

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2018/19

DOCTORANDO: **VALIMAÑA TRAVERSO, JESUS MANUEL**  
D.N.I./PASAPORTE: \*\*\*\*6516Q

PROGRAMA DE DOCTORADO: **D415-QUÍMICA**  
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: **QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA**  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 29/03/19, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de **MARISA LUISA MARINA ALEGRE // MARIA ANGELES GARCIA GONZALEZ**.

Sobre el siguiente tema: *DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE FÁRMACOS Y AGROQUÍMICOS POR CROMATOGRFÍA ELECTROCINÉTICA. SÍNTESIS DE NUEVAS ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS PARA SU PRECONCENTRACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>1</sup> de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 29 de MARZO de 2019

EL PRESIDENTE



Fdo.: PILAR FERNANDEZ HERNANDO

EL SECRETARIO



Fdo.: MARIA PAZ ANDRES LLEDO

EL VOCAL

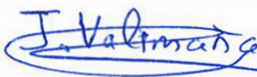


Fdo.: BELEN GOMARA MORENO

Con fecha 24 de abril de 2019 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

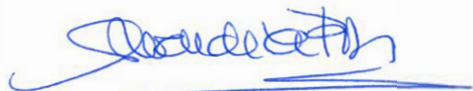
- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: VALIMAÑA TRAVERSO, JESUS MANUEL

La Secretaria de la Comisión Delegada



<sup>1</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:

No ha lugar

El presente informe es el resultado de la inspección realizada en el día 15 de mayo de 2018, en el domicilio de la Sra. Dña. María José García, en la calle de San Juan, nº 10, de la localidad de San Juan de los Ríos, provincia de Burgos, en el que se ha constatado que el inmueble objeto de la presente inspección se encuentra en un estado de conservación que no permite su uso como vivienda habitual, por lo que se ha emitido un informe de no conformidad.

El presente informe es el resultado de la inspección realizada en el día 15 de mayo de 2018, en el domicilio de la Sra. Dña. María José García, en la calle de San Juan, nº 10, de la localidad de San Juan de los Ríos, provincia de Burgos, en el que se ha constatado que el inmueble objeto de la presente inspección se encuentra en un estado de conservación que no permite su uso como vivienda habitual, por lo que se ha emitido un informe de no conformidad.

El presente informe es el resultado de la inspección realizada en el día 15 de mayo de 2018, en el domicilio de la Sra. Dña. María José García, en la calle de San Juan, nº 10, de la localidad de San Juan de los Ríos, provincia de Burgos, en el que se ha constatado que el inmueble objeto de la presente inspección se encuentra en un estado de conservación que no permite su uso como vivienda habitual, por lo que se ha emitido un informe de no conformidad.

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 24 de abril, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por VALIMAÑA TRAVERSO, JESUS MANUEL, el día 29 de marzo de 2019, titulada *DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE FÁRMACOS Y AGROQUÍMICOS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA. SÍNTESIS DE NUEVAS ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS PARA SU PRECONCENTRACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA*, para determinar si a la misma se le concede la mención “cum laude”, no habiendo obtenido la unanimidad de los miembros del Tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve no otorgar la Mención de “cum laude”** a dicha Tesis.

Alcalá de Henares, 24 de abril de 2019

EL VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA



*J. Javier de la Mata*

Javier de la Mata de la Mata

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: VALIMAÑA TRAVERSO, JESUS MANUEL

Secretario del Tribunal: MARIA PAZ ANDRES LLEDO

Directores de Tesis: MARISA LUISA MARINA ALEGRE//MARIA ANGELES GARCIA GONZALEZ







Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato:  soporte electrónico  impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario



# Universidad de Alcalá

Programa de Doctorado en Química

**DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA DE FÁRMACOS Y  
AGROQUÍMICOS POR CROMATOGRFÍA  
ELECTROCINÉTICA. SÍNTESIS DE NUEVAS  
ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS PARA SU  
PRECONCENTRACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE  
SÓLIDA**

Tesis doctoral presentada por

**JESÚS VALIMAÑA TRAVERSO**

**Directoras:**

**DRA. MARÍA LUISA MARINA ALEGRE**

**DRA. MARÍA ÁNGELES GARCÍA GONZÁLEZ**

**Alcalá de Henares, febrero 2019**





Universidad  
de Alcalá

Departamento de Química  
Analítica, Química Física e  
Ingeniería Química  
Facultad de Ciencias  
Edificio Polivalente  
Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33.600  
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)  
Tel: 91-885 4941  
Fax: 91-885 4971

**ALBERTO ESCARPA MIGUEL**, Coordinador del Programa de Doctorado en  
Química de la Universidad de Alcalá,

**CERTIFICA:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado:

**“Determinación enantiomérica de fármacos y agroquímicos por Cromatografía  
Electrocinética. Síntesis de nuevas organosílices mesoporosas para su  
preconcentración por extracción en fase sólida”**

ha sido realizado por **D. Jesús Valimaña Traverso**, bajo la dirección de las Dras.  
María Luisa Marina Alegre y María Ángeles García González, en el Departamento de  
Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,  
excepto la síntesis y caracterización de las organosílices mesoporosas que fueron  
realizadas en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad  
Rey Juan Carlos. Asimismo, autoriza su presentación para que sea defendido como  
Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Alcalá de  
Henares a 19 de febrero de 2019.

  
**Alberto Escarpa Miguel**







Universidad  
de Alcalá

Departamento de Química  
Analítica, Química Física e  
Ingeniería Química  
Facultad de Ciencias  
Campus Universitario  
Ctra. Madrid-Barcelona Km. 33,600  
E-28871 Alcalá de Henares (Madrid)  
Tel: 91-885 4941  
Fax: 91-885 4971

MARÍA LUISA MARINA ALEGRE, Catedrática de Química Analítica del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, y

MARÍA ÁNGELES GARCÍA GONZÁLEZ, Profesora Titular de Química Analítica del Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado:

**“Determinación enantiomérica de fármacos y agroquímicos por Cromatografía Electrocinética. Síntesis de nuevas organosilices mesoporosas para su preconcentración por extracción en fase sólida”**

ha sido realizado bajo su dirección por **D. Jesús Valimaña Traverso** en el Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá, excepto la síntesis y caracterización de las organosilices mesoporosas que fueron realizadas en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos. Asimismo, autorizan su presentación para que sea defendido como Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente en Alcalá de Henares a 19 de febrero de 2019.

María Luisa Marina Alegre



María Ángeles García González





*Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la concesión de un contrato de Formación de Personal Investigador (Ref. BES-2014-070532) asociado al proyecto titulado "Metodologías avanzadas para análisis quiral mediante técnicas micro-separativas. Búsqueda de biomarcadores en sistemas enantioselectivos" (CTQ2013-48740-P) financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2014-2016) y cuya investigadora principal ha sido la Dra. Maria Luisa Marina Alegre. Agradecer también la concesión del proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad titulado "Nuevos nanoaditivos para separación quiral por Electroforesis Capilar. Aplicación a la determinación de biomarcadores" (CTQ2016-76368-P) en cuyo marco se ha desarrollado esta Tesis Doctoral durante los años 2017 y 2018.*

*Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras de Tesis, las Dras. Maria Luisa Marina Alegre y Maria Ángeles García González, por toda la ayuda y apoyo que me han brindado durante estos cuatro años y por todo lo que me han enseñado. Sin ellas, esta Tesis Doctoral no habría sido posible.*

*A los Dres. Isabel Sierra Alonso, Sonia Morante Zarcero y Damián Pérez Quintanilla quiero agradecerles el haberme recibido en la Universidad Rey Juan Carlos para llevar a cabo la síntesis de las sílices mesoporosas utilizadas en esta Tesis Doctoral como sorbentes para extracción en fase sólida de compuestos de interés. El trabajo allí realizado me ha enriquecido tanto científicamente como personalmente.*

*Al Centro de Apoyo a la Investigación en Química de la Universidad de Alcalá. Gracias por la disponibilidad del equipo de Electroforesis Capilar necesario para la realización de una parte importante de este trabajo de investigación.*

*No puedo olvidarme de agradecer al Departamento de Química Analítica, Química Física e Ingeniería Química, en especial, a mis compañeros del Área de Química Analítica.*

*Por último, agradecer enormemente a mis padres por todo su apoyo constante y a mi tía Virtudes por todos los ratos de enseñanza que me ha dedicado. A todas aquellas buenas personas que he conocido a lo largo de estos 4 años en Madrid, especialmente a ti, Esther T., por no haberme dejado nunca de lado, a mi amigo Pedro que en paz descanse (nunca te olvido), a Isa S. por su gran amistad, a Dani y Laura como los mejores alcaláinos que existen, a todos mis compañeros de ambos equipos de baloncesto (Cotizados y Complutum) por todas las canastas, punto y minutos disputados, y a los mejores grupos sociales que he tenido, constituidos por mis gaditanos y "Sin censura".*

## **RESUMEN**



El impacto de la quiralidad en los campos farmacéutico y medioambiental es muy alto debido a la diferente actividad biológica y distinto comportamiento que los enantiómeros de un compuesto quiral pueden tener. En efecto, uno de los enantiómeros de un fármaco puede tener la actividad biológica deseada mientras que el otro puede tener una actividad biológica diferente, ser inactivo o incluso tóxico; los enantiómeros de un fármaco o un agroquímico pueden tener distinta toxicidad para los organismos diana y/o no diana, distinta persistencia en los organismos vivos o en el medioambiente y/o diferente velocidad de degradación. Ello ha incrementado el interés por el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación individual de los enantiómeros de un compuesto quiral en distintas matrices. Por una parte, la tendencia a comercializar una buena parte de los fármacos quirales como enantiómeros puros hace necesario llevar a cabo un adecuado control de calidad de estas formulaciones farmacéuticas. Por otra parte, la evaluación de la toxicidad real de las muestras ambientales hace necesario disponer de metodologías analíticas quirales sensibles y accesibles a los laboratorios de control.

Una de las técnicas de separación quiral que más potencial ha demostrado en el campo de las separaciones enantioméricas ha sido la Electroforesis Capilar. La posibilidad de adicionar un selector quiral al medio de separación (en el modo de Cromatografía Electrocinética) sin necesidad de utilizar columnas quirales de elevado coste como sucede en las técnicas cromatográficas (HPLC, SFC, GC), confiere a la CE una flexibilidad importante que facilita la elección del selector quiral más apropiado que es la etapa más crítica para llevar a cabo una separación enantiomérica. Al mismo tiempo, los pequeños volúmenes de fase móvil y de muestras empleados en esta técnica permiten reducir el coste económico y el impacto medioambiental con respecto a otras técnicas dando lugar a metodologías analíticas que respetan los principios de la química verde.

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado nuevas metodologías analíticas para la determinación enantiomérica de fármacos y agroquímicos por Cromatografía Electrocinética, utilizando ciclodextrinas como selectores quirales, con el fin de aplicarlas al análisis de formulaciones farmacéuticas comercializadas como enantiómero puro, de muestras medioambientales y de medios de cultivo empleados para la evaluación de la estabilidad y toxicidad de contaminantes emergentes (fármacos) en condiciones abióticas y bióticas. Con el fin de alcanzar la sensibilidad necesaria para poder llevar a cabo la determinación individual de los enantiómeros de fármacos considerados contaminantes emergentes y de agroquímicos en muestras medioambientales, se han sintetizado cinco organosílices mesoporosos periódicos novedosos (cuatro de ellas sintetizadas por primera vez en este trabajo), tres de ellas utilizando ligandos neutros y dos más basadas en el empleo de ligandos catiónicos, y se ha evaluado su potencial como sorbentes para la extracción y preconcentración de los fármacos y agroquímicos en muestras de agua por SPE.

En el capítulo III de esta memoria se presenta la separación enantiomérica del fármaco antiurémico colchicina, por primera vez en el formato de la CE. Las formulaciones farmacéuticas de colchicina se preparan como enantiómero puro (S-colchicina) por lo que se hace necesaria la determinación individual de los dos enantiómeros para su adecuado control de calidad. La única separación enantiomérica de colchicina que se había descrito en la bibliografía en el momento de llevar a cabo este trabajo se había realizado utilizando Cromatografía Líquida Plana en 3.5 h. Además, no había ninguna referencia bibliográfica relacionada con la determinación de colchicina en formulaciones farmacéuticas. Con el fin de seleccionar las condiciones más adecuadas para la separación de los enantiómeros de este fármaco por Cromatografía Electrocinética, se investigó el efecto de la naturaleza del selector quiral (trece ciclodextrinas aniónicas), la concentración del

mismo, la concentración del tampón de separación, la temperatura, el tiempo de inyección y los parámetros de detección UV. La utilización de la ciclodextrina aniónica Succ- $\gamma$ -CD como selector quiral a concentración 7 mM en un medio tampón borato 50 mM (pH 9.0) a una temperatura de 16°C, un voltaje de 20 kV, un tiempo de inyección de 5 s (a 50 mbar) y un ancho de banda de 35 nm ( $\lambda$  243 nm), permitió llevar a cabo la primera separación de los enantiómeros de colchicina por Cromatografía Electrocinética con una resolución de 5.6 en 12 min. En estas condiciones se constató que el primer enantiómero en migrar fue S-colchicina. Aunque se considera deseable que la impureza enantiomérica migre en primer lugar, en este caso era previsible que este orden de migración no afectara a la determinación de la impureza enantiomérica (R-colchicina) dada la elevada resolución obtenida, como así se comprobó con posterioridad en nuestro grupo de investigación cuando se desarrolló una metodología analítica para la determinación enantiomérica de colchicina en formulaciones farmacéuticas basada en las condiciones optimizadas en este trabajo. El orden de migración observado para los enantiómeros de colchicina no se correspondía con el que podía esperarse teniendo en cuenta los valores de las constantes aparentes de los complejos formados por cada enantiómero y la ciclodextrina Succ- $\gamma$ -CD calculadas por RMN, por lo que pudo concluirse que además de la estabilidad de los complejos analito-selector quiral, la movilidad electroforética de los mismos era determinante también en el caso de colchicina, de acuerdo con resultados previos de nuestro grupo de investigación para otros compuestos.

El capítulo IV recoge los resultados obtenidos en el desarrollo de una metodología analítica por Cromatografía Electrocinética para la separación enantiomérica simultánea de siete fármacos de uso común con distintas actividades farmacológicas y considerados contaminantes emergentes (duloxetine (antidepresivo), terbutalina (broncodilatador), econazol (antifúngico), propranolol



(antihipertensivo), verapamil (antihipertensivo, angina de pecho, arritmia, dolor de cabeza, vasodilatador), metoprolol (antihipertensivo, infarto agudo de miocardio) y betaxolol (antihipertensivo)) y su determinación en muestras de agua previa preconcentración por SPE utilizando como sorbentes tres organosílices mesoporosas periódicas novedosas sintetizadas (con ligandos neutros) y caracterizadas en este trabajo.

Con el fin de desarrollar la metodología analítica para la separación enantiomérica simultánea de los siete fármacos por Cromatografía Electrocinética con ciclodextrinas como selectores quirales se ensayaron ocho ciclodextrinas de forma individual (cuatro neutras y cuatro aniónicas) como selectores quirales a una concentración del 2 % (w/v) en tampón fosfato 25 mM a pH 3.0. Entre ellas, solo la ciclodextrina aniónica S- $\beta$ -CD permitió obtener una enantioselectividad y enantioresolución adecuadas para los siete fármacos estudiados dando lugar a la separación simultánea de los 14 enantiómeros en 16 min con resoluciones comprendidas entre 2.4 y 8.5 para todos los compuestos y LODs instrumentales de 0.4 a 1.5 mg/L.

Además, se sintetizaron tres organosílices mesoporosas periódicas utilizando ligandos neutros, dos de ellas sintetizadas por primera vez en este trabajo de investigación (PMO-TMSEB-1 y PMO-TMSEB-2) basadas en el ligando neutro 1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno (TMSEB), y una tercera (PMO-TESEB-1) que había sido escasamente utilizada con anterioridad, y para cuya síntesis se utilizó el ligando neutro 1,4-bis(trietoxisilil)benceno (TESEB). De las dos organosílices sintetizadas con TMSEB, para una de ellas se utilizó una fuente adicional de sílice (tetraetilortosilicato) (PMO-TMSEB-2). Las tres organosílices mesoporosas sintetizadas se caracterizaron mediante la realización de isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental, SEM y FTIR. En el caso del

material PMO-TEB-1 se llevó también a cabo un estudio XRD en polvo y RMN. Asimismo, las tres se evaluaron como sorbentes para la extracción y preconcentración de los siete fármacos en aguas por SPE utilizando 100 mg de cada uno de los materiales. Los mejores resultados se obtuvieron para las organosílices PMO-TEB-1 y PMO-TMSEB-1 ya que en el primer caso se obtuvieron recuperaciones entre el 80 y 100 % para los enantiómeros de todos los fármacos excepto en el caso de terbutalina (30 %) y en el segundo caso se obtuvieron resultados similares para todos los compuestos excepto para duloxetina (40 %). Estos resultados no mejoraron cuando se utilizó una cantidad de 200 mg de sorbente. A pesar de que el material PMO-TMSEB-2 dio lugar a los peores resultados, se investigó para los tres materiales el volumen máximo de disolución de los analitos que es posible pasar a través del sorbente (100 mg) sin que se reduzcan de forma significativa las recuperaciones de los mismos. Los mejores resultados se obtuvieron para el material PMO-TEB-1 cuando se pasaba un volumen de 200 mL de disolución dando lugar a un factor de preconcentración de 400 excepto para terbutalina que presentó una baja afinidad por este sorbente. En estas condiciones, y una vez seleccionado el material PMO-TEB-1, se investigó el efecto de la polaridad del disolvente de elución y las condiciones de elución, sobre los porcentajes de recuperación de los fármacos estudiados. La utilización de 2 x 4 mL de metanol en el proceso de elución dio lugar a los mejores resultados para los seis fármacos (todos excepto terbutalina) con valores de recuperación en muestras de agua de río y de depuradora entre 73.9 y 102.9 % (excepto para econazol con valores de recuperación entre 58.5 y 72.4 %) y límites de cuantificación para el método comprendidos entre 5.6 y 21.9 µg/L para 12 de los enantiómeros estudiados (todos excepto los dos enantiómeros de terbutalina) poniendo de manifiesto el potencial de la organosílice mesoporosa PMO-TEB-1

para la preconcentración de los fármacos estudiados en muestras de agua por SPE.

En el capítulo V de esta memoria se muestran los resultados obtenidos en el desarrollo de una metodología analítica que permite la separación simultánea de los enantiómeros de seis herbicidas fenoxiácidos (fenoprop, mecoprop, dicloroprop, 4-CPPA, 3-CPPA y 2-PPA) por Cromatografía Electrocinética utilizando ciclodextrinas como selectores quirales, así como su determinación en muestras de agua previa preconcentración de dichos compuestos por SPE utilizando como sorbentes dos nuevas organosílices mesoporosas sintetizadas (con ligandos catiónicos) y caracterizadas en este trabajo.

Para llevar a cabo la separación enantiomérica simultánea de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo por Cromatografía Electrocinética, se realizó un screening inicial utilizando seis ciclodextrinas neutras como selectores quirales a una concentración 15 mM y a pH ácido con el fin de que los herbicidas fenoxiácidos tuvieran carga positiva (tampón formiato 50 mM a pH 5.0). De las seis ciclodextrinas ensayadas, fueron  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y TM- $\beta$ -CD las que dieron lugar a los mejores resultados si bien con ninguna de ellas se consiguió separar cada uno de los compuestos en sus enantiómeros. Por ello, se utilizaron como selectores quirales en EKC mezclas duales de esas tres ciclodextrinas, siendo el sistema constituido por HP- $\beta$ -CD+TM- $\beta$ -CD el que dio lugar a la separación enantiomérica simultánea de cinco de los seis herbicidas fenoxiácidos. El estudio del efecto de la concentración de las ciclodextrinas (10, 15 y 20 mM de cada una) y del empleo de un tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 puso de manifiesto que una mezcla 10 mM en HP- $\beta$ -CD y 20 mM en TM- $\beta$ -CD en este medio permitía separar simultáneamente los 12 enantiómeros de los fenoxiácidos estudiados con valores de resolución comprendidos entre 0.6 y 1.7 en 11 min. Se

investigó el efecto de la temperatura y se comprobó que a a 15°C era posible aumentar la resolución enantiomérica de los compuestos (entre 0.9 y 2.4) aunque en un tiempo algo mayor (16 min). Finalmente, la reducción de la concentración de HP- $\beta$ -CD en la mezcla dual a 7 mM permitió incrementar la resolución enantiomérica de fenoprop que era la más baja con resoluciones enantioméricas para todos los compuestos comprendidas entre 1.1 y 2.9 en 16 min. Un incremento en el valor del potencial a 25 kV permitió reducir el tiempo de análisis a 11 min con resoluciones enantioméricas de 2.7 para mecoprop, de 2.0 para dicloroprop, de 1.7 para 4-CPPA, de 1.6 para 2-CPPA y de 1.2 para fenoprop y 3-CPPA, con LODs instrumentales entre 0.7 y 1.5 mg/L, si bien en estas condiciones se observó una co-elución entre el enantiómero del mecoprop que eluye en segundo lugar y el enantiómero del dicloroprop que eluye en primer lugar.

