol	0.6	7.5	1.1	12.1
Harmina	0.7	4.3	1.5	8.9
Harmol	0.5	7.3	1.5	10.3
Harmano	1.1	3.0	1.8	8.5
Norharmano	0.7	9.5	1.3	15.3

Tabla 5.2. Valores de repetitividad y reproducibilidad expresados como %RSD para los tiempos de migración y para las áreas obtenidas para los seis alcaloides a una concentración de 0.01 µg/mL por SPE-CE-UV. Repetitividad por 10 replicados y reproducibilidad por 10 replicados para tres microcartuchos distintos en tres días diferentes. BGE de acetato de amonio.

Para eliminar las impurezas poco retenidas después de la etapa de introducción de muestra, se evaluaron distintos tiempos de lavado (*clean-up*) entre 1 y 3 minutos con el BGE de acetato de amonio, que contenía una pequeña proporción de metanol (10% v/v). Se observó experimentalmente que empleando tiempos de lavado de hasta 2 minutos las áreas de pico para los distintos analitos se mantenían constantes, mientras que para tiempos superiores (3 y 5 min) se notaron reducciones, indicando la pérdida de analito del microcartucho y, por tanto, merma en la recuperación. Si bien esta etapa adicional de lavado con BGE hidroorgánico aumenta el tiempo total del análisis por SPE-CE, es muy útil a la hora de eliminar las impurezas poco retenidas de la matriz de la muestra lo que resulta imprescindible al momento de aplicar este procedimiento a muestras reales.

Respecto a la elución de los analitos, el eluyente aparte de tener una fuerza eluotrópica grande debido a la presencia en gran proporción de un solvente orgánico, también debería tener un pH ácido con el fin de, en el momento de la elución, protonar a los analitos y de esta forma generar fuerzas de repulsión adicionales con el sorbente apolar. Por lo tanto, en esta etapa se optimizó, primeramente, la composición del eluyente y se evaluó el uso de distintos ácidos y de distintas composiciones de metanol. El criterio es que la solución de eluyente tenga la fuerza mínima suficiente para extraer a los analitos en forma de una banda estrecha, manteniendo la eficiencia separativa, y dejando retenidos en el microcartucho la mayor parte de los componentes de la matriz que pueden interferir y que no fueron eliminados durante el lavado previo al requerir fuerzas eluotrópicas mayores. Por lo tanto, en esta instancia se prestó especial atención a los anchos y a la forma de los picos. A efectos de obtener

un eluyente que, a futuro, resultará compatible con detección por MS, estas pruebas se llevaron a cabo con soluciones de ácido fórmico 50mM y ácido acético 50mM. Y dado que el BGE de separación contenía metanol, se evaluó la mezcla de los ácidos antes mencionados con distintas proporciones de este solvente, concretamente, agregados de 50%, 60% y 70% v/v. De esta forma, se obtuvieron resultados similares para las tres composiciones de metanol, sobresaliendo levemente la condición que posee un 60% v/v de metanol.

En cuanto al volumen de solución eluyente, variando el producto “presión x tiempo” de inyección hidrodinámica y observando, el área total de pico para cada analito, las perturbaciones que produce la diferencia de solvente, de ácido y de composición de esta solución respecto del BGE, y la estabilidad de la corriente durante la separación posterior, se sacaron las pertinentes conclusiones. El objetivo de esta optimización es el de utilizar el menor volumen de eluyente que mantenga la capacidad de elución de los analitos en forma de pico estrecho sin extraer otros componentes de la matriz pero que, ahora, lo haga produciendo la mínima interferencia posible, tanto en la línea de base del electroferograma posterior como en la estabilidad de la corriente eléctrica de separación. En la figura 5.7 se puede observar la comparación entre tres volúmenes de eluyente distintos expresados como producto “presión x tiempo” de la inyección hidrodinámica para las áreas de pico de la harmalina, harmina y norharmano. Como se puede notar la recuperación de los tres compuestos aumenta significativamente con el aumento del volumen de eluyente, al pasar de 50 x 20 a 50 x 40, lo cual tiene sentido. Por otra parte se puede ver que para los volúmenes representados como 50x40 y 50x60 no se observa un crecimiento significativo. Esto nos llevó a seleccionar como mejor opción el volumen de inyección indicado como 50x40, ya que de esta forma se inyectaba la menor cantidad de solvente orgánico dentro del capilar y se evitaban futuros inconvenientes relacionados a la estabilidad de la línea de base y de la corriente. Este volumen de inyección equivale a 0.3 μ L en el capilar empleado para SPE-CE-UV.

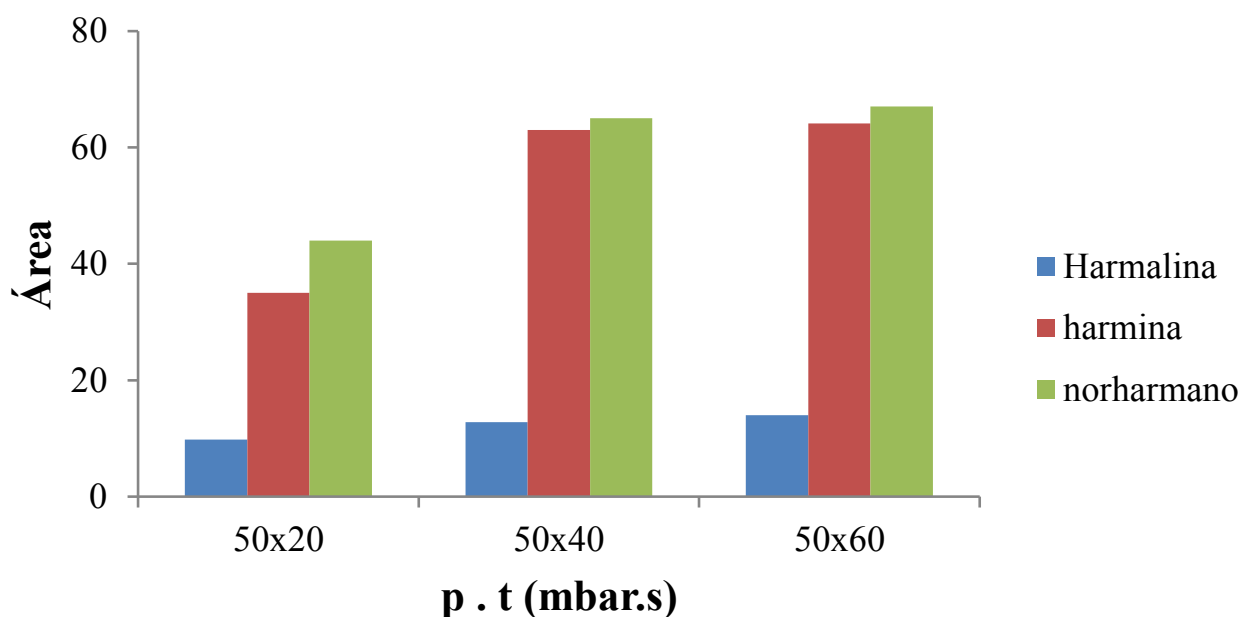


Figura 5.7. Volúmenes de eluyente expresados como el producto “presión x tiempo” (mbar*s) para un eluyente 60:40 metanol/agua 50 mM de ácido fórmico y 50mM de ácido acético en función del área de pico obtenida para harmalina, harmina y norharmano a una concentración de 0.01 µg/mL por SPE-CE-UV.

Otra de las variables que se estudió fue el tiempo de introducción de muestra. En la figura 5.8 se puede observar los gráficos de área vs. tiempo de introducción de muestra a 930 mbar para la preconcentración de una mezcla de harmalina, harmina y norharmano a tres niveles distintos de concentración (0.5, 1 y 10 ng/mL). Como puede observarse, las curvas de carga no son iguales para los distintos analitos. Así a una concentración de 10 ng/mL, para el caso de harmina y norharmano alcanzan un máximo a los 20 minutos de introducción de muestra, mientras que para el caso de la harmalina crece abruptamente hasta los 20 minutos y continua en crecimiento con una pendiente menor como si alcanzaran los niveles de saturación del microcartucho. Cuando se estudian los tiempos de introducción de muestra empleando soluciones con concentraciones menores de los alcaloides se puede observar el comportamiento normal y esperado: que cuanto menor es la concentración de los analitos en la muestra se necesita un tiempo superior (un volumen mayor de muestra) para que este fenómeno ocurra.

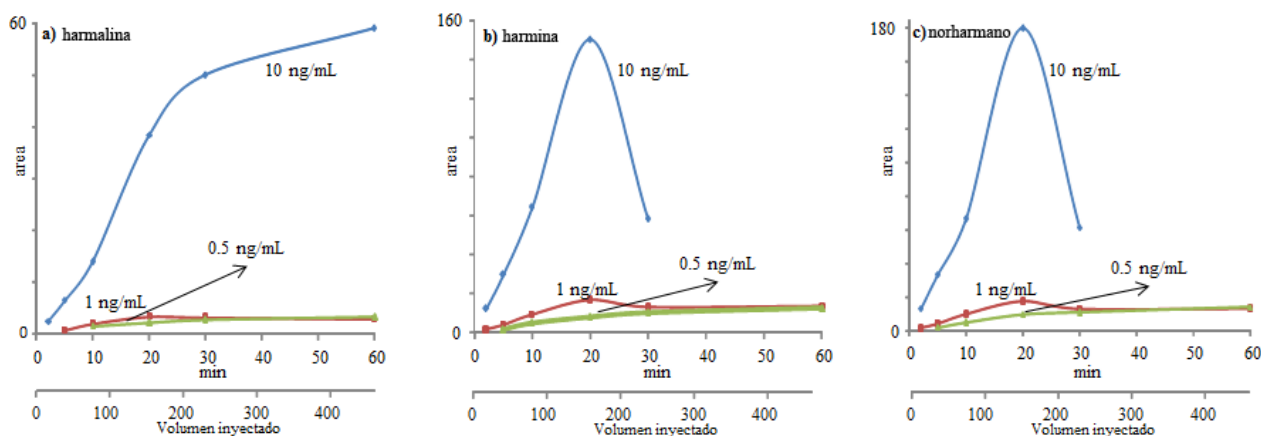


Figura 5.8. Gráficos de área de pico en función del tiempo de introducción hidrodinámica de muestra a 930 mbar para a) harmalina, b) harmina y c) norharmano a tres niveles distintos de concentración de cada uno. Volumen inyectado en μL .

Por otra parte, en la figura 5.9 se comparan las curvas de introducción de muestra de los tres alcaloides pero todos a la misma concentración de 1 ng/mL(i) y 0.5 ng/mL (ii).

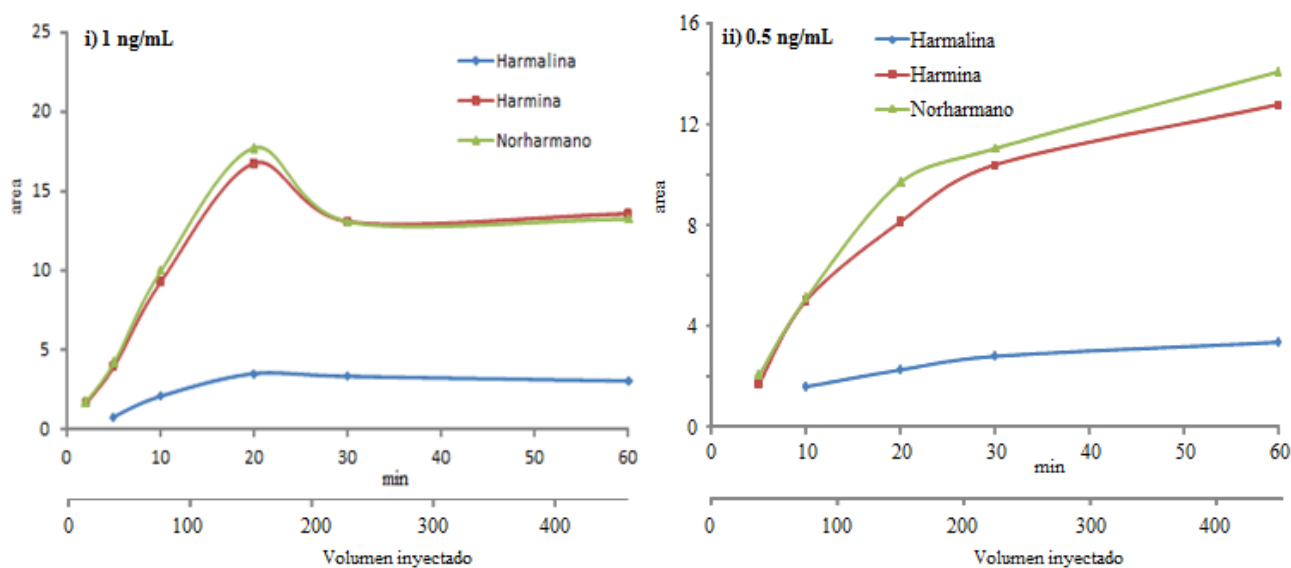


Figura 5.9. Gráficos de área de pico en función del tiempo de introducción de muestra en minutos a 930 mbar para una mezcla de harmalina, harmina y norharmano a una misma concentración de i) 1 ng/mL y, ii) 0.5 ng/mL. Volumen inyectado en μL .

A la concentración de 1 ng/mL (fig. 5.9-i) se puede observar claramente que si bien el factor de preconcentración máximo para los tres analitos ocurre a los 20 minutos de introducción de muestra, y que para tiempos de carga mayores estos factores se reducen hasta un 75% del valor máximo posible.

Esto es debido a que a partir de los 20 min de carga, se comienza a sobrepasar el volumen de ruptura, osea que se comienza a eluir parte del analito retenido. Esto conducirá directamente a un deterioro en los LODs. Sin embargo, como podemos observar en la figura 5.9-ii, las diferencias que se observan a una concentración de 0.5 ng/mL entre 20 y 30 minutos son poco significativas (alrededor de un 20%), lo que hace pensar que no se traducirán en diferencias tan significativas en los LODs. Por tal motivo el tiempo óptimo de introducción de muestra debería tener como límite superior 20 minutos, donde la curva de carga comienza a dejar de comportarse de forma prácticamente lineal. Por otra parte, si bien el tiempo de introducción de muestra estará relacionado también a los LOD alcanzables, valores demasiado grandes conllevarían a tiempos totales de análisis demasiado largos. Por lo tanto, para que el tiempo de análisis no sea demasiado extenso, la mejor situación de compromiso es introducir la muestra durante 10 minutos. De esta forma se obtendrán LODs muy buenos trabajando lejos de la zona en la que se pierde la linealidad, incluso trabajando a concentraciones relativamente altas, todas por debajo de los LODs obtenidos para CE-UV (Tabla 3.2).

Basado en estas condiciones optimizadas se procedió a inyectar la mezcla de los seis alcaloides. En la figura 5.10 se muestra: (a) un electroferograma de CE-UV de la mezcla estándar de los seis alcaloides a una concentración de 10 µg/mL y (b) el electroferograma obtenido por SPE-CE-UV de la mezcla estándar pero a una concentración 1000 veces menor, es decir 0.01 µg/mL. Como puede observarse, la etapa de preconcentración concentra alrededor de mil veces a los seis analitos utilizando un tiempo de introducción de muestra de 10 minutos respecto a CE-UV. Sin embargo se puede evidenciar la clara pérdida en la eficiencia y resolución de la separación debido a la inclusión del paso de preconcentración en línea. Los pares harmalina y harmalol, o harmano y norharmano, que en el análisis directo por CE-UV se encuentran perfectamente separados (fig. 5.10-a)), ahora, en el análisis por SPE-CE-UV (fig.5.10-b), prácticamente comigran. Esta disminución de la calidad de la separación es algo común en SPE-CE y de acuerdo a nuestra experiencia tiene difícil solución cuando ya se ha optimizado al pH del BGE y el eluyente para una resolución y preconcentración óptimas. El problema, en general se agrava, al analizar muestras reales complejas ya que los sorbentes basados en C18 son poco selectivos y suelen quedar retenidos, a pesar de los lavados posteriores, numerosos componentes de la matriz, de manera que interfieren en la separación. En consecuencia, conviene emplear un detector más selectivo que el UV para analizar estos alcaloides en muestras de *Undaria pinnatifida*. La utilización de la MS surge naturalmente como una posible alternativa la cual permitiría diferenciar cada uno de los compuestos de la mezcla, sumado a la posibilidad de reducir aún más los LODs de cada uno de los analitos. En este caso en particular se

utilizó un espectrómetro de masas con analizador de TOF.

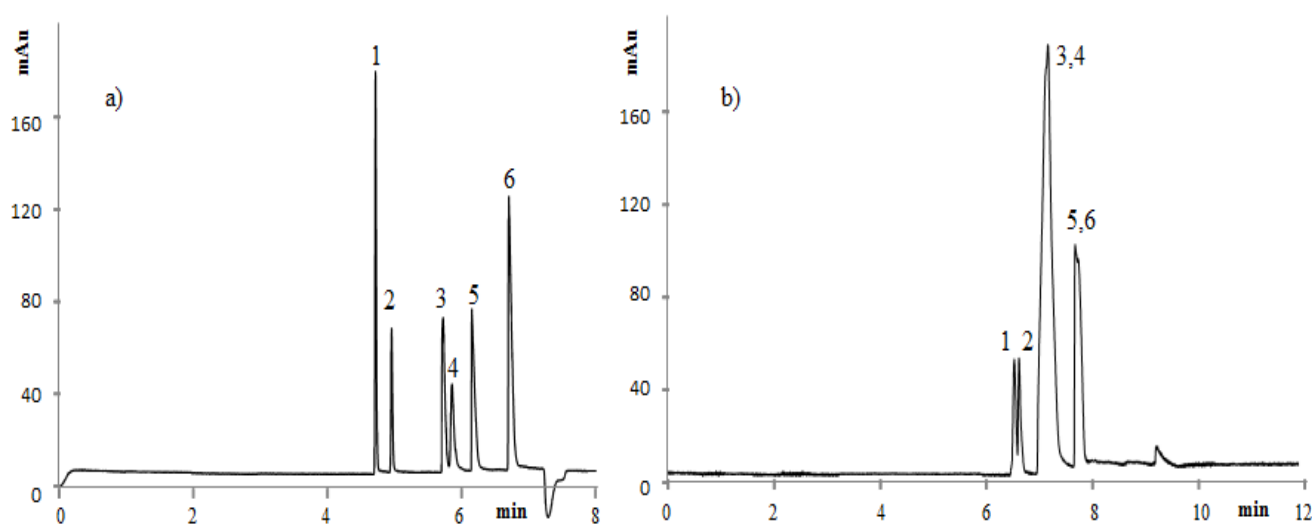


Figura 5.10. Separación de 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y, 6) norharmano por a) CE-UV a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno y por, b) SPE-CE-UV a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno. Introducción de muestra 10 min a 930 mbar, lavado 2 min a 930 mbar con BGE, eluyente de 60:40 % v/v metanol/agua (50mM ácido fórmico y ácido acético 50 mM), 50 mbar x 30 s. BGE acetato de amonio 20 mM pH 7.8 a 25 kV y 25°C. Detección a 254 nm. Post-acondicionamiento de 2 minutos de acetonitrilo seguido de 2 minutos de agua ambos a 930 mbar.

5.2.2.2. Validación en SPE-CE-TOF-MS

Debido a que el BGE optimizado por SPE-CE-UV (acetato de amonio 20 mM pH 7.8 10% v/v metanol) contenía elementos volátiles no fue necesario modificar su composición para compatibilizar las condiciones SPE-CE-TOF-MS. Únicamente se realizó una optimización de los parámetros del espectrómetro de masa TOF porque era diferente al utilizado anteriormente (IT)

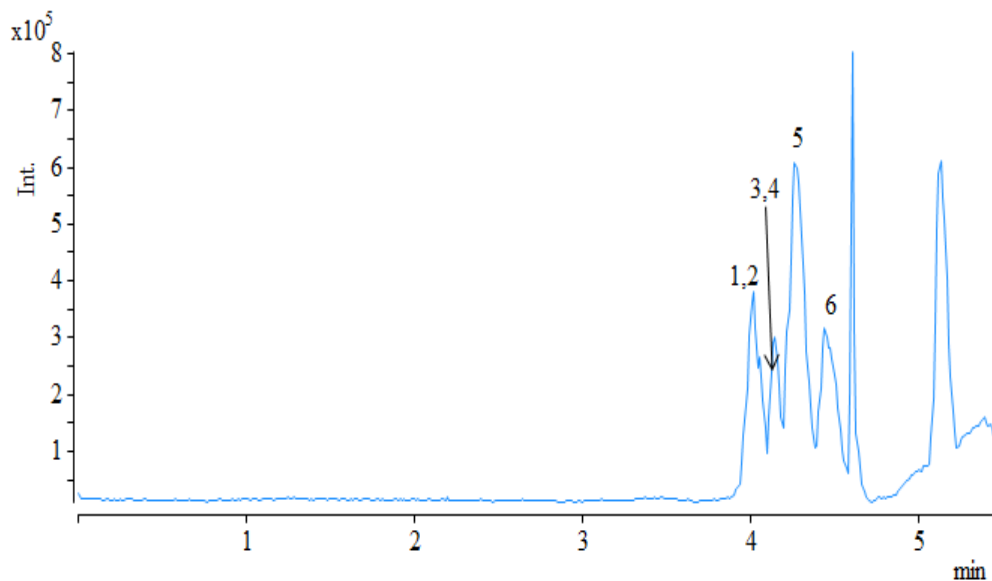


Figura 5.11. Electroferograma de iones totales (TIE) de SPE-CE-TOF-MS para una mezcla estándar de alcaloides a una concentración de 0.001 $\mu\text{g/mL}$. 1) harmalina, 2) harmalol, 3) harmina, 4) harmol, 5) harmano y, 6) norharmano. Introducción de muestra 10 min a 930 mbar, lavado 2 min a 930 mbar con BGE, eluyente de 60:40 % v/v metanol/agua (ácido fórmico 50mM y ácido acético 50 mM), 50 mbar x 30 s. BGE acetato de amonio 20 mM pH 7.8 10% v/v metnaol a 25 kV y 25°C. Post-acondicionamiento de 2 minutos de acetonitrilo seguido de 2 minutos de agua ambos a 930 mbar.