Una vez llevada a cabo la separación enantiomérica simultánea de los 12 enantiómeros de los herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo, se sintetizaron y caracterizaron dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas con ligandos catiónicos con el fin de utilizarlas como sorbentes para la preconcentración por SPE de dichos compuestos. Los ligandos utilizados para la síntesis de estos materiales fueron cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio (STPA) y bis(3-trietoxisililpropil)amina (TEPA) que dieron lugar a la obtención de materiales (PMO-STPA y PMO-TEPA) que permiten trabajar en el modo mixto fase reversa/intercambio aniónico fuerte o intercambio aniónico fuerte, respectivamente. Las dos organosílices mesoporosas sintetizadas en este trabajo se caracterizaron mediante la realización de isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental, SEM, TEM, FTIR, TGA, y en el caso del material PMO-STPA se llevó a cabo también su caracterización adicional por RMN de sólidos de <sup>13</sup>C y de <sup>29</sup>Si. Asimismo, estos dos nuevos materiales se evaluaron como sorbentes para la extracción y

preconcentración de los seis herbicidas fenoxiácidos en aguas por SPE utilizando cantidades iniciales de los mismos de 100 y 200 mg y distintos valores de pH del disolvente de elución (2 x 4 mL de metanol a pH 5.6 o 1.8) cuando se hacían pasar volúmenes de 100 mL de una disolución acuosa standard de los compuestos estudiados a pH 6.3. Dado que las mejores recuperaciones se obtuvieron para PMO-STPA, se investigó el máximo volumen de disolución que era posible pasar por este sorbente (100 mg) sin que tuvieran lugar descensos apreciables de las recuperaciones de los analitos. Las recuperaciones más altas (entre 78.3 y 107.5 % para muestras de agua de río y de depuradora enriquecidas con los herbicidas fenoxiácidos) se obtuvieron para un volumen de 750 mL de muestra por lo que este material permitió obtener un factor de preconcentración de 1500, con LODs y LOQs del método obtenidos para las mismas muestras entre 0.1 y 4.3 µg/L y entre 0.4 y 14.3 µg/L, respectivamente.

En el capítulo VI de esta memoria, se ha optimizado un método analítico por Cromatografía Electrocinética con la ciclodextrina aniónica S-β-CD como selector quirial, para la separación simultánea rápida (7.5 min) de los enantiómeros de duloxetina y econazol. Además, el método ha permitido obtener resoluciones enantioméricas elevadas para ambos fármacos (7.9 para duloxetina y 6.5 para econazol). La metodología optimizada se ha aplicado a la evaluación de la estabilidad de los dos fármacos y de sus mezclas mediante la cuantificación individual de sus enantiómeros en muestras abióticas y bióticas, en este último caso utilizando dos organismos: la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna*. Para ello, se determinó la disminución de la concentración de los fármacos en las condiciones mencionadas a diferentes tiempos de incubación (hasta 72 h) estableciéndose los perfiles de estabilidad de mezclas de duloxetina y econazol, por primera vez, en condiciones bióticas y abióticas. Asimismo, con el fin de establecer el impacto de la presencia

de duloxetina y econazol en muestras ambientales sobre organismos no diana, se determinó la toxicidad de estos dos fármacos y de sus mezclas llevando a cabo su cuantificación por la metodología desarrollada en condiciones de ecotoxicidad utilizando los dos organismos mencionados (*Spirodela polyrhiza* y *Daphnia magna*). La determinación de los valores de EC50 y los índices de combinación han permitido establecer, por primera vez, la elevada toxicidad de las mezclas de duloxetina y econazol para ambos organismos. En todos los casos se utilizaron las concentraciones reales determinadas para los fármacos con el fin de evaluar la estabilidad y calcular todos los parámetros de toxicidad, y no las concentraciones nominales que son las empleadas en la mayoría de los artículos con objetivos similares a los planteados en este trabajo.





## **ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS**



### Abreviaturas y acrónimos

<b>2-PPA</b>	Ácido 2-fenoxipropiónico
<b>3-CPPA</b>	Ácido 2-(3-clorofenoxi)propiónico
<b>4-CPPA</b>	Ácido 2-(4-clorofenoxi)propiónico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>Ac-<math>\beta</math>-CD</b>	Acetil- $\beta$ -CD
<b>ANDA</b>	Ácido 7-amino-1,3-naftalendisulfónico
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
<b>API</b>	Ionización a presión atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Ionization</i> )
<b>BGE</b>	Disolución electrolítica ( <i>Background Electrolyte</i> )
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>CD-EKC</b>	Cromatografía electrocinética con ciclodextrinas ( <i>Cyclodextrin Electrokinetic Chromatography</i> )
<b>CE</b>	Electroforesis capilar ( <i>Capillary Electrophoresis</i> )
<b>CE-<math>\alpha</math>-CD</b>	Carboxietil- $\alpha$ -CD
<b>CE-<math>\beta</math>-CD</b>	Carboxietil- $\beta$ -CD
<b>CE-<math>\gamma</math>-CD</b>	Carboxietil- $\gamma$ -CD
<b>CEC</b>	Electrocromatografía capilar ( <i>Capillary Electrochromatography</i> )
<b>CI</b>	Índice de combinación ( <i>Combination Index</i> )
<b>CM-<math>\alpha</math>-CD</b>	Carboximetil- $\alpha$ -CD

<b>CM-β-CD</b>	Carboximetil-β-CD
<b>CM-γ-CD</b>	Carboximetil-γ-CD
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetilamonio ( <i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i> )
<b>d.e.</b>	Diámetro externo
<b>d.i.</b>	Diámetro interno
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada
<b>DAD</b>	Detector de diodos en serie ( <i>Diode Array Detector</i> )
<b>DLLME</b>	Microextracción líquido-líquido dispersiva ( <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> )
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado
<b>DM-β-CD</b>	Heptakis(2,6-di-O-metil)-β-CD
<b>DS</b>	Grado de sustitución ( <i>Degree of Substitution</i> )
<b>DTA</b>	Análisis térmico diferencial ( <i>Differential Thermal Analysis</i> )
<b>EA</b>	Análisis elemental ( <i>Elemental Analysis</i> )
<b>EC50</b>	Concentración que afecta al 50% de los organismos ( <i>Effective Concentration 50</i> )
<b>EDS</b>	Espectrometría de energía dispersiva ( <i>Energy-Dispersive Spectrometry</i> )
<b>EKC</b>	Cromatografía electrocinética ( <i>Electrokinetic Chromatography</i> )
<b>EME</b>	Extracción por electromembrana ( <i>Electromembrane extraction</i> )

<b>EMO</b>	Orden de migración enantiomérico ( <i>Enantiomer Migration Order</i> )
<b>EOF</b>	Flujo electroosmótico ( <i>Electroosmotic Flow</i> )
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray Ionization</i> )
<b>EtOAc</b>	Acetato de etilo
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>FTIR</b>	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier ( <i>Fourier-transform Infrared Spectroscopy</i> )
<b>GC</b>	Cromatografía de gases ( <i>Gas Chromatography</i> )
<b>GC-GC</b>	Cromatografía de gases en dos dimensiones
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	Ácido bórico
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido fosfórico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>HCOOH</b>	Ácido fórmico
<b>HDAM-β-CD</b>	Heptakis-(6-deoxi-6-amino)-β-CD
<b>HDAS-β-CD</b>	Heptakis-(2,3-di-O-acetil-6-O-sulfo)-β-CD
<b>HDMS-β-CD</b>	Heptakis-(2,3-di-O-metil-6-O-sulfo)-β-CD
<b>HP-B-β-CD</b>	Hidroxipropilbuten-β-CD
<b>HP-α-CD</b>	2-Hidroxipropil-α-CD
<b>HP-β-CD</b>	2-Hidroxipropil-β-CD
<b>HP-γ-CD</b>	2-Hidroxipropil-γ-CD
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

<b>ICH</b>	Conferencia internacional de armonización ( <i>International Conference on Harmonisation</i> )
<b>IT</b>	Trampa iónica ( <i>Ion Trap</i> )
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>LC-LC</b>	Cromatografía líquida ( <i>Liquid Chromatography</i> ) en dos dimensiones
<b>LIF</b>	Detector de fluorescencia inducida por láser ( <i>Laser Induced Fluorescence Detector</i> )
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido ( <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
<b>LOD</b>	Límite de detección ( <i>Limit of Detection</i> )
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación ( <i>Limit of Quantitation</i> )
<b>LPME</b>	Microextracción en fase líquida ( <i>Liquid Phase Microextraction</i> )
<b>MCE</b>	Electroforesis capilar en microchip ( <i>Microchip Capillary Electrophoresis</i> )
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MISPE</b>	Extracción en fase sólida con impresión molecular ( <i>Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction</i> )
<b>MS</b>	Espectrometría de masas ( <i>Mass Spectrometry</i> )
<b>M-<math>\alpha</math>-CD</b>	Metil- $\alpha$ -CD
<b>M-<math>\beta</math>-CD</b>	Metil- $\beta$ -CD
<b>M-<math>\gamma</math>-CD</b>	Metil- $\gamma$ -CD
<b>NAC</b>	N-acetil-L-cisteína

<b>NACE</b>	Electroforesis capilar no acuosa ( <i>Non-Aqueous Capillary Electrophoresis</i> )
<b>NP</b>	Polaridad normal ( <i>Normal Polarity</i> )
<b>OECD</b>	Organización para la cooperación y desarrollo económico ( <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> )
<b>OPA</b>	O-ftaldialdehido
<b>P123®</b>	Pluronic 123 (Poli(etilenglicol))
<b>PLE</b>	Extracción mediante líquidos presurizados ( <i>Pressurized Liquid Extraction</i> )
<b>PMO</b>	Organosílices periódicas mesoporosas ( <i>Periodic Mesoporous Organosilica</i> )
<b>P-<math>\alpha</math>-CD</b>	$\alpha$ -CD fosfatada
<b>P-<math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -CD fosfatada
<b>P-<math>\gamma</math>-CD</b>	$\gamma$ -CD fosfatada
<b>Q</b>	Cuadrupolo ( <i>Quadrupole</i> )
<b>QQQ</b>	Triple cuadrupolo
<b>QA-<math>\beta</math>-CD</b>	(2-hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- $\beta$ -CD
<b>QA-<math>\gamma</math>-CD</b>	(2-hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- $\gamma$ -CD
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RP</b>	Polaridad inversa ( <i>Reversed Polarity</i> )
<b>S-<math>\alpha</math>-CD</b>	$\alpha$ -CD sulfatada
<b>S-<math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -CD sulfatada
<b>S-<math>\gamma</math>-CD</b>	$\gamma$ -CD sulfatada
<b>SB-<math>\beta</math>-CD</b>	Sulfobutil- $\beta$ -CD



<b>SC</b>	Colato sódico ( <i>Sodium Cholate</i> )
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> )
<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
<b>SFC</b>	Cromatografía de fluidos supercríticos ( <i>Supercritical Fluid Chromatography</i> )
<b>SFC-SFC</b>	Cromatografía de fluidos supercríticos en dos dimensiones
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida ( <i>Solid-phase Extraction</i> )
<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida ( <i>Solid-phase Microextraction</i> )
<b>STPA</b>	(Estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio
<b>Suc-<math>\alpha</math>-CD</b>	Succinil- $\alpha$ -CD
<b>Suc-<math>\beta</math>-CD</b>	Succinil- $\beta$ -CD
<b>Suc-<math>\gamma</math>-CD</b>	Succinil- $\gamma$ -CD
<b>TA-<math>\beta</math>-CD</b>	Triacetil- $\beta$ -CD
<b>TEM</b>	Microscopía electrónica de transmisión ( <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
<b>TEOS</b>	Tetraetilortosilicato
<b>TEPA</b>	Bis(3-trietoxisililpropil)amina
<b>TESB</b>	1,4-bis(trietoxisilil)benceno
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico ( <i>Thermogravimetric Analysis</i> )
<b>TLC</b>	Cromatografía en capa fina ( <i>Thin-layer Chromatography</i> )
<b>TMSEB</b>	1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno
<b>TM-<math>\beta</math>-CD</b>	Heptakis 2,3,6-tri-o-metil- $\beta$ -CD
<b>ToF</b>	Tiempo de vuelo ( <i>Time of Flight</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta

<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>XRD</b>	Difracción de rayos X ( <i>X-Ray Diffraction</i> )

## **Símbolos**

<b>a</b>	Ordenada en el origen
<b>A<sub>C</sub></b>	Área corregida
<b>A<sub>R</sub></b>	Área corregida para cada enantiómero tras el proceso de SPE
<b>A<sub>T</sub></b>	Área corregida para cada enantiómero con recuperación del 100% tras el proceso de SPE
<b>b</b>	Pendiente de la recta de calibrado
<b>D</b>	Concentración de tóxico que afecta a una fracción de la población
<b>D<sub>m</sub></b>	Concentración media efectiva de tóxico
<b>f<sub>a</sub></b>	Fracción de población de un organismo
<b>Rs</b>	Resolución
<b>S<sub>a</sub></b>	Desviación estándar de la ordenada en el origen
<b>S/N</b>	Señal/Ruido
<b>t</b>	Tiempo de migración
<b>W<sub>1/2</sub></b>	Anchura de pico a la mitad de su altura
<b>μ</b>	Movilidad electroforética



# ÍNDICE



---

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Interés del análisis quiral</b>	<b>3</b>
<b>I.2 Técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas para análisis quiral</b>	<b>10</b>
<b>I.2.1 Cromatografía en Capa Fina</b>	<b>19</b>
<b>I.2.2 Cromatografía Líquida de Alta Resolución</b>	<b>20</b>
<b>I.2.3 Cromatografía de Gases</b>	<b>20</b>
<b>I.2.4 Cromatografía de Fluidos Supercríticos</b>	<b>21</b>
<b>I.2.5 Electroforesis Capilar</b>	<b>22</b>
<b>I.3 Separación enantiomérica de fármacos por Cromatografía Electrocinética</b>	<b>38</b>
<b>I.4 Separación enantiomérica de compuestos de interés medioambiental por Electroforesis Capilar</b>	<b>61</b>
<b>I.5 Organosílices mesoporosas como sorbentes para la extracción en fase sólida de compuestos de interés medioambiental</b>	<b>72</b>
<b>I.6 Objetivos</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>87</b>
<b>II.1 Reactivos, patrones y muestras</b>	<b>89</b>
<b>II.1.1 Reactivos</b>	<b>89</b>
<b>II.1.2 Patrones</b>	<b>92</b>
<b>II.1.3 Muestras</b>	<b>95</b>
<b>II.2 Instrumentación</b>	<b>96</b>
<b>II.3 Procedimientos</b>	<b>98</b>
<b>II.3.1 Electroforesis capilar</b>	<b>98</b>
<b>II.3.2 Preparación de tampones y medios de separación electroforéticos</b>	<b>100</b>
<b>II.3.3 Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras</b>	<b>100</b>
<b>II.3.4 Síntesis de las organosílices mesoporosas</b>	<b>101</b>

---

II.3.5 Extracción en fase sólida	103
II.3.6 Estudios de estabilidad de duloxetine, econazol y sus mezclas en los medios de cultivo correspondientes a <i>Spirodela polyrhiza</i> y <i>Daphnia magna</i>	104
II.3.7 Ensayos de toxicidad	105
II.4 Tratamiento de datos	106
<b>CAPÍTULO III. SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DEL FÁRMACO ANTIURÉMICO COLCHICINA POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA</b>	109
III.1 Introducción	111
III.2 Objetivos	113
III.3 Resultados y discusión	114
<b>Artículo 1</b>	119
<i>“Enantiomeric separation of the antiuremic drug colchicine by Electrokinetic Chromatography. Method development and quantitative analysis”.</i>	
N. Menéndez-López, J. Valimaña-Traverso, M. Castro-Puyana, A. Salgado, M. A. García, M.L. Marina.	
<b>Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis</b> 138 (2017) 189-196.	
<b>CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA SIMULTÁNEA DE UNA MEZCLA DE FÁRMACOS EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA PREVIA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON NUEVAS ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS SINTETIZADAS CON LIGANDOS NEUTROS</b>	149
IV.1 Introducción	151
IV.2 Objetivos	154
IV.3 Resultados y discusión	155

IV.3.1 Desarrollo de una metodología analítica por Cromatografía Electrocinética para la separación enantiomérica simultánea de una mezcla de siete fármacos de uso común	155
IV.3.2 Síntesis de tres organosílices mesoporosas periódicas basadas en ligandos neutros	157
IV.3.3 Caracterización de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos neutros	157
IV.3.4 Evaluación de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los siete fármacos estudiados en aguas por SPE	160
<b>Artículo 2</b>	163
<i>“Periodic mesoporous organosilica materials as sorbents for solid-phase extraction of drugs prior to simultaneous enantiomeric separation by capillary electrophoresis”.</i>	
J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M. A. García, I. Sierra, M.L. Marina.	
<b>Journal of Chromatography A</b> 1566 (2018) 135-145.	
<b>CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA SIMULTÁNEA DE UN GRUPO DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA PREVIA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON NUEVAS ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS SINTETIZADAS CON LIGANDOS CATIONICOS</b>	215
V.1 Introducción	217
V.2 Objetivos	219
V.3 Resultados y discusión	220
V.3.1 Desarrollo de una metodología analítica por Cromatografía Electrocinética para la separación enantiomérica simultánea de una mezcla de seis herbicidas fenoxiácidos	220



V.3.2 Síntesis de dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas basadas en ligandos catiónicos	223
V.3.3 Caracterización de las nuevas organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos catiónicos	224
V.3.4 Evaluación de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos catiónicos para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en aguas por SPE	226
<b>Artículo 3</b>	229
<i>“Cationic amine-bridged periodic mesoporous organosilica materials for off-line solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples prior to their simultaneous enantiomeric determination by capillary electrophoresis”.</i>	
J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelo, D. Pérez-Quintanilla, M. A. García, I. Sierra, M.L. Marina.	
<b>Journal of Chromatography A</b> 1566 (2018) 146-157.	
<b>CAPÍTULO VI. ESTABILIDAD ENANTIOMÉRICA Y TOXICIDAD DE DULOXETINA, ECONAZOL Y SUS MEZCLAS POR CROMATOGRAFÍA ELECTROCINÉTICA</b>	285
<b>VI.1 Introducción</b>	287
<b>VI.2 Objetivos</b>	289
<b>VI.3 Resultados y discusión</b>	290
VI.3.1 Optimización de una metodología analítica por EKC para la separación enantiomérica simultánea de duloxetina y econazol	290
VI.3.2 Estudios de estabilidad enantiomérica en condiciones abióticas y bióticas para duloxetina, econazol y sus mezclas	292
VI.3.3 Determinación de la toxicidad de duloxetina, econazol y sus mezclas para la planta acuática <i>Spirodela polyrhiza</i> y el microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	293

---

<b>Artículo 4</b>	297
<i>“Stability and toxicity studies for duloxetine and econazole on Spirodela polyrhiza using chiral capillary electrophoresis”.</i>	
J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M. A. García, M.L. Marina.	
<b>Journal of Hazardous Materials:</b> <i>En primera revisión.</i>	
<b>Artículo 5</b>	323
<i>“Enantiomer stability and combined toxicity of duloxetine and econazole on Daphnia magna using real concentrations determined by capillary electrophoresis”.</i>	
J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M. A. García, M.L. Marina.	
<b>Journal of Science of the Total Environment:</b> <i>En primera revisión.</i>	
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES</b>	353
<b>CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	363



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS**



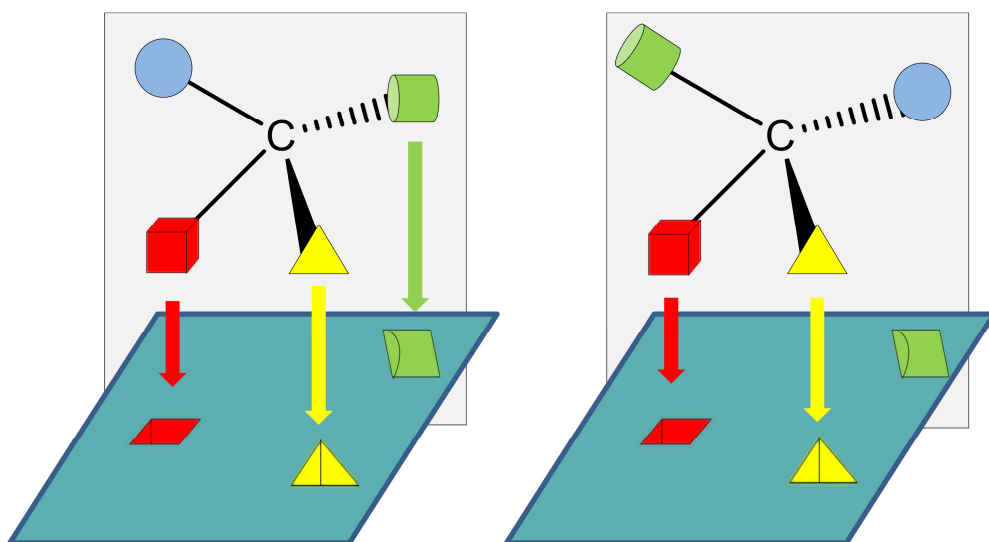
## I.1 Interés del análisis quiral

La asimetría es una propiedad fundamental del universo [1], que abarca desde todo el cosmos hasta la más pequeña y simple molécula orgánica. “*Es la asimetría lo que crea el fenómeno. Cuando ciertos efectos desvelan una cierta asimetría, se deben investigar las causas de ésta*”, frase atribuida a Pierre Curie sobre la quiralidad de la vida [2]. Este concepto es uno de los más importantes en la naturaleza y en la química orgánica, pues sistemas biológicos complejos ven condicionada su actividad en función de él. Así, la quiralidad constituye una propiedad intrínsecamente relacionada con el desarrollo de los seres vivos, y tanto metabolitos primarios (aminoácidos, azúcares) como metabolitos secundarios producidos por plantas y microorganismos, son compuestos quirales que se presentan enantioméricamente puros. Esta estereoespecificidad de un compuesto quiral en un sistema biológico tiende a producir una serie de reacciones en el organismo que pueden tener diferentes consecuencias en función del isómero administrado, como veremos a continuación.