En la figura 5.11 se muestra un TIE por SPE-CE-TOF-MS de la mezcla estándar de 6 alcaloides a una concentración de 0.001 $\mu\text{g/mL}$. Si comparamos este electroferograma con el que se mostró previamente por SPE-CE-UV (fig. 5.10-b) se observan ligeras diferencias en la separación y los tiempos de análisis. Esto se debe a la presencia del gas nebulizador, que produce un flujo laminar hacia el detector y se suma a la implicancia de otras características propias del acoplamiento CE-TOF-MS. La falta de separación electroforética se soluciona obteniendo los electroferogramas de iones extraídos (EIE), donde se aprovecha la excelente selectividad de este tipo de detectores para separar dos compuestos que tienen masas moleculares diferentes pero muy similares. En la figura 5.12 podemos observar los EIE de los diferentes compuestos (fig.5.12).

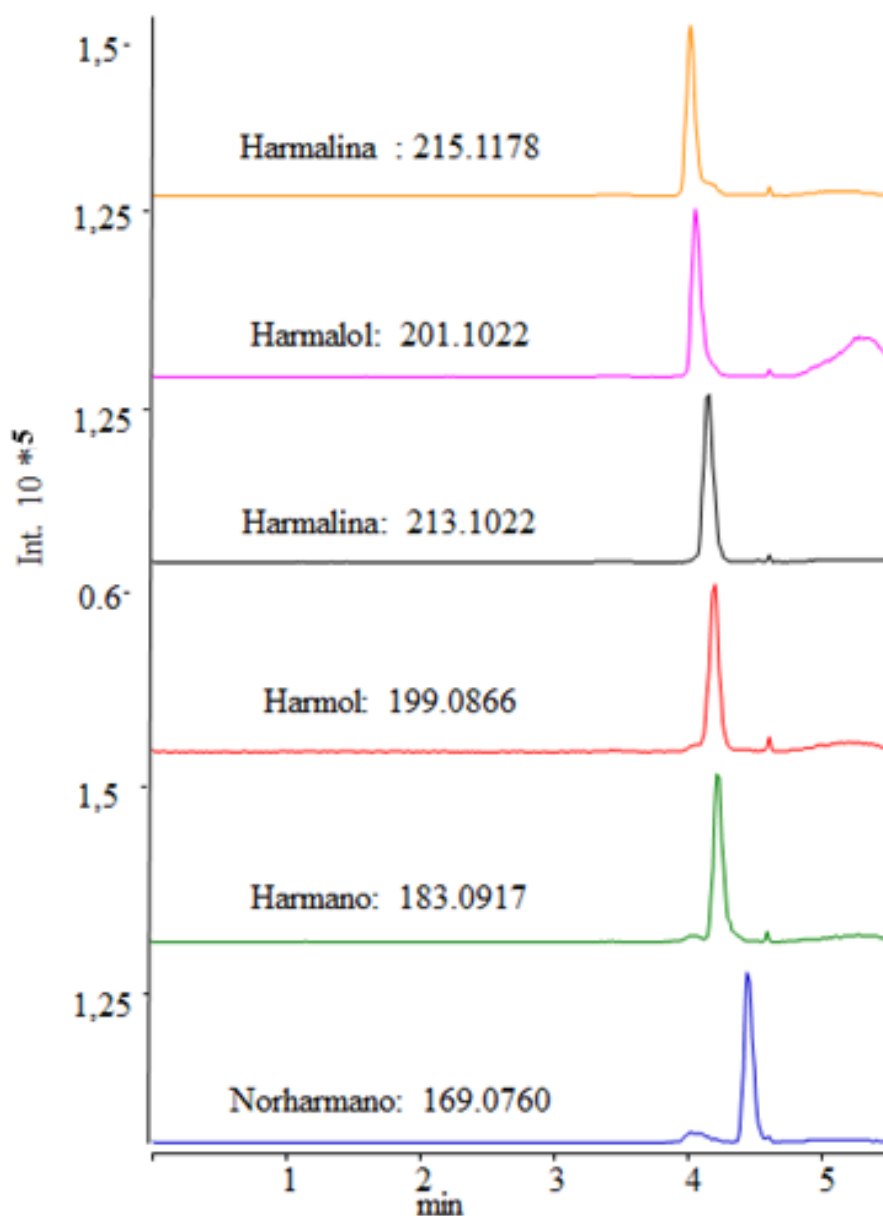


Figura 5.12. Electroferograma de iones extraídos (EIE) para los iones moleculares monocargados ($[M+H]^+$) de los diferentes alcaloides (M = masa molecular monoisotópica). Se tienen en cuenta para el cálculo sólo los isotopos más abundantes.

A partir de estos electroferogramas es fácil obtener los espectros de masa de alta resolución de cada uno de los analitos de interés para confirmar con un muy alto grado de fiabilidad la identidad de los mismos. En la figura 5.13 se puede observar claramente la diferencia en exactitud y resolución entre los espectros de masa del norharmano obtenidos utilizando espectrómetros de masa con analizador de trampa de iones, IT (5.13-i), y un TOF (5.13-ii). Vemos que la exactitud en las masas y la resolución

espectral aumentan drásticamente cuando utilizamos un TOF como analizador. De esta manera podemos obtener relaciones m/z con cuatro cifras significativas después de la coma (errores muy pequeños). Esto permite diferenciar fácilmente entre iones moleculares con relaciones m/z muy similares, obtener masas moleculares mucho más fiables, y observar más claramente la distribución isotópica típica de los iones monocargados, lo que resulta de gran utilidad al momento de confirmar que el ión considerado corresponde con el compuesto de interés.

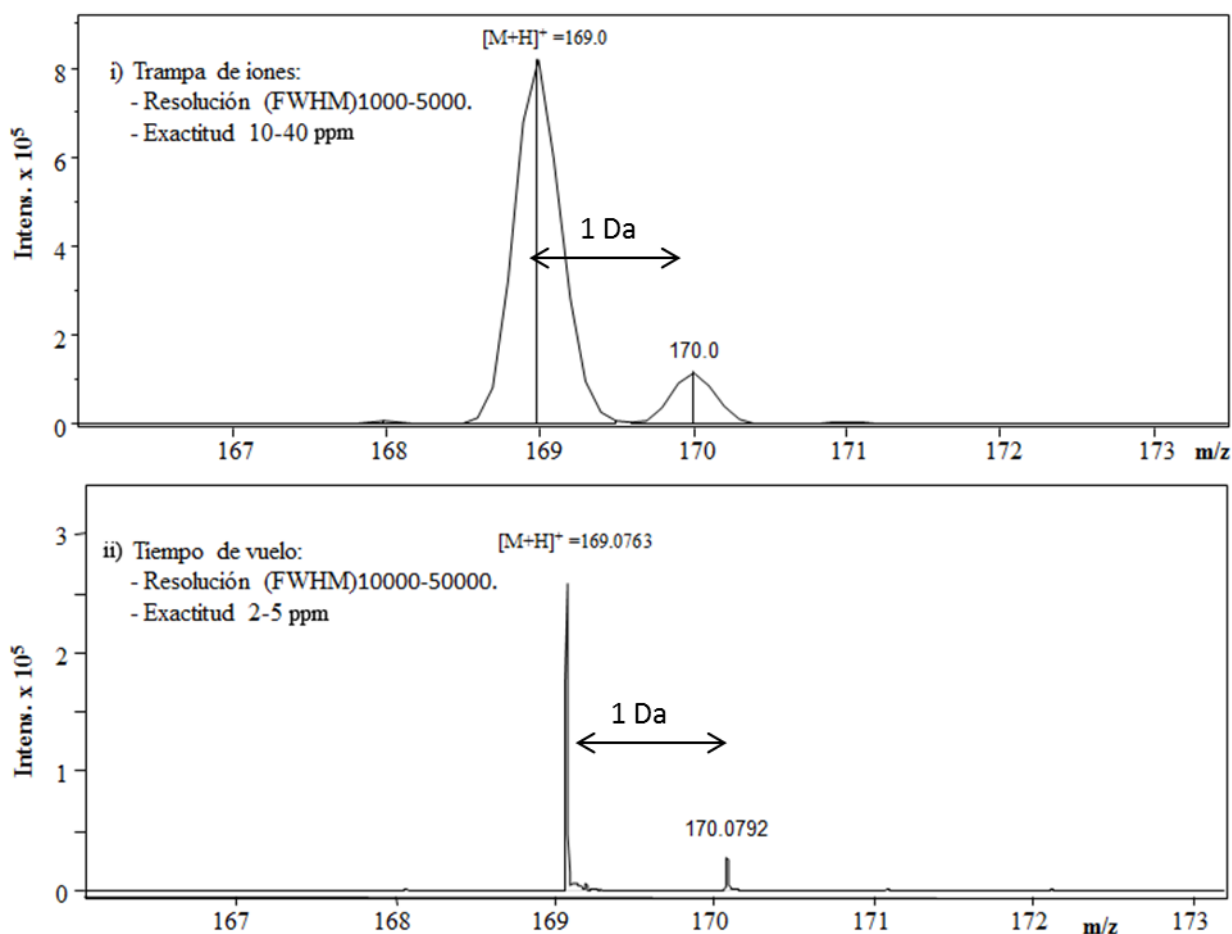


Figura 5.13. Espectros de masa del norharmano utilizando un analizador i) IT y ii) TOF. Resolución (FWHM:full-width-at-half-maximum). Exactitud (Error: $|M_{\text{teo}} - M_{\text{exp}}| / M_{\text{teo}} \times 10^6$).

Así, en la figura 5.14 se muestran los espectros de masa de los seis alcaloides obtenidos con el analizador TOF y los errores asociados a la medida de la m/z del ion molecular monocargado.

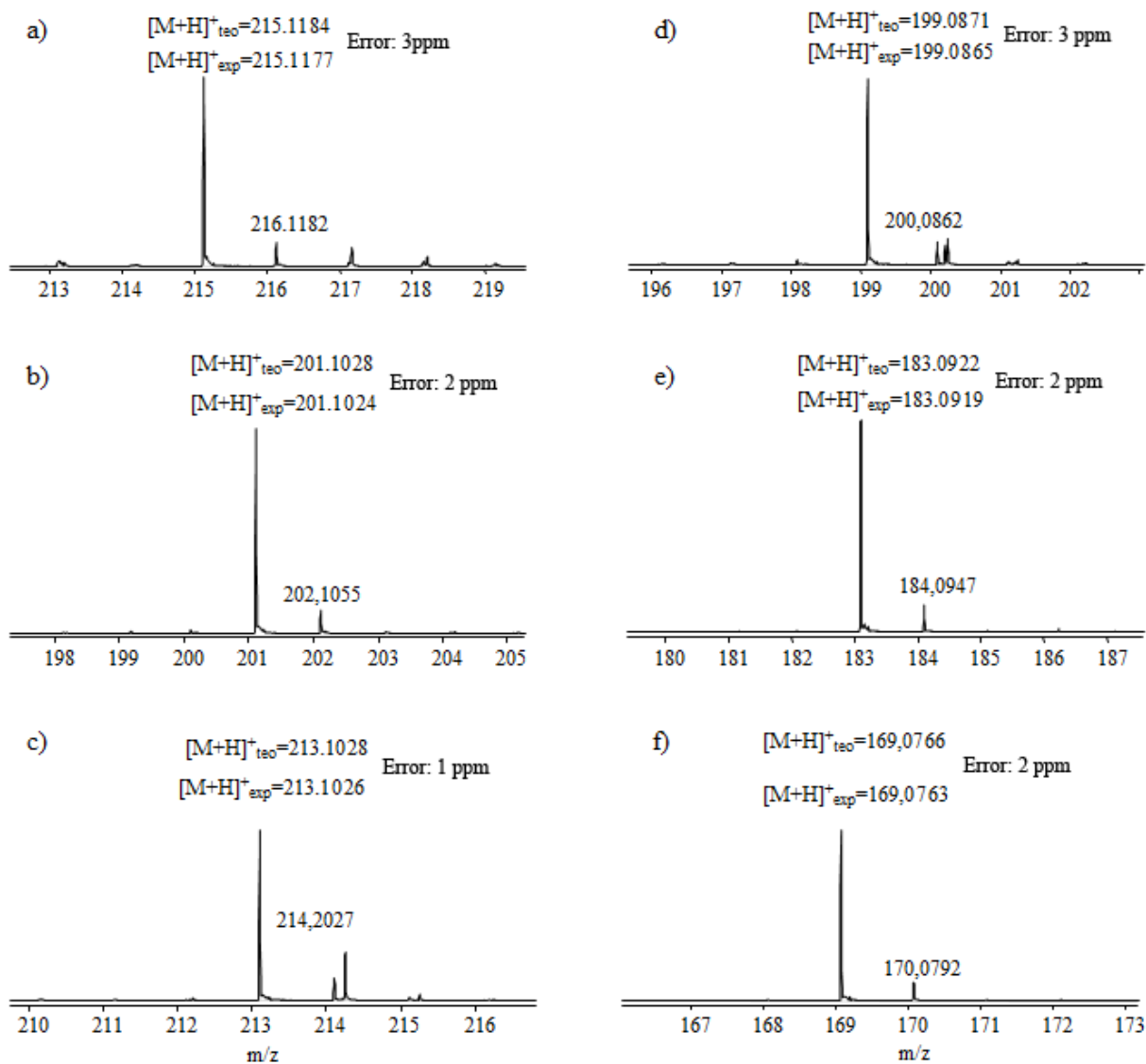


Figura 5.14. Espectros de masa de alta resolución de a) harmalina, b)harmalol, c) harmina, d) harmol, e) harmano y f) norharmano obtenidos con un espectrómetro de masas con analizador TOF. Relaciones m/z monoisotópicas. Exactitud expresada como error (en ppm).

A partir de estos valores de m/z es posible obtener valores de masa molecular monoisotópica con una alta exactitud (< 5 ppm) lo que permite la identificación fiable de los mismos.

Una vez transferido el método de SPE-CE-UV a SPE-CE-TOF-MS se procedió a la validación del método de SPE-CE-TOF-MS. Para ello se realizaron curvas de calibración de cinco niveles para cada uno de los analitos, usando triplicados a cada nivel en un intervalo de concentraciones que iba desde $0.0001 \mu\text{g/mL}$ hasta $0.01 \mu\text{g/mL}$. Todas las calibraciones se obtuvieron con coeficientes de determinación (R^2) >0.99 . En la figura 5.15 se muestran las curvas de calibrado de cada compuesto

con su respectiva regresión lineal y expresión asociada.

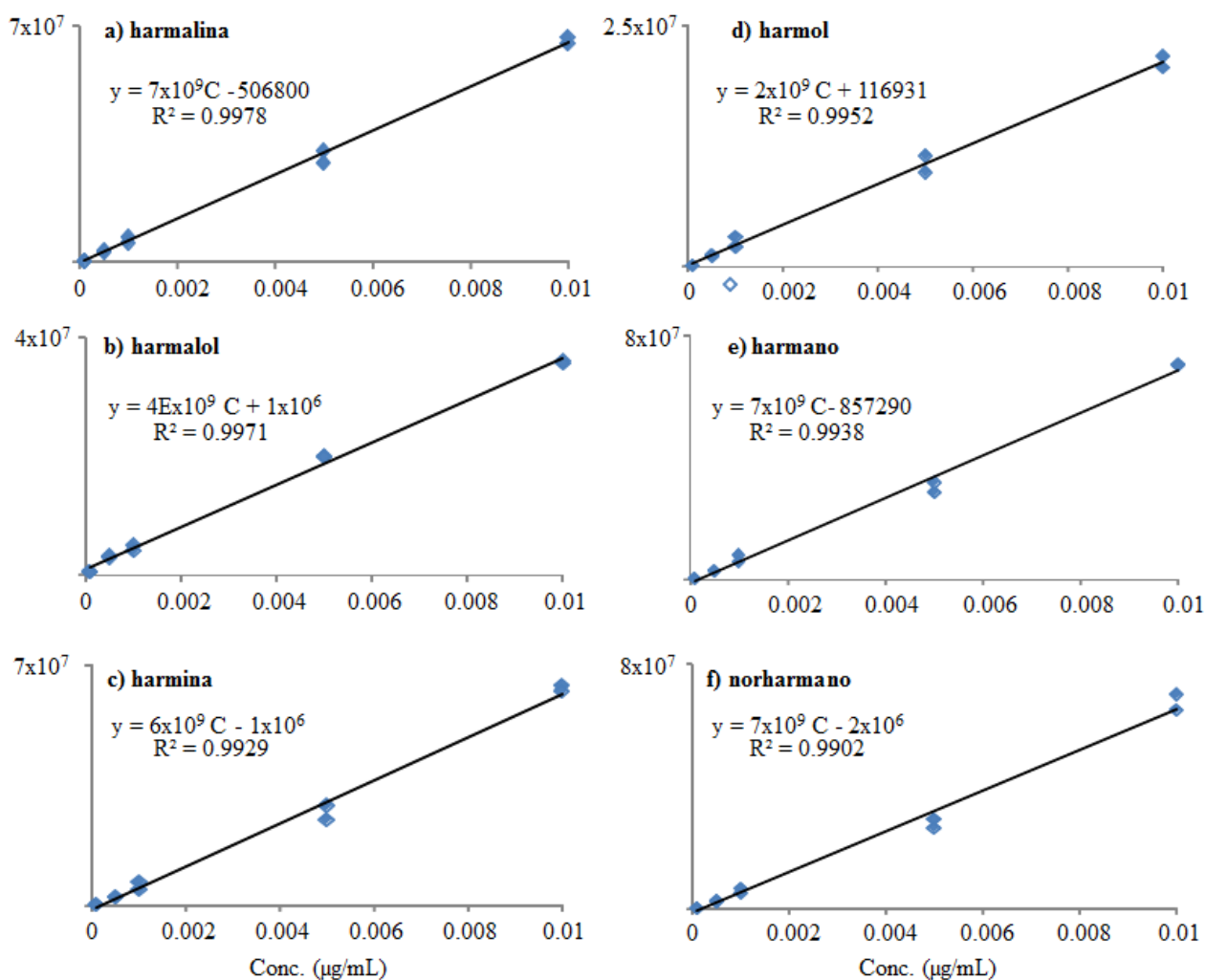


Figura 5.15. Curvas de calibrado por SPE-CE-TOF-MS para a) harmalina, b) harmalol, c) harmina, d) harmol, e) harmano y f) norharmano.

Se encontraron LODs para los seis alcaloides de entre 2-77 pg/ml resumidos en la tabla 5.3. Estos valores son aproximadamente 1000 veces inferiores a los que se obtuvieron en CE-MS utilizando un analizador IT (Tabla 4.1) y apuntan el enorme potencial del método SPE-CE-TOF-MS para determinar estos compuestos a nivel de trazas, tanto en fluidos biológicos como en extractos naturales. Además se obtuvieron excelentes valores de repetitividad y reproducibilidad en tiempos y en áreas para todos los compuestos que rondaron entre 0.8-2.3% y 5.0-15.5% para los diferentes alcaloides, respectivamente (Ver tabla 5.3). Los parámetros que caracterizan la reproducibilidad en estos casos son ligeramente mayores que los que se pueden obtener mediante análisis realizados por

CE-UV o CE-MS debido a que para los distintos días se utilizaron distintos preconcentradores. Sin embargo, los valores siguen siendo muy buenos y similares a los de SPE-CE-UV. En condiciones óptimas una columna de SPE-CE-TOF-MS permite realizar alrededor de 30 análisis antes de comenzar a observar disminuciones en las recuperaciones de la extracción o inestabilidades e interrupciones de la corriente.

	Repetitividad RSD%(n=10)		Reproducibilidad RSD%(n=10,3 días)		LOD (pg/mL)
	tm	Area	tm	Area	
Harmalina	1.2	5.4	2.3	8.2	77
Harmalol	1.1	10.2	1.8	12.1	3
Harmina	0.8	8.3	1.6	9.5	2
Harmol	0.9	9.4	1.8	11.5	7
Harmano	1.5	5.0	2.1	12.3	37
Norharmano	1.1	10.5	1.8	15.5	39

Tabla 5.3. Valores de repetitividad y reproducibilidad expresados como desviación estándar relativa porcentual (RSD%) tanto para tiempos de migración como para las áreas obtenidas para los seis compuestos a una concentración de 0.001µg/mL de cada uno. Repetitividad por 10 replicados y reproducibilidad por 10 replicados para tres microcartuchos distintos en tres días diferentes. BGE acetato de amonio pH 7.8, I= 25mM, 10 % v/v de metanol. Estimación LOD: 3*S/N

5.2.2.3. Aplicación a muestras reales

Para el caso de SPE-CE-UV, se utilizó el pretratamiento de algas desarrollado para CE-UV y CE-MS, con la diferencia que al extracto orgánico que se obtenía originalmente se le realizaron dos modificaciones adicionales independientes. Esto se debía a que la gran cantidad de metanol que poseía el extracto no permitía que los compuestos interactuaran con la fase estacionaria, por ende, no fueron retenidos.

El primer pretratamiento consistió en la evaporación completa del extracto, seguido de la reconstitución del precipitado con agua a un volumen final de 700 µL. Como última etapa, se realizó una filtración con filtro de nylon 0.22 µm. Por otra parte, el pretratamiento alternativo consistió en la evaporación parcial del extracto, dejando de los 700 µL iniciales unos 200 µL que luego se

reconstituyeron con agua hasta un volumen de 700 μL nuevamente, siendo finalmente filtrado de la misma manera anteriormente mencionada. De esta forma se buscó evitar que precipitaran parte de los analitos que son poco solubles en agua. Sin embargo, ya que los resultados de estabilidad de corriente al inyectar la muestra y los electroferogramas obtenidos fueron similares, se utilizó el primer pretratamiento adicional, ya que se consideró más exhaustivo al eliminar totalmente la presencia de metanol en el medio.

En figura 5.16 se pueden observar los electroferogramas de SPE-CE-UV del extracto sin fortificar junto con el extracto fortificado con los alcaloides a una concentración de 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno. A esta concentración, se deberían detectar los alcaloides en el extracto fortificado, pero como puede observarse esto no ocurre.

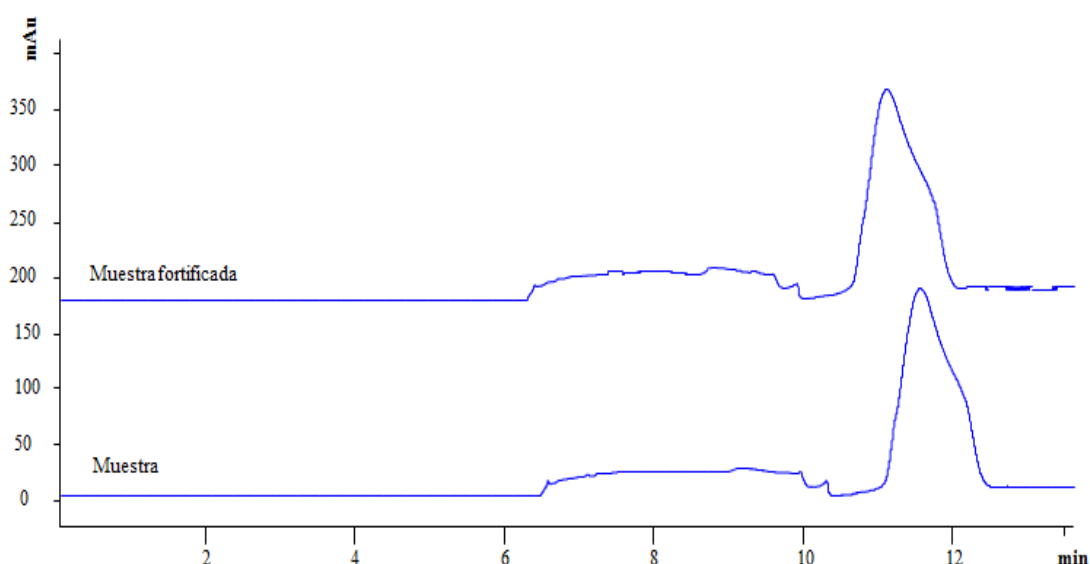


Figura 5.16. Electroferogramas de SPE-CE-UV de *Undaria pinnatifida* (Bord & Bord, Bretaña, Francia) sin fortificar y fortificada a una concentración de 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada uno de los alcaloides. Condiciones óptimas del análisis detalladas anteriormente. Longitud de onda de detección: 254 nm.

Esto significa que, o bien la selectividad de la detección UV no es suficiente como para poder detectarlos de forma clara, o bien, los interferentes de la matriz son muy importantes y no permiten que los analitos se retengan eficazmente en el sorbente, ya que, como se ha mencionado anteriormente, un C18 es poco selectivo. Un indicio de que se podría estar reteniendo una parte muy grande de la matriz yace en los valores muy elevados de absorbancia que podemos observar en los dos electroferogramas. Debido a estos inconvenientes, y para rechazar una de las dos hipótesis planteadas en el párrafo anterior, se analizaron los extractos por SPE-CE-TOF-MS.

En la figura 5.17 se observa la comparación entre los TIE obtenidos mediante el análisis por SPE-CE-TOF-MS del extracto de i) *Undaria pinnatifida* y ii) *Undaria pinnatifida* fortificada con los alcaloides β -carbólicos a una concentración de 0.015 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno.

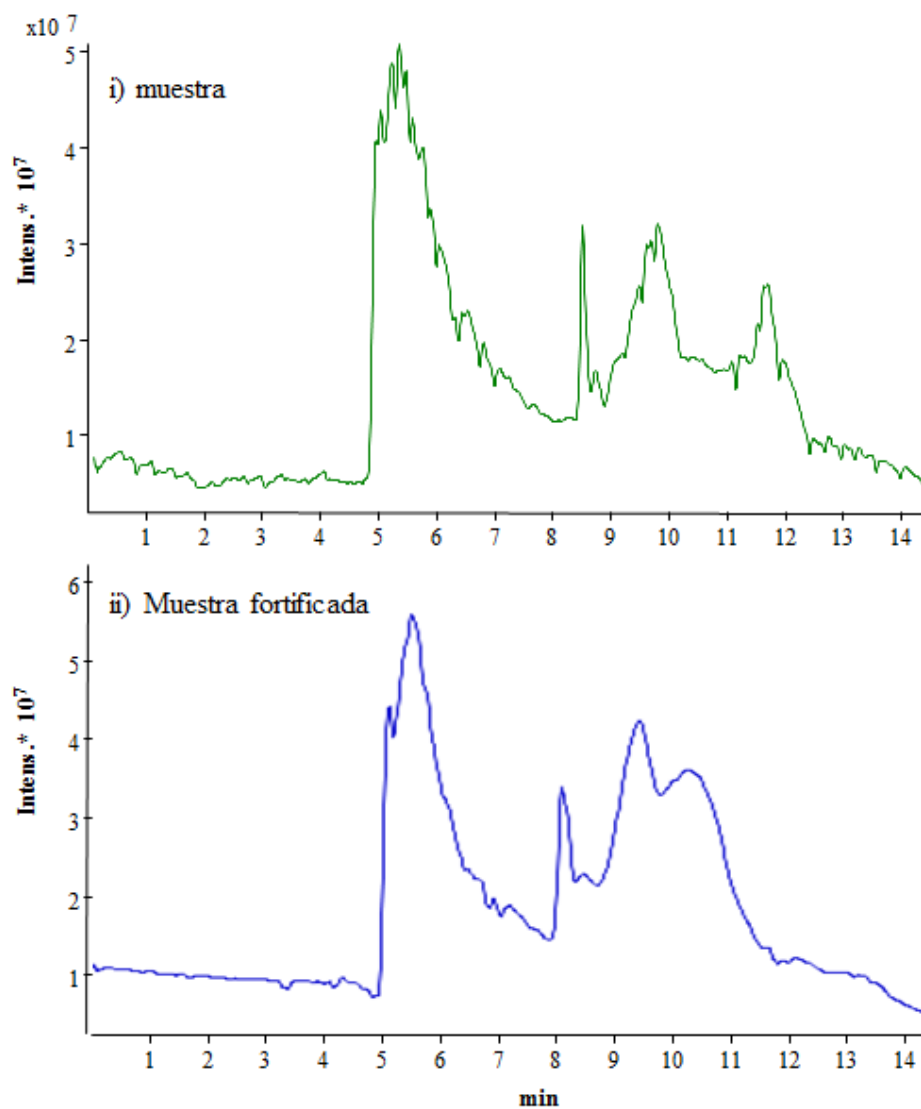


Figura 5.17. TIEs del análisis de alcaloides por SPE-CE-TOF-MS de un extracto de i) *Undaria pinnatifida* y de una ii) *Undaria pinnatifida* fortificada a una concentración de 0.015 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los alcaloides. Bord & Bord (Bretaña, Francia). Condiciones óptimas del análisis detalladas anteriormente.

Como puede observarse, son numerosos los compuestos de la matriz que se retienen en el C18 y que se preconcentran junto con los alcaloides. La comparación entre la figura 5.17-i e -ii no arroja resultados favorables en cuanto a la identificación de los compuestos debido a que no se encuentran diferencias apreciables en la zona que migrarían los alcaloides entre la muestra y la muestra

fortificada con alcaloides. Esto nos lleva a pensar nuevamente, que la poca selectividad del sorbente jugaría un papel negativo frente a la complejidad de la matriz, reteniéndose muchos de los compuestos presentes en la misma. Para poder eliminar los posibles efectos negativos de la matriz, se decidió agregar lavados con BGE durante uno y dos minutos después de la introducción de muestra y antes de la elución pero los resultados fueron similares.

Para poder observar que sucedía individualmente con los alcaloides, se estudiaron los EIEs correspondientes (ver figura 5.12) de las muestras fortificadas y sin fortificar, las cuales se pueden observar con detalle en la figura 5.18-I y 5.18-II.

Como se puede observar en el caso del harmalol y harmol (figura 5.18-I-b y 5.18-II-d) la retención de estos compuestos no se puede detectar en las muestras fortificadas y sin fortificar. En estos casos se puede sacar como conclusión que ambos compuestos dentro de la matriz presentan una retención mínima, es decir, competitivamente son desplazados del sorbente frente a otros compuestos presentes en ésta. En un sentido estructural el harmalol y harmol poseen el mismo núcleo β -carbólico y los mismos sustituyentes (un grupo metilo y un grupo oxidrilo) diferenciándose sólo en una insaturación. Se puede pensar que el grupo oxidrilo podría ser el responsable de la falta de retención cuando estos analitos interactúan dentro de un medio competitivo ya que sólo a estos alcaloides de los seis estudiados les ocurre este fenómeno. Por otra parte, en los casos de harmina y harmalina (figura 5.18-I-a y c), se puede afirmar que no hay evidencia de la presencia de estos compuestos en las muestras debido a que poseen una señal muy clara en los EIE de las muestras fortificadas y los mismos están totalmente ausentes en los electroferogramas de las muestras sin fortificar.

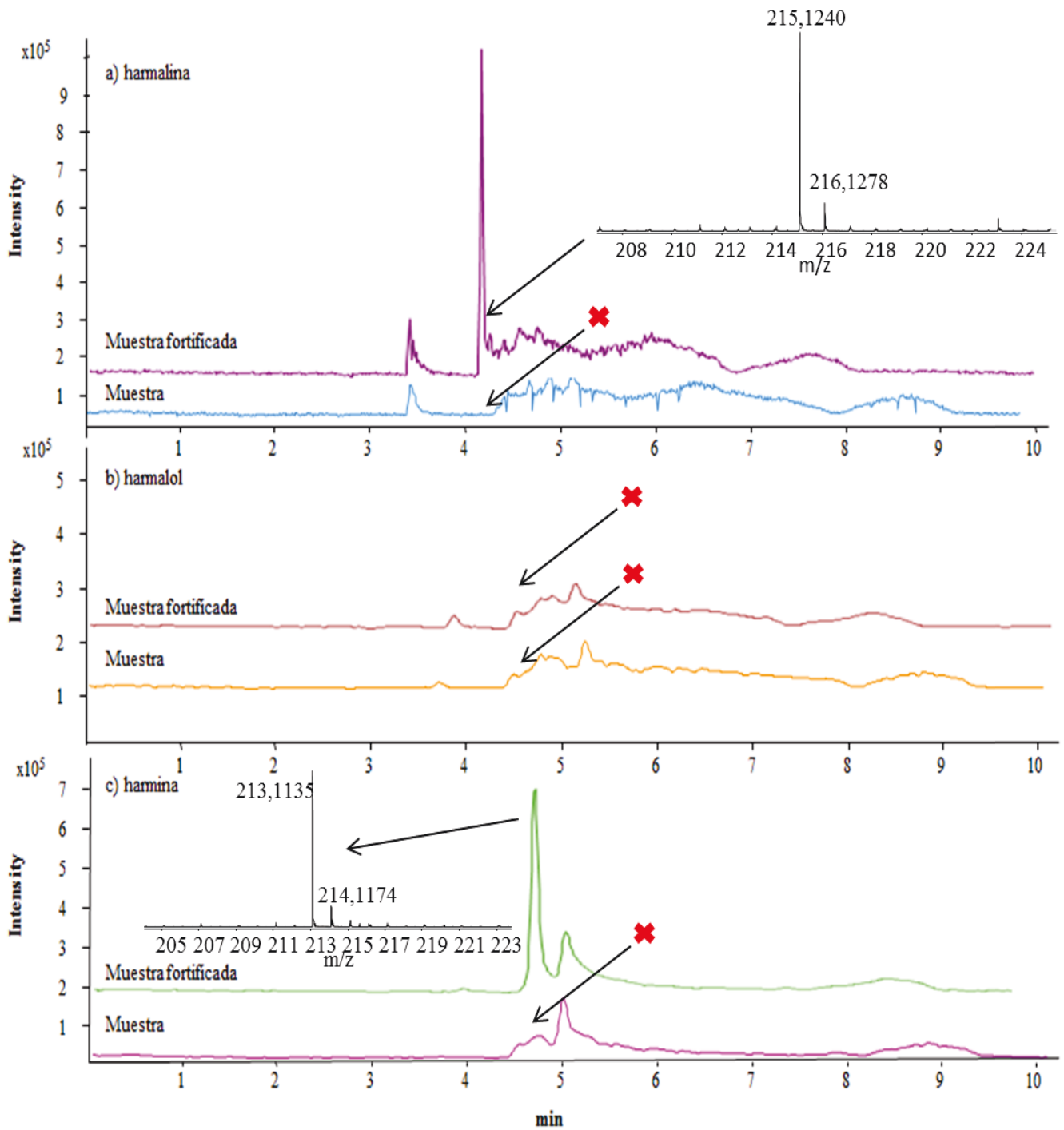


Figura 5.18.I. EIEs por SPE-CE-TOF-MS de un extracto de *Undaria pinnatifida* y de un extracto de *Undaria pinnatifida* fortificado antes de analizar, a una concentración de 0.015 $\mu\text{g/mL}$ de a) harmalina, b) harmalol y, c) harmina. Condiciones óptimas del análisis detalladas anteriormente. Bord & Bord (Bretaña, Francia).

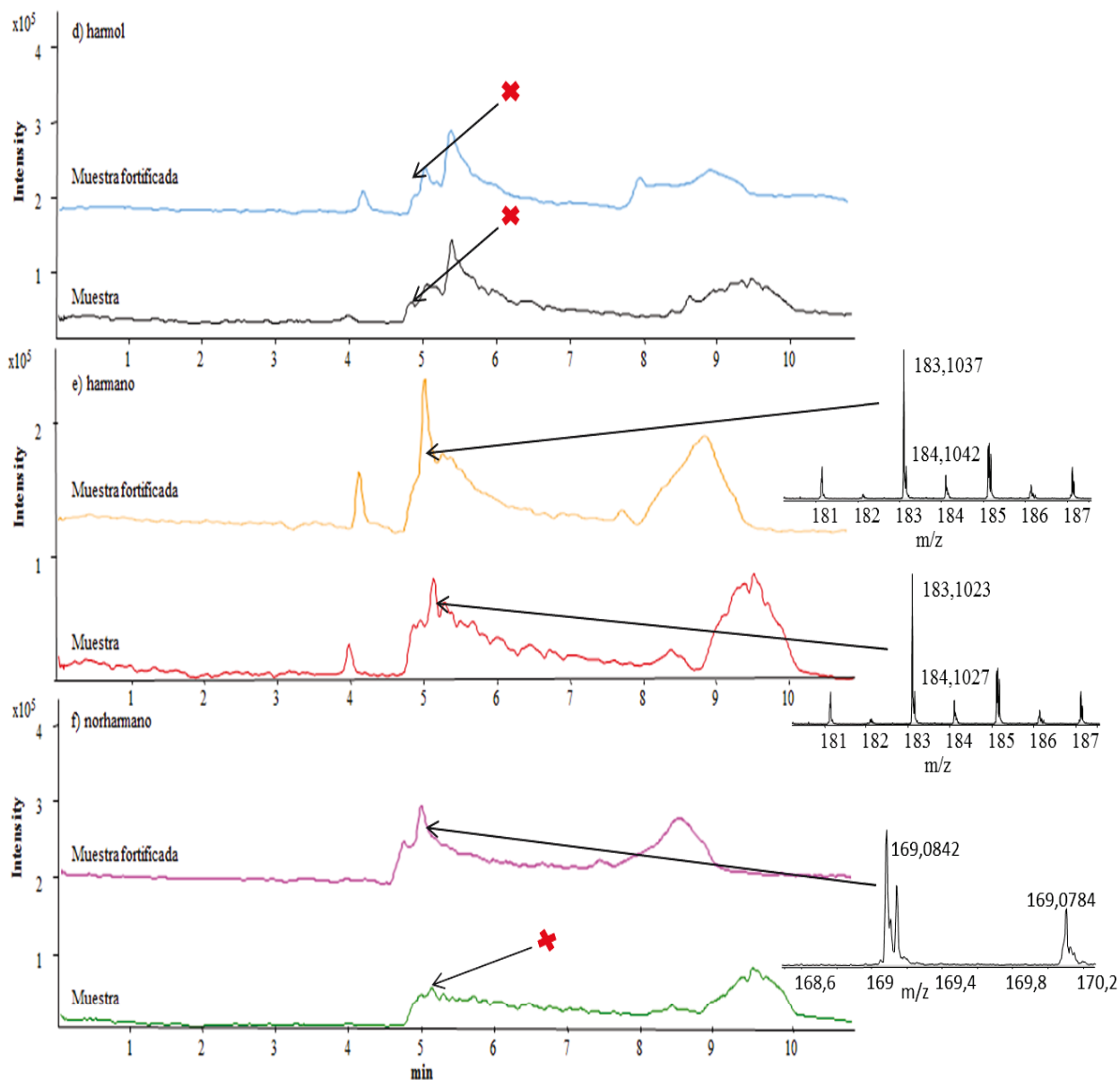


Figura 5.18.II. EIEs por SPE-CE-TOF-MS de extracto de *Undaria pinnatifida* y de un extracto de *Undaria pinnatifida* fortificado antes de analizar, a una concentración de 0.015 $\mu\text{g/mL}$ de d) harmol, e) harmano y, f) norharmano. Condiciones óptimas del análisis detalladas anteriormente. Bord & Bord (Bretaña, Francia).

De manera similar, se puede evidenciar la ausencia del norharmano en las muestras sin fortificar (figura 5.18-II-f), aunque la retención de este es mucho menor que la de harmina y harmalina, tal y como se puede comprobar en las muestras fortificadas. Por otro lado, sólo el harmano pudo detectarse tanto en las muestras fortificadas como sin fortificar. En éstas últimas se pudo estimar una concentración de 60 pg/ mL considerando la recta de calibrado externa establecida para este alcaloide por SPE-CE-TOF-MS (fig. 5.15-e).

5.3. Conclusiones Parciales

- Basado en trabajos previos del grupo de investigación se optimizó la separación y preconcentración de péptidos opiáceos tanto para mezclas estándar como para muestras de plasma fortificado.
- Se optimizó la preconcentración mediante SPE-CE-UV de alcaloides β -carbolínicos en mezclas estándar utilizando como sorbente C_{18} . Debido a la pérdida de eficiencia en la separación debido a la adición del preconcentrador, los analitos no se lograron separar completamente impidiendo su cuantificación. Esto, unido a los problemas con la matriz de las muestras de *Undaria pinnatifida*, conllevó a la utilización de detectores más selectivos para poder resolver el inconveniente.
- Posteriormente se realizó el desarrollo y compatibilización del método de preconcentración utilizando como detector un espectrómetro de masas con analizador de TOF el cual permitió detectar de forma independiente cada uno de los analitos.
- Se validó el método SPE-CE-TOF-MS mediante la realización de rectas de calibrado, estimando LODs, así como ensayos de repetitividad y reproducibilidad en áreas y tiempos de migración para los distintos alcaloides.
- Se analizaron muestras de *Undaria pinnatifida* mediante SPE-CE-UV y SPE-CE-TOF-MS. Por un lado, la detección UV resultó no poseer la suficiente selectividad como para detectar los analitos sin las interferencias de la matriz de la muestra. Por otro lado, la detección mediante MS no arrojó datos concluyentes cuando se analizaron los TIE tanto de muestras como de muestras fortificadas. Finalmente el análisis de los EIE de muestras, muestras fortificadas y espectros de masa, sólo evidenció la presencia de harmano a una concentración estimada de 60 pg/mL en los extractos de algas. Harmalina y harmina, si bien presentan retenciones altas a los niveles fortificados, no se han encontrado indicios de su presencia en los extractos de *Undaria pinnatifida* proveniente de la costa francesa, lo cual es congruente con los resultados encontrados en el capítulo 4. Tampoco se observó la presencia de norharmano en el extracto a pesar de que los niveles de retención en la fase estacionaria eran

de moderados a bajos. Respecto al harmalol y al harmol, ambos no fueron detectados tanto en el extracto sin fortificar como en el extracto fortificado debido a su nula retención. Por lo tanto el harmalol no pudo ser detectado aunque pudo cuantificarse por CE-MS en el capítulo 4.

6. EVALUACIÓN DE LA TEMPERATURA EN SPE-CE-UV

En este capítulo se estudia principalmente el efecto de la temperatura (T) en distintas instancias del método de SPE-CE-UV con el fin de tratar de mejorar aún más los factores de preconcentración. Inicialmente, se estudió el efecto de la T en CE-UV utilizando la termostatación interna del equipo comercial con el fin de observar si la T poseía influencias en los cambios de señal o resolución de las separaciones convencionales. En una segunda etapa se procedió a evaluar la T en métodos SPE-CE-UV utilizando la termostatación del equipo comercial, la cual es limitada. Finalmente, se diseñó un mini baño termostático (MTB) capaz de termostatar el microcartucho SPE de manera localizada, y eficiente, controlar la T en distintas etapas de la preconcentración. Este dispositivo se utilizó en la preconcentración de soluciones patrón de alcaloides y péptidos opiáceos. Basado en las condiciones de T óptimas, se analizaron por SPE-CE-UV los péptidos en muestras de plasma humano fortificados y se estudiaron las diferencias respecto a la preconcentración a T ambiente.