Las moléculas que poseen los mismos átomos y conectividad, pero difieren en la orientación tridimensional, se denominan esteroisómeros e incluyen tanto a los enantiómeros como a los diastereoisómeros, considerándose a los primeros como aquellos isómeros que son imágenes especulares no superponibles, como son nuestras manos [3]; de hecho, el término quiralidad viene de *chiros*, que en griego significa mano. Esta característica no la cumplen los diastereoisómeros [4]. Para un compuesto que posee N centros asimétricos o estereogénicos, es decir, N átomos con diferentes sustituyentes, como puede darse en los átomos de carbono, nitrógeno, azufre, y fósforo [5], existen  $2^N$  esteroisómeros [4]. Existe una nomenclatura específica para denominar a los esteroisómeros, como es el sistema D/L para biomoléculas con un único centro

quiral, o el sistema elaborado por Cahn-Ingold-Prelog con los estereodescriptores R/S para el resto de moléculas con uno o más centros quirales [3].

Los enantiómeros de un mismo compuesto quiral poseen las mismas propiedades físico-químicas, pero no interactúan del mismo modo en un entorno quiral. Por ello, pueden tener diferente actividad biológica ya que poseen estereoespecificidad frente a determinados receptores y sitios activos [6]. Ello se explica mediante el “modelo de anclaje a 3 puntos” [7], según el cual dos enantiómeros reaccionan de diferente modo para un mismo receptor quiral como los existentes en la superficie celular, tal y como se representa en la **Figura I.1**. Es más, las interacciones entre moléculas biológicamente activas y receptores de proteínas o enzimas suelen mostrar una alta o completa estereoselectividad, por lo que la afinidad entre ambas partes resultará en diferente actividad biológica.



**Figura I.1.** Modelo enantiomérico de anclaje a tres puntos. Reproducida con el permiso de [7].

El impacto de la quiralidad es muy grande en diferentes campos como el farmacéutico [8], clínico, alimentario, medioambiental o forense, entre otros [9, 10]. Ello se debe a la diferente actividad biológica que pueden tener los dos enantiómeros de un compuesto quiral.

En lo que respecta al campo farmacéutico, hoy en día, más del 60 % de los fármacos comercializados son quirales [11], y en estos casos, uno de los enantiómeros puede tener la actividad deseada mientras que para el otro se pueden dar distintas situaciones:

- Que no presente actividad, como es el caso del ibuprofeno (cuyo enantiómero R es inactivo y tiende a convertirse en el activo por acción enzimática) [12], el propranolol [13] o el betaxolol [13].
- Que posea exactamente la misma actividad, como es el caso del sotalol, cuyos dos enantiómeros poseen propiedades antiarrítmicas [14].
- Que posea actividad, pero de menor intensidad, como es el caso de la ketamina, para el que el enantiómero R presenta una menor potencia anestésica [15] o la colchicina cuyo enantiómero R posee una menor actividad antiurémica [16]. En este caso, al más activo se le denomina eutómero [17], mientras que al menos activo distómero [18].
- Que posea actividad totalmente diferente, como es el caso de fluoxetina, cuyo enantiómero R resulta ser eficaz contra la ansiedad y disfunción sexual, mientras que el S es útil contra las migrañas [10], o el caso de levometorfano (analgésico opioide) y de dextrometorfano (antitusígeno) [19].
- Que presente toxicidad, como es el caso de la penicilamina, cuyo enantiómero R resulta ser neurotóxico [15], la bupivacaína, un anestésico administrado



como racémico y cuyo enantiómero R posee cierta toxicidad cardíaca y cerebral [20], o la talidomida cuyo enantiómero S resultó ser un agente teratogénico muy potente que produjo en los años 60 del siglo pasado consecuencias muy graves para los fetos al ser pautaado el racemato a las mujeres embarazadas para tratar las náuseas y mareos [15].

Todo ello ha motivado que cuando un fármaco se comercialice como racemato sean necesarios estudios farmacológicos y toxicológicos de cada enantiómero por separado. También en muchos casos se han comercializado fármacos enantioméricamente puros para evitar los inconvenientes del enantiómero cuya actividad es distinta a la deseada. De esta forma, no se expone al organismo a la acción de un enantiómero que podría ser no activo o incluso ser perjudicial para el organismo [21]. Solo en aquellos casos en los que los dos enantiómeros poseen actividades biológicas complementarias debe resultar interesante la utilización de fármacos racémicos. De hecho, incluso cuando las características de ambos enantiómeros se han establecido con seguridad, sigue teniendo más ventajas utilizar enantiómeros puros lo que se ha traducido en un incremento de fármacos comercializados enantioméricamente puros [22].

El desarrollo de fármacos como enantiómeros puros ha hecho necesario disponer de procedimientos de síntesis asimétrica en los cuales se obtiene uno de los enantiómeros con alta pureza [10]. Ello se encuadra dentro de las líneas de investigación que se centran en el estudio de catalizadores adecuados y procedimientos de síntesis que permitan introducir el centro estereogénico específico deseado [23] y obtener elevados enriquecimientos enantioméricos. Otra opción para obtener enantiómeros puros es llevar a cabo la síntesis del compuesto racémico mediante una síntesis convencional y a continuación utilizar técnicas de separación preparativas para obtener uno de los enantiómeros purificado al

separarlo del otro. En ambos casos, se hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas estereoselectivas sensibles que permitan la determinación individual de los estereoisómeros proporcionando las herramientas necesarias para evaluar la efectividad de los procesos de síntesis asimétrica en el primer caso y de separación estereoselectiva en el segundo. En todo caso, la determinación de la pureza enantiomérica es necesaria tanto en materias primas como en producto terminado. De hecho, el enantiómero que no debe estar presente en un fármaco enantiómericamente puro se considera una impureza enantiomérica y no debe superar el 0.1 % en el fármaco de acuerdo con la normativa ICH (International Conference of Harmonization) [24].

El sector clínico también ha sido otro campo en el que el análisis quiral ha resultado tener gran relevancia debido a la posibilidad de estudiar si un determinado enantiómero posee relación con ciertas enfermedades, ya que los sistemas biológicos basan su funcionalidad en la acción de enantiómeros específicos. En efecto, se han propuesto enantiómeros puros de compuestos quirales como biomarcadores de enfermedades al haber sido relacionados con determinadas patologías. Como ejemplos se puede citar que: i) las hormonas y neurotransmisores relacionados con el sistema nervioso autónomo se encuentran en sus formas enantioméricas puras (L-dopamina, L-tirosina y D-aldosterona) [21]; ii) la determinación enantiomérica de una serie de aminoácidos libres en pacientes que se encuentran en diferentes etapas del desarrollo de Alzheimer ha revelado que la variación de la concentración de los enantiómeros puros de estos compuestos está relacionada con el avance de la enfermedad encontrándose L-Glu, L-Arg, L-Asp y L-Lys entre los potenciales biomacadores de mayor interés [25, 26]. También en el caso de enfermedades del riñón, una serie de aminoácidos de configuración D, pese a encontrarse a nivel de trazas en el organismo, resultaron ser efectivos biomarcadores al incrementarse sus concentraciones en la

mayoría de pacientes (D-Ser, D-Ala, D-Pro y D-Asn) [27]; iii) El isómero D-chiro-inositol resultó ser un biomarcador útil para indicar evidencias del síndrome de ovario poliquístico debido a la deficiencia de este compuesto en los tejidos de este órgano que posee una implicación directa con alteraciones hormonales [28].

En el campo de la industria alimentaria el impacto de la quiralidad es también de extrema importancia. De hecho, la adición de D-aminoácidos a suplementos alimenticios está prohibida por la normativa legal [29] de modo que únicamente se pueden utilizar L-aminoácidos [21], que son los isómeros predominantes de forma natural en los sistemas biológicos, con dichos fines [30]. Dado que la adición de racematos es mucho más ventajosa económicamente, es necesario controlar estos alimentos para evitar fraudes no solo económicos, sino que también pueden presentar riesgos para la salud dada la distinta actividad biológica que pueden tener los D-enantiómeros. Por otra parte, los D-aminoácidos pueden generarse en determinados procesados como la fermentación que puede originar la racemización del enantiómero L para dar lugar al D [31]. Además, los D-aminoácidos también pueden aparecer por contaminación microbiológica. Por todo ello, se exige un estricto control de calidad de los alimentos que, entre otros, implica el análisis enantiomérico de compuestos quirales. Aunque el análisis de aminoácidos proteínogénicos (componentes principales de las proteínas y péptidos) [31, 32] y no proteínogénicos en alimentos es de gran interés, y puede aportar información muy relevante sobre la adulteración o estado de conservación de los alimentos, existen otros compuestos quirales cuya determinación enantiomérica es necesaria como D-azúcares [10], edulcorantes como aspartamo [33] o saborizantes (derivados de lactonas o de hesperetinas) [34].

En lo que se refiere al campo del medioambiente, resaltar el carácter quiral de muchos de los contaminantes presentes en las diferentes matrices. Asimismo, el 30 % de los productos agroquímicos que se utilizan (pesticidas) son quirales [35]. En el primer caso, destacar que para evaluar de forma correcta la toxicidad de muestras ambientales, es necesario llevar a cabo una determinación enantiomérica de los contaminantes que se desea estudiar ya que la determinación de la cantidad total presente de dichos contaminantes no es útil debido a la diferente toxicidad que pueden tener los distintos estereoisómeros de contaminantes quirales. En el caso de los agroquímicos, es importante concienciar a la industria relacionada de que cuando solo uno de los estereoisómeros posee la actividad deseada se deben comercializar formulaciones agroquímicas que contengan el enantiómero puro. Aunque en algunos casos esto es así (metamifop [36], y mecoprop, dicloroprop y uniconazol, entre otros [37]), aún se hace necesario que existan normativas legales a nivel mundial que prohíban el empleo de racematos, como así se establece en las normativas de algunos países europeos como Holanda, Suecia y Dinamarca, que han decretado que solo debe usarse el enantiómero activo en las formulaciones de herbicidas fenoxiácidos revocando los registros de estos herbicidas racémicos y aprobando registros de productos enantioméricamente puros [38]. En efecto, el uso de agroquímicos racémicos puede producir un perjuicio tan enorme como innecesario ya que si uno de los dos enantiómeros no es activo (como es el caso de los herbicidas fenoxiácidos, por ejemplo [35]), se está añadiendo al medioambiente el doble de la cantidad necesaria del compuesto quiral para obtener el mismo efecto herbicida, insecticida etc. La producción de formulaciones agroquímicas enantioméricamente puras implica la necesidad de disponer de métodos adecuados para el control de calidad de las mismas lo cual requiere la determinación individual de los enantiómeros.

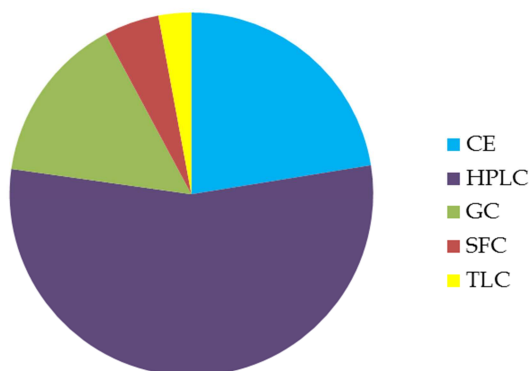
Destacar además que, dependiendo del tipo de pesticida, el isómero activo puede ser el R (como en el caso de los herbicidas fenoxiácidos) o el S (para acetanilidas y derivados de feniléteres) [35].

Todo lo mencionado anteriormente pone de manifiesto el enorme interés que tiene en la actualidad el desarrollar metodologías analíticas quirales que permitan la determinación individual de los enantiómeros de compuestos de interés en los campos farmacéutico, clínico, alimentario o medioambiental/agroquímico, entre otros. Para conseguir este objetivo, es necesario utilizar técnicas de separación por lo que a continuación se describirán brevemente las características de las principales técnicas basadas en principios cromatográficos y electroforéticos utilizadas con este fin.

## **I.2 Técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas para análisis quiral**

Las técnicas de separación basadas en principios cromatográficos y electroforéticos que más se han utilizado para análisis quiral han sido la Cromatografía en Capa Fina (TLC), la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), la Cromatografía de Gases (GC), la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC) y la Electroforesis Capilar (CE).

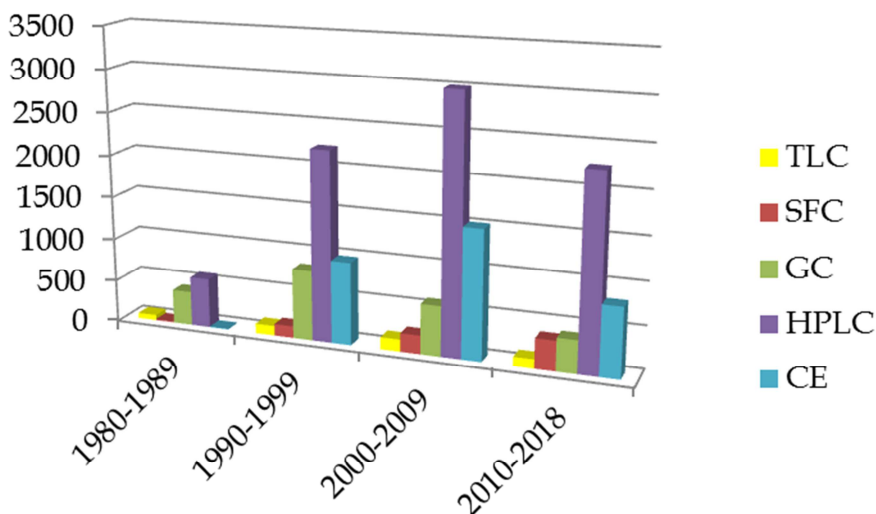
Como se observa en la **Figura I.2**, la técnica más empleada ha sido HPLC seguida de CE y GC mientras que las técnicas menos empleadas han sido SFC y TLC.



**Figura I.2.** Gráfico que representa el número de artículos publicados en relación a la separación enantiomérica de compuestos quirales por las distintas técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas más empleadas. Datos obtenidos de SciFinder Scholar a fecha de octubre de 2018.

Asimismo, la **Figura I.3** representa el número de publicaciones científicas aparecidas por década desde 1980 hasta la actualidad y en las que se han llevado a cabo separaciones quirales utilizando las técnicas de separación mencionadas. Teniendo en cuenta que la última década no está completa, se observa que el número de publicaciones relacionadas con el análisis quiral ha ido aumentando considerablemente a lo largo de los años siendo HPLC la técnica más utilizada para llevar a cabo separaciones enantioméricas seguida de CE a partir de los años 90, momento en que esta técnica irrumpe en el ámbito científico de las separaciones consolidándose en los años siguientes. Puede observarse también que, aunque en la década de los 80 se utiliza HPLC en extensión similar a la GC, esta última técnica ha sufrido un estancamiento en las dos últimas décadas en lo que se refiere al análisis quiral, probablemente debido al desarrollo de las técnicas en fase líquida como HPLC y CE en dicho período. Las técnicas menos empleadas

para análisis quiral han sido TLC y SFC, si bien esta última se implementa con mayor extensión que TLC en las dos últimas décadas.



**Figura I.3.** Número de publicaciones aparecidas por década desde 1980 empleando las diferentes técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas para el análisis quiral.

Datos obtenidos de Scifinder Scholar a fecha de octubre de 2018.

Existen dos modos de trabajo posibles para llevar a cabo una separación enantiomérica [39, 40]:

- Modo indirecto: Consiste en realizar la derivatización de los compuestos quirales con otro reactivo quiral auxiliar con el fin de formar los correspondientes diastereoisómeros [41] y separarlos con una columna cromatográfica no quiral. Como ventaja de este modo, mencionar la posibilidad de reducir los límites de detección de los diastereómeros utilizando detección de fluorescencia cuando el reactivo quiral es fluorescente

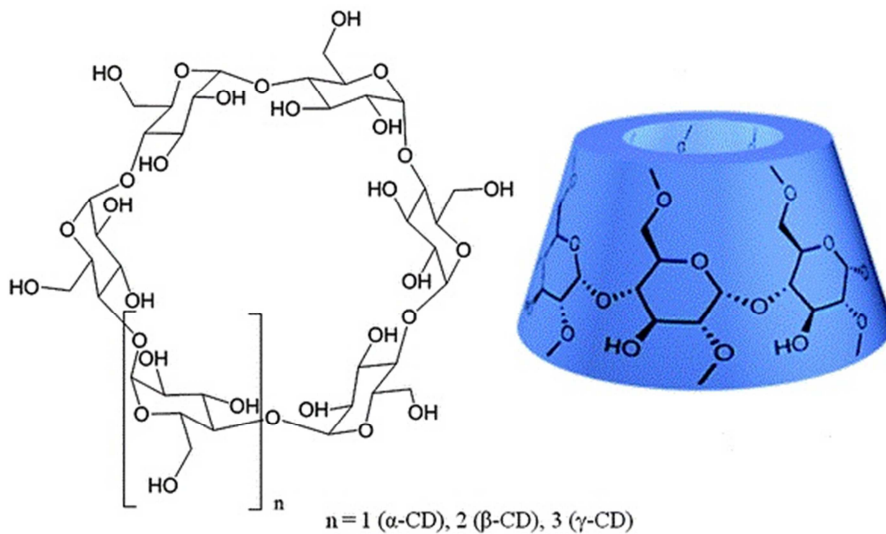
[40]. Como inconveniente citar la necesidad de que el agente derivatizante tenga una muy alta pureza enantiomérica para no dar lugar a interferencias [40]. Asimismo, la etapa de derivatización de los analitos incrementa el tiempo de análisis.

- Modo directo: Consiste en utilizar una fase quiral que da lugar a un intermedio diastereomérico transitorio con los compuestos quirales en cuya formación intervienen factores cinéticos y termodinámicos [41], y que hace posible la elución de los enantiómeros a diferentes tiempos. La fase quiral puede estar anclada a una fase estacionaria inmóvil o puede ser un selector quiral añadido al medio de separación. Por tanto, en este modo tiene lugar una separación enantiomérica basada en un principio cromatográfico y/o electroforético. Este modo tiene la ventaja de que existe una gran variedad de columnas cromatográficas y selectores quirales lo que permite evitar la etapa de derivatización necesaria en el modo indirecto para la obtención de los diastereoisómeros.