6.1. Procedimientos

Las columnas de SPE-CE fueron acondicionadas a una presión de 930 mbar por sucesivos lavados de agua (10 min), metanol (5 min), agua (5 min) y BGE (5 min). Finalmente, se aplicaron durante 10 min el voltaje de separación (25kV). Un análisis típico por SPE-CE a una T de 25 °C consiste en: acondicionamiento a 930 mbar de agua (1 min), metanol (1 min), agua (1 min), muestra (10 min) y, finalmente BGE (2 min) para lavar el microcartucho de impurezas no retenidas y para llenar el capilar de separación. Luego (50 x 10 mbar.seg) se inyecta un tapón de elución cuya composición es 50mM ácido acético y 50mM ácido fórmico preparado en una mezcla metanol : agua 60:40 (v/v). Una vez inyectado se aplica un voltaje de separación de 25 kV, al finalizar el análisis se realiza un post-acondicionamiento y lavado del preconcentrador que consta de 2 minutos con ACN seguido de 2 minutos con agua.

6.1.1. Temperatura en CE-UV modificando la termostatación interna

El sistema de termostatación interna de los instrumentos comerciales de CE posee prestaciones limitadas, sin embargo permite realizar estudios preliminares relacionados con la influencia de la T, tanto en CE como en SPE-CE [144]. En el caso específico de este trabajo de tesis, las pruebas se realizaron sobre un instrumento HP^{3D}CE (Agilent technologies), el cual posee un sistema de

termostatación del cassette por convección forzada de aire regulado por un Peltier. Este permite regular la T del capilar desde 10 °C por debajo de la T ambiente (para T ambientes mayores 15 grados) hasta 60 °C (± 0.1 °C). En nuestro laboratorio en particular, se pudieron estudiar las T entre 15 °C y 60 °C.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizó un capilar de sílice fundida de 57 cm de L_T x 50 cm de L_D x 75 μm id x 365 μm od. Los capilares que se utilizaron por primera vez fueron activados por lavados sucesivos a una presión de 930 mbar, con NaOH 1M (20 min) seguido de, agua (20 min) y BGE (50mM de ácido acético y 50mM de ácido fórmico ajustado a pH 3.5 con amoníaco) (30 min). Entre análisis los capilares fueron acondicionados de la siguiente forma: NaOH 0.1 M (2 min), agua (2 min) y BGE (4 min). La inyección de la muestra se realizó de forma hidrodinámica a una presión de 50 mbar, sin embargo los tiempos de inyección fueron ajustados teniendo en cuenta los cambios de viscosidad ocasionados por la T utilizando la ecuación de Hagen-Poiseuille para inyectar siempre los mismos volúmenes [46]. La separación fue realizada a un voltaje de 25 kV a 6 T distintas entre 25 °C y 60 °C. La longitud de onda de detección fue de 214 nm. Debido a que el contexto de este trabajo implica altas T los péptidos que se utilizaron como modelo (Metionina encefalina (MET), secuencia: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, PM: 573.23 Da, Endomorfin 1 (END), secuencia: Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, PM: 610.29 Da y Dinorfina A (Dyn A), secuencia: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, PM: 867.47 Da), fueron sometidos a pruebas de estabilidad a alta T. Luego de analizar por CE-UV mezclas estándar de concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antes y después de estar a una T de 95 °C en un baño de agua durante 1 hora, no se evidenciaron cambios en las áreas o formas de los picos electroforéticos, los espectros UV-Vis ni los tiempos de migración.

6.1.2. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV con termostatación interna

En una primera etapa se evaluó todo el procedimiento de SPE-CE a distintas T entre 25°C y 60 °C, es decir, incluyendo las etapas de introducción de muestra, lavado, elución y separación. A continuación, el proceso se dividió temporalmente en dos pasos en los que se modificó independientemente la T, uno que incluye la introducción de muestra mientras que el otro comprende el lavado, la elución y la separación. En este último caso la T fue programada con el software de manera automática y los tiempos fueron adaptados a los tiempos de estabilización del equipo, los cuales eran mucho más largos para enfriar que para calentar. Basados en esta división se combinaron

las T extremas del instrumento realizando introducciones de muestra a 60°C mientras que posteriormente se lavaba, eluía y separaba a 25°C y viceversa. La duración de los lavados, introducción de muestra, inyección e inyección del eluyente fueron corregidos acorde a la T de trabajo utilizando la ecuación de Hagen-Poiseuille por los motivos mencionados anteriormente.

6.1.3. Efecto de la temperatura en SPE-CE utilizando el mini baño termostático.

En esta parte del trabajo se utilizó un mini baño termostático diseñado especialmente para llevar a cabo los experimentos de SPE-CE-UV a distintas T, como el motivo principal del estudio radica en el efecto de la T sobre la preconcentración, en este caso simplemente se modifica la T del microcartucho mientras que la T del resto del cassette es controlada a 25 °C. El análisis por SPE-CE-UV fue nuevamente dividido en dos etapas: La primera etapa, la cual consistía en la introducción de muestra, fue probada a distintas T comprendidas entre 5 °C y 90 °C. Una vez finalizada la etapa la T fue rápidamente modificada hasta 25 °C, para comenzar isotérmicamente la segunda etapa comprendida por el lavado del cartucho, la elución y la separación.

Dado que el cambio de T estuvo enfocado solamente en el microcartucho de extracción, y sabiendo que este es el responsable de una gran proporción de la caída total de presión del capilar al interponer un lecho particulado, la forma de corregir los volúmenes inyectados hidrodinámicamente fue diferente a la anteriormente mencionada (ecuación de Hagen-Poiseuille). Para ello se midieron las velocidades del caudal a través del capilar inyectando metanol como marcador de tiempo muerto (3sec x 30mbar para 25 °C) y eluyendo por presión a distintas T del MBT. A continuación se normalizaron las medidas respecto a las velocidades obtenidas a 25°C y se estableció un factor de corrección hidrodinámico (f), el cual dividiendo los tiempos aplicados a 25°C resultan en los tiempos deseados a la T que se requiere trabajar.

En la figura 6.1 se pueden observar los factores de corrección hidrodinámico a diferentes T comprendidas entre 5 y 90 ° C. Estos experimentos se realizaron por duplicados para tres capilares SPE-CE distintos. En consecuencia, se puede observar la excelente coincidencia entre rectas, lo que permite usar los factores f independizándose del preconcentrador.

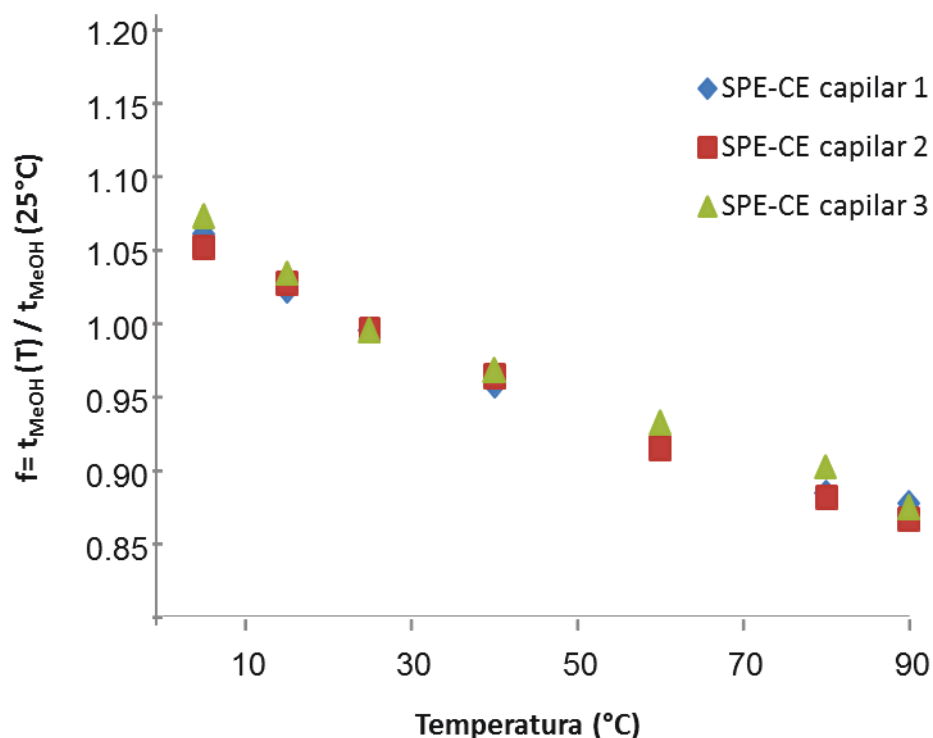


Fig. 6.1. Factor de corrección hidrodinámico (f) en función de la temperatura para tres capilares distintos. Cada medida fue realizada por duplicados. Inyección de metanol 35 mbar x 3 seg. Analisis aplicando 50 mbar y 20 kV. Detección a 200 nm.

6.2. Resultados y Discusiones

6.2.1. Optimización de la temperatura en la separación en CE utilizando termostatación interna

Para esta etapa se analizó por CE-UV una solución estándar de los tres péptidos opiáceos a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno, en la que se variaron las T entre 25 °C y 60 °C utilizando el sistema de termostatación interno, que en el caso del instrumento Agilent HP^{3D}CE es por convección forzada de aire. En este equipo el sistema interno termostata la zona central del capilar

de separación que en este caso en que utilizamos un tubo de $L_t = 57.5$ cm corresponde al tramo de 45 cm comprendido entre los 5.0 cm desde el extremo de entrada y los 7.5 cm desde el extremo de salida.

Los resultados se muestran en la figura 6.2, en donde se observa claramente que los cambios de T pueden causar cambios muy drásticos, en particular sobre los tiempos de análisis. Esto se debe a que el aumento de la T disminuye marcadamente la viscosidad del BGE, lo cual afecta fuertemente la movilidad aparente de los analitos.

Por ende, si aumentamos la T de 25 °C a 60°C, podemos reducir los tiempos de análisis a la mitad, lo cual convierte a la T en una herramienta importante a la hora de optimizar los análisis.

Es importante destacar, aunque este no sea el caso, que la T también puede afectar equilibrios químicos secundarios presentes en la separación relacionados con las especies del BGE o los analitos, como por ejemplo el equilibrio ácido-base [144].

Para poder comparar las áreas de los picos, las cuales pueden estar directamente asociadas a mejores LOD de un método, se necesita tener en cuenta las diferencias en los tiempos de migración. Debido a que la detección UV responde a concentración y no a masa, el ancho y el área de los picos dependen de la velocidad a la que pasa el analito por la ventana de detección que es diferente para cada analito. Por lo tanto las áreas serán normalizadas dividiéndolas por el tiempo de migración ($A_{c,i} = A_i / t_{m,i}$).

En la figura 6.2 se observa que al aumentar la T desde 25°C a 60°C se produce un incremento del 44% y 11% en las A_c de MET y END respectivamente, mientras que el mismo aumento de T para el caso de Dyn A produce una disminución de la A_c de alrededor de un 10%. Las selectividades entre picos adyacentes, definidas como el cociente entre los tiempos de migración electroforética ($\alpha_{a,b} = t_{(a)} / t_{(b)}$) no muestran cambios significativos frente a variaciones en la T. Esto resulta razonable dado que en este caso no hay efecto de la T sobre el grado de ionización y el efecto sobre la viscosidad afecta en igual medida a todos los analitos.

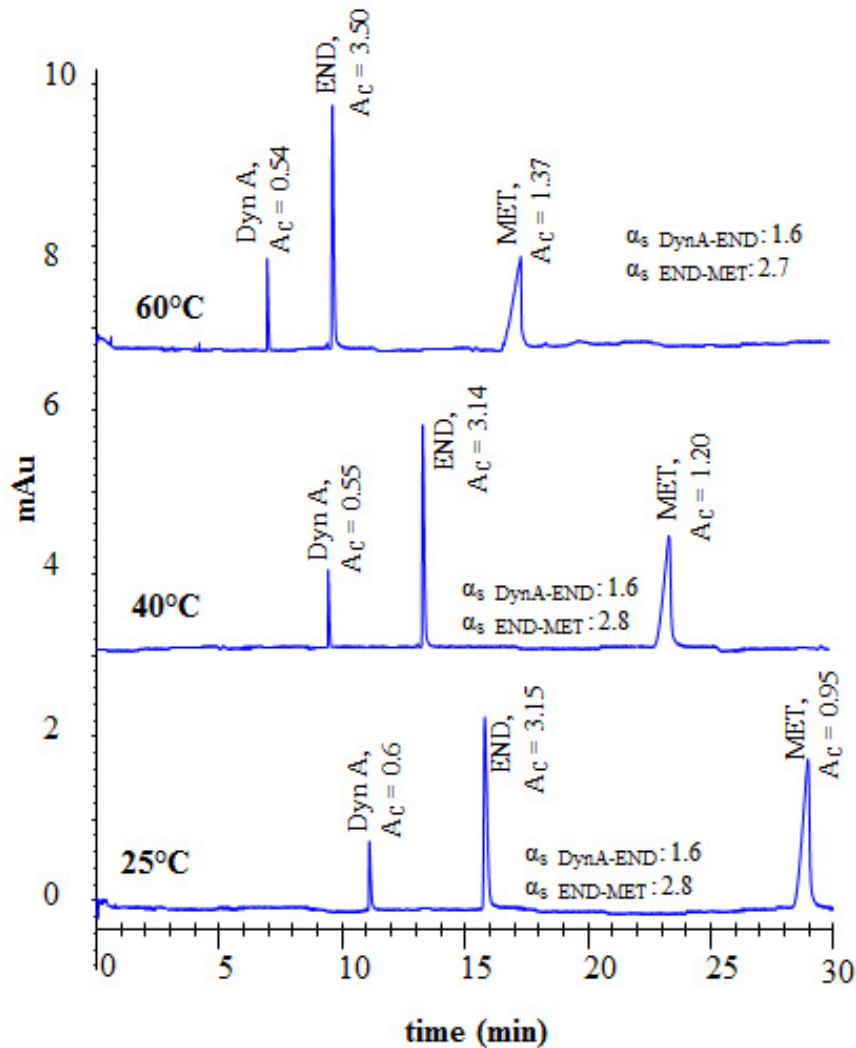


Fig. 6.2. Electroferograma de CE-UV de mezclas estándar de Dyn A, End y Met a una concentración de 50 µg/mL a tres temperaturas diferentes, 25°C, 40 °C y 60°C. BGE: ácido fórmico 50 mM y ácido acético 50 mM pH= 3.5 ajustado con amoníaco. Separación a 25 kV y longitud de onda de detección a 214 nm.

6.2.2. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV utilizando termostatación interna

En esta serie de experimentos se utilizó el sistema de termostatación interna de forma similar a la sección anterior con la diferencia que ahora lo que se sometió a diferencias de T fue todo el capilar SPE-CE-UV. En primera instancia el estudio se llevó a cabo analizando una solución estándar conteniendo los tres péptidos opiáceos a una concentración de 10 ng/mL de cada uno, mientras que las T fueron estudiadas en el intervalo comprendido entre 25°C y 60°C. Dado que la T máxima de este intervalo de estudio no es extremadamente alta, los microcartuchos SPE se construyeron

utilizando los mismos materiales y con el mismo procedimiento que los que se emplean para trabajar a T ambiente.

Los electroferogramas obtenidos cuando el capilar de SPE-CE-UV es utilizado a tres T diferentes son mostrados en la figura 6.3 En adelante en cada electroferograma se utilizará una etiqueta que indica de modo resumido las T de las diferentes etapas SPE-CE. Por ejemplo, 25-25 indica que la etapa de introducción de muestras se realiza a 25°C, mientras que el “*clean-up*”, elución y separación electroforética también se llevan a cabo a esa T. Más adelante se mostrarán combinaciones que justifican la introducción de esta codificación.

Volviendo al análisis de los resultados, como es de esperar, los efectos más significativos fueron los relacionados a los cambios en la viscosidad, lo cual se ve reflejado en la marcada reducción de los tiempos de análisis a medida que aumenta la T. Si tomamos como ejemplo los resultados de las figuras 6.3-a y c se observa un aumento de T desde 25 °C a 60 °C reduce el tiempo de análisis de 30 a 10 min. Al igual que en CE-UV las selectividades entre los analitos adyacentes no presentan modificaciones con los cambios de T. Con respecto a las áreas de pico corregidas (A_c), se incrementa desde 25°C hasta 40°C los valores sólo disminuyen para Dyn A y End (figura 6.3 -a y -b) pero, luego, al incrementar la T desde 40°C hasta 60°C vuelven a valores máximos próximos a los de 25°C en todos los casos.

Estos comportamientos sugieren que podría existir una combinación de efectos de la T, algunos disminuyendo los valores de A_c y que prevalecen a T más bajas, y otros que aumentan el A_c que prevalecen a T más altas. Por lo tanto, el siguiente estudio se consistió en separar el procedimiento total en diferentes etapas y así evaluar el efecto de cambiar la T independientemente en cada una de ellas. Se realizaron nuevos experimentos en donde la introducción de muestra se llevó a cabo a 25°C, mientras que el lavado, la elución y la separación se realizaron a una T de 60°C (25-60). Luego, se realizó el experimento inverso, cargando la muestra a 60°C, y realizando los pasos de lavado, elución y separación a 25 °C (60-25). Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 6.4. En esta figura se repitieron los experimentos 25-25 y 60-60 a efectos de facilitar la comparación con los experimentos 25-60 y 60-25.

Comparando los valores de A_c entre 25-25 vs 25-60 se puede probar que incrementando la T en el paso de lavado/elución/separación los LOD se ven deteriorados.

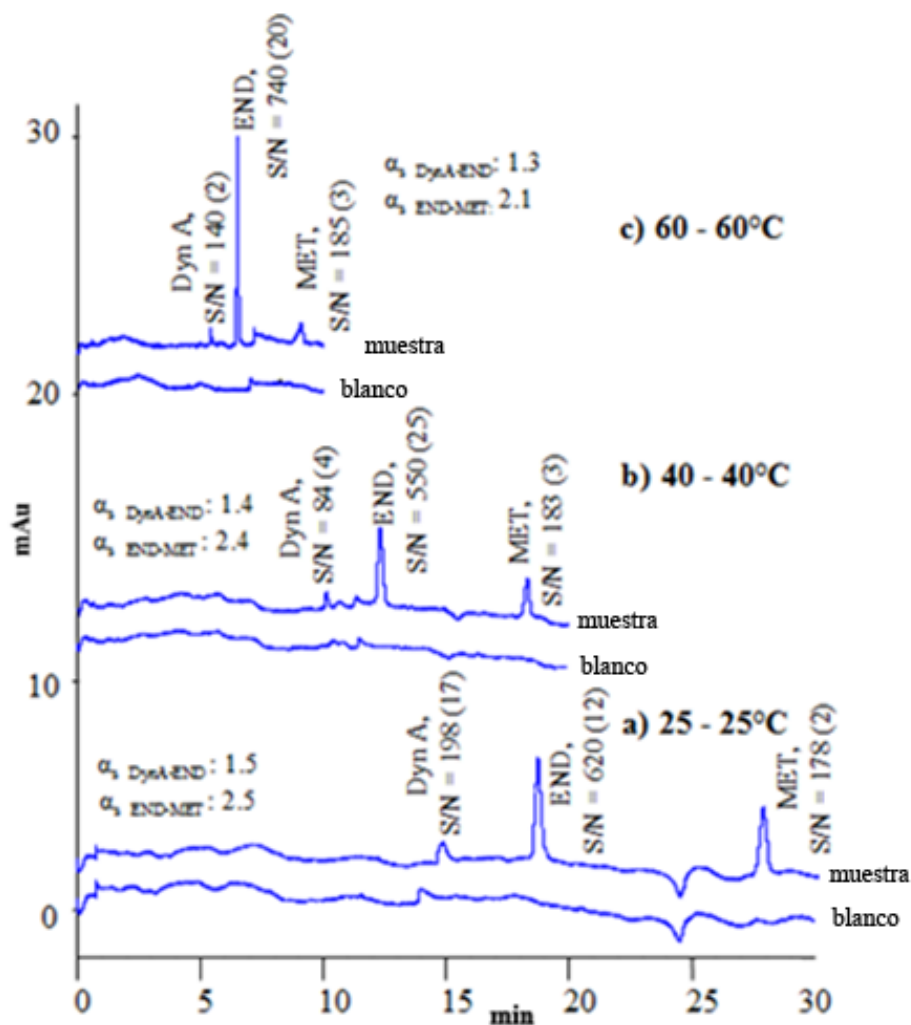


Fig.6.3. SPE-CE-UV de una mezcla patrón de Dyn A, End y Met a una concentración de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a, a) 25-25°C, b) 40-40°C y, c) 60-60°C. La primera temperatura indica la temperatura en la etapa de introducción de muestra mientras que la segunda indica la temperatura en la etapa de elución y separación. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Por otra parte, si comparamos los electroferogramas en donde solo se cambia la T de introducción de muestra, es decir 25-25 vs. 60-25, se reafirma esta explicación, ya que el uso de altas T en el paso de introducción de muestra arrojó claras mejoras en los valores de A_c , especialmente en el caso de END cuyas A_c aumentaron un 35%.

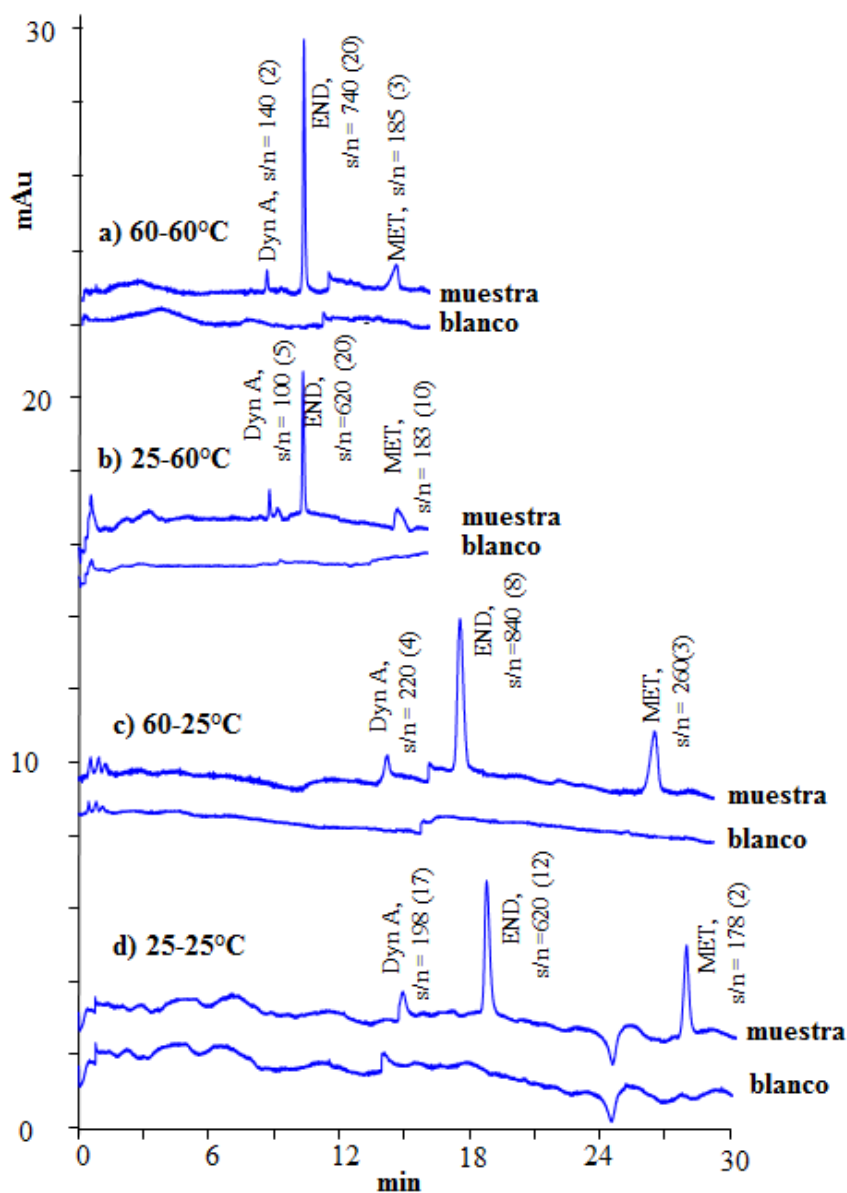


Fig.6.4. SPE-CE-UV de una mezcla estándar de Dyn A, END y MET a una concentración de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ a, a) 60-60°C, b)25-60°C, c) 60-25°Cy, d) 25-25°C. La primera temperatura indica la temperatura en la etapa de introducción de muestra mientras que la segunda indica la temperatura en la etapa de elución y separación.

Por ende, queda comprobado que aumentar la T aplicada durante la etapa de introducción de muestra mejora efectivamente la preconcentración de estos péptidos empleando un sorbente C18 en SPE-CE-UV los procedimientos de SPE-CE en línea en el paso de introducción de muestras para el caso de estos péptidos opiáceos. De todos modos, la termostatación interna por convección forzada del instrumento tiene varias limitaciones. Entre ellos podemos mencionar que el intervalo de T que permite utilizar es muy limitado, tanto hacia T mayores como para T menores; y por otro lado, que los tiempos que se requieren para cambiar la T del cassette son muy lentos.

A modo de ejemplo, podemos mencionar que utilizando el sistema de termostatación interna para el experimento 25-60, el paso de calentamiento desde 25°C hasta 60°C tomó alrededor de 10 minutos, mientras que en el sentido inverso, por ejemplo para el experimento 60-25, el enfriamiento demora prácticamente el doble de tiempo. Esto dió pie para diseñar un sistema de termostatación alternativo que permita realizar los cambios de T de manera más eficiente y en intervalos más amplios de T.

6.2.3. Efecto de la temperatura en SPE-CE-UV con sistemas de alta eficiencia (MBT)

Como se mencionó en la sección anterior, la T aparentemente posee una influencia en la retención de los compuestos durante la etapa de introducción de muestra. Por lo tanto, esta variable debería ser estudiada con más precisión, cambiando la T de forma localizada y permitiendo cambios de T mucho más rápidos y amplios. El mini baño termostático (MBT) permite tener un control independiente de la T en la zona específica del microcartucho, brindando grandes intervalos de T (entre 5 y 95°C utilizando agua como fluido termostático).

6.2.3.1. Construcción del MBT, accesorios y metodología

El sistema básicamente consiste en la incorporación de un pequeño baño termostático para controlar la T del microcartucho de extracción, que puede ser insertado con facilidad dentro de un cassette de cualquier equipo de CE comercial. Este dispositivo está conectado a un circuito externo de termostatación por líquido el cual está compuesto por tres electroválvulas las cuales permiten modificar a voluntad la circulación del líquido a través del MBT desde un tablero eléctrico de control y así, de esta forma, controlar y cambiar la T de manera rápida y eficiente. En la figura 6.5-A el esquema representa al MBT. El mismo fue maquinado a partir de una pieza de bronce rectangular

cuyas dimensiones eran 30mm x 16mm x 12mm.

El material elegido para su fabricación fue el bronce debido a que este material posee una gran cantidad de ventajas respecto a otros materiales como por ejemplo la facilidad para el maquinado, resistencia mecánica de las roscas, resistencia a la corrosión, conductividad térmica, etc. A lo largo de la de la pieza se realizó un conducto de 5mm de diámetro para alojar el microcartucho y por donde pasará el líquido termostatizador. Este líquido circulará a grandes velocidades en contacto con el microcartucho. Los extremos de entrada y de salida del capilar están sellados con dos septas de silicona resistentes a la T.

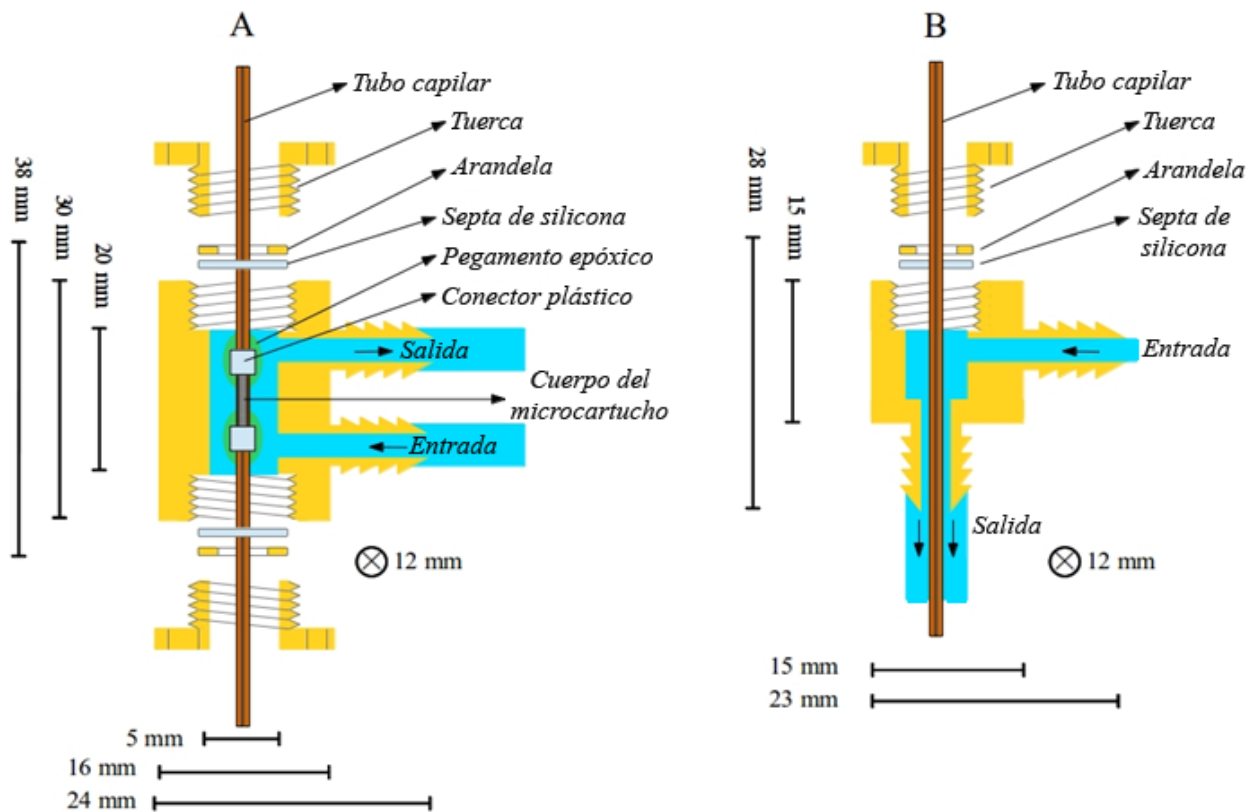


Fig. 6.5. Esquemas de A-mini baño termostático (MBT) y B- interfaz de termostatización líquido-capilar (ILC).

El capilar de SPE-CE-UV atraviesa la septa de entrada y de salida, las cuales se comprimen al mismo tiempo por arandelas y tuercas agujereadas para sellar firmemente al conjunto y de esta forma minimizar el riesgo de fugas de líquido termostatizador al instrumento. En los extremos de la cámara cilíndrica que aloja al microcartucho, se encuentran dos canales perpendiculares que mediante mangueras, las cuales permiten la entrada y salida del recirculado de líquido termostatizador.

El MBT fue probado dentro de cassettes de distintos equipos de CE comerciales. En todos los casos se tuvo que realizar dos orificios en lugares apropiados del cassette para poder atravesar el mismo por la manguera de entrada y de salida al circuito de termostatización (figura 6.6). El mismo procedimiento se realizó sobre las cubiertas de los equipos con el mismo fin, además se trató de minimizar el camino entre los baños termostáticos externos y el MBT para reducir a su mínima expresión las pérdidas de calor ocasionadas por la disipación. Las conexiones se realizaron utilizando mangueras de silicona de pared delgada (id/od 3mm/6mm y 8mm/14mm) , cubiertas externamente con un aislante térmico para tubos (Isolan S. A.). Los baños termostáticos junto con estas mangueras poseían un flujo aproximado de 1.2 l/min, 1.3 l/min y en el caso del criostato de 3.3 l/min (a 25 °C). En las condiciones más extremas en el que el MBT se encuentra a 90 °C con el baño termostático que menor flujo provee, se requiere fijar la T del baño a 2.7 °C por encima de la deseada en el MBT. Es decir, en este caso específico la T sería de 92.7 °C. Caso contrario, en el caso de que se use el criostato, el cual posee el mayor flujo, la T que debería fijarse en el instrumento se debe encontrar 1.1 °C por sobre la deseada. Para el caso específico en el que la termostatización es efectuada por aire, el MBT es suficiente para asegurar la termostatización eficiente tanto del capilar como del microcartucho de forma independiente. Sin embargo, en el caso en el cual la termostatización del capilar es llevada a cabo por un fluido líquido (agua o refrigerantes), el MBT no es suficiente debido a que no se puede termostatar selectivamente una sección específica del capilar (microcartucho). Por lo tanto, surge la necesidad de desarrollar un dispositivo adicional para poder compatibilizar esta tecnología con este tipo de equipos. Para ello, se desarrollaron dos dispositivos que actúan como interfases de la termostización (*ILC- interfaz líquido-capilar*) que son utilizados para desviar el flujo de líquido en una sección específica y a su vez mantener la T del resto del capilar. Un esquema de la pieza puede ser observado en detalle en la figura 6.5-B. Vale la pena destacar que el diseño fue basado en el MBT utilizando exactamente los mismos materiales y el mismo sistema de sellado. Los ILC realizan una derivación de la termostatización interna del instrumento sobre un segmento discreto del capilar permitiendo controlar la T de esta zona de forma externa y eficiente. Además, estos dispositivos pueden ser utilizados de dos formas diferentes:

- 1- Utilizando un único ILC, esto se puede llevar a cabo colocando el MBT inmediatamente en la entrada del capilar y el dispositivo conectado a la entrada de fluido por un lado y por el otro inmediatamente después del MBT.
- 2- La otra alternativa a tener en cuenta es la que emplea dos ILC realizando una derivación del fluido termostático exactamente en la zona donde se va a utilizar el MBT. En esta configuración no importa la zona que se desee termostatar selectivamente, ya que siempre se podrá adaptar.

Para poder probar este dispositivo, el mismo se instaló dentro de un el cassette del equipo Lumex Capel 105M (posee termostatación interna por agua), este se ubicó exactamente después del MBT (el cual estaba muy próximo a la entrada) para solo utilizar un solo ILC. Estos dos estaban colocados prácticamente en contacto pero separados por un papel secante que sirve para aislar las T que cada uno regula y además verificar la ausencia de fugas de líquido a través de las septas que el capilar atraviesa. Una vez presentado el sistema, el MBT se conectó a un baño termostático y el ILC al sistema del instrumento. Mientras que la T del MBT se mantuvo a 20 °C la del sistema se evaluó entre un rango entre 5 y 90 °C, y en sentido inverso se mantuvo constante la T del sistema y se varió en el mismo rango las T del MBT. Al no haber modificaciones en las T del sistema se logró demostrar la independencia entre los sistemas de termostatación. Además, se evidenció que debido a la inclusión de una pieza de metal dentro del cassette la velocidad a la que alcanzaba la T el sistema comercial sufría un pequeño retraso. Esto puede ser adjudicado a que la gran capacidad calorífica de la pieza de metal está modificando el entorno a termostatar, y cuanto más se agudiza la diferencia de T entre MBT y sistema más tiempo tarda en alcanzar la T de equilibrio que se desea. Sin embargo, estos tiempos no representaron ningún inconveniente experimental ya que en las situaciones más adversas los tiempos de retraso estaban en el orden de los 2 minutos.

El sistema colocado en el cassette del equipo comercial de CE Agilent puede ser observado en las fotografías de la fig.6.6. En la fotografía superior se puede visualizar las dimensiones del MBT y como se inserta dentro del cassette mientras que en la imagen inferior se puede observar el instrumento visto exteriormente, donde se puede ver la cubierta modificada y las mangueras hacia el baño termostático. Debido a la capacidad calorífica de la pieza de metal insertada en el cassette, la velocidad a la cual se alcanza la T final deseada es muy grande ya que la pieza toma la T circulante casi de manera inmediata. Esto genera como desventaja que el sistema que termostata el capilar tarde un poco más de tiempo mantener o alcanzar la T deseada debido a que la pieza se va a

encontrar a una T distinta y por ende se encontrará disipando calor dentro del cassette. A fines prácticos, simplemente se exige solo un poco más al sistema de termostatación comercial.

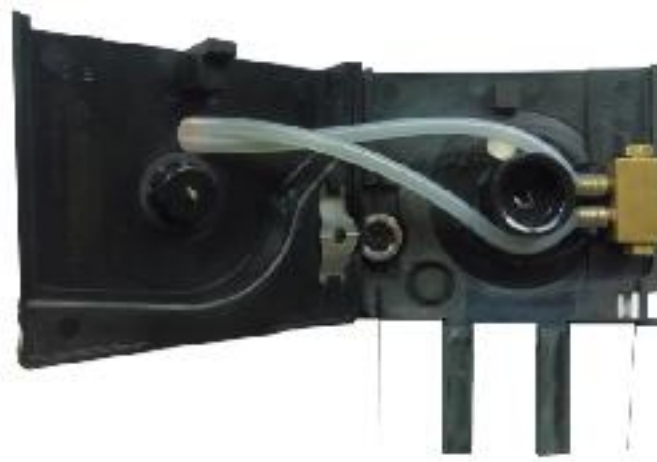
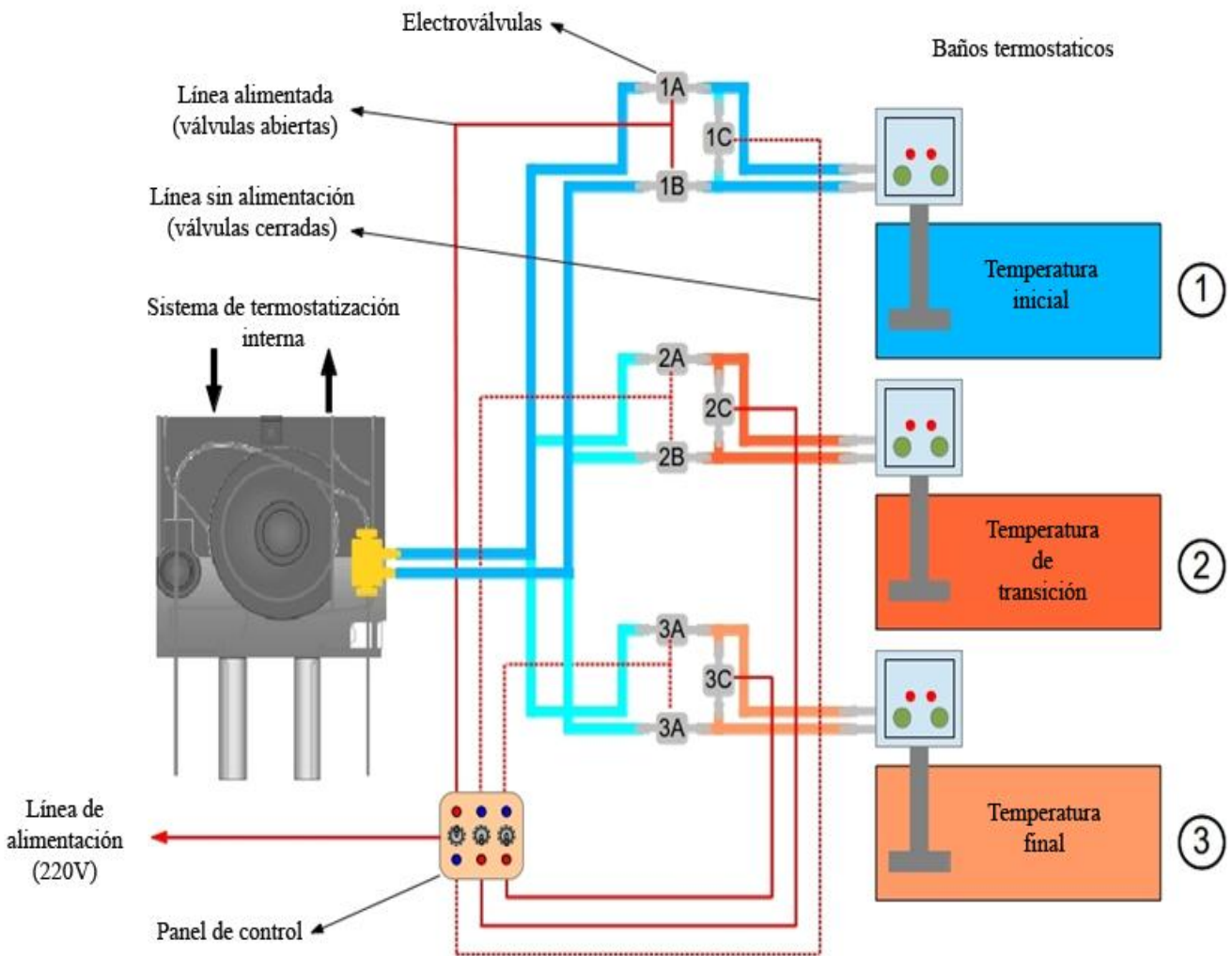


Fig. 6.6. Fotografías de cassette comercial con el MBT instalado (superior) y cubierta del equipo con el circuito de termostatación instalado (inferior).

El circuito externo de termostatación consta de tres baños termostáticos conectados a la entrada y a la salida del MBT. En el esquema de la figura 6.7 se puede observar las conexiones tanto de agua, como las electroválvulas y el circuito eléctrico. Por cada baño termostático, existen tres electroválvulas controladas por un selector de tres puntos. Ya que este tipo de válvulas se encuentran abiertas cuando circula corriente a través de ellas, el interruptor abierto indica que las válvulas A y B se encuentran abiertas y por lo tanto, la circulación de agua a través del MBT se efectúa, mientras que la válvula C de recirculado de fluido se encuentra apagada (sin circulación de corriente). Caso contrario, cuando el interruptor es cambiado hacia la otra posición, las válvulas A y B no reciben

corriente y estas se cierran mientras que la válvula C se abre y permite el recirculado del fluido.



6.7. Esquema del sistema de termostatización.

En el esquema de la figura 6.7 las líneas rojas representan el circuito eléctrico, en las cuales las continuas representan las líneas alimentadas mientras que las discontinuas representan las líneas que no están alimentadas. La condición específica que se observa es en la que el baño termostático 1 posee las válvulas A y B abiertas, por lo tanto el líquido a una T determinada se encuentra circulando a través del MBT y la válvula C de recirculación se encuentra cerrada. En consecuencia la T del mismo está regulada por el baño número 1. Los baños número 2 y 3 poseen abiertas las válvulas C de recirculación (2C y 3C respectivamente), mientras que las válvulas A y B se encuentran cerradas (2A, 2B, 3A y 3B respectivamente), por ende no tienen influencia alguna sobre el dispositivo.

Debido a que la transferencia de calor depende principalmente de dos factores, -1- la convección forzada del MBT y, -2- la diferencia de T entre las zonas calientes y las frías, tres baños termostáticos son utilizados en el circuito para aumentar la velocidad de cambio de T.

Dos baños controlan las T inicial y final del experimento (baño inicial o BI, y baño final o BF, respectivamente), mientras que el tercero es el utilizado como baño de transición (o BT), el cual es usado para acelerar la transferencia de calor y de esta forma aumentar la velocidad de cambio de T entre dos estados distintos. En los experimentos que involucran un aumento de T el BT es establecido a una T mayor que el BF, mientras en los casos en los que se necesita un descenso de T (BF a menor T que BI), el BT está fijado a una T menor a la de BF. Dado que la T del BT excede a la final, una vez que el MBT alcanza la T deseada de forma más rápida, se cambia al BF para poder mantener la T deseada inicialmente, la cual fue alcanzada de una manera mucho más rápida.