Las fases estacionarias quirales más frecuentemente empleadas en las técnicas cromatográficas se basan en el anclaje de determinadas moléculas con diferentes grupos funcionales sobre soportes aquirales como gel de sílice o polímeros orgánicos y se encuentran empaquetadas en la columna o unidas a su pared interna [42]. El mecanismo de separación consiste en el reconocimiento enantiomérico en los diferentes canales/cavidades de la fase estacionaria donde los enantiómeros quedan estereoespecíficamente atrapados interviniendo importantes interacciones tipo puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo,  $\pi$ - $\pi$ ,  $\pi$ -ácidas,  $\pi$ -básicas y Van der Waals [43]. Entre las moléculas quirales más comunes para funcionalizar estas columnas se encuentran:



- Polisacáridos: Están constituidos por moléculas nativas de celulosa o amilosa [43], con diferente estructura helicoidal, y comercializadas con el nombre Chiralcel o Chiralpak, respectivamente, junto con otros sufijos en función de los derivados funcionalizados empleados. Otras fases de este tipo son las dextrinas helicoidales y dextrans para compuestos iónicos, y heparina y sulfato de condroitina tanto para analitos neutros como iónicos [44].
- Ciclodextrinas (CDs) y derivados: Las CDs son oligosacáridos cíclicos, con forma de cono truncado, formados por unidades de glucopiranosas (6 para las  $\alpha$ -CDs, 7 para las  $\beta$ -CDs y 8 para las  $\gamma$ -CDs) y en los cuales existen hasta 3 sustituyentes hidroxilos funcionalizables por unidad (en posición C-2, C-3 y C-6) (**Figura I.4**). Los grupos polares se encuentran en la parte externa del macrociclo mientras que la cavidad es hidrófoba [42]. Estas moléculas dan lugar a la formación de complejos entre los analitos (*guest*) y la cavidad (*host*) mediante el mecanismo conocido como “*host-guest*” o de inclusión, jugando el tamaño de la cavidad y del analito un papel importante en la interacción analito-CD [45]. No obstante, no es necesaria la total inclusión del enantiómero en la cavidad del selector, ya que la interacción analito-CD puede verse incrementada en aquellos casos en los que el analito posea grupos aromáticos o hidrofóbicos, e incluso puede tener lugar una interacción intermolecular a través de la pared exterior mediante puentes de hidrógeno con analitos polares [10].



**Figura I.4.** Estructura química de una ciclodextrina. Reproducida con el permiso de [46].

- **Antibióticos macrocíclicos:** Son glicopéptidos que poseen multitud de grupos funcionales que pueden interactuar estereoselectivamente con los analitos debido a interacciones iónicas,  $\pi$ - $\pi$ , puentes de hidrógeno, complejación por inclusión [10]. Estos antibióticos pueden ser clasificados en dos grupos [47]: glicopéptidos como son la rifamicina B, rifamicina SV, vancomicina, teicoplanina o ristocetina A [44, 48], y aminoglucósidos, como frademicina, kanamicinas y estreptomina [47]. Como inconvenientes de las fases estacionarias basadas en antibióticos macrocíclicos, destacar la baja estabilidad que presentan a altas temperaturas y condiciones muy ácidas o muy básicas, además de su alta absorción UV por debajo de 250 nm, dando lugar a una disminución de la sensibilidad de detección [49].
- **Éteres corona:** Pueden resolver enantioméricamente con gran eficacia gran diversidad de compuestos quirales que poseen grupos amino primarios [50].

- Ligandos de intercambio: Suelen emplearse derivados de aminoácidos [51-54] complejados con un ión metálico ( $\text{Cu}^{2+}$ ), de modo que se formen complejos ternarios diastereoméricos con los analitos.
- Líquidos iónicos: Son sales que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente, pertenecientes a una clase única de disolventes no moleculares con punto de fusión por debajo de los  $100^{\circ}\text{C}$  [55]. Se han empleado como fases estacionarias quirales [52, 55-62] que, en algunos casos, se han bifuncionalizado al unir una CD a la fase estacionaria de líquido iónico quiral [57].
- Proteínas: Su carácter anfótero les confiere gran utilidad para separar quiralmente analitos neutros o iónicos, dados los múltiples sitios de enlace que poseen las proteínas en su superficie [47]. Entre las proteínas más empleadas para preparar fases estacionarias destacar la albúmina sérica [42], penicilina G-acilasa, anticuerpos y estreptavidina [47].

Las columnas cromatográficas quirales suelen tener un alto coste económico [63], y además la selectividad y eficacia del selector quiral anclado a las mismas con respecto a un grupo determinado de analitos puede ser desconocida de antemano. Ello implica que deben realizarse pruebas de ensayo y error con distintas columnas ya que no se conoce cuál de los selectores quirales anclados a las mismas proporcionará la mejor separación quiral, no habiendo condiciones generales de separación quiral válidas para una amplia gama de analitos. Estos inconvenientes constituyen uno de los motivos por los que las separaciones quirales por CE utilizando selectores quirales en el medio de separación, tienen un enorme atractivo como se verá más adelante y además, son la base de muchas de las investigaciones que se llevan a cabo en la actualidad con

el fin de poder avanzar en el conocimiento de las interacciones analito-selector quiral para hacer posible la predicción del paso más difícil y más importante en una separación enantiomérica, la selección del selector quiral [64].

La naturaleza del selector quiral además puede ser responsable del orden de elución/migración de los enantiómeros (EMO), concepto de gran interés en determinadas situaciones que se plantean en análisis quiral como la determinación de impurezas enantioméricas. En este caso, es recomendable que la impureza enantiomérica eluya/migre en primer lugar ya que, de lo contrario, su pico podría co-eluir con el del enantiómero mayoritario dificultando su determinación. Además de la naturaleza del selector quiral, su concentración también puede dar lugar a una inversión del EMO [65-70]. El EMO depende de las constantes de asociación analito-selector quiral y de la movilidad electroforética ( $\mu$ ) del complejo [64].

Pero si la elección de la columna/selector quiral adecuado es crucial en una separación enantiomérica, la sensibilidad de detección es otro aspecto de extrema importancia en análisis quiral ya que la determinación de la impureza enantiomérica en una materia prima o en una formulación comercial requiere la cuantificación de una muy baja cantidad de uno de los enantiómeros en presencia de una muy elevada cantidad del enantiómero mayoritario. Los sistemas de detección más empleados para análisis quiral han sido aquellos utilizados en las técnicas cromatográficas con columnas no quirales [71, 72] como son detección Ultravioleta con detección de diodos en serie (UV-DAD), fluorescencia convencional y fluorescencia inducida por láser (LIF), fosforescencia, potenciometría, amperometría, conductimetría, Raman, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o Espectrometría de Masas (MS) incluyendo sistemas utilizados en GC o SFC como Ionización de llama y otros. En muchos casos, es posible llevar

a cabo también detección indirecta por disminución de la señal del analito o por derivatización para formar un compuesto detectable por el sistema elegido [40]. En la actualidad, cada vez se utilizan más los detectores de MS por la sensibilidad que aportan [73] y la información estructural que proporcionan para los analitos existiendo una amplia variedad de configuraciones [47, 73-75] para las distintas necesidades con diferentes analizadores (Cuadrupolo (Q), Trampa de Iones (IT), Tiempo de vuelo (ToF), triple Cuadruplo (QQQ), Orbitrap, etc.) y sistemas de nebulización (Ionización por Electrospray (ESI), Ionización a Presión Atmosférica (API), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), etc.), si bien con limitaciones en algunas técnicas como CE cuando se utilizan selectores quirales no volátiles en el medio de separación [73, 74].

Finalmente, existen detectores capaces de reconocer enantiómeros si bien su empleo ha sido limitado. Algunos de ellos son los siguientes [76]:

- Los polarímetros, que miden el grado de rotación de la luz polarizada cuando esta atraviesa la muestra.
- Detectores de dispersión óptica rotatoria, basados en el mismo principio que el anterior, pero a longitudes de onda menores.
- Detectores basados en dicroísmo circular, que miden la diferencia de absorción de luz circularmente polarizada a izquierda y derecha cuando el analito fluye a través de la celda del detector, siendo más sensible que los dos anteriores.

La necesidad de obtener metodologías sensibles para el análisis quiral accesibles a muchos laboratorios y el elevado coste de algunos sistemas de detección como MS, ha implicado la utilización de sistemas de detección económicos como los basados en detección óptica combinados con técnicas de

preparación de muestra off-line u on-line para la pre-concentración de los analitos [71]. A este aspecto se prestará atención en la parte final de este capítulo.

A continuación, se comentarán brevemente algunas características de las técnicas de separación cromatográficas quirales [52] y se pondrá especial énfasis en la técnica utilizada en este trabajo de investigación y que ha sido la Electroforesis Capilar.

### **I.2.1 Cromatografía en capa fina**

Entre las diferentes formas de separación quiral en TLC se encuentran las siguientes:

- Empleo de fases estacionarias quirales constituidas por un selector quiral unido a la placa cromatográfica de sílice, como pueden ser CDs, biopolímeros, polisacáridos, etc., siendo necesaria una fase móvil aquiral para eluir los isómeros.
- Placas cromatográficas impregnadas con el selector quiral, usándose también una fase móvil aquiral para la elución.
- Placas cromatográficas aquirales con aditivos quirales en la fase móvil.

TLC constituye una metodología cromatográfica práctica para la separación de racematos y el control de pureza enantiomérica [17] ya que ofrece gran simplicidad, flexibilidad de trabajo y bajo coste. Sin embargo, los largos tiempos de análisis y las dificultades en la automatización de la detección con

distintos sistemas en especial aquellos que proporcionan información estructural, justifica que haya sido escasamente empleada (ver **Figura I.2**).

### **I.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución**

Como ya se ha comentado, esta técnica de separación ha sido la más utilizada en análisis quiral como muestra la **Figura I.2**. Aunque es posible llevar a cabo separaciones quirales por HPLC añadiendo un selector quiral a la fase móvil (utilizando una columna no quiral), el método más empleado ha sido la utilización de columnas quirales. Existe una gran variedad de fases estacionarias quirales utilizadas para llevar a cabo determinaciones enantioméricas por HPLC [77, 78], tal y como se ha descrito anteriormente. El elevado coste de estas columnas quirales constituye el principal inconveniente de HPLC en este campo, en comparación con otras técnicas que se describirán más adelante y que no requieren el empleo de columnas quirales, como es la CE.

### **I.2.3 Cromatografía de gases**

Al igual que para HPLC, como se ha puesto de manifiesto en este capítulo, existe una gran variedad de fases estacionarias quirales para su empleo en la separación de enantiómeros por GC. Aunque esta técnica se ha utilizado en menor extensión que HPLC (ver **Figura I.2**), y ha sido desplazada en parte, en los últimos años por CE (ver **Figura I.3**), presenta una interesante complementariedad con estas dos técnicas en algunas aplicaciones. Para evitar el deterioro de las columnas quirales, se debe operar con temperaturas máximas comprendidas entre 200 y 250°C [52]. Finalmente, al igual que en HPLC, el elevado coste de las columnas quirales para GC es uno de sus principales

inconvenientes y también la imposibilidad de analizar compuestos no volátiles o termolábiles, lo que limita su campo de aplicación, constituyendo ello un motivo que justifica el amplio número de aplicaciones desarrolladas por HPLC quiral, así como el impulso experimentado por CE en el campo de las separaciones enantioméricas.

#### **I.2.4 Cromatografía de fluidos supercríticos**

A pesar de ocupar el cuarto puesto entre las técnicas de separación quiral (**Figura I.2**), la utilización de SFC en el análisis de enantiómeros ha ido en aumento en las últimas décadas en contraposición a lo observado para GC (**Figura I.3**). Ello ha podido venir motivado por las interesantes características de los fluidos supercríticos, que poseen menor viscosidad que un líquido y mayor coeficiente de difusión que un gas con las consiguientes ventajas sobre la facilidad de controlar la densidad de la fase móvil [79] respecto a HPLC, dando lugar en muchos casos a mayores eficacias e incluso menores tiempos de análisis. Destacar el interés del CO<sub>2</sub> dados sus parámetros críticos, su bajo coste y reducida toxicidad e impacto ambiental si bien para solutos polares se hace necesario emplear un disolvente orgánico adicional de naturaleza polar [80]. También en este caso, es posible utilizar una variedad de columnas quirales como las mencionadas anteriormente en este capítulo.

Todas las técnicas de separación quiral que se acaban de mencionar, se han implementado en formato bidimensional, tanto TLC en dos dimensiones como LC-LC, SFC-SFC o GC-GC. En estos últimos casos, es posible acoplar dos columnas con diferente selectividad quiral con el fin de potenciar la separación de enantiómeros de analitos con distintas características en muestras complejas.

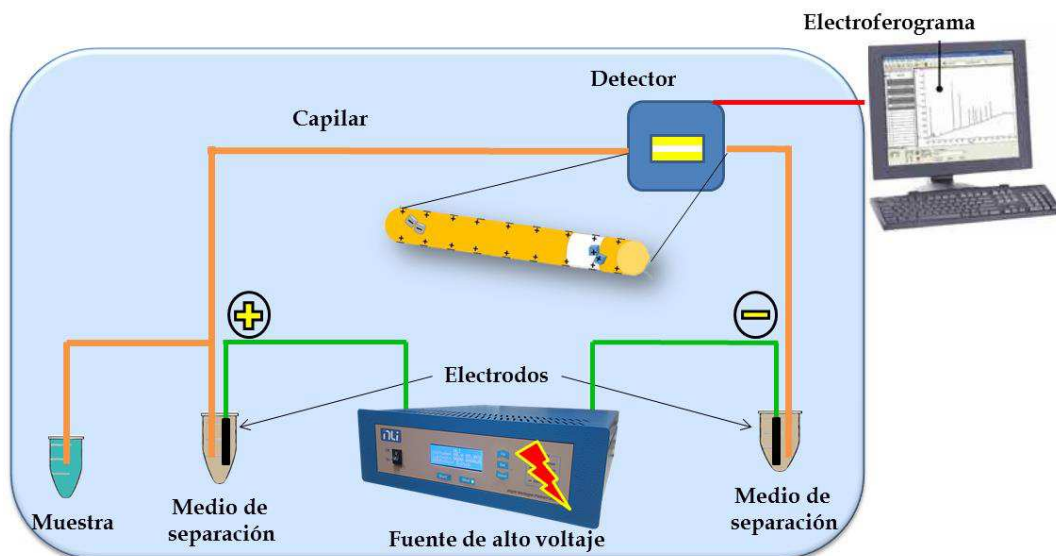


### **I.2.5 Electroforesis capilar**

Esta técnica se basa en la diferente movilidad de especies iónicas presentes en una disolución electrolítica bajo la acción de un campo eléctrico aplicado en el seno de un capilar [81]. La separación se fundamenta en dos fenómenos físico-químicos: la migración electroforética y la electroósmosis. La primera implica la diferente movilidad electroforética de los iones de la muestra en el seno de una disolución conductora cuando se le somete a un campo eléctrico determinado. La movilidad electroforética discrimina entre las diferentes sustancias en función de su relación carga/tamaño y hace que las sustancias cargadas tiendan a moverse hacia el polo de signo contrario al de su carga, con mayor velocidad cuanto mayor sea su carga y menor su tamaño. El otro fenómeno que interviene en la separación es la “electroósmosis”, que es independiente de las especies analizadas, y tiene lugar en el interior de los capilares de sílice. Se origina como consecuencia de la ionización de los grupos silanoles de la sílice (Si-OH), formándose grupos Si-O<sup>-</sup> y este exceso de cargas negativas en la pared del capilar se neutraliza parcialmente con los iones positivos de la disolución electrolítica (BGE), que se organizan en el interior del capilar formando una doble capa (capa Stern, fija, y capa difusa, móvil). Como consecuencia de ello, al aplicar el campo eléctrico, esta organización de cargas positivas hace que el conjunto de la disolución electrolítica se desplace hacia el polo negativo (cátodo) arrastrando las moléculas y especies que estén en su interior, generando el denominado “flujo electroosmótico” (EOF). Por tanto, la movilidad de un determinado analito se deberá a la resultante de la movilidad electroforética y del EOF, cada uno de ellos con su signo. CE es ideal para llevar a cabo la separación de compuestos iónicos, aunque ciertos aditivos en el medio de separación, como las micelas, hacen posible que se puedan separar compuestos neutros [82]. El principal éxito de esta técnica se basa en su gran flexibilidad, alta eficiencia de pico y bajo consumo de reactivos y muestras [83].

La instrumentación básica empleada en CE se muestra esquemáticamente en la **Figura I.5** y consta de una fuente de alto voltaje que aplica una diferencia de potencial entre dos electrodos de platino, un amperímetro, un capilar generalmente de sílice fundida, recipientes para el medio de separación y la muestra, y un detector. Los sistemas comerciales incorporan además un sistema para el control de temperatura en muestras y capilar, un muestreador automático que permite la automatización de los análisis, así como el software necesario para el tratamiento de datos. La separación tiene lugar en el interior del capilar cuyo diámetro interno suele variar entre 25 y 100  $\mu\text{m}$ , y cuyos extremos se sumergen en el medio de separación.

Para llevar a cabo el análisis, el capilar se llena con un BGE, que consta al menos de un tampón que constituye el medio conductor de la corriente eléctrica y al cual se pueden añadir otro tipo de sustancias dependiendo del modo de separación en el que se trabaje. En el caso de una separación enantiomérica se añadirá un selector quiral [83]. A continuación, se inyecta una pequeña cantidad de muestra, empleando inyección hidrodinámica o electrocinética, simplemente cambiando uno de los viales de BGE por el vial que contiene la muestra. Una vez inyectada la muestra, se aplica un voltaje (hasta 30 kV) entre los extremos del capilar. Existen dos modos de trabajo [83]: polaridad normal (NP) o polaridad inversa (RP), según se aplique voltaje positivo o negativo.

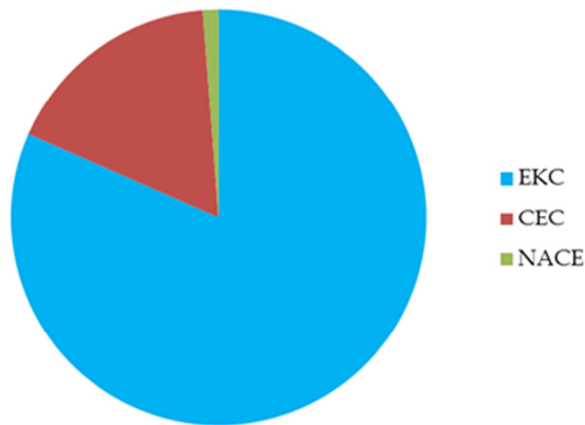


**Figura I.5.** Esquema general de un equipo de Electroforesis Capilar.

Una vez llevada a cabo la separación, los analitos se detectan en continuo directamente en el capilar (detección *on column*) o al final del mismo (detección *end column*). Los detectores UV-Vis son los que más se utilizan por su simplicidad, versatilidad, bajo coste relativo y características no destructivas. Además, el empleo de detectores de diodos en serie (DAD) permite obtener información adicional como son la pureza de pico e información estructural. Otros sistemas de detección empleados han sido LIF, detección electroquímica, conductimetría, RMN, MS, etc. [44].

Es posible emplear diferentes modos de trabajo en el formato de la CE para llevar a cabo una separación quiral, como son Cromatografía Electrocinética (EKC), Electro cromatografía Capilar (CEC) y Electroforesis Capilar No Acuosa (NACE). La **Figura I.6** representa el número total de publicaciones aparecidas en

la bibliografía relacionadas con el análisis quiral por dichas técnicas. Destacar el empleo de EKC con un 82 % de las publicaciones, seguida de CEC con un 17 % y por último NACE con un 1 %.



**Figure I.6.** Número de publicaciones relacionadas con el análisis quiral mediante los tres principales modos de trabajo en el formato de la CE quiral. Datos obtenidos de Scifinder Scholar a fecha de enero de 2019.