A modo de ejemplo, para un experimento en el cual quiero modificar la T desde 5°C hasta 90°C el BT debería estar fijado a una T de aproximadamente 99.3°C. En este caso el tiempo de cambio de T fue de 26 segundos. Estas medidas fueron realizadas con una termocupla calibrada insertada dentro del microcartucho. Experimentalmente la T del BF fue de 92.7°C por razones anteriormente mencionadas, y la T alcanzada fue de 90 °C \pm 1 °C. De manera similar, el cambio inverso de T, es decir de 90°C a 5 °C demoró 32 segundos.

Considerando las pérdidas de calor que sufre el fluido desde que sale del baño termostático hasta que alcanza el MBT, la T alcanzada dentro del dispositivo debe ser calibrada de acuerdo a la T del baño. Por este motivo, el MBT fue montado dentro del cassette con un microcartucho de prueba para emular la restricción del flujo dentro del mismo y manteniendo la convección forzada de aire a las mismas condiciones que es usada en los experimentos. Colocando una termocupla en el lugar donde debería ir el capilar dentro del MBT se procedió a calibrar el sistema para las distintas T y saltos de T empleados.

6.2.3.2. Desarrollo de un microcartucho resistente a altas temperaturas

La construcción de un microcartucho con partículas de C18 como sorbente y dos fritas en los extremos (7 mm L_T \times 250 μ m id \times 365 μ m od) dentro de un capilar de separación de sílice (57 cm L_T \times 50 cm L_D \times 75 μ m id \times 365 μ m od) fue similar al anteriormente mencionado con algunas modificaciones para que logre resistir de forma robusta las altas T de trabajo [58]. La configuración resultante, después de realizar ensayos de repetitividad, reproducibilidad y robustez de la construcción, empleaba tubos de Tygon® como conectores entre el microcartucho y el capilar de separación, pero esta vez cubierto de una fina capa de un pegamento epóxico (Araldit®), como

sellador, confiriéndole de esta forma al preconcentrador, una excelente resistencia mecánica, química, térmica y eléctrica.

6.2.3.3. Estudio de la temperatura sobre SPE-CE de péptidos empleando el sistema de termostatación de cartuchos de alta eficiencia MBT

Se estudió sistemáticamente el efecto de la T del microcartucho durante la introducción de muestra en un intervalo de entre 5°C y 90°C, mientras que el resto del capilar se mantuvo a 25°C. Luego, paso seguido, durante la etapa de lavado/elución/ separación la T de todo el sistema (microcartucho + capilar de separación) fue llevado a 25°C.

La figura 6.7 muestra un gráfico de A_c para el análisis de una solución conteniendo los tres péptidos opiáceos en concentraciones de 10 ng/mL en función de la T del microcartucho durante el período de introducción de muestra.

Consistentemente con las hipótesis planteadas en la sección anterior, donde el A_c de la END se incrementaba con la T cuando se introducía la muestra a 60°C, ahora este incremento se extiende para todos péptidos estudiados. Pero además, la posibilidad de extender los estudios a mayores T permite ver que la situación obtenida para 60°C era un máximo y no un punto intermedio de una tendencia siempre ascendente. De hecho, en la figura 6.8 se puede observar que cuando se carga la muestra con el microcartucho termostatación a T superiores a 60°C la capacidad de preconcentración disminuye a medida que la T aumenta llegando a la mínima capacidad de preconcentración a 90°C que es la máxima T estudiada.

En esta instancia podría surgir la idea de que a T elevadas los péptidos se degraden. Sin embargo, los ensayos de estabilidad comparando las áreas de pico para los péptidos antes y después de incubarlos durante 30 minutos a 95°C en un baño de agua, demostraron excelente estabilidad por lo tanto esta posibilidad fue descartada. Los resultados observados en la figura 6.8 en donde las dependencias de la capacidad de concentración con la T no muestran una tendencia monótona, sino que poseen un máximo a una cierta T intermedia, prueba que la T de carga puede mejorar la concentración y por ende los límites de detección, pero la T ideal debe ser experimentalmente determinada para cada caso específico. El hecho de que a T muy bajas (5°C) se observe un pequeño incremento de A_c en comparación con la condición de 25°C, le da más fuerza a la hipótesis de que la retención y la elución están dominadas por mecanismos complejos.

El comportamiento observado aquí concuerda con los resultados obtenidos por A. W. Purcell y

coautores [244–247] que reportaron efectos similares de la T en la retención de péptidos en cromatografía de líquidos basándose en los cambios de conformación e hidrofobicidad de los mismos. Considerando los replicados que se realizaron se puede resaltar que la repetitividad fue excelente a cualquiera de las T de trabajo. Mucho más, los replicados realizados para distintos capilares de SPE-CE-UV, lo cual confirma la fiabilidad del control de la T del microcartucho así como la durabilidad de los mismos trabajando en condiciones de altas T. Incluso después de 15 inyecciones a altas T, no hubo evidencias de pérdidas en la sensibilidad del método o inestabilidades en la corriente. Estos valores fueron similares a aquellos observados a T ambiente (25 °C).

En la figura 6.9 se puede observar los electroferogramas obtenidos de una solución estándar de los tres péptidos a una concentración de 10 ng/mL cada uno (A) y de plasma humano fortificado con 100 ng/mL de cada uno (B) empleando como T de introducción de muestra de 25°C y de 60°C.

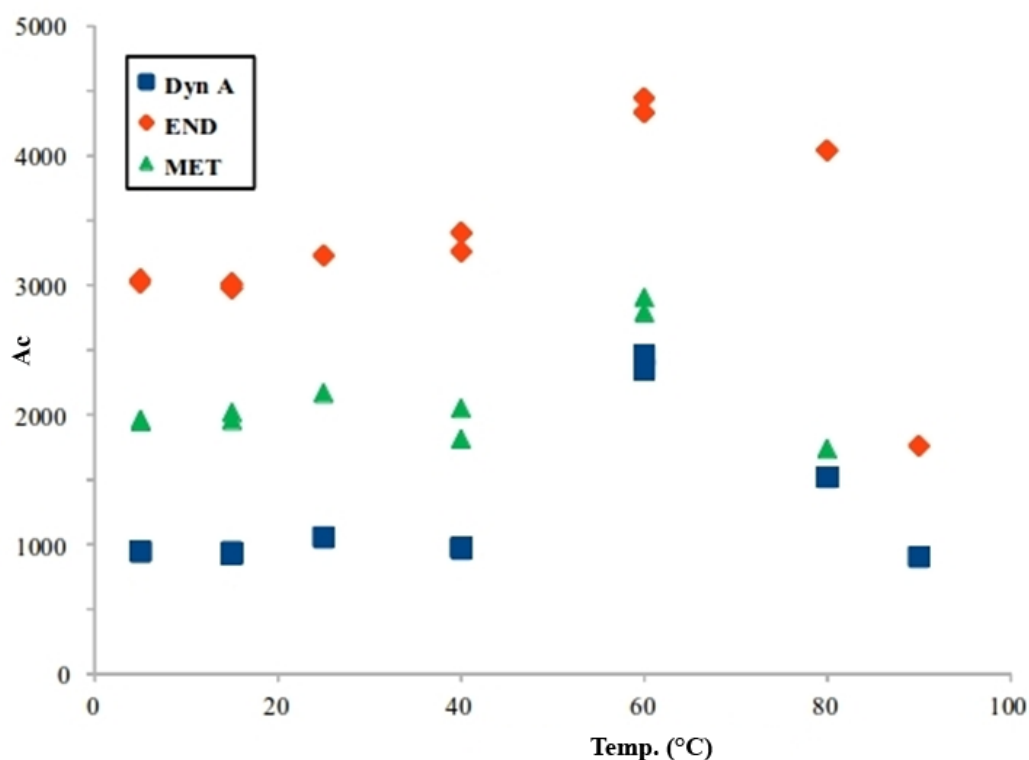


Fig. 6.8. Gráfico de área corregida de los picos en función de la temperatura de introducción de muestra utilizando el MBT.

Analizando las mezclas estándar las A_c resultaron incrementadas en un 150%, 37% y 35% para Dyn A, END y MET, respectivamente, mientras que en el caso del plasma fortificado, resultaron en un

incremento del 29%, 46% y 27% para Dyn A, END y MET, respectivamente. Estos incrementos pueden ser traducidos en una mejora en los LOD de hasta casi tres veces en el caso de Dyn A en la muestra de estándar. Cabe notar que las diferencias en las alturas relativas de los picos entre los electroferogramas de la solución estándar y las muestras de plasma (Figura 6.9-A vs Figura 6.9-B) puede ser explicada en base a los factores de recuperación. Esto se debe al pretratamiento de filtrado con membrana de corte molecular realizado a la muestra de plasma, el cual sea probablemente el que esté afectando las recuperaciones, especialmente al péptido Dyn A (23%)[226].

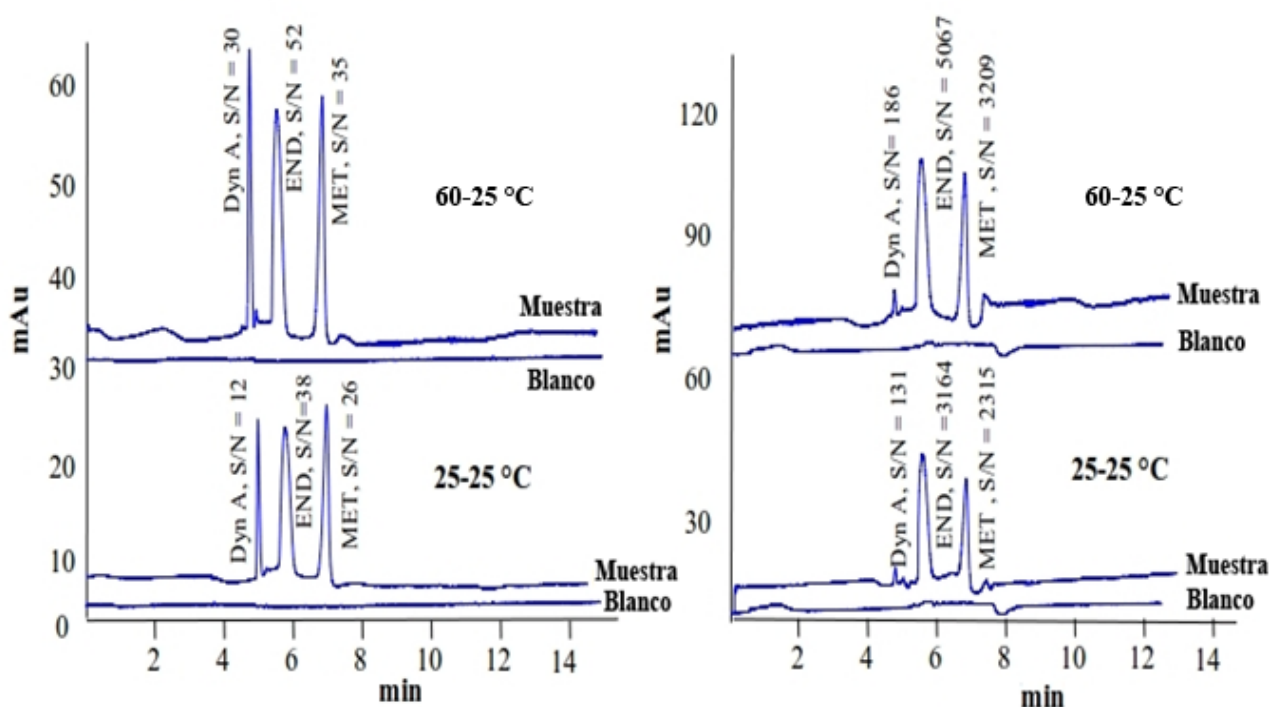


Fig. 6.9. SPE-CE-UV de mezclas estándar de los tres péptidos a una concentración de 0.01 μ g/mL de cada uno a 25-60 $^{\circ}$ C y 25-25 $^{\circ}$ C y B- de muestras de plasma fortificados a 0.01 μ g/mL de cada péptido a 25-60 $^{\circ}$ C y 25-25 $^{\circ}$ C.

Una vez sistematizado el estudio de la T se realizó el procedimiento sobre tres compuestos representativos de la mezcla de β -carbolinas: harmalina, harmina y norharmano. Además, otro criterio de selección se fundó en que por más que exista una pérdida de eficiencia debido al análisis por SPE-CE, los mismos se encontrarían siempre completamente separados y no habría influencia en las medidas a diferentes T.

Los mismos fueron preconcentrados en línea utilizando la fase estacionaria C18 y las condiciones de separación utilizadas anteriormente. Las medidas de área y tiempos de migración fueron tomadas al

igual que para los péptidos por duplicado para dos preconcentradores independientes para obtener a su vez valores de reproducibilidad. Las áreas fueron corregidas por el tiempo de migración y todos los volúmenes fueron corregidos hidrodinámicamente con el objetivo de siempre inyectar la misma cantidad ya sea de analito como de solventes.

En la figura 6.10 se puede observar un gráfico de las A_c obtenidas para tres de las β -carbolinas estudiadas previamente en función de las T de introducción de muestra, análogo al que se realizó para los péptidos. En este caso y, a diferencia del anterior, no se pueden evidenciar cambios sustanciales o tendencias en la capacidad de concentración de estos compuestos.

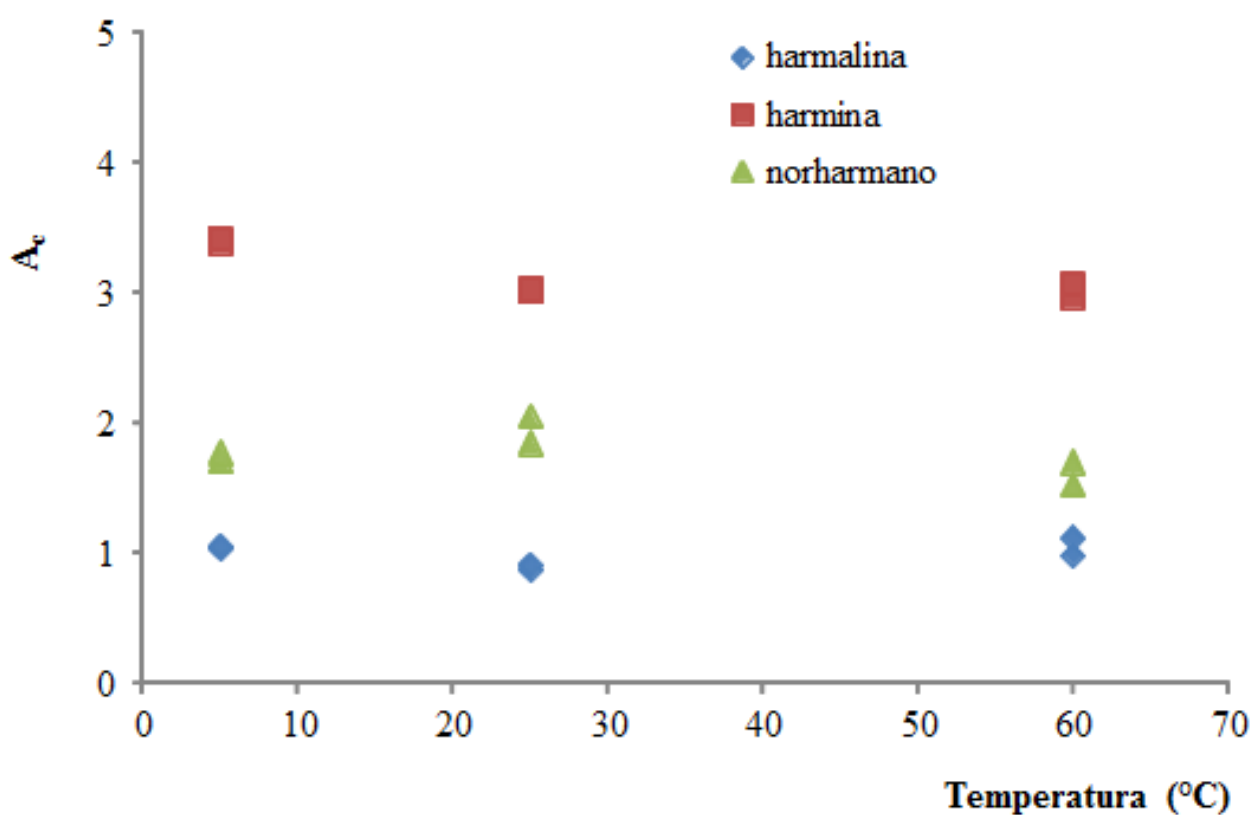


Fig. 6.10. Gráfico de áreas corregidas para distintas T de introducción de muestra para tres de los seis alcaloides. Introducción de muestra 10 min a 930 mbar, lavado 2 min a 930 mbar con BGE, eluyente de 60:40 % (v/v) metanol : agua (50mM ácido fórmico y ácido acético 50 mM), 50 mbar x 30 s. BGE acetato de amonio 20 mM pH 7.8 a 25 kV y 25°C. Detección a 254 nm. Post-acondicionamiento de 2 minutos de acetonitrilo seguido de 2 minutos de agua ambos a 930 mbar.

En el futuro, otros sorbentes y otros analitos serán evaluados, específicamente aquellos en los que sus mecanismos de retención estén dominados por valores de entalpías grandes, como mecanismos de adsorción o ácido-base. Además, la influencia de la T puede ser estudiada en otras aplicaciones

que implican el acoplamiento en línea de distintos microcartuchos (reactores químicos o enzimáticos, membranas de filtración, etc.) a la electroforesis capilar que resultarían fácilmente aplicables.

6.3. Conclusiones parciales

- Se estudió la influencia de la T en CE-UV para un grupo de péptidos opiáceos utilizando la termostatización interna del instrumento comercial.
- Además, con el mismo sistema de termostatización interno se evaluaron los métodos SPE-CE-UV isotérmicamente y a T combinadas para la introducción de muestra y elución-separación. Los mejores factores de preconcentración cuando la muestra era introducida a una T de 60°C y la elución y separación a 25°C. Sin embargo, las limitaciones de la termostatización interna en cuanto a la velocidad con la que se modificaba y regulaba la T eran grandes además de la imposibilidad de cambiar la T de forma localizada en la zona que se desea estudiar.
- Se diseñó y fabricó un mini baño termostático (MBT) unido a tres baños termostáticos externos el cual permite termostatar zonas localizadas (alrededor de 1 cm) del cassette. Además mediante un sistema de electroválvulas se optimizaron los cambios de T llegando en pocos segundos a modificar y mantener la T del preconcentrador de 5 a 95 °C.
- Con este sistema se logró estudiar de una forma más eficiente y rápida, eliminando tiempos muertos donde se propicia el ensanchamiento de banda, las T de introducción de muestra obteniendo el mejor factor de preconcentración a 60 °C para los tres péptidos.
- Se aplicó el método en las condiciones óptimas a muestras de plasma fortificadas con estos péptidos observando mejoras respecto a el método a 25°C pero no tan grandes como las evidenciadas en mezclas estándar introduciendo la muestra a 60°C.

7. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo, se desprenden las siguientes conclusiones:

- Se definió un nuevo parámetro para caracterizar la separación electroforética de pares de analitos. El mismo puede utilizarse como Criterio Elemental para optimizar separaciones. Siguiendo la línea de razonamiento se estableció el criterio para componer una función para caracterizar la calidad de la separación de un número mayor de analitos. Estas funciones resultan superadoras respecto de los criterios anteriores, y su aplicabilidad es demostrada en la optimización de 6 analitos muy similares entre sí en función el pH.
- En base a la optimización del pH anterior se desarrolló un método para el análisis de los 6 alcaloides β -carbolínicos por CE-UV. El mismo fue validado para tres instrumentos comerciales diferentes. Luego se aplicó a muestras de alga *Undaria pinnatifida*, en el cual los LODs del método resultaron insuficientes para detectar a estos compuestos, y a semillas de *Peganum harmala*, donde se detectaron y cuantificaron harmalina, harmina y harmol.
- Se compatibilizó el método CE-UV con la detección por MS con el fin de utilizar un detector más selectivo y sensible. Se desarrolló un método de extracción de alcaloides en muestras de algas. El mismo consistió en una extracción en medio hidroorgánico ácido seguida de una ultra-filtración con filtros de corte molecular de 3 kDa. Del mismo se obtuvieron excelentes recuperaciones con valores mayores al 95% en todos los casos. El método completo fue validado tanto para soluciones patrón como para las muestras de algas. Se analizaron muestras de *Undaria pinnatifida* de tres marcas comerciales diferentes extraídas dos de la costa de Galicia (España) mientras que la tercera pertenecía a la costa de Bretaña (Francia). Se detectaron en las tres muestras harmalol, mientras que a niveles cercanos al límite de cuantificación se detectaron harmina y harmalina en los productos provenientes de las costas de Galicia.
- Se diseñó un método SPE-CE-UV y SPE-CE-TOF-MS. Éste último fue validado en términos de su recta de calibración externa, repetitividad y reproducibilidad. Luego se aplicó a muestras de *Undaria pinnatifida* (Bretaña, Francia) donde solo se detectó harmano en el orden de los pg/mL. El harmalol, presente en las muestras, no pudo ser detectado debido a que en presencia de la matriz, éste no poseía retención alguna. Esto se evidenció por medio

de la comparación de extractos de alga fortificados con los alcaloides y sin fortificar.

- Se diseñó y maquinó un mini baño termostático para modificar la T de una zona localizada de alrededor de 6 mm del capilar, el cual puede ser implementado a cualquier tipo de cassette comercial. El mismo fue utilizado con el fin de estudiar los efectos de la T en SPE-CE-UV tanto para un grupo de péptidos opiáceos así como para los alcaloides anteriormente estudiados. Se obtuvieron resultados significativos en el caso de los péptidos mejorando los factores de preconcentración en hasta un 200%, respecto a SPE-CE-UV a T ambiente, simplemente por el cambio de T. Este estudio se extendió a muestras reales donde se verificaron los resultados en plasma humano fortificado con los péptidos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Hjerten, Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.* 9 (1967).
- [2] F.E.P.; Mikkers, F.M.; Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, High-performance zone electrophoresis, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 11–20.
- [3] R. Virtanen, Zone electrophoresis in a narrow-bore tube employing potentiometric detection-Theoretical and experimental study, *Acta Polytech. Scand.* 123 (1974) 1.
- [4] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298–1302.
- [5] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, *J. Chromatogr. A.* 218 (1981) 209–216.
- [6] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: Preliminary data on performance, *J. Sep. Sci.* 4 (1981) 230–231.
- [7] S. Hjerten, M.D. Zhu, Micropreparative version of high-performance electrophoresis : The electrophoretic counterpart of narrow-bore high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 327 (1985) 157–164.
- [8] S. Hjerten, M.D. Zhu, Analytical and micropreparative high-performance electrophoresis, *Protides Biol. Fluids.* 33 (1985) 537–540.
- [9] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111–113.
- [10] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, Band broadening in electrokinetic chromatography with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.* 61 (1989) 251–260.
- [11] K. Otsuka, S. Terabe, Effects of pH on electrokinetic velocities in micellar electrokinetic chromatography, *J. Microcolumn Sep.* 1 (1989) 150–154.
- [12] M.M. Bushey, J.W. Jorgenson, Effects of methanol-modified mobile phase on the separation of isotopically substituted compounds by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Microcolumn Sep.* 1 (1989) 125–130.
- [13] Y.Y. Rawjee, D.U. Staerk, G. Vigh, Capillary electrophoretic chiral separations with cyclodextrin additives I . Acids : chiral selectivity as a function of pH and the concentration of p-cyclodextrin for fenoprofen and ibuprofen, *J. Chromatogr.* 635 (1993) 291–306.
- [14] D. Snyder, Kirkland, Introduction to modern liquid chromatography, 3rd editio, Wiley, 2010.
- [15] S. Hjerten, M.D. Zhu, Adaptation of the equipment for high-performance electrophoresis to isoelectric focusing, *J. Chromatogr. A.* 346 (1985) 265–270.
- [16] S. Hjerten, J. Liao, K. Yao, Theoretical and experimental study of high-performance electrophoretic mobilization of isoelectrically focused protein zones, *J. Chromatogr. A.* 387 (1987) 127–138.

- [17] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis, *Electrophoresis*. 32 (2011) 116–26.
- [18] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Sorbent preconcentration procedures coupled to capillary electrophoresis for environmental and biological applications., *Anal. Chim. Acta*. 616 (2008) 1–18.
- [19] M.. Carneiro, L. Puignou, M.. Galceran, Comparison of silica and porous graphitic carbon as solid-phase extraction materials for the analysis of cationic herbicides in water by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta*. 408 (2000) 263–269.
- [20] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water., *J. Chromatogr. A*. 946 (2002) 275–82.
- [21] E. Teixidó, O. Núñez, F.J. Santos, M.T. Galceran, 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography, *Food Chem*. 126 (2011) 1902–1908.
- [22] D. Martínez, M.J. Cugat, F. Borrull, M. Calull, Solid-phase extraction coupling to capillary electrophoresis with emphasis on environmental analysis., *J. Chromatogr. A*. 902 (2000) 65–89.
- [23] R. Ramautar, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2009-2011., *Electrophoresis*. 33 (2012) 243–50.
- [24] J.R. Veraart, H. Lingeman, U. a Brinkman, Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A*. 856 (1999) 483–514.
- [25] D. Osbourn, D. Weiss, C. Lunte, On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 21 (2000) 2768–2779.
- [26] P. Britz-McKibbin, S. Terabe, On-line preconcentration strategies for trace analysis of metabolites by capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A*. 1000 (2003) 917–34.
- [27] S.L. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe, On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications., *J. Chromatogr. A*. 1184 (2008) 504–41.
- [28] C. Schwer, B. Gas, F. Lottspeich, E. Kenndler, Computer simulation and experimental evaluation of on-column sample preconcentration in capillary zone electrophoresis by discontinuous buffer systems, *Anal. Chem*. 65 (1993) 2108–2115.
- [29] J.L. Beckers, P. Boc, Review Sample stacking in capillary zone electrophoresis : Principles , advantages and limitations CE and CEC, (2000).
- [30] P. Gebauer, P. Boc, Review Recent progress in capillary isotachopheresis CE and CEC, (2000) 3898–3904.

- [31] F. Foret, K. Klepárník, P. Gebauer, P. Boček, Ionic boundaries in biological capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1053 (2004) 43–57.
- [32] Z.K. Shihabi, Transient pseudo-isotachopheresis for sample concentration in capillary electrophoresis., *Electrophoresis.* 23 (2002) 1612–7.
- [33] Z.K. Shihabi, Direct injection of organic solvent extracts for capillary electrophoresis., *Electrophoresis.* 29 (2008) 1672–5.
- [34] Z.K. Shihabi, Enhanced detection in capillary electrophoresis: example determination of serum mycophenolic acid., *Electrophoresis.* 30 (2009) 1516–21.
- [35] P. Britz-McKibbin, D.D. Chen, Selective focusing of catecholamines and weakly acidic compounds by capillary electrophoresis using a dynamic pH junction., *Anal. Chem.* 72 (2000) 1242–52.
- [36] P. Britz-McKibbin, G.M. Bebault, D.D. Chen, Velocity-difference induced focusing of nucleotides in capillary electrophoresis with a dynamic pH junction., *Anal. Chem.* 72 (2000) 1729–35.
- [37] R. Aebbersold, H.D. Morrison, Analysis of dilute peptide samples by capillary zone electrophoresis., *J. Chromatogr.* 516 (1990) 79–88.
- [38] J.P. Quirino, Exceeding 5000-Fold Concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography, *Science (80-.)*. 282 (1998) 465–468.
- [39] Y. Sera, N. Matsubara, K. Otsuka, S. Terabe, Sweeping on a microchip: concentration profiles of the focused zone in micellar electrokinetic chromatography., *Electrophoresis.* 22 (2001) 3509–13.
- [40] F. Kitagawa, T. Tsuneka, Y. Akimoto, K. Sueyoshi, K. Uchiyama, A. Hattori, et al., Toward million-fold sensitivity enhancement by sweeping in capillary electrophoresis combined with thermal lens microscopic detection using an interface chip., *J. Chromatogr. A.* 1106 (2006) 36–42.
- [41] J.P. Quirino, S. Terabe, Sweeping of Analyte Zones in Electrokinetic Chromatography, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1638–1644.
- [42] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, S. Jameson, S. Naylor, Rapid loading of large sample volumes, analyte cleanup, and modified moving boundary transient isotachopheresis conditions for membrane preconcentration-capillary electrophoresis in small diameter capillaries., *Electrophoresis.* 17 (1996) 1801–7.
- [43] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Recent developments in coupled SPE-CE., *Electrophoresis.* 31 (2010) 44–54.
- [44] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Design and applications of coupled SPE-CE., *Electrophoresis.* 29 (2008) 108–28.

- [45] N.A. Guzman, R.E. Majors, New Directions for Concentration Sensitivity Enhancement in CE and Microchip Technology, *LC-GC Eur.* 19 (2001) 14.
- [46] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N. a Guzman, Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1140 (2007) 205–12.
- [47] Y.H. Tak, J.S. Toraño, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Optimization of in-line fritless solid-phase extraction for capillary electrophoresis-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1267 (2012) 138–43.
- [48] S. Medina-Casanellas, E. Domínguez-Vega, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Low-picomolar analysis of peptides by on-line coupling of fritless solid-phase extraction to sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1328 (2014) 1–6.
- [49] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS, *Electrophoresis.* 28 (2007) 3957–65.
- [50] I. Majjó, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, An in-line SPE strategy to enhance sensitivity in CE for the determination of pharmaceutical compounds in river water samples., *Electrophoresis.* 32 (2011) 2114–22.
- [51] J.S. Fritz, *Analytical solid-phase extraction*, Willey int, New york, 1999.
- [52] W. J.D., *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry : CHEMICAL ANALYSIS*, willey int, Ney york, 2003.
- [53] K. Goss, Ä.P. Schwarzenbach, Linear Free Energy Relationships Used To Evaluate Equilibrium Partitioning of Organic Compounds, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 1–9.
- [54] M.C. Hennion, Graphitized carbons for solid-phase extraction., *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 73–95.
- [55] C.F. Poole, New trends in solid-phase extraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362–373.
- [56] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Evaluation of on-line solid phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of neuropeptides in human plasma., *Electrophoresis.* 29 (2008) 3366–76.
- [57] G. Morales-Cid, S. Cárdenas, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Fully automatic sample treatment by integration of microextraction by packed sorbents into commercial capillary electrophoresis-mass spectrometry equipment: application to the determination of fluoroquinolones in urine., *Anal. Chem.* 81 (2009) 3188–93.
- [58] F. Benavente, S. Medina-Casanellas, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1294–304.

- [59] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Transient isotachopheresis in on-line solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry for peptide analysis in human plasma., *Electrophoresis*. 32 (2011) 1750–9.
- [60] T.D. Mai, B. Bomastyk, H.A. Duong, H.V. Pham, P.C. Hauser, Automated capillary electrophoresis with on-line preconcentration by solid phase extraction using a sequential injection manifold and contactless conductivity detection., *Anal. Chim. Acta*. 727 (2012) 1–7.
- [61] K. Jooß, J. Sommer, S.-C. Bunz, C. Neusüß, In-line SPE-CE using a fritless bead string design--application for the analysis of organic sulfonates including inline SPE-CE-MS for APTS-labeled glycans., *Electrophoresis*. 35 (2014) 1236–43.
- [62] E. Rohde, A.J. Tomlinson, D.H. Johnson, S. Naylor, Comparison of protein mixtures in aqueous humor by membrane preconcentration - capillary electrophoresis - mass spectrometry., *Electrophoresis*. 19 (1998) 2361–70.
- [63] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, C. Neusüss, F. Alés-Barrero, Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 3372–9.
- [64] I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, In-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for determination of drugs of abuse in human urine., *Anal. Bioanal. Chem*. 403 (2012) 777–84.
- [65] L. Arce, P. Kuban, A. Ríos, M. Valcarcel, B. Karlber, On-line ion-exchange preconcentration in a $\bar{\tau}$ ow injection system coupled to capillary electrophoresis for the direct determination of UV absorbing anions, *Anal. Chim. Acta*. 390 (1999) 39–44.
- [66] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, J.M. Bosque-Sendra, In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction., *Electrophoresis*. 29 (2008) 2117–25.
- [67] I. Maijó, N. Fontanals, F. Borrull, C. Neusüß, M. Calull, C. Aguilar, Determination of UV filters in river water samples by in-line SPE-CE-MS., *Electrophoresis*. 34 (2013) 374–82.
- [68] F. Svec, Less common applications of monoliths: preconcentration and solid-phase extraction., *J. Chromatogr. B*. 841 (2006) 52–64.
- [69] P. Chaisuwan, D. Nacapricha, P. Wilairat, Z. Jiang, N. William Smith, Monolithic and packed particle materials for in-line pre-concentration in capillary electrophoresis for 4-hydroxy-3-methoxy-methamphetamine and terbutaline., *Electrophoresis*. 29 (2008) 4008–16.
- [70] J.R.E. Thabano, M.C. Breadmore, J.P. Hutchinson, C. Johns, P.R. Haddad, Selective extraction and elution of weak bases by in-line solid-phase extraction capillary electrophoresis using a pH step gradient and a weak cation-exchange monolith., *Analyst*. 133 (2008) 1380–7.

- [71] J.R.E. Thabano, M.C. Breadmore, J.P. Hutchinson, C. Johns, P.R. Haddad, Silica nanoparticle-templated methacrylic acid monoliths for in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis of basic analytes., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4933–40.
- [72] E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Alvarez, L. Ruano-Miguel, R. Carabias-Martínez, In-capillary preconcentration of pirimicarb and carbendazim with a monolithic polymeric sorbent prior to separation by CZE., *Electrophoresis.* 29 (2008) 4066–77.
- [73] E. Rodríguez-Gonzalo, L. Ruano-Miguel, R. Carabias-Martínez, In-capillary microextraction using monolithic polymers: application to preconcentration of carbamate pesticides prior to their separation by MEKC., *Electrophoresis.* 30 (2009) 1913–22.
- [74] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Role of carbon nanotubes in analytical science., *Anal. Chem.* 79 (2007) 4788–97.
- [75] H. Wang, G. Knobel, W.B. Wilson, K. Calimag-Williams, A.D. Campiglia, Gold nanoparticles deposited capillaries for in-capillary microextraction capillary zone electrophoresis of monohydroxy-polycyclic aromatic hydrocarbons., *Electrophoresis.* 32 (2011) 720–7.
- [76] N.A. Guzman, T.M. Phillips, Immunoaffinity capillary electrophoresis: a new versatile tool for determining protein biomarkers in inflammatory processes., *Electrophoresis.* 32 (2011) 1565–78.
- [77] F. Lampreave, M.A. Alava, A. Piñeiro, Developments in lectin affinity immunoelectrophoresis of serum glycoproteins, *TrAC Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 122–129.
- [78] Y. Yoshimoto, A. Shibukawa, H. Sasagawa, S. Nitta, T. Nakagawa, Michaelis-Menten analysis of immobilized enzyme by affinity capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 483–488.
- [79] V. Kasicka, Z. Prusík, Isotachophoretic electrodesorption of proteins from an affinity adsorbent on a microscale, *J. Chromatogr.* 273 (1983) 117–128.
- [80] J.P.A. A. Guzman, M.A. Trebilcock, The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass spectrometry, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 997.
- [81] L.J. Cole, R.T. Kennedy, Selective preconcentration for capillary zone electrophoresis using protein G immunoaffinity capillary chromatography., *Electrophoresis.* 16 (1995) 549–56.
- [82] N.A. Guzman, Biomedical Applications of On-Line Preconcentration-Capillary Electrophoresis Using an Analyte Concentrator: Investigation of Design Options, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 3751.
- [83] F. Benavente, E. Hernández, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Determination of human erythropoietin by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis: a preliminary report., *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2633–9.

- [84] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein digests by immunoaffinity capillary electrophoresis-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2574–82.
- [85] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry., *Anal. Chim. Acta.* 717 (2012) 134–42.
- [86] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent with Fab' antibody fragments for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry., *Anal. Chim. Acta.* 789 (2013) 91–9.
- [87] N.A. Guzman, Improved solid-phase microextraction device for use in on-line immunoaffinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis.* 24 (2003) 3718–27.
- [88] N.A. Guzman, T.M. Phillips, Immunoaffinity CE for Proteomics Studies, *Anal. Chem.* 77 (2005) 60 A–67 A.
- [89] F.J. Lara, F. Lynen, P. Sandra, A.M. García-Campaña, F. Alés-Barrero, Evaluation of a molecularly imprinted polymer as in-line concentrator in capillary electrophoresis., *Electrophoresis.* 29 (2008) 3834–41.
- [90] J.B. Fenn, Ion Formation from Charged Droplets : Roles of geometry, energy and time, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 4 (1993) 524–525.
- [91] M.G. Khaledi, High performance capillary electrophoresis. Theory, techniques and applications, in: J.D. Winefordner (Ed.), Wiley inte, New York, 1998: p. 53.
- [92] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications., *Electrophoresis.* 24 (2003) 3837–67.
- [93] P. Hommerson, A.M. Khan, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application., *Mass Spectrom. Rev.* 30 1096–120.
- [94] R.D.. Smith, C.J.. Barinaga, H.R. Udseth, Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry., *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948–1952.
- [95] F.E. Ahmed, The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery., *J. Chromatogr. B.* 877 (2009) 1963–81.
- [96] M. Herrero, E. Ibañez, A. Cifuentes, Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics., *Electrophoresis.* 29 (2008) 2148–60.

- [97] R. Ramautar, A.A.M. Heemskerk, P.J. Hensbergen, A.M. Deelder, J.-M. Busnel, O.A. Mayboroda, CE-MS for proteomics: Advances in interface development and application., *J. Proteomics*. 75 (2012) 3814–28.
- [98] C.W. Klampfl, CE with MS detection: a rapidly developing hyphenated technique., *Electrophoresis*. 30 Suppl 1 (2009) S83–91.
- [99] H.J. Issaq, G.M. Janini, K.C. Chan, T.D. Veenstra, Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis–mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*. 1053 (2004) 37–42.
- [100] A.D. Zamfir, Recent advances in sheathless interfacing of capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry., *J. Chromatogr. A*. 1159 (2007) 2–13.
- [101] F. Benavente, R. van der Heijden, U.R. Tjaden, J. van der Greef, T. Hankemeier, Metabolite profiling of human urine by CE-ESI-MS using separation electrolytes at low pH., *Electrophoresis*. 27 (2006) 4570–84.
- [102] M. Moini, Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip., *Anal. Chem*. 79 (2007) 4241–6.
- [103] G. Bonvin, J.-L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler, Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling., *Electrophoresis*. 33 (2012) 552–62.
- [104] K. Faserl, B. Sarg, L. Kremser, H. Lindner, Optimization and evaluation of a sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry platform for peptide analysis: comparison to liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry., *Anal. Chem*. 83 (2011) 7297–305.
- [105] R. Haselberg, C.K. Ratnayake, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins., *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 7605–11.
- [106] R. Haselberg, S. Harmsen, M.E.M. Dolman, G.J. de Jong, R.J. Kok, G.W. Somsen, Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry., *Anal. Chim. Acta*. 698 (2011) 77–83.
- [107] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins., *Anal. Chem*. 85 (2013) 2289–96.
- [108] M. Kawai, Y. Iwamuro, R. Iio-Ishimaru, S. Chinaka, T. Nariaki, K. Hayakawa, Analysis of Phosphorus-containing Amino Acid-type Herbicides by Sheathless Capillary Electrophoresis/Electrospray Ionization–Mass Spectrometry Using a High Sensitivity Porous Sprayer, *Anal. Sci*. 27 (2011) 857.

- [109] R. Ramautar, R. Shyti, B. Schoenmaker, L. de Groote, R.J.E. Derks, M.D. Ferrari, et al., Metabolic profiling of mouse cerebrospinal fluid by sheathless CE-MS., *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2895–900.
- [110] A.D. Wilkinson, A. McNaught, IUPAC. Compendium of Chemical Terminology., 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [111] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins., *J. Chromatogr. A.* 1159 (2007) 81–109.
- [112] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, High-resolution mass spectrometers, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto. Calif.)* 1 (2008) 579–99.
- [113] M. Himmelsbach, 10 years of MS instrumental developments--impact on LC-MS/MS in clinical chemistry., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 883-884 (2012) 3–17.
- [114] P. Pantuckova, P. Bocek, Isotachophoresis in zone electrophoresis, 838 (1999) 55–70.
- [115] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2011-2013., *Electrophoresis.* 35 (2014) 128–37.
- [116] J. Quirino, S. Terabe, Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: cation-selective exhaustive injection and sweeping, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023–30.
- [117] J.-B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, Anion-selective exhaustive injection-sweep-micellar electrokinetic chromatography., *J. Chromatogr. A.* 932 (2001) 129–137.
- [118] A.T. Aranas, A.M. Guidote, J.P. Quirino, Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis., *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 175–85.
- [119] P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, S. Terabe, On-Line Focusing of Flavin Derivatives Using Dynamic pH Junction-Sweeping Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3736–3743.
- [120] L. Yu, S.F.Y. Li, Dynamic pH junction-sweeping capillary electrophoresis for online preconcentration of toxic pyrrolizidine alkaloids in Chinese herbal medicine., *Electrophoresis.* 26 (2005) 4360–7.
- [121] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, Recent progress in analytical capillary isotachophoresis., *Electrophoresis.* 34 (2013) 19–28.
- [122] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gas, High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: electrokinetic supercharging., *Electrophoresis.* 24 (2003) 498–504.
- [123] A.J. Tomlinson, S. Naylor, Enhanced performance membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry (mPC-CE-MS) in conjunction with transient

- isotachopheresis for analysis of peptide mixtures, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 384–386.
- [124] Q. Yang, A.J. Tomlinson, S. Naylor, Peer Reviewed: Membrane Preconcentration CE., *Anal. Chem.* 71 (1999) 183A–9A.
- [125] M.C. Breadmore, A.S. Palmer, M. Curran, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad, On-Column Ion-Exchange Preconcentration of Inorganic Anions in Open Tubular Capillary Electrochromatography with Elution Using Transient-Isotachopheretic Gradients. 3. Implementation and Method Development, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2112–2118.
- [126] J.C. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwsen, A. Bult, H. Lingeman, W.J. Underberg, Quantitative analysis of pharmaceutically active peptides using on-capillary analyte preconcentration transient isotachopheresis., *Electrophoresis.* 21 (2000) 2851–8.
- [127] Y. Wang, B.R. Fonslow, C.C.L. Wong, A. Nakorchevsky, J.R. Yates, Improving the comprehensiveness and sensitivity of sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for proteomic analysis., *Anal. Chem.* 84 (2012) 8505–13.
- [128] D. Heiger, High-performance capillary electrophoresis, Agilent, 2000.
- [129] M. Mandaji, G. Rübensam, R.B. Hoff, S. Hillebrand, E. Carrilho, T.L. Kist, Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions I. Analytes with low dpKa/dT crossing a single thermally induced pH junction in a BGE with high dpH/dT, *Electrophoresis.* 30 (2009) 1501–9.
- [130] M. Mandaji, G. Rübensam, R.B. Hoff, S. Hillebrand, E. Carrilho, T.L. Kist, Sample stacking in CZE using dynamic thermal junctions II: analytes with high dpKa/dT crossing a single thermal junction in a BGE with low dpH/dT, *Electrophoresis.* 30 (2009) 1510–5.
- [131] K. Klepárník, F. Foret, J. Berka, W. Goetzinger, a W. Miller, B.L. Karger, The use of elevated column temperature to extend DNA sequencing read lengths in capillary electrophoresis with replaceable polymer matrices., *Electrophoresis.* 17 (1996) 1860–6.
- [132] J.H. Knox, Thermal effects and band spreading in capillary electro-separation, *Chromatographia.* 26 (1988) 329–337.
- [133] J.H.. Knox, K.A. Mc Cormack, Temperature Effects in Capillary Electrophoresis . 1 : Internal Capillary Temperature and Effect upon Performance ., *Chromatographia.* 38 (1994) 207–214.
- [134] J.H.. Knox, K.A. Mc Cormack, Temperature Effects in Capillary Electrophoresis . 2 : Some Theoretical Calculations and Predictions ., *Chromatographia.* 38 (1994) 215–221.
- [135] J.-P. Hsu, Y.-H. Tai, L.-H. Yeh, S. Tseng, Importance of temperature effect on the electrophoretic behavior of charge-regulated particles., *Langmuir.* 28 (2012) 1013–9.
- [136] C.J. Evenhuis, R.M. Guijt, M. Macka, P.J. Marriott, P.R. Haddad, Variation of zeta-potential with temperature in fused-silica capillaries used for capillary electrophoresis., *Electrophoresis.* 27 (2006) 672–6.