### Cromatografía Electrocinética

EKC constituye un modo de trabajo de CE que combina principios de separación electroforéticos y cromatográficos [84]. Así, en EKC, además del tampón de separación empleado en CE, se añade un componente denominado “pseudofase” que origina la existencia de un fenómeno cromatográfico. Al existir dos fases, tiene lugar una distribución del soluto entre ellas [85]. El fenómeno electrocinético, que incluye tanto la electroforesis como la electroósmosis, provoca el transporte de la pseudofase y de los analitos dentro del capilar. Los solutos que no interaccionen con la pseudofase se moverán con una movilidad debida

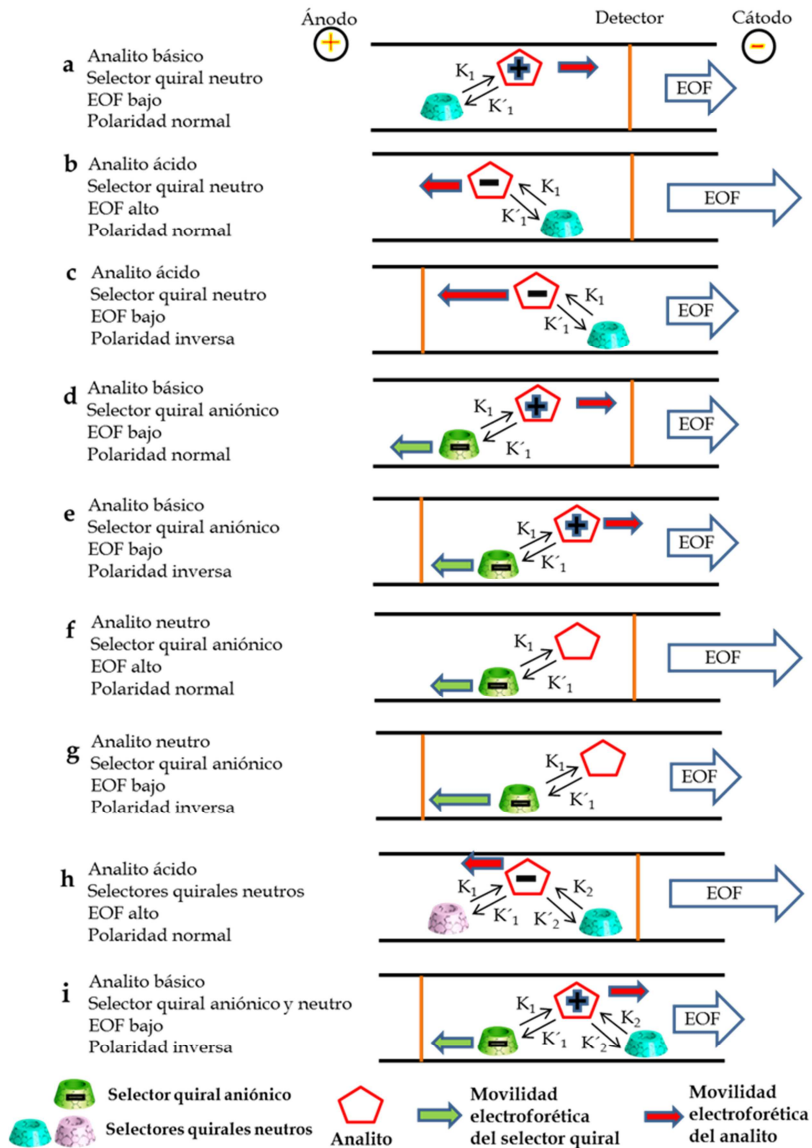
exclusivamente al fenómeno electrocinético. En el caso de que la pseudofase sea un selector quiral, EKC permite la separación de los enantiómeros de compuestos quirales.

La **Figura I.7** muestra diferentes situaciones que se pueden dar en EKC con selectores quirales neutros y aniónicos dependiendo de la naturaleza iónica o neutra del analito quiral y trabajando con polaridad directa o inversa. Como se observa, en el caso de que el complejo formado no migre hacia el detector, hay que considerar la opción de generar un EOF elevado, de modo que la migración resultante permita la detección de los analitos.

En esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo separaciones enantioméricas de compuestos de interés basadas en las situaciones esquematizadas en las Figuras I.7 e) f) y h).

La Figura I.7 e) representa la separación de analitos de carácter básico utilizando un selector quiral aniónico con polaridad inversa y un EOF bajo. En esta situación, los analitos con carga positiva que no interaccionen con el selector quiral, migrarán hacia el cátodo y no podrán detectarse, los que interaccionen parcialmente con el selector quiral se desplazarán hacia el detector a una velocidad inferior a la del selector quiral aniónico tanto más pequeña cuanto menor sea su afinidad por el mismo. En el caso de un compuesto quiral cargado positivamente cuyos enantiómeros interaccionan con el selector quiral de forma enantioselectiva, experimentarán un reparto diferencial entre la fase acuosa y el selector quiral originando dos picos a distintos tiempos de migración, es decir, estarán separados. La Figura I.7 f) describe la separación enantiomérica de un analito quiral neutro en presencia de un selector quiral aniónico con polaridad normal y EOF elevado. En este caso, la movilidad de los enantiómeros del analito se debe al selector quiral en caso de que interaccionen con él y si esta interacción

es enantioselectiva tendrá lugar su separación y se podrán detectar siempre que el EOF sea suficientemente elevado.

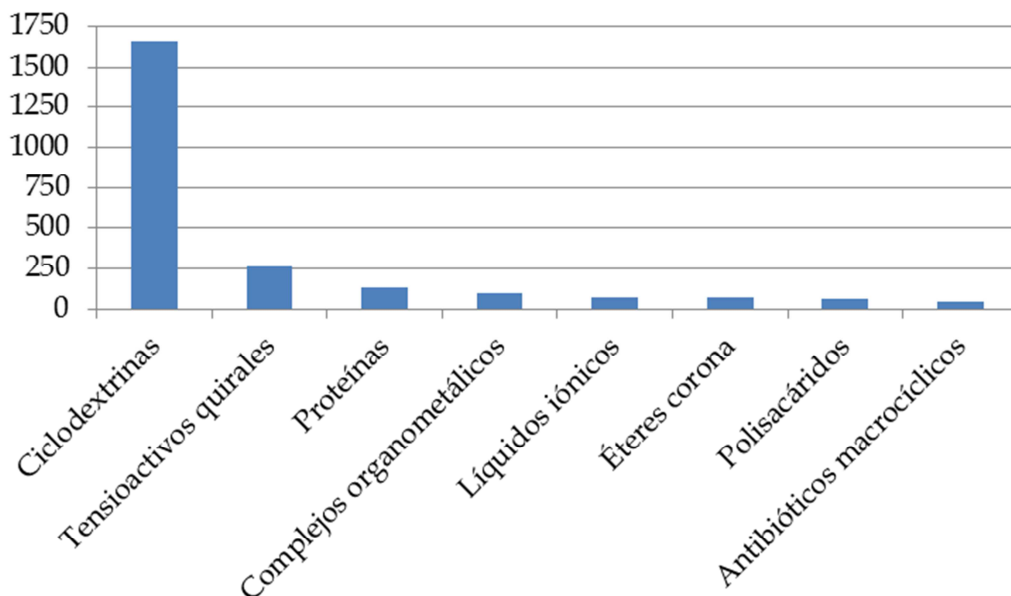


**Figura I.7.** Situaciones que se pueden dar en EKC con selectores quirales neutros y aniónicos dependiendo de la naturaleza iónica o neutra del analito quiral y según se trabaje con polaridad directa o inversa. Reproducida con el permiso de [83].

Finalmente, la Figura I.7 h) muestra la separación de analitos quirales de carácter ácido con un sistema dual de selectores quirales neutros que permiten una enantioselectividad variada para distintos analitos de una misma muestra. En este caso, los analitos con carga negativa poseen la movilidad propia en sentido contrario al detector por lo que se hace necesario un EOF alto para poder detectarlos ya que el selector quiral no posee movilidad propia y se mueve con el EOF salvo que interaccione con los analitos. La interacción enantioselectiva dará lugar a la separación enantiomérica.

Los selectores quirales más empleados en EKC han sido las CDs, tensioactivos quirales, proteínas, complejos organometálicos (ligandos de intercambio), líquidos iónicos, éteres corona, polisacáridos y antibióticos macrocíclicos. De entre todos ellos, destacan con diferencia las CDs como se muestra en la **Figura I.8** [83, 86].

Como ya se ha mencionado anteriormente, las CDs son oligosacáridos cíclicos constituidos por varias unidades de *D*(+)-glucopiranosas. Tienen forma de cono anular truncado de extremos abiertos, con una cavidad interna relativamente hidrófoba, determinada por el número de unidades de glucopiranosas ( $\alpha$ -CD 6,  $\beta$ -CD 7 y  $\gamma$ -CDs 8 unidades de glucopiranosas); por tanto, tienen la misma profundidad y diferente diámetro interno y una parte exterior o superficie hidrofílica (incluso iónica en el caso de algunos derivados de CDs nativas) debido a la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 2, 3, y 6 del anillo de la glucopiranosas.



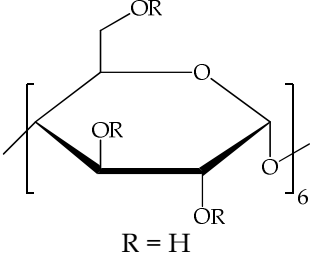
**Figura I.8.** Publicaciones en las que se emplean diferentes selectores quirales en CE. Datos obtenidos de Scifinder Scholar a fecha de febrero de 2018.

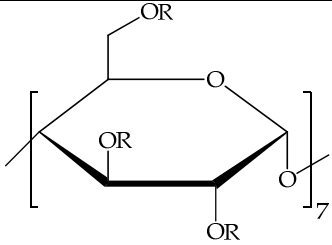
En la **Tabla I.1** se agrupan las CDs comerciales más empleadas en EKC. Puede observarse que es posible obtener una gran variedad de derivados de CDs con diferentes características. La derivatización de los grupos hidroxilo de las CDs nativas en general mejora la solubilidad y enantioselectividad de las mismas [66].

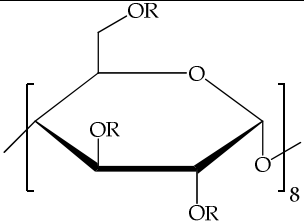
El mecanismo más aceptado para la enantioseparación de un analito quiral con CDs se basa en la formación de complejos de inclusión en los que el analito quiral (molécula “guest”) es incluido en el interior de la CD (molécula “host”).



**Tabla I.1.** Estructura de las CDs comerciales más comúnmente utilizadas en EKC [87, 88]. DS: Grado de sustitución.

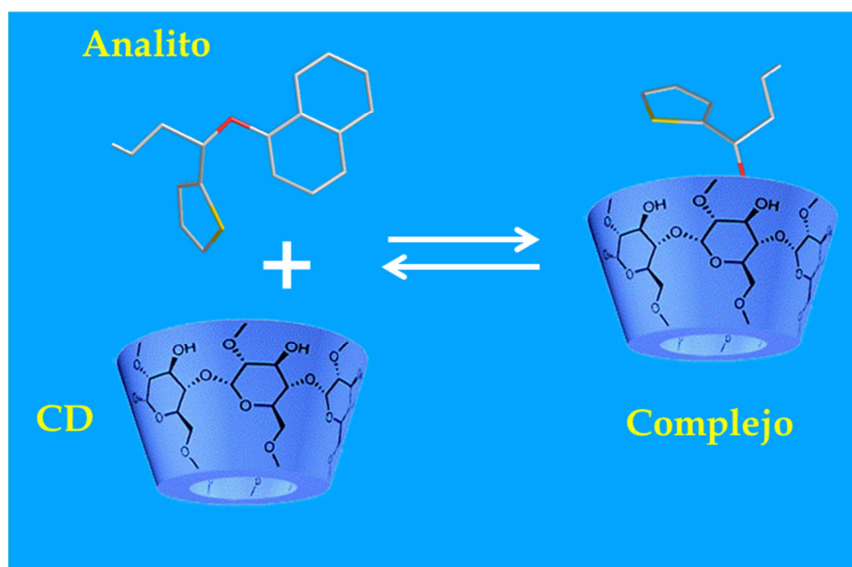
Ciclodextrina	Naturaleza	Estructura
( $\alpha$ -CD)	Neutra	 <p style="text-align: center;">R = H</p>
(2-Hidroxipropil)- $\alpha$ -CD DS: 4.5 (HP- $\alpha$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
Metil- $\alpha$ -CD DS: 11 (M- $\alpha$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_3$
(2-Hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- $\alpha$ -CD (QA- $\beta$ -CD)	Catiónica	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
(2-Carboxietil)- $\alpha$ -CD DS: 3 (CE- $\alpha$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
Carboximetil- $\alpha$ -CD DS: 3.5 (CM- $\alpha$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{CH}_2\text{COONa}$
Fosfato- $\alpha$ -CD DS: 2-6 (P- $\alpha$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{PO}_3\text{HNa}$
Succinil- $\alpha$ -CD DS: 3.5 (Suc- $\alpha$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
Sulfatada- $\alpha$ -CD DS: 12 (Suc- $\alpha$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{SO}_3\text{Na}$

$\beta$ -CD	Neutra	 <p>R = H</p>
(2-Carboxietil)- $\beta$ -CD (CE- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Carboximetil- $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó CH <sub>2</sub> COONa
Acetil- $\beta$ -CD DS: 7 (Ac- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó C(O)CH <sub>3</sub>
Heptakis(2,6-di-O-metil)- $\beta$ - CD DS: 14 (DM- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó CH <sub>3</sub> x 2
(2-Hidroxipropil)- $\beta$ -CD DS: 4.5 (HP- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub>
Metil- $\beta$ -CD DS: 12 (M- $\beta$ -CD)	Neutra	R = H ó CH <sub>3</sub>
Heptakis(2,3,6-tri-O-metil- $\beta$ -CD (TM- $\beta$ -CD)	Neutra	R = CH <sub>3</sub>
(2-Hidroxi-3-N,N,N- trimetilamino)propil- $\beta$ -CD DS: 3-4 (QA- $\beta$ -CD)	Catiónica	R = H ó CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Heptakis(6-deoxi-6-amino- $\beta$ -CD (HDAM- $\beta$ -CD)	Catiónica	R = H ó NH <sub>2</sub> .HCl
(2-Carboxietil)- $\beta$ -CD DS: 3.5 (CE- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COONa
Carboximetil- $\beta$ -CD DS: 3.5 (CM- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó CH <sub>2</sub> COONa

Fosfato- $\beta$ -CD DS: 2-6 (P- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{PO}_3\text{HNa}$
Succinil- $\beta$ -CD DS: 3.5 (Suc- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$
Sulfatada- $\beta$ -CD DS: 13 (S- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{SO}_3\text{Na}$
Sulfobutil- $\beta$ -CD DS: 4, 6, 10 (SB- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$
Triacetil- $\beta$ -CD (TA- $\beta$ -CD)	Aniónica	R = $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$
$\gamma$ -CD	Neutra	 <p>R = H</p>
Metil- $\gamma$ -CD DS: 12 (M- $\gamma$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_3$
(2-Hidroxipropil)- $\gamma$ -CD DS: 4.5 (HP- $\gamma$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
(2-Carboxietil)- $\gamma$ -CD DS: 3.5 (CE- $\gamma$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COONa}$
Carboximetil- $\gamma$ -CD DS: 3.5 (CM- $\gamma$ -CD)	Neutra	R = H ó $\text{CH}_2\text{COONa}$
(2-Hidroxi-3-N,N,N-trimetilamino)propil- $\gamma$ -CD (QA- $\gamma$ -CD)	Catiónica	R = H ó $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
Fosfato- $\gamma$ -CD DS: 2-6 (P- $\gamma$ -CD)	Aniónica	R = H ó $\text{PO}_3\text{HNa}$

Succinil- $\gamma$ -CD DS: 3.5 (Suc- $\gamma$ -CD)	Aniónica	R = H ó C(O)CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH
Sulfatada- $\gamma$ -CD DS: 14 (S- $\gamma$ -CD)	Aniónica	R = H ó SO <sub>3</sub> Na

Se establecen enlaces con los grupos hidroxilos secundarios y se forma el denominado complejo de inclusión “host-guest”, el cual está representado en la **Figura I.9**. Sin embargo, la formación de esos complejos de inclusión no es siempre un requisito para la enantioseparación, ya que una inclusión parcial o interacciones intermoleculares externas pueden ser suficientes para la resolución enantiomérica de un analito quiral [44]. Por regla general, las CDs forman con los analitos complejos de inclusión de estequiometría 1:1 [89].



**Figura I.9.** Complejo de inclusión formado por un analito y una CD. Reproducida con el permiso de [89].

El campo de aplicación de EKC puede ampliarse si se añaden al medio de separación otros aditivos además del selector quirál [90]. Estos aditivos pueden ser no quirales (tensioactivos no quirales, microemulsiones, urea, modificadores orgánicos) o quirales (sales biliares) y permiten llevar a cabo la separación enantiomérica de compuestos de características e hidrofobicidad muy variadas.

Como principal inconveniente de EKC indicar las dificultades de su acoplamiento a MS cuando se emplean selectores quirales no volátiles debido a que provocan problemas de supresión de la ionización. Estas dificultades se eliminan o aminoran utilizando bajas concentraciones del selector quirál o selectores quirales compatibles con MS como las micelas poliméricas [91].

### Electrocromatografía Capilar

CEC es una técnica de separación híbrida entre HPLC y CE que presenta algunas de las mejores características de cada una de estas dos técnicas, como son la alta selectividad de HPLC y la elevada eficacia de la CE [92]. Se lleva a cabo en columnas capilares que contienen una fase estacionaria con la que los distintos analitos interaccionan de forma selectiva y una fase móvil que se mueve debido a la existencia de un EOF generado por la acción de un campo eléctrico y que en combinación con la movilidad electroforética de los analitos hace que éstos se desplacen hacia el detector. Por tanto, los solutos se separan por la combinación de la distribución que experimentan entre la fase móvil y la estacionaria, y si tienen carga, además por la diferencia en sus movilidades electroforéticas y son transportados a través de la columna por el EOF y/o debido a sus movilidades electroforéticas.

La fase estacionaria en CEC se encuentra inmovilizada en el interior de la columna capilar pudiéndose comentar tres situaciones distintas [93]:

- Columna capilar abierta, en la que la pared interna del capilar está cubierta con la fase estacionaria.
- Columna capilar rellena de partículas de fase estacionaria en las que se hace necesario el uso de fritas para mantener el empaquetado dentro de la columna [94].
- Columna capilar rellena de una fase monolítica, obtenida por polimerización en el interior del capilar dando lugar a un material de gran porosidad, estabilidad y flexibilidad [94].

En CEC quirral, se puede llevar a cabo una separación enantiomérica bien utilizando un capilar que contiene una fase estacionaria no-quiral y un BGE que contiene un aditivo quirral, o bien utilizando una columna capilar con una fase estacionaria quirral siendo este el modo de separación quirral más empleado.

Como principal ventaja de CEC quirral mencionar que si se trabaja con una columna quirral no es necesario adicionar a la fase móvil un selector quirral evitando los inconvenientes derivados de la incompatibilidad de selectores quirales no volátiles con la detección de MS. Sin embargo, CEC con columnas capilares quirales presenta también algunos inconvenientes como son la escasez de columnas capilares quirales comerciales, el elevado precio de las que se encuentran disponibles, los problemas relacionados con el uso de fases estacionarias como pueden ser el deterioro de dicha fase o la formación de burbujas [81] o la falta de flexibilidad en la optimización de una separación quirral al venir el selector quirral predeterminado por la columna sin poder realizar

fácilmente un cambio de selector simplemente adicionándolo a la fase móvil como ocurre en EKC.

### Electroforesis Capilar No Acuosa

NACE es un modo electroforérico basado en el empleo de disolventes orgánicos, usualmente metanol, acetonitrilo o de tipo amida, como medio de separación en sustitución del medio acuoso, con la ventaja de:

- Modificar la selectividad ya que se ve modificado el pKa de los analitos en medio orgánico, haciendo que varíe la interacción analito-selector, así como la movilidad de ambos [81].
- Disminuir la corriente eléctrica en el seno del capilar lo que permite poder emplear concentraciones más altas de electrolitos en disolución [81].
- Obtener tiempos de análisis más cortos mediante la modificación de la viscosidad del medio de separación con respecto a medios acuosos [95].
- Poder solubilizar más fácilmente moléculas con alto carácter hidrofóbico [81, 96].

Una posible dificultad de la utilización de medios de separación orgánicos cuando se emplea detección UV es la absorción que presentan algunos de los disolventes empleados pudiendo interferir en la detección de los analitos, inconveniente que se puede evitar utilizando otros sistemas de detección [96].