- [137] R.C. Weast, Handbook of chemistry and Physics, 55 th, CRC, Boca Raton, Florida, 1986-1987, 1980.
- [138] G. Jones, M. Dole, The viscosity of aqueous solutions of strong electrolytes with special reference to barium chloride., *J. Am. Chem. Soc.* 51 (1929) 2950–2964.
- [139] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Rafols, E. Bosch, Static Dielectric Constants of Acetonitrile/Water Mixtures at Different Temperatures and Debye-Huckel A and a0B Parameters for Activity Coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 52 (2007) 1103–1107.
- [140] W. a. Gobie, C.F. Ivory, Thermal model of capillary electrophoresis and a method for counteracting thermal band broadening, *J. Chromatogr. A.* 516 (1990) 191–210.
- [141] C.J. Evenhuis, V. Hruska, R.M. Guijt, M. Macka, B. Gas, P.J. Marriott, et al., Reliable electrophoretic mobilities free from Joule heating effects using CE., *Electrophoresis.* 28 (2007) 3759–66.
- [142] C.J. Evenhuis, P.R. Haddad, Joule heating effects and the experimental determination of temperature during CE., *Electrophoresis.* 30 (2009) 897–909.
- [143] K.H. Patel, C.J. Evenhuis, L.T. Cherney, S.N. Krylov, Simplified universal method for determining electrolyte temperatures in a capillary electrophoresis instrument with forced-air cooling., *Electrophoresis.* 33 (2012) 1079–85.
- [144] J.C. Reijenga, L.G. Gagliardi, E. Kenndler, Temperature dependence of acidity constants, a tool to affect separation selectivity in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 1155 (2007) 142–5.
- [145] F. Foret, M. Deml, P. Boček, Capillary zone electrophoresis: Quantitative study of the effects of some dispersive processes on the separation efficiency, *J. Chromatogr. A.* 452 (1988) 601–613.
- [146] H. Veraart, J. Gooijer, C. Lingeman, Thermostating in Capillary Electrophoresis, *Chromatographia.* 44 (1997).
- [147] G.Y. Tang, C. Yang, J.C. Chai, H.Q. Gong, Joule heating effect on electroosmotic flow and mass species transport in a microcapillary, *Int. J. Heat Mass Transf.* 47 (2004) 215–227.
- [148] R.S. Rush, a S. Cohen, B.L. Karger, Influence of column temperature on the electrophoretic behavior of myoglobin and alpha-lactalbumin in high-performance capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1346–50.
- [149] K.M. Balss, W.N. Vreeland, K.W. Phinney, D. Ross, Simultaneous concentration and separation of enantiomers with chiral temperature gradient focusing., *Anal. Chem.* 76 (2004) 7243–9.
- [150] B. Gas, Axial temperature, *J. Chromatogr.* 644 (1993) 161–174.

- [151] J.M. Padró, A. Acquaviva, M. Tascon, L.G. Gagliardi, C.B. Castells, Effect of temperature and solvent composition on acid dissociation equilibria, I: Sequenced (s)(s)pKa determination of compounds commonly used as buffers in high performance liquid chromatography coupled to mass spectroscopy detection., *Anal. Chim. Acta.* 725 (2012) 87–94.
- [152] a Acquaviva, M. Tascon, J.M. Padró, L.G. Gagliardi, C.B. Castells, Automatized sspKa measurements of dihydrogen phosphate and Tris(hydroxymethyl) aminomethane in acetonitrile/water mixtures from 20 to 60°C., *Talanta.* 127 (2014) 196–203.
- [153] J.J. Christensen, L.D. Hansen, R.M. Izatt, *Handbook of Proton Ionization Heats and Related Thermodynamic Quantities*, Wiley, New York, 1976.
- [154] D.D. Perrin, *Dissociation constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, IUPAC, New York, 1972.
- [155] D.D. Perrin, *Ionization Constants of Inorganic Acids and Bases in Aqueous Solution*, Pergamon, Oxford, 1982.
- [156] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Modeling retention and selectivity as a function of pH and column temperature in liquid chromatography, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5858–67.
- [157] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds, *J. Chromatogr. A.* 1077 (2005) 159–169.
- [158] L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, Effect of temperature on the chromatographic retention of ionizable compounds. III. Modeling retention of pharmaceuticals as a function of eluent pH and column temperature in RPLC, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 969–80.
- [159] S. Heinisch, G. Puy, M.-P. Barrioulet, J.-L. Rocca, Effect of temperature on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: application to method development, *J. Chromatogr. A.* 1118 (2006) 234–43.
- [160] D. Ross, L.E. Locascio, Microfluidic temperature gradient focusing, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2556–64.
- [161] M.S. Munson, G. Danger, J.G. Shackman, D. Ross, Temperature gradient focusing with field-amplified continuous sample injection for dual-stage analyte enrichment and separation., *Anal. Chem.* 79 (2007) 6201–7.
- [162] J.G. Shackman, D. Ross, Gradient elution isotachopheresis for enrichment and separation of biomolecules., *Anal. Chem.* 79 (2007) 6641–9.
- [163] N.A. Guzman, Electrophoresis apparatus having valve system. US patent 8,007,725 B2, 2011.
- [164] P.J. Schoenmakers, *Optimization of chromatographic selectivity*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1986.

- [165] S.. Li, *Capillary electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1993.
- [166] J.C. Giddings, Generation of Variance, "Theoretical Plates, Resolution, and Peak Capacity in Electrophoresis and Sedimentation," *Sep. Sci.* 4 (1969) 181–189.
- [167] P. Gebauer, P. Boček, Optimization in isotachopheresis, *J. Chromatogr. A.* 320 (1985) 49–65.
- [168] a M. Siouffi, R. Phan-Tan-Luu, Optimization methods in chromatography and capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A.* 892 (2000) 75–106.
- [169] J.C. Reijenga, E. Kenndler, Computational simulation of migration and dispersion in free capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 659 (1994) 403–415.
- [170] V. Šustáček, F. Foret, P. Boček, Selection of the background electrolyte composition with respect to electromigration dispersion and detection of weakly absorbing substances in capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 545 (1991) 239–248.
- [171] X. Xu, W.T. Kok, H. Poppe, Change of pH in electrophoretic zones as a cause of peak deformation, *J. Chromatogr. A.* 742 (1996) 211–227.
- [172] L. Vera-Candioti, A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, Simultaneous multiresponse optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis., *Anal. Chim. Acta.* 595 (2007) 310–8.
- [173] M.M. Rogan, K.D. Altria, D.M. Goodall, Plackett-Burman experimental design in chiral analysis using capillary electrophoresis, *Chromatographia.* 38 (1994) 723–729.
- [174] R. Ragonese, M. Macka, J. Hughes, P. Petocz, The use of the Box-Behnken experimental design in the optimisation and robustness testing of a capillary electrophoresis method for the analysis of ethambutol hydrochloride in a pharmaceutical formulation., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27 (2002) 995–1007.
- [175] M. Liu, Y. Zheng, Y. Ji, C. Zhang, Development and validation of a capillary electrophoresis method for the enantiomeric purity determination of RS86017 using experimental design., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 93–100.
- [176] J. Havel, E.M. Pena, A. Panaye, Neural networks for optimization of high-performance capillary zone electrophoresis methods A new method using a combination of experimental design and, 793 (1998) 317–329.
- [177] B.K. Clark, C.L. Nickles, K.C. Morton, J. Kovac, M.J. Sepaniak, Rapid separation of DNA restriction digests using size selective capillary electrophoresis with application to DNA fingerprinting, *J. Microcolumn Sep.* 6 (1994) 503–513.
- [178] J.W. Jorgenson, L. Krynyn DeArman, Zone Electrophoresis in Open-Tubular Glass Capillaries, *Anal. Chem.* 53 (1981) 1298–1302.

- [179] N. Chen, L. Wang, Y. Zhang, Electrophoretic Selectivity as a Function of Operating Parameters in Free-Solution Capillary Electrophoretic Separation of Dipeptides, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3609–3622.
- [180] G.M. Janini, K.C. Chan, G.M. Muschik, H.J. Issaq, Optimization of Resolution in Capillary Zone Electrophoresis: Effect of Solute Mobility and Buffer pH, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3591–3607.
- [181] D.D. Perrin, The dissociation constants of perloridene and harmol, *NZ J. Sci. Technol.* 388 (1957) 688–694.
- [182] K.T. Douglas, R.S. Sharma, J.F. Walmsley, R.C. Hider, Ionization processes of some harmala alkaloids, *Mol. Pharmacol.* 23 (1983) 614–618.
- [183] A.F. Arribam, J.M. Lizcano, M.D. Balsa, M. Unzeta, Inhibition of Monoamine Oxidase from Bovine Retina by P-Carbolines, *J. Pharm. Pharmacol.* 46 (1994) 809–813.
- [184] T. May, M. Pawlik, H. Rommelspacher, [3 H]Harman Binding Experiments. II: Regional and Subcellular Distribution of Specific [3 H]Harman Binding and Monoamine Oxidase Subtypes A and B Activity in Marmoset and Rat, *J. Neurochem.* 56 (1991) 500–508.
- [185] T. Herraiz, D. González, C. Ancín-Azpilicueta, V.J. Arán, H. Guillén, beta-Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO), *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 839–45.
- [186] M. Kartal, M.L. Altun, S. Kurucu, HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of Peganum harmala L., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 263–269.
- [187] G. Frison, D. Favretto, F. Zancanaro, G. Fazzin, S.D. Ferrara, A case of beta-carboline alkaloid intoxication following ingestion of Peganum harmala seed extract., *Forensic Sci. Int.* 179 (2008) 37–43.
- [188] M. Yritia, J. Riba, A. Castillo, J. Ortuño, A. Ramirez, Y. Alfaro, et al., Determination of N,N-dimethyltryptamine and b-carboline alkaloids in human plasma following oral administration of Ayahuasca., *J. Chromatogr. B.* 779 (2002) 271–281.
- [189] D.J. McKenna, Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges., *Pharmacol. Ther.* 102 (2004) 111–29.
- [190] E.H. McIlhenny, J. Riba, M.J. Barbanoj, R. Strassman, S. a Barker, Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood., *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 301–13.
- [191] W. Pfau, K. Skog, Exposure to beta-carbolines norharman and harman., *J. Chromatogr. B.* 802 (2004) 115–126.

- [192] T.N. Posch, N. Martin, M. Pütz, C. Huhn, Nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry: a versatile, straightforward tool for the analysis of alkaloids from psychoactive plant extracts., *Electrophoresis*. 33 (2012) 1557–1066.
- [193] T. Herraiz, Tetrahydro-beta-carbolines, potential neuroactive alkaloids, in chocolate and cocoa., *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4900–4.
- [194] I.I. Koleva, T. a van Beek, A.E.M.F. Soffers, B. Dusemund, I.M.C.M. Rietjens, Alkaloids in the human food chain--natural occurrence and possible adverse effects., *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 30–52.
- [195] T. Herraiz, C. Chaparro, Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and beta-carbolines norharman and harman isolated from coffee., *Life Sci.* 78 (2006) 795–802.
- [196] E.D. Louis, M. Michalec, W. Jiang, P. Factor-Litvak, W. Zheng, Elevated blood harmane (1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole) concentrations in Parkinson's disease., *Neurotoxicology*. 40 (2014) 52–6.
- [197] E. European Food Safety Authority, Compendium of botanicals reported to contain naturally occurring substances of possible concern for human health when used in food and, *EFSA J.* 10 (2012) 2663–2723.
- [198] V. González-Ruiz, A.I. Olives, M.A. Martín, SPE/RP-HPLC using C1 columns: an environmentally friendly alternative to conventional reverse-phase separations for quantitation of beta-carboline alkaloids in human serum samples., *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 395–401.
- [199] T. Zhao, S.-S. Zheng, B.-F. Zhang, Y.-Y. Li, S.W.A. Bligh, C.-H. Wang, et al., Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy., *Food Chem.* 134 (2012) 1096–105.
- [200] S. Li, W. Liu, L. Teng, X. Cheng, Z. Wang, C. Wang, Metabolites identification of harmane in vitro/in vivo in rats by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 92 (2014) 53–62.
- [201] M. Balon, J. Hidalgo, P. Guardado, M.A. Muaoz, C. Carmona, Acid-base and spectral properties of b-carbolines. Part 2. Dehydro and fully aromatic b-carbolines, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* 2 (1993) 99–104.
- [202] M. Unger, D. Stöckigt, D. Belder, J. Stöckigt, General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 767 (1997) 263–276.
- [203] J. Cheng, K.R. Mitchelson, Improved separation of six harmane alkaloids by high-performance capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 761 (1997) 297–305.

- [204] J. Stöckigt, Y. Sheludk, M. Unger, I. Gerasimenko, H. Warzecha, D. Stöckigt, High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic-electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups., *J. Chromatogr. A.* 967 (2002) 85–113.
- [205] M. Perry, Q. Li, R.T. Kennedy, Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters., *Anal. Chim. Acta.* 653 (2009) 1–22.
- [206] L.R. D. Andreu, *Péptidos en biología y biomedicina.*, Madrid, 1997.
- [207] C. Chavkin, Dynorphin--still an extraordinarily potent opioid peptide., *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 729–36.
- [208] J.C. Froehlich, opioid peptides, *Alcohol Heal. Res. World.* 21 (1997).
- [209] A. Lesniak, A.W. Lipkowski., Opioid peptides in peripheral pain control., *Acta Neurobiol. Exp. (Wars).* 71 (2011) 129–138.
- [210] C.N. K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress., *Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* (2002).
- [211] R.J. Bodnar, Endogenous opiates and behavior: 2011., *Peptides.* 38 (2012) 463–522.
- [212] M. Wollemann, S. Benyhe, Non-opioid actions of opioid peptides., *Life Sci.* 75 (2004) 257–70.
- [213] J.N. Baraniuk, G. Whalen, J. Cunningham, D.J. Clauw, Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain, *BMC Musculoskelet. Disord.* 5 (2004) 48.
- [214] A. Rosén, T. Lundeberg, B. Bytner, I. Nylander, Central changes in nociceptin dynorphin B and Met-enkephalin-Arg-Phe in different models of nociception, *Brain Res.* 857 (2000) 212–218.
- [215] D.S. Jessop, A. Fassold, C. Wolff, R. Hofbauer, A. Chover-Gonzalez, L.J. Richards, et al., Endomorphins in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and experimental arthritis., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193 (2010) 117–22.
- [216] F.Z. Xia, Y.L. Lu, Y. Chen, T. Gu, H.X. Zhang, J. Yu, et al., Peripheral endomorphin-1 levels are suppressed in diabetic patients, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87 (2010) 200–203.
- [217] D.M. Desiderio, Mass spectrometric analysis of neuropeptidergic systems in the human pituitary and cerebrospinal fluid, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 731 (1999) 3–22.
- [218] H.G. Lee, J.L. Tseng, R.R. Becklin, D.M. Desiderio, Preparative and analytical capillary zone electrophoresis analysis of native endorphins and enkephalins extracted from the bovine pituitary: mass spectrometric confirmation of the molecular mass of leucine enkephalin., *Anal. Biochem.* 229 (1995) 188–97.

- [219] T. Lapainis, J. V Sweedler, Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience., *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 144–58.
- [220] Q. Li, J.-K. Zubietta, R.T. Kennedy, Practical aspects of in vivo detection of neuropeptides by microdialysis coupled off-line to capillary LC with multistage MS., *Anal. Chem.* 81 (2009) 2242–50.
- [221] T.M. Phillips, E. Wellner, Measurement of neuropeptides in clinical samples using chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis., *J. Chromatogr. A.* 1111 (2006) 106–11.
- [222] T.L. Lisi, K.A. Sluka, A new electrochemical HPLC method for analysis of enkephalins and endomorphins., *J. Neurosci. Methods.* 150 (2006) 74–9.
- [223] J. Hernández-Borges, C. Neusüss, A. Cifuentes, M. Pelzing, On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules., *Electrophoresis.* 25 (2004) 2257–81.
- [224] C.-H. Lin, T. Kaneta, On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules, *Electrophoresis.* 25 (2004) 4058–73.
- [225] F.G. Dellatorre, *El alga exótica Undaria pinnatifida en Argentina*, 2012.
- [226] L. Pont, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, An update for human blood plasma pretreatment for optimized recovery of low-molecular-mass peptides prior to CE-MS and SPE-CE-MS., *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3896–902.
- [227] S.D. Mendonsa, R.J. Hurtubise, Determination of ionization constants of heterocyclic aromatic amines using capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 841 (1999) 239–247.
- [228] B. Hemmateenejad, A. Abbaspour, H. Maghami, R. Miri, M.R. Panjehshahin, Partial least squares-based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta-carboline derivatives in *Peganum harmala* seed extracts., *Anal. Chim. Acta.* 575 (2006) 290–9.
- [229] J.C. Callaway, L.P. Raymon, W.L. Hearn, D.J. McKenna, C.S. Grob, G.S. Brito, et al., Quantitation of N,N-Dimethyltryptamine and Harmala Alkaloids in Human Plasma after Oral Dosing with Ayahuasca, *J. Anal. Toxicol.* 20 (1996) 492–497.
- [230] C. Huhn, C. Neusüss, M. Pelzing, U. Pyell, J. Mannhardt, M. Pütz, Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: a case study., *Electrophoresis.* 26 (2005) 1389–97.
- [231] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS., *Electrophoresis.* 28 (2007) 3957–65.
- [232] F. Benavente, R. van der Heijden, U.R. Tjaden, J. van der Greef, T. Hankemeier, Metabolite profiling of human urine by CE-ESI-MS using separation electrolytes at low pH., *Electrophoresis.* 27 (2006) 4570–84.

- [233] H.-T. Feng, L.-L. Yuan, S.F.Y. Li, Analysis of Chinese medicine preparations by capillary electrophoresis-mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1014 (2003) 83–91.
- [234] L. Mateus, S. Cherkaoui, P. Christen, J.L. Veuthey, Capillary electrophoresis-diode array detection--electrospray mass spectrometry for the analysis of selected tropane alkaloids in plant extracts., *Electrophoresis.* 20 (1999) 3402–9.
- [235] H. Feng, S.F.Y. Li, Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A.* 973 (2002) 243–247.
- [236] I. Bjørnsdottir, S.H. Hansen, Determination of opium alkaloids in opium by capillary electrophoresis., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 687–93.
- [237] H.-L. Li, W.-D. Zhang, R.-H. Liu, C. Zhang, T. Han, X.-W. Wang, et al., Simultaneous determination of four active alkaloids from a traditional Chinese medicine *Corydalis saxicola* Bunting. (*Yanhuanglian*) in plasma and urine samples by LC-MS-MS., *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 831 (2006) 140–6.
- [238] J. Ohnesorge, C. Neusüss, H. Wätzig, Quantitation in capillary electrophoresis-mass spectrometry., *Electrophoresis.* 26 (2005) 3973–87.
- [239] D. Vitamvasova, Reversed-phase high-performance liquid chromatographic determination of isoflavones in plant materials after isolation by solid-phase extraction, 839 (1999) 261–263.
- [240] W.-H. Lee, C.-W. Wang, G.-R. Her, Staggered multistep elution solid-phase extraction capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry: a high-throughput approach in protein analysis., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2124–30.
- [241] V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Hernández, J. Barbosa, Evaluation of the electrophoretic behaviour of opioid peptides Separation by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry., *Anal. Chim. Acta.* 577 (2006) 68–76.
- [242] N.J. Adamson, E.C. Reynolds, Rules relating electrophoretic mobility, charge and molecular size of peptides and proteins., *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 699 (1997) 133–47.
- [243] a Cifuentes, H. Poppe, Behavior of peptides in capillary electrophoresis: effect of peptide charge, mass and structure., *Electrophoresis.* 18 (1997) 2362–76.
- [244] W. Purcell, M. Aguilar, M.T. Hearn, Conformational effects in reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptides I. Resolution of insulin variants, *J. Chromatogr. A.* 711 (1995) 61–70.
- [245] W. Purcell, M.I. Aguilar, M.T.W. Hearn, Conformational effects in reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptides II. The role of insulin A and B chains in the chromatographic behaviour of insulin, *J. Chromatogr. A.* 711 (1995) 71–79.
- [246] A.W. Purcell, M.I. Aguilar, M.T.W. Hearn, High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins CXV. Thermodynamic behaviour of peptides in reversed-phase chromatography, *J. Chromatogr. A.* 593 (1992) 103–117.

- [247] W. Purcell, M.I. Aguilar, M.T. Hearn, High-performance liquid chromatography of amino acids, peptides, and proteins. 123. Dynamics of peptides in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3038–47.