Entre los selectores quirales habitualmente empleados en NACE se encuentran las CDs y éteres corona, pudiéndose modificar la selectividad de separación modificando el disolvente orgánico [96].

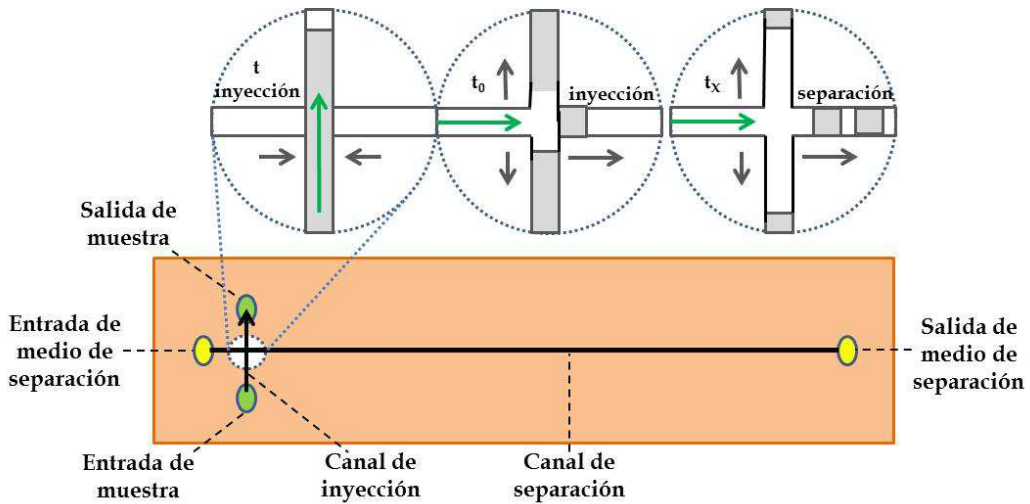
### Electroforesis Capilar en Microchip

La miniaturización de la CE en microchips (MCE) ha dado lugar a interesantes aplicaciones en el campo de la genómica, proteómica y metabolómica [97] dada la disminución del consumo de reactivos que conlleva [98, 99], con volúmenes a niveles de pico o nanolitros [100], así como por permitir realizar separaciones en segundos y con alta resolución [97].

Las separaciones por MCE se llevan a cabo en dispositivos planos con microcanales fabricados con materiales basados en polímeros dadas sus propiedades elásticas y de transparencia óptica [100] (ver **Figura I.10**). En general, el canal de mayor longitud se rellena con el tampón electrolítico de separación y otro canal más pequeño perpendicular al anterior permite la inyección de la muestra. A continuación se aplica un potencial en el canal de separación [98] para obtener el campo eléctrico [97].

Las separaciones quirales en MCE se suelen llevar a cabo de forma similar a como se realizan en EKC, con un selector quiral disuelto en el medio de separación siendo CDs y éteres corona los selectores quirales más empleados y pudiéndose utilizar otros aditivos en el BGE como tensioactivos que mejoren la separación [98]. Sin embargo, en ocasiones no se suele conseguir una aceptable discriminación quiral debido a que la miniaturización reduce el tiempo de interacción entre los enantiómeros y el selector quiral [99].





**Figura I.10.** Esquema del proceso de inyección y separación por MCE. Reproducida con el permiso de [98].

### I.3 Separación enantiomérica de fármacos por Cromatografía Electrocinética

La necesidad de llevar a cabo un riguroso control de calidad en la industria farmacéutica, tanto de materias primas como de formulaciones farmacéuticas, ha originado el desarrollo de un gran número de metodologías analíticas para la determinación de principios activos. Una parte importante de dichas metodologías son quirales dado el gran número de fármacos quirales desarrollados y comercializados como racematos o como enantiómeros puros. En este contexto, EKC ha demostrado un gran potencial como lo demuestra el hecho de que se haya publicado un elevado número de trabajos científicos centrados en el desarrollo de metodologías enantioselectivas para el análisis de fármacos.

La **Tabla I.2** agrupa los artículos publicados en los últimos nueve años, en los que se han desarrollado metodologías analíticas por EKC para la

determinación enantiomérica de fármacos tanto en materias primas como en formulaciones farmacéuticas o muestras biológicas. Esta tabla se limita a los artículos publicados en el periodo indicado en los que se utiliza EKC para llevar a cabo la separación quiral y no considera otros modos de CE quiral dado el elevado número de referencias. Puede observarse la gran variedad de compuestos analizados en dichas muestras en el periodo considerado y que se han clasificado en dicha tabla de acuerdo a su actividad farmacológica. Las metodologías desarrolladas permiten tanto la determinación individual de los enantiómeros de un determinado fármaco en unos casos como la determinación enantiomérica simultánea de distintos fármacos de la misma familia, en otros.

El principal modo de separación empleado en todos estos trabajos ha sido CD-EKC ya que las CDs han sido los selectores quirales más utilizados como se muestra en la **Tabla I.2.** tanto en sistemas con un solo selector como en sistemas duales de CDs [101-103]. En algunos casos, se añadieron al medio de separación que contenía la CD como selector quiral, aditivos como tensioactivos no quirales [103-105], nanoliposomas [106], tensioactivos quirales naturales [107] o microemulsiones [108-110].

**Tabla I.2.** Artículos publicados en los que se describen separaciones quirales de fármacos por EKC en formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas desde el año 2010 hasta la actualidad.

Analito (Familia específica)	Medio de separación	Aplicación	Tratamiento de muestra	LOD (Rs)	Ref.
<i>Analgésicos</i>					
Tramadol (Inhibidor de la recaptación de noradrenalina y serotonina)	BGE: 50 mM tampón borato, pH 10.2 + MD (10 %, p/v) Capilar: 75 µm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20kV; Inyección: 30 mbar x 5s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en agua, filtrado y dilución con agua.	<b>1.5 mg/L</b> (2.8)	[111]
1- Tramadol (Inhibidor de la recaptación de noradrenalina y serotonina) 2- Metadona (Agonista opioide)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 8.0 + MD-DE 4-7 (20 %, p/v) Capilar: 50 µm d.i. x 47 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 16kV; Inyección: 65 mbar x 10 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica simultánea en comprimidos, orina y plasma humano	Comprimidos: Trituración, disolución con MeOH, centrifugación, dilución del sobrenadante con agua y filtrado. Orina: dilución (1:1, v/v) con agua. Plasma: dilución (1:3, v/v) con agua. Ambas muestras se dopan con los correspondientes patrones racémicos.	<b>1- 2 mg/L</b> (1.8) <b>2- 1.5 mg/L</b> (1.7)	[112]
Meptazinol y 3 intermedios de síntesis (Agonista opioide)	BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 6.0 + 2 mM CM-β-CD + ACN (5 %, v/v) Capilar: 50 µm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -; V: 15 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 237 nm (un compuesto de intermedio); 271 nm (Meptazinol y 2 compuestos intermedios)	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración y disolución en MeOH.	<b>2.5 mg/L</b> (2.0)	[113]

Tetrahidropalmitina (Inhibidor de los canales de calcio)	BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 7.4 + 50 $\mu$ M BSA Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 57.6 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 15 kV; Inyección: 15 kV x 12 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en planta medicinal ( <i>C. yanhusuo</i> )	Extracción con EtOH, centrifugación, filtrado y dilución del extracto en agua.	0.6 $\mu$ g/L (2.0)	[114]
<b>Anestésicos</b>					
1- Ketamina 2- Norketamina (Antagonistas de los receptores de glutamato)	BGE: 15 mM tampón fosfato/Tris, pH 2.5 + HS- $\gamma$ -CD (0.1 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 35 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 7 kV x 20 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica simultánea en cabello humano	Lavado con SDS, agua y MeOH. Incubación en HCl a 37°C durante 12 h de la muestra dopada. Posteriormente ajuste del extracto a pH 10 con NaOH seguido de LLE con una mezcla hexano/EtOAc (50:50, v/v). El extracto orgánico se trata con HCl, se evapora y reconstituye en una mezcla agua:HCl (98:2; v/v).	0.08 ng/mg (1- 2.4; 2- 2.0)	[115]
Bupivacaina (Bloqueante de los canales de sodio)	BGE: 4 mM tampón acetato amónico, pH 4.0 + 0.48 mM SBE- $\beta$ -CD Capilar: 25 $\mu$ m d.i. x 55 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -; V: 12 kV; Inyección: 10 kV x 3 s; Detección: Conductividad	Determinación enantiomérica en suero de conejo e inyectable	Suero: LLE de la muestra dopada y tratada con NaOH con una mezcla cloroformo:éter (10:1, v/v). El extracto orgánico se lleva a sequedad y se reconstituye en una mezcla MeOH:tampón acetato (1:1, v/v). Inyectable: dilución en agua.	52 $\mu$ g/L (5.0)	[116]
<b>Antiarrítmicos</b>					
RS86017 (Inhibidor de los canales de calcio)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 8.0 + 28 mg/mL SBE- $\beta$ -CD + ACN (20 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 22 kV; Inyección: 50 mbar x 8 s; Detección: UV 206 nm	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	--	0.8 mg/L (5.8)	[117]

<i>Antibióticos</i>					
1- Ofloxacino (Inhibidor de la enzima ADN girasa) 2- Ornidazol (--)	BGE: 50 mM tampón fosfato/Tris, pH 1.9 + 30 mg/mL S-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 31.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 18 kV; Inyección: 50 mbar x 15 s; Detección: UV 230 nm	Determinación enantiomérica simultánea en comprimidos	Trituración, disolución con EtOH, dilución con agua y filtrado.	1- <b>0.5 mg/L</b> (5.5) 2- <b>0.9 mg/L</b> <sup>1</sup> (6.3)	[118]
Ofloxacino (Inhibidor de la enzima ADN girasa)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.75 + 40 mM HP-β-CD + 30 mM EMIM-L-L Capilar: 50 μm d.i. x 41 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -; V: 20 kV; Inyección: -; Detección: UV -	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	--	<b>0.5 mg/L</b> (5.4)	[119]
Ornidazol (--)	BGE: 20 mM tampón fosfato/Tris, pH 2.1 + S-α-CD (2 %, p/v) Capilar: 50 μm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 277 nm	Determinación enantiomérica en inyectable	Filtrado.	<b>0.3 mg/L</b> (> 2.0)	[120]
<i>Anticoagulantes</i>					
1- Warfarina (Inhibidor de la enzima hepática que reduce la vitamina K) 2- Cinco metabolitos hidroxilados de warfarina	BGE: 25 mM tampón acetato amónico, pH 5.0 + 25 mM poli-L,L-SULV + MeOH (15 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 120 cm l.t.; T <sup>a</sup> : -; V: 30 kV; Inyección: 5 mbar x 2 s; Detección: MS	Determinación enantiomérica simultánea en suero humano	Dilución con ácido perclórico (10 %, v/v), centrifugación, SPE del sobrenadante en cartuchos de extracción MAX, elución con ACN/MeOH/Ácido fórmico (50:50:5, v/v/v), evaporación del extracto y reconstitución en ACN/agua (40:60, v/v).	1- <b>0.5 μg/L</b> (> 2.0) 2- <b>3.0 μg/L</b> <sup>3</sup> (> 2.0)	[121]
<i>Antidepresivos</i>					
Citalopram (Inhibidor de la recaptación de serotonina)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 5.0 + MD- DE 4-7 (15 %, p/v) Capilar: 50 μm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 18 kV; Inyección: 60 mbar x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en orina	Dilución (1:3, v/v) con agua, ajuste a pH básico y dopado. Microextracción en fase líquida sobre fibra hueca y elución a pH ácido.	<b>20 μg/L</b> (4.5)	[122]

1- Venlafaxina (Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina) 2- Metabolito	BGE: 20 mM tampón acetato amónico/25 mM TEA, pH 8.5 + 25 mM Poli-L,L-SULA Capilar: 50 µm d.i. x 60 cm l.t.; T <sup>a</sup> : -°C; V: 20 kV; Inyección: 5 mbar x 100 s; Detección: MS	Determinación enantiomérica simultánea en plasma humano	Dilución con ácido fosfórico (4 %, v/v) y centrifugación. SPE del sobrenadante con cartucho de extracción Strata-X-C, elución con acetato amónico/MeOH (5:95, v/v), evaporación del extracto y reconstitución del residuo en MeOH/agua (10:90, v/v).	1- <b>10.5 µg/L</b> (1.1) 2- <b>15 µg/L</b> (1.5)	[123]
Duloxetine (Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina)	BGE: 150 mM tampón fosfato, pH 3.0 + HP-β-CD (0.5 %, p/v) Capilar: 50 µm d.i. x 56 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 30kV; Inyección: 50 mbar x 20 s; Detección: UV 220 nm y MS	Determinación enantiomérica en cápsulas	Disolución en DMSO, centrifugación y dilución del sobrenadante en agua.	UV: <b>200 µg/L</b> (2.5) MS: <b>20 µg/L</b> (2.5)	[124]
Fluoxetine (Inhibidor de la recaptación de serotonina)	BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 8.0 + HS-β-CD (0.25 %, p/v) Capilar: 50 µm d.i. x 21 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 30°C; V: 25 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración y disolución en BGE.	- (2.4)	[125]
Trimipramina (Inhibidor de la recaptación de serotonina, norepinefrina y dopamina)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 2.0 + 10 mM α-CD Capilar: 50 µm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 18 kV; Inyección: 60 mbar x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en: a- plasma y b- orina	Extracción por electromembrana (membrana líquida de 2-nitrofeniloctiléter) de fibra hueca de polipropileno de las muestras dopadas.	a- <b>10 µg/L</b> b- <b>8 µg/L</b> (2.9)	[126]
Sertralina (Inhibidor de la recaptación de serotonina)	BGE: 20 mM tampón tetraborato sódico, pH 8.84 + β-CD (1 %, p/v) + PDDAC (0.1 %, v/v) + SDS (1.2 %, p/v) + BuOH (21 %, v/v) + ACN (18 %, v/v) + Hexano (0.8 %, v/v) Capilar: 50 µm d.i. x 45 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: -20 kV; Inyección: -; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Disolución en EtOH (75 %, v/v), filtración y dilución en tampón tetraborato.	<b>300 µg/L</b> <sup>1</sup> (2.4)	[108]
Bupropion (Inhibidor de la recaptación de dopamina y norepinefrina)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 3.0 + 5 mM S-α-CD Capilar: 75 µm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: -20 kV; Inyección: 50 mbar x 10 s; Detección: LIP (λ <sub>Excitación</sub> : 250 nm y λ <sub>Emisión</sub> : 453 nm)	Determinación enantiomérica en comprimidos y orina	Comprimidos: trituración, disolución en agua, filtración y dilución con agua. Orina: Muestra dopada con racemato y diluida 1:10 con agua.	<b>0.2 µM</b> (>3.0)	[127]

<i>Antifúngicos</i>					
1- Tioconazol 2- Isoconazol 3- Fenticonazol (Inhibidores de la biosíntesis de ergosterol)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 35 mM HP- $\gamma$ -CD + 10 mM DM- $\beta$ -CD + 50 mM SDS + ACN (20 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 56 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 30°C; V: 25 kV; Inyección: 3 kV x 3 s; Detección: UV 200 nm	Separación quiral simultánea. Determinación enantiomérica simultánea en orina, e individual en crema	Orina: Dilución (1:10, v/v) en agua, filtración, dopado y SPE con cartucho Bond Elut Plexa, elución con MeOH, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en MeOH. Crema: Disolución en DCM, filtración y SPE con cartucho con diol, elución con MeOH, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en MeOH.	1- <b>4.2 mg/L</b> <sup>1</sup> 2- <b>7.7 mg/L</b> <sup>1</sup> 3- <b>2.7 mg/L</b> (> 1.6)	[103]
Econazol (Inhibidor de la biosíntesis de ergosterol)	BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 8.0 + 40 mM HP- $\gamma$ -CD + 50 mM SDS Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 56 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30kV; Inyección: 3 kV x 3 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en crema	Disolución en DCM, filtración, SPE con cartucho diol, elución con MeOH, evaporación del extracto y dilución en MeOH.	<b>4.3 mg/L</b> <sup>1</sup> (2.2)	[104]
<i>Antihipertensivos</i>					
Pindolol ( $\beta$ -bloqueante)	BGE: 80 mM tampón MOPS, pH 7.12 + 6 mM OS- $\gamma$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. X 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 25kV; Inyección: 20 mbar x 6 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en inyectables y capsulas	Inyectable: dilución en DMSO. Cápsulas: disolución en BGE, filtrado y dilución en una mezcla DMSO/BGE.	<b>0.6 mg/L</b> (> 2.0)	[128]

Carvedilol (β-bloqueante)	BGE: 100 mM tampón fosfato/TEA, pH 2.5 + CM-β-CD (0.6 %, p/v) + MeOH (30 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 41 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25 kV; Inyección: 15 kV x 30 s; Detección: UV 241 nm	Determinación enantiomérica en plasma humano	La muestra de plasma se dopa con el patrón racémico. Posteriormente, precipitación de las proteínas con acetona, centrifugación del sobrenadante y adición de NaOH (pH 10). LLE con cloroformo/acetona, evaporación del extracto orgánico a sequedad y se reconstitución del residuo en agua/ACN.	<b>4 μg/L</b> (4.0)	[129]
Propranolol (β-bloqueante)	BGE: 80 mM tampón acetato amónico, pH 2.5 + 8 mM HP-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 18 kV; Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en: a- plasma b- orina	a y b- Extracción con electromembrana basada en una fibra hueca de polipropileno impregnada de 2-nitrofenil-octil éter.	a- <b>7 μg/L</b> (1.6) b- <b>10 μg/L</b> (1.6)	[130]
Carvedilol (β-bloqueante)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 2.5 + 20 mM HP-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 20 kV; Inyección: 50 mbar x 1 s; Detección: UV 242 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH, centrifugación y dilución del sobrenadante con MeOH.	<b>1.2 mg/L<sup>1</sup></b> (2.7)	[131]
1- Propranolol 2- Carteolol 3- Metoprolol 4- Atenolol 5- Pindolol 6- Esmolol 7- Bisoprolol 8- Bevantolol 9- Arotinolol 10- Sotalol (β-bloqueantes)	1-, 2- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 3.5 + 15 g/L CM-β-CD 3- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 3.5 + 5 g/L CM-β-CD 4-, 5-, 7-, 8- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 4.5 + 8 g/L CM-β-CD 6-, 9- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 4.5 + 5 g/L CM-β-CD 10- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 4.0 + 5 g/L CM-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 25 kV; Inyección: 10 cm x 5 s; Detección: UV 210 nm	Separación enantiomérica individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de propranolol en un medicamento <sup>2</sup>	--	<b>1- 0.3 mg/L</b> (En todos los casos > 2.0)	[132]



Ambrisentán (Antagonista de los receptores de endotelina)	BGE: 100 mM tampón borato, pH 9.2 + 50 mM $\gamma$ -CD + 100 mM SDS Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 64.5 cm l.t.; T <sup>a</sup> : 22°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución con MeOH, centrifugación y dilución del sobrenadante con agua.	-- (1.5)	[105]
Perindopril (Inhibidor de la acetilcolinesterasa)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 5 mM HP- $\beta$ -CD + MeOH (15 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 56 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 15kV; Inyección: 50 mbar x 10 s; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en tampón fosfato/MeOH (20 %, v/v) y filtración.	<b>14.7 mg/L</b> (> 2.0)	[133]
Lercanidipina (Bloqueante de los canales de calcio)	BGE: 200 mM tampón acetato, pH 4.0 + 10 mM TM- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25kV; Inyección: 0.5 psi x 10 s; Detección: UV 237 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración y disolución en MeOH.	<b>0.8 mg/L<sup>1</sup></b> (1.3)	[134]
1-fenil-R,S-tetrahydro-isoquinolina (Bloqueante del receptor M3 muscular)	BGE: 35 mM tampón fosfato, pH 7.9 + 20 mM $\beta$ -CD + 30 mM SDC + ACN (20 %, v/v) Capilar: 25 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -; V: 20 kV; Inyección: Electrocinética; Detección: Electroquímica	Deteminación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	Secado a 40°C, disolución en EtOH (75 %), filtrado y dilución con tampón.	<b>0.5 <math>\mu</math>M<sup>1</sup></b> (2.7)	[107]
Amlodipino (Antagonista de los iones calcio)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 3.0 + 20 mM RAMEB Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25 kV; Inyección: 50 mbar x 3 s; Detección: UV 238 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH, centrifugación y dilución del sobrenadante con MeOH.	<b>2.4 mg/L<sup>1</sup></b> (2.5)	[135]
Amlodipino (Antagonista de los iones calcio)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 4.0 + MD-DE 4-7 (10 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 49 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 60 mbar x 6 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración y disolución con agua grado HPLC.	<b>0.52 mg/L</b> (1.8)	[136]
Isradipina (Bloqueante de los canales de calcio)	BGE: 15 mM tampón borato, pH 9.3 + SBE- $\beta$ -CD (2.5 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 51.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 7.5 s; Detección: UV 239 nm	Determinación enantiomérica en cápsulas. Estudio de la estabilidad.	Disolución en ACN, centrifugación y dilución del sobrenadante con ACN.	<b>3.7 mg/L<sup>1</sup></b> (5.9)	[137]

<i>Antihistamínicos</i>					
Cetirizina (Antagonista del receptor H <sub>1</sub> de histamina)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 5 mM SBE-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 50 mbar x 1 s; Detección: UV 230 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en agua, centrifugación, filtración y dilución en agua.	<b>2.9 mg/L<sup>1</sup></b> (> 2.0)	[138]
Levocetiricina (Antagonista del receptor H <sub>1</sub> de histamina)	BGE: 50 mM tampón tetraborato, pH 8.2 + S-β-CD (1 %, p/v) Capilar: 50 μm d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 10 kV; Inyección: 2 psi x 5 s; Detección: UV 195 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH, centrifugación, dilución en agua y filtración.	<b>0.075 mg/L</b> (> 3.0)	[139]
Feniramina (Antagonista del receptor H <sub>1</sub> de histamina)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 3.0 + 50 mM HP-β-CD Capilar: 75 μm d.i. x 66 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en colirio	Dilución (1:40, v/v) en tampón fosfato.	<b>0.5 μM</b> (1.8)	[140]
<i>Antiinflamatorios</i>					
1- Naproxeno 2- Carprofeno 3- Ibuprofeno 4- Ketoprofeno 5- Pranoprofeno (Inhibidores de la prostaglandina sintetasa)	BGE1-, 3-, 4-, 5-: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 2 mM VC + 15 mM CIL1 + MeOH (20 %, v/v) BGE2-: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 2 mM VC + 15 mM CIL2 + MeOH (20 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 24.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 50 mbar x 4 s; Detección: UV 1- 235 nm, 2- 230 nm, 3 y 4- 225, 5- 210	Separación quiral individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de naproxeno en medicamento <sup>2</sup>	Disolución en MeOH/H <sub>2</sub> O (50:50, v/v)	<b>1- 9.0 mg/L</b> (1- 4.9; 2- 3.1; 3- 2.6; 4- 4.1; 5- 3.5)	[141]
Penicilamina (Inhibidor del entrecruzamiento del colágeno y modulador del sistema inmune)	Derivatización de analito con ANDA BGE1-: 200 mM tampón acetato, pH 4.5 + 19 mM β-CD BGE2-: 30 mM tampón fosfato, pH 7.4 + 17 mM β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 23°C; V: - 15 kV (+15 kV a pH 7.4); Inyección: 0.5 psi x 2 s; Detección: UV 254 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en bicarbonato sódico, centrifugación y dilución (1:5, v/v) del sobrenadante con bicarbonato sódico.	<b>1- 2.6 mg/L</b> (7.0) <b>2- 2.6 mg/L</b> (7.0)	[142]

	Derivatización de analito con ANDA BGE: 80 mM tampón borato, pH 9.7 + 17 mM $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 23°C; V: 15 kV; Inyección: 0.5 psi x 2 s; Detección: UV 254 nm			<b>1.4 mg/L</b> (4.0)	
<b><i>Antiparasitarios</i></b>					
Praziquantel (Antihelmíntico, provoca daño en los tejidos parasitarios y contracción tetánica de la musculatura)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.0 + 15 mM S- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 15 kV; Inyección: 50 mbar x 2 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH/ácido fosfórico (99.7:0.3, v/v), filtración y dilución con tampón fosfato.	<b>750 <math>\mu</math>g/L</b> (16.8)	[143]
<b><i>Antipsicóticos</i></b>					
Levosulpirida (Antagonista de los receptores de la dopamina)	BGE: 5 mM tampón Britton-Robinson, pH 3.45 + 10 mM S- $\beta$ -CD + 34 mM M- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 24.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 16°C; V: 14 kV; Inyección: 50 mbar x 2 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en ampollas	Dilución (25:75, v/v) con agua.	<b>1.2 mg/L</b> (> 1.5)	[101]
1- Etopropazina 2- Metotrimeprazina 3- Prometazina 4- Tioridazina 5- Trimeprazina (Antagonistas de los receptores de la histamina y de los receptores muscarínicos de la acetilcolina)	BGE: 75 mM tampón ácido fórmico, pH 3.0 + 5 mM HP- $\gamma$ -CD + 0.9 % PDDAC Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 22.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -°C; V: -9.5 kV; Inyección: 20 cm x 10 s; Detección: UV 254 nm	Determinación enantiomérica simultánea en orina	Centrifugación y dopado con los patrones racémicos.	<b>1- 4 <math>\mu</math>M<sup>1</sup></b> <b>2- 3 <math>\mu</math>M</b> <b>3- 8 <math>\mu</math>M<sup>1</sup></b> <b>4- 3 <math>\mu</math>M<sup>1</sup></b> <b>5- 3 <math>\mu</math>M<sup>1</sup></b> (> 1.8)	[144]

1- Etopropazina 2- Metotrimeprazina 3- Prometazina 4. Tioridazina 5- Trimeprazina (Antagonistas de los receptores de la histamina y de los receptores muscarínicos de la acetilcolina)	BGE: 100 mM tampón formiato/Tris, pH 3.0 + 5 mM HP- $\gamma$ -CD + PDDAC (0.9 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : -°C; V: -10 kV; Inyección: 20 cm x 10 s; Detección: UV 254 nm	Determinación enantiomérica simultánea en orina	Muestra ajustada a pH 7.0 con NaOH, centrifugación y dopado del sobrenadante. SPE con columna de extracción C <sub>18</sub> , elución con MeOH, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en agua/MeOH (50:50, v/v) .	1- <b>2.9 nM</b> <sup>1</sup> 2- <b>2.6 nM</b> <sup>1</sup> 3- <b>2.3 nM</b> <sup>1</sup> 4- <b>6.3 nM</b> <sup>1</sup> 5- <b>2.6 nM</b> <sup>1</sup> (> 2.0)	[145]
<i>Antitusivos</i>					
Dextrometorfano (Agonista opiáceo y antagonista del receptor de glutamato)	BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 6.5 + 16 mg/mL S- $\beta$ -CD + 14 mg/mL M- $\alpha$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 0.7 psi x 5 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en cápsulas	Disolución en EtOH (96 %), centrifugación, evaporación de una porción del sobrenadante y reconstitución en HCl 10 mM.	<b>0.3 mg/L</b> (> 2.0)	[102]
<i>Antitusivos y analgésicos</i>					
Metorfano (Levomorfano: agonista de receptores opioides. Dextromorfano: agonista opiáceo, antagonista del receptor de glutamato y disminuidor de la producción de taquicinas)	BGE: 150 mM tampón fosfato, pH 4.4 + 5 mM HP- $\beta$ -CD + MeOH (20 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25 kV; Inyección: 0.5 psi x 8 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en muestras de sangre post-mortem	LLE de la muestra dopada con disolución de carbonato sódico saturado + hexano/EtOAc (50:50, v/v), centrifugación, evaporación y reconstitución con MeOH/HCl 10 mM (90:10, v/v).	<b>8 <math>\mu</math>g/L</b> 2.0	[19]

<i>Broncodilatadores</i>					
1- Clembuterol 2- Procaterol 3- Bambuterol 4- Tranterol 5- Salbutamol 6- Terbutalina (Agonistas $\beta_2$ adrenérgicos)	1-, 2-, 3-, 6- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 3.5 + 5 g/L CM- $\beta$ -CD 4-, 5- BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 4.0 + 8 g/L CM- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>o</sup> : 20°C; V: 25 kV; Inyección: 10 cm x 5 s; Detección: UV 210 nm	Separación quiral individual	--	-- (En todos los casos > 2.0)	[132]
1- Clembuterol 2- Bambuterol 3- Procaterol 4- Salbutamol 5- Tulobuterol (Agonistas $\beta_2$ adrenérgicos)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 3.5 + 10 mM CM- $\beta$ -CD Capilar: 75 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>o</sup> : 15°C; V: 20 kV; Inyección: 10 kV x 5 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica individual en diferentes comprimidos	Trituración, disolución en agua y filtración.	-- (1- 7.7; 2- 8.5; 3- 25.4; 4- 2.2; 5- 2.3)	[146]
<i>Broncodilatadores y antiespasmódicos</i>					
Glicopirrolato (Antagonista de los receptores muscarínicos de la acetilcolina)	BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 7.0 + S- $\beta$ -CD (2.0 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>o</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	--	0.3 mg/L > 2.0	[147]
<i>Broncodilatadores y tratamiento de la obesidad</i>					
Higenamina (Agonista $\beta_2$ adrenérgicos)	BGE: 30 mM tampón fosfato, pH 3.5 + 15 mg/mL CM- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>o</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 0.5 psi x 20 s; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en semillas de <i>Nelumbo nucifera</i>	Trituración, disolución en MeOH, filtración y dilución con agua.	-- (9.4)	[148]

<i>Psicoactivos</i>					
1- Efedrina 2- Pseudoefedrina 3- Metilefedrina 4- Norefedrina 5- Dietilnorefedrina 6- Adrenalina (Agonista adrenérgico de los receptores del SCN)	BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 2.5 + S-β-CD (4.0%, p/v) + EtOAc (0.5 %, v/v) + SDS (1.0 %, p/v) + BuOH (4.0 %, v/v) + i-PrOH (3.0 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: -15 kV; Inyección: 3.4 kPa x 4 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica individual de las impurezas de síntesis de efedrina	--	1- <b>1.9 mg/L</b> 2- <b>1.6 mg/L</b> (En todos los casos > 2.0)	[109]
Anfetamina (Agonista indirecto de los receptores presinápticos de noradrenalina y dopamina del SNC)	BGE: 50 mM tampón fosfato sódico, pH 3.0 + S-β-CD (5.5 %, p/v) + SDS (1.5 %, p/v) + EtOAc (0.5 %, v/v) + BuOH (3.5 %, v/v) + i-PrOH (2.5 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 42 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: -14 kV; Inyección: 0.5 psi x 4 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en fármaco comercial	Disolución en agua.	<b>1.5 mg/L</b> (Levoanfetamina) (> 2.0)	[110]
1- Efedrina (Agonista adrenérgico de los receptores del SCN) 2- Metilpseudoefedrina 3- Anfetamina 4- Metanfetamina 5- Etilanfetamina 6- (3,4- metilendioxfanfetamina) 7- (3,4- metilendioximetanfetamina) 8- (3,4-metilendioxi-N-etilanfetamina) (Agonista indirecto de los receptores presinápticos de la noradrenalina y dopamina del SNC)	BGE: 50 mM tampón formiato amónico, pH 2.2 + HS-γ-CD (0.26 %, p/v) Capilar: 50 μm d.i. x 90 cm l.t.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 7.25 bar x 10 s; Detección: MS	Determinación enantiomérica individual en anfetaminas.	Disolución en agua y filtración.	1- <b>8.6 mg/L</b> <sup>1</sup> (2.8) 2- <b>1.0 mg/L</b> <sup>1</sup> (2.0) 3- <b>15.5 mg/L</b> <sup>1</sup> (5.3) 4- <b>4.8 mg/L</b> <sup>1</sup> (2.8) 5- <b>1.8 mg/L</b> <sup>1</sup> (3.3) 6- <b>7.4 mg/L</b> <sup>1</sup> (9.8) 7- <b>3.2 mg/L</b> <sup>1</sup> (3.6) 8- <b>3.0 mg/L</b> <sup>1</sup> (2.6)	[149]

1- Mefedrona 2- Metilefedrina 3- Metilendioxi- pirovalerona (-)	BGE: 80 mM tampón fosfato, pH 2.5 + 12 mg/mL $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 71.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica simultánea en muestra de cabello humano	PLE de la muestra dopada con agua alcalinizada a pH 10.0 con hidróxido amónico (28 %, v/v), dilución del extracto con agua a pH 10 y filtración. Posterior SPE en línea con sorbente Oasis HLB y elución con MeOH/ácido fórmico (2 % v/v).	1- <b>0.02 ng/mg</b> (1.6) 2- <b>0.02 ng/mg</b> (1.6) 3- <b>0.1 ng/mg</b> (> 2.0)	[150]
1- 3,4-metilendioxi- metanfeamina 2- Metanfetamina (Agonista indirecto de los receptores presinápticos de la noradrenalina y dopamina del SNC) 3- Ketamina (Antagonistas de los receptores de glutamato)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 3.2 + 20 mM $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 15 kV; Inyección: 5 kV x 7 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica simultánea en papel (embalar, aluminio y plástico)	Las muestras se pusieron en contacto con los contaminantes durante 5 días. Posteriormente, extracción con ácido acético y filtración. DLLME con isopropranol/cloroformo (92.5:7.5, v/v), centrifugación, evaporación del extracto orgánico y reconstitución en agua.	1- <b>0.08 <math>\mu</math>g/L</b> 2- <b>0.20 <math>\mu</math>g/L</b> 3- <b>0.15 <math>\mu</math>g/L</b> (En todos los casos > 1.9,	[151]

1- Dimetilcatinona 2- Metcatinona 3- Bufedrona 4- Pentedrona 5- Metedrona 6- Metilona 7- Mefedrona 8- Etilona 9- 3,4-DMMC 10- Pentilona 11- MDPV (Agonista indirecto de los receptores presinápticos de la noradrenalina y dopamina del SNC)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 2.5 + 10 mM $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 49 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 25 kV; Inyección: 10 kV x 10 s; Detección: UV 206 nm	Determinación enantiomérica simultánea en drogas.	Disolución en MeOH y centrifugación.	1- <b>11 <math>\mu</math>g/L</b> (1.6) 2- <b>1.0 <math>\mu</math>g/L</b> (1.6) 3- <b>3.5 <math>\mu</math>g/L</b> (0.8) 4- <b>3.7 <math>\mu</math>g/L</b> (> 2.0) 5- <b>5.0 <math>\mu</math>g/L</b> (NS) 6- <b>9.5 <math>\mu</math>g/L</b> (1.8) 7- <b>5.0 <math>\mu</math>g/L</b> (1.6) 8- <b>3.8 <math>\mu</math>g/L</b> (1.8) 9- <b>5.0 <math>\mu</math>g/L</b> (> 2.0) 10- <b>6.7 <math>\mu</math>g/L</b> (> 2.0) 11- <b>5.5 <math>\mu</math>g/L</b> (> 2.0)	[152]
Treo-metilfenidato (Inhibidor de la recaptación de la dopamina y la noradrenalina)	BGE: 50 mM tampón fosfato/TEA, pH 3.0 + 20 mg/mL HP- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 6 kV x 50 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en muestras de fluidos orales	LLE con agua/hexano (24:76, v/v), centrifugación, dilución de la fase orgánica con agua, evaporación y reconstitución con ácido acético 1M.	<b>1.5 <math>\mu</math>g/L</b> (2.0)	[153]



<i>Sedantes</i>					
Metadona (Agonista opiode)	BGE: 150 mM tampón fosfato/TEA, pH 2.5 + CM-β-CD (0.8 %, p/v) + MeOH (30 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 41.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25 kV; Inyección: 15 kV x 40 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en muestras dopadas de suero, orina y aire exhalado condensado.	Suero: LLE con cloroformo de la muestra tratada con NaOH hasta pH 9 y ACN, centrifugación, evaporación de la fase orgánica y reconstitución en agua. Orina: Idéntico al procedimiento seguido en el suero, en este caso de la muestra diluida (1:5, v/v) con agua. Aire: Condensación en trampa fría de aire exhalado. Las tres muestras fueron posteriormente dopadas antes del análisis.	<b>0.05 mg/L</b> (2.0)	[154]
1- Mefobarbital 2- Pentobarbital 3- Secobarbital (Depresores del SNC)	BGE: 40 mM tampón acetato amónico, pH 7.0 + 50 mM poli-L-SUCIL Capilar: 50 μm d.i. x 60 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 25 kV; Inyección: 2 mbar x 5 s; Detección: MS	Determinación enantiomérica simultánea en suero humano	Disolución con HCl 0.1M, dopado, centrifugación, recogida del sobrenadante, SPE con cartuchos Oasis MCX, elución con ACN, evaporación de eluato y reconstitución en ACN/H <sub>2</sub> O 80:20.	1- <b>7.8 mg/L</b> 2- <b>7.8 mg/L</b> 3- <b>7.8 mg/L</b> (2.0)	[155]
Zopiclona (Agonista del receptor benzodiazepínico)	BGE: 80 mM tampón fosfato, pH 2.5 + 5 mM CM-β-CD Capilar: 50 μm d.i. x 42 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 27 kV; Inyección: 55 mbar x 30 s; Detección: UV 305 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en ACN, filtración, evaporación y reconstitución en agua: ACN (9:1, v/v).	<b>0.1 mg/L</b> (> 2.0)	[156]

<i>Suplementos dietéticos</i>					
Derivado de ácido piroglutámico (-)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.5 + HS-β-CD (2.5 %, p/v) Capilar: 50 μm d.i. x 72 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: -30 kV; Inyección: 50 mbar x 15 s; Detección: UV 260 nm	Determinación enantiomérica en inyectable y plasma	Inyectable: Dilución con agua. Plasma: Dopado <i>in vivo</i> en rata, recogida de muestras de sangre a diferentes tiempos tras la ingestión y centrifugación.	<b>0.15 mg/L</b> (> 2.0)	[157]
Ácido aspártico (Neurotransmisor)	Derivatización del analito con OPA/NAC BGE: 37.5 mM tampón tetraborato, pH 9.3 + 50 mM HP-β-CD + DMSO (18 %, v/v) Capilar: 75 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 30 kV; Inyección: 6.9 kPa x 5 s; Detección: LIF (Excitación a 488 nm y emisión a 520 nm)	Determinación enantiomérica en comprimidos	Disolución en bicarbonato sódico, filtración y dilución 1:4 con N-acetil-L-cisteína.	-- (> 2.0)	[158]
<i>Tratamiento del Alzheimer</i>					
Huperzina A (Inhibidor de acetilcolinesterasa y antagonista de los receptores de glutamato)	BGE: 50 mM tampón acetato, pH 5.0 + L,L-AV (0.2 %, p/v) + t-BuOH (10 %, v/v) Capilar: 50 μm d.i. x 55.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 30 mbar x 3 s; Detección: UV 230 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH, filtrado, evaporación, y reconstitución en MeOH.	<b>4170 μg/L</b> (1.8)	[159]
<i>Tratamiento de cáncer, artritis reumatoide y psoriasis</i>					
Metotrexato (Antagonista del ácido fólico, e inhibidor enzimático de la síntesis de purinas y pirimidinas)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 3 mg/mL HP-β-CD + 1 mM BrNS + MeOH (20 %, v/v) Capilar: 75 μm d.i. x 60 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: Fosforescencia con excitación a 294 nm	Determinación enantiomérica en extracto de células humanas leucémicas	Centrifugación, decantación, y reconstitución del sólido en disolución salina de Hanks, dopado, centrifugación, y filtración del sobrenadante.	<b>0.3 μM</b> (1.5)	[160]

<i>Tratamiento de la diabetes</i>					
Alogliptin (Inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4)	BGE: 25 mM tampón acetato, pH 4.75 + 5 mM SBE- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 16°C; V: 18 kV; Inyección: 20 mbar x 4 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	--	<b>2 mg/L</b> (8.4)	[161]
Repaglinida (Estimulador de la liberación de insulina)	BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 2.5 + DM- $\beta$ -CD (1.25 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 36 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: Gravedad; Detección: UV 243 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos y medicamento <sup>2</sup>	Comprimidos: Trituración, disolución en MeOH, filtración y dilución. Medicamento: Disolución en MeOH, dilución en agua y filtración.	<b>100 <math>\mu</math>g/L</b> (2.0)	[162]
Vildagliptina (Inhibidor de la dipeptidil peptidasa-4)	BGE: 50 mM tampón acetato/Tris, pH 4.75 + 20 mM SBE- $\alpha$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 25 kV; Inyección: 50 mbar x 4 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en agua, centrifugación y filtración del sobrenadante.	<b>2.5 mg/L</b> (5.2)	[163]
<i>Tratamiento de la dispepsia</i>					
1- Omeprazol 2- Pantoprazol (Inhibidor de la bomba de protones)	BGE1-: 50 mM tampón fosfato, pH 2.5 + 20 mM RAMEB BGE2-: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 5 mM SBE- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 20 kV; Inyección: 50 mbar x 1 s; Detección: UV 1- 210 y 2- 300 nm	Determinación enantiomérica individual en comprimidos de omeprazol o pantoprazol	Trituración, disolución en MeOH, centrifugación y filtración de sobrenadante.	<b>1- 0.9 mg/L</b> (3.0) <b>2- 1.1 mg/L</b> (2.5)	[164]
Omeprazol (Inhibidor de la bomba de protones)	BGE: 100 mM tampón fosfato/Tris, pH 2.5 + 20 mM HP- $\beta$ -CD + 1 mM ditionito Capilar: 75 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 28 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 301 nm	Determinación enantiomérica en pastillas	Disolución en NaOH 0.1M/tampón borato pH 9.2 (8:92, v/v) y centrifugación.	<b>0.6 mg/L</b> (2.3)	[165]
Pantoprazol (Inhibidor de la bomba de protones)	BGE: Borax/tampón fosfato (50/150 mM), pH 6.5 + 20 mg/mL SBE- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 38 cm l.e. T <sup>a</sup> : 16°C; V: 10 kV; Inyección: 10 cm x 10 s Detección: UV 290 nm	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	Disolución en NaOH 0.1M.	<b>0.9 mg/L</b> (3.0)	[166]

*Tratamiento de la enuresis*

Darifenacina (Bloqueante del receptor muscarínico de la acetilcolina)	BGE: 50 mM tampón fosfato/TEA, pH 2.5 + HS- $\gamma$ -CD (10 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 31.2 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 25 kV; Inyección: 0.6 psi x 3.5 s; Detección: UV 286 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en tampón fosfato, filtración y dilución en tampón.	<b>12.3 mg/L</b> (9.0)	[167]
--	--	--	---	---------------------------	-------

*Tratamiento del hiperparatiroidismo*

Cinacalcet (Regulador alostérico del receptor de sensor de calcio)	BGE: 150 mM tampón fosfato, pH 2.7 + 3.1 mM HP- $\gamma$ -CD + MeOH (2 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 18°C; V: 26 kV; Inyección: 50 mbar x 3 s; Detección: UV 220 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en EtOH, centrifugación y dilución del sobrenadante con agua.	<b>0.3 mg/L</b> 2.0	[168]
Cinacalcet (Regulador alostérico del receptor de sensor de calcio)	BGE: 150 mM tampón fosfato, pH 2.5 + HP- $\gamma$ -CD (0.5 %, p/v) + MeOH (20 %, v/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 25 kV; Inyección: 50 kPa x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en MeOH, dilución con agua y filtración.	<b>0.15 mg/L</b> (1.8)	[169]

*Tratamiento de migrañas y jaquecas*

Zolmitriptán (Agonista selectivo de los receptores de la contracción vascular craneal)	BGE: 50 mM tampón citrato, pH 4.6 + 20 mM SBE- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 72 cm l.t.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 3 s; Detección: UV 225 nm	Determinación enantiomérica en medicamento <sup>2</sup>	Disolución con tampón citrato.	<b>0.3 mg/L</b> (3.0)	[170]
---	--	---	--------------------------------	--------------------------	-------

*Tratamiento de la obesidad*

Sibutramina (Inhibidor de la recaptación de serotonina, noradrenalina y dopamina)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 3.0 + 10 mg/mL M- $\beta$ -CD Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 56 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 50 mbar x 3 s; Detección: UV 225 nm	Determinación enantiomérica en cápsulas	--	<b>0.5 mg/L</b> (2.0)	[171]
--	---	---	----	--------------------------	-------

<i>Tratamiento del Parkinson</i>					
Pramipexol (Agonista de los receptores dopaminérgicos)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.8 + 25 mM CM-β-CD Capilar: 75 μm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 25 kV; Inyección: 3.45 kPa x 5 s; Detección: UV 262 nm	Determinación enantiomérica en comprimidos	Trituración, disolución en agua, centrifugación y filtración del sobrenadante.	<b>0.9 mg/L</b> (3.7)	[172]
<i>Mezcla de familias de fármacos</i>					
1- Ácido mandélico ( <i>Tratamiento del acné</i> , actividad humectante y exfoliativa) 2- Warfarina 3- Coumaclor (2-, 3- <i>Anticoagulantes</i> inhibidores de la enzima hepática que reduce la vitamina K) 4- Flurbiprofeno 5- Indoprofeno 6- Ketoprofeno 7- Fenoprofeno 8- Ibuprofeno (4-, 5-, 6-, 7-, 8- <i>Antiinflamatorios</i> inhibidores de la prostaglandina sintetasa)	1-, 2-, 3- BGE: 50 mM tampón fosfato/Tris, pH 6.1 + 5 mM ERM Capilar: 75 μm d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: - 10 kV; Inyección: 2.5 kPa x 5 s; Detección: UV 305 nm 4-, 5-, 6-, 7-, 8- BGE: 50 mM tampón fosfato/Tris, pH 6.1 + 5 mM ERM Capilar: 75 μm d.i. x 30 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 1, 2, 3, 4 -10 kV; 5- (-5) kV; Inyección: 2.5 kPa x 5 s; Detección: UV 254 nm	Separación quiral individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de: a- warfarina en comprimidos y b- flurbiprofeno en comprimidos	a- Trituración, disolución en MeOH:agua (50:50, v/v) y filtración. b- Trituración y disolución en MeOH:agua (50:50, v/v).	a- <b>2- 12 μM<sup>l</sup></b> b- <b>1- 12 μM<sup>l</sup></b>  (1- 4.6; 2- 2.0; 3- 3.0; 4- 11.4; 5- 10.9; 6- 4.8; 7- 5.0; 8- 9.9)	[173]

1- Warfarina ( <i>Anticoagulante</i> inhibidor de la enzima hepática que reduce la vitamina K)	1- BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 8.4 + SBE-β-CD (2.0 %, p/v) + NLips (1.2 %, p/v)	Separación quiral individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de naproxeno en medicamento <sup>2</sup>	--	2- 4.5 mg/L (1- 2.2; 2- 1.6; 3- 1.5; 4- 2.6)	[106]
2- Naproxeno	2- BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 5.2 + SBE-β-CD (2.0 %, p/v) + NLips (1.2 %, p/v)				
3- Ketoprofeno ( <i>Antiinflamatorios</i> inhibidores de la prostaglandina sintetasa)	3- BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 4.0 + SBE-β-CD (1.5 %, p/v) + NLips (1.2 %, p/v)				
4- Amlodipino ( <i>Antihipertensivo</i> , antagonista de los iones calcio)	4- BGE: 20 mM tampón fosfato, pH 2.6 + SBE-β-CD (1.5 %, p/v) + NLips (0.96 %, p/v)				
	Capilar: 50 μm d.i. x 24.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 1-, 2-, 3- (-6 kV) y 4- (-10 kV); Inyección: 50 mbar x 5 s; Detección: UV 1- 305 nm, 2- 235 nm, 3- 256 nm, 4- 237 nm				

<sup>1</sup>Se corresponde con el mayor LOD de los dos enantiómeros.

<sup>2</sup>Medicamento: fármaco con excipientes sin estar en su forma comercial.

<sup>3</sup>Mayor LOD encontrado para los enantiómeros correspondientes a los diferentes metabolitos.

3,4-DMMC: (±)-1-(3,4-dimetilfenil)-2-(metilamino)propan-1-ona; ACN: Acetonitrilo; ANDA: Ácido 7-amino-1,3-naftalendisulfónico; BGE: Medio de separación; Bond Elut Plexa: Polímero para retención de analitos neutros e iónicos; BrNS: Ácido 1-bromo-4-naftalensulfónico; BSA: Albúmina sérica bovina; BuOH: Butanol; CD: Ciclodextrina; CIL: Líquido iónico quirale; CIL1: L-alanina-tert-butilesterbis(trifluorometano)sulfonimida; CIL2: L-valina-tert-butilesterbis(trifluorometano)sulfonimida; CM-β-CD: Carboximetil-β-CD; DCM: Diclorometano; DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva; DM-β-CD: Heptakis(2,6-di-O-metil)-β-CD; DMSO: Dimetilsulfóxido; EMIM-L-L: 1-etil-3-metilimidazolium-L-lactato; ERM: Eremomicina; EtOAc: Acetato de etilo; EtOH: Etanol; HCl: Ácido clorhídrico; HLB: Sorbente para retención de compuestos hidrófilos e hidrofóbicos; HP-β-CD: (2-hidroxipropil)-β-CD; HP-γ-CD: (2-hidroxipropil)-γ-CD; HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia; HS-β/γ-CD: β/γ-CD con alto grado de sustitución sulfatada; i-PrOH: Isopropanol; L,L-AV: N-undecanoil-L,L-alanil-valinato; LIF: Fluorescencia inducida por láser; LIP: Fosforescencia inducida por láser; LLE: Extracción líquido-líquido; LOD: Límite de detección; MAX: Intercambio aniónico en modo mixto; MCX: Sorbente para intercambio catiónico; MD: maltodextrina, MD-DE 4-7: Maltodextrina con 4-7 equivalente de dextrosas; MDPV: (±)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-2-(pirrolidin-1-il)pentan-1-ona; MeOH: Metanol; M-α-CD: Metil-α-CD; M-β-CD: Metil-β-CD; MOPS: Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico; MS: Espectrometría de masas; NAC: N-acetil-L-cisteína; NaOH: Hidróxido sódico; NLip: Nanoliposoma; NS: No separación; OPA: O-ftaldialdehído; OS-γ-CD: Octa(6-O-sulfo)-γ-CD; PDDAC: Poli(cloruro de dialildimetilamonio); PLE: Extracción con líquidos presurizados; Poli-L-SUCIL: Poli-(N-undecenoicarbonil-L-isoleucinato de sodio); Poli-L,L-SULA: Poli-sodium-N-undecenoil-L,L-leucilalaninato; Poli-L,L-SULV: Poli-sodium-N-undecenoil-L,L-leucilvalinato; RAMEB: β-CD metilada aleatoriamente; Rs: Resolución; RS86017: (-)7R,13aS-N-p-chlorobenzyl-2,3-methylenedioxy-9,10-dimethoxy-5,8,13,13a-tetrahydro-6H-dibenzo[a,g]quinolizinium chloride; S-α-CD: α-CD sulfatada; S-β-CD: β-CD sulfatada; Sal de Hank: Disolución rica en iones bicarbonatos; SBE-β-CD: Sulfobutileter-β-CD; SDC: Deoxicolato sódico; SDS: Dodecil sulfato sódico; SNC: Sistema nervioso central; SPE: Extracción en fase sólida; Strata-X-C: Polímero para intercambio catiónico fuerte y fase reversa; Tampón Britton-Robinson: Tampón basado en la mezcla de 40 mM ácido bórico + 40 mM ácido fosfórico + 40 mM ácido acético; t-BuOH: Terc-Butanol; TEA: Trietanolamina; TM-β-CD: Heptakis 2,3,6-tri-O-metil-β-CD; Tris: Tris(hidroximetil)aminometano; UV: Ultravioleta; VC: Vancomicina

Además de las CDs, se han empleado otros selectores quirales como la proteína BSA (Albúmina Sérica Bovina) para separar analgésicos [114], antibióticos como eremomicina para separar diversas familias de fármacos [173], líquidos iónicos quirales para separar antibióticos [119] y antiinflamatorios [141], micelas poliméricas para separar anticoagulantes [121], antidepresivos [123], sedantes [155] y fármacos para el tratamiento de Alzheimer [159], así como maltodextrina [111] y maltodextrina derivatizada con varios equivalentes de dextrosas para la separación enantiomérica de varios analgésicos [112], antidepresivos [122] y antihipertensivos [136].

En lo que se refiere al modo de detección, mayoritariamente se empleó el detector UV-DAD. En el caso de analitos que no absorben la radiación UV, fue necesario un proceso de derivatización con diversos reactivos como ácido 7-amino-1,3-naftalendisulfónico (ANDA) [142] y O-ftalaldehído (OPA)/N-acetil-L-cisteína (NAC) [158]. Otros modos de detección empleados han sido la conductimetría, la fosforescencia (empleando derivatización con el ácido 1-bromo-4-naftalensulfónico (BrNS) [127, 160]), MS y la detección electroquímica. Estos sistemas de detección permitieron alcanzar LODs a niveles de los  $\mu\text{g/L}$  y nM.

Dada la baja concentración a la que pueden encontrarse los analitos, sobre todo en las muestras de fluidos biológicos, se hace necesaria una etapa previa de pre-concentración mediante diversas técnicas, como son la extracción en fase sólida (SPE) [103, 104, 121, 123, 145, 155], microextracción en fase líquida (LPME) [122], extracción líquido-líquido (LLE) [19, 115, 116, 129, 153, 154], extracción mediante líquidos presurizados (PLE) [150], microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [151] y extracción por electromembrana (EME) [126, 130].

#### **I.4 Separación enantiomérica de compuestos de interés medioambiental por Electroforesis Capilar**

Como ya se ha comentado anteriormente, la separación enantiomérica de compuestos de interés medioambiental también presenta un elevado interés. Dado que, en este caso, el número de trabajos aparecidos en la bibliografía ha sido considerablemente inferior a los publicados en relación a las separaciones quirales llevadas a cabo en el campo farmacéutico, en este apartado se han considerado todos los trabajos relacionados con la separación quiral de compuestos de interés medioambiental en el formato de la CE (EKC, CEC, NACE) y publicados hasta la fecha. La **Tabla I.3** detalla las características de las metodologías analíticas desarrolladas en los trabajos en los que se ha descrito la determinación enantiomérica de fármacos, fungicidas, herbicidas, insecticidas y nematocidas en muestras de agua, suelos o formulaciones agroquímicas con fines a evaluar el impacto de la presencia de dichos compuestos en el medioambiente y la calidad de las formulaciones comerciales, así como llevar a cabo estudios de degradación [174-179] o de biotransformación [180].

Utilizando la sal biliar colato sódico (SC) como selector quiral y SDS como cosurfactante en una fase orgánica formada por MeOH/ACN, se llevó a cabo la separación enantiomérica individual de varios insecticidas organofosforados mediante NACE [181]. Por su parte, el modo CEC permitió la determinación enantiomérica y el estudio de la degradación enantioselectiva del herbicida fenoxiácido dicloroprop en muestras de suelo utilizando una columna monolítica basada en un derivado de tergurida [177] y la determinación enantiomérica individual de un grupo de fungicidas (fenilamidas y triazoles) utilizando una columna de celulosa [182].



**Tabla I.3.** Artículos publicados en los que se describen separaciones quirales de compuestos de interés medioambiental por CE en aguas, suelos y formulaciones agroquímicas.

Analito (Familia química)	Medio de separación	Aplicación	Tratamiento de muestra	LOD (Rs)	Ref.
<i>Fármacos</i>					
1- Pindolol 2- Atenolol 3- Propranolol 4- Metoprolol (Hidroxi-propil aminas)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.5 + M- $\beta$ -CD (1.25 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 30°C; V: 20 kV; Inyección: 10 kV x 6 s; Detección: UV 2- y 4- 200 nm; 1- y 3- 220 nm	Determinación enantiomérica simultánea en agua de río, grifo y subterránea	SPE con cartucho de extracción SBA15-C18 de las muestras dopadas con los racematos. Elución con MeOH, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en tampón.	1- <b>1.3 <math>\mu</math>g/L</b> (1- 1.8) 2- <b>1.3 <math>\mu</math>g/L</b> (2- 1.0) 3- <b>1.3 <math>\mu</math>g/L<sup>1</sup></b> (3- 2.0) 4- <b>1.6 <math>\mu</math>g/L</b> (4- 1.0)	[183]
Ketoprofeno (2-aril propionato)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 2.5 + S- $\beta$ -CD (4.0 %, p/v) + TM- $\beta$ -CD (0.5 %, p/v) + 20 mM SDS Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 24.5 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: -15 kV; Inyección: -15 kV x 30 min; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica en agua residual	Estabilización de la muestra con ácido nitríco 1 M (0.1 %; v/v), almacenamiento en oscuridad a 8°C y previamente a su análisis, dopado y filtración.	<b>2.5 nM</b> (> 2.0)	[184]
<i>Fungicidas</i>					
Propiconazol (1- enantiómeros mayoritarios y 2- enantiómeros minoritarios) (Azol)	BGE: 25 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 30 mM HP- $\gamma$ -CD + 75 mM SDS + MeOH (10 %, v/v) + ACN (5 %, v/v) Capilar: 75 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 23°C; V: 30 kV; Inyección: hidrodinámica x 6.5 s; Detección: UV 190 nm	Determinación enantiomérica en lodo	Dopado de la muestra, centrifugación, decantación y filtración.	1- <b>0.75 mg/L</b> 2- <b>0.09 mg/L</b> (2.0)	[185]

1- Metalaxil 2- Benalaxil (Fenilamidas)	1- BGE: 50 mM tampón MES pH 6.5 + 15 mM Suc- $\gamma$ -CD + 2 M Urea 2- BGE: 50 mM tampón MES pH 6.5 + 5 mM Suc- $\beta$ -CD + 2 M Urea Capilar: 50 $\mu$ m d.i x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 30 kV, Inyección: 25 mbar x 3 s; Detección: UV a 210 nm	Separación enantiomérica individual. Aplicación a la determinación enantiomérica en productos agroquímicos comerciales en estado sólido y líquido	Sólidos: Disolución en MeOH. Líquidos: Dilución en MeOH o en BGE:agua (50:50, v/v).	1- <b>4.2 mg/L<sup>1</sup></b> (3.1) 2- <b>5.6 mg/L<sup>1</sup></b> (15)	[186]
Imamailil (Azol)	BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 3.0 + 5 mM $\beta$ -CD Capilar: 75 $\mu$ m d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 25 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica y estudio de la degradación del racemato en suelos	Dopado de la muestra, extracción con MeOH, centrifugación, evaporación parcial del sobrenadante y dilución (1:10, v/v) en tampón. Los estudios de degradación se hicieron en diferentes condiciones experimentales.	<b>0.25 mg/L</b> (4.0)	[174]
Triadimefon Triadimenol (Triazoles)	BGE: -- mM tampón fosfato, pH 3.0 + S- $\beta$ -CD (2 %, p/v) Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 53 cm l.e.; T <sup>a</sup> :-- °C; V: -20 kV; Inyección: --; Detección: UV 220 nm	Separación enantiomérica y estudios de biotransformación en suelo de triadimefon en triadimenol	Tamizado, dopado de la muestra con racemato de triadimefon, adición de agua de estanque e incubación a 35°C durante 20 días. Posteriormente, LLE con acetona, centrifugación y dilución (1:5, v/v) del sobrenadante con agua, preconcentración SPE con cartucho de extracción ODS-6, elución con acetona, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución en tampón.	-- (> 2.0)	[180]

<p>1- Metalaxil 2- Benalaxil 3- Diniconazol 4- Hexaconazol 5- Miclobutanil 6- Tebuconazol 7- Uniconazol 8- Flutriafol (1-2 Fenilamidas; 3-8 Triazoles)</p>	<p>Fase móvil: ACN/agua/formiato amónico (90:9:1, v/v/v) pH 2.5 Columna de CEC: fase estacionaria de celulosa tris(4-cloro-3-metilfenilcarbamato); 100 µm d.i. x 24 cm l.e.; T<sup>a</sup>: 25°C; V: -10 kV; Inyección: 10 bar x 12 s; Detección: UV 210 nm</p>	<p>Determinación enantiomérica individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de metalaxil en agua de grifo y suelos</p>	<p>Agua de grifo: SPE con cartucho de extracción C18 de la muestra dopada con un producto comercial enantioméricamente puro en R-metalaxil, elución con MeOH, evaporación a sequedad del extracto y reconstitución del residuo en ACN/agua (80:20, v/v). Suelo: Extracción con MeOH de la muestra seca y dopada con el producto comercial enantioméricamente puro en R-metalaxil. Evaporación parcial del extracto metanólico, dilución con agua y posterior LLE con acetato de etilo. Secado de la fase orgánica con sulfato de sodio, evaporación a sequedad y reconstitución del residuo en hexano. Finalmente, limpieza por SPE del extracto con cartucho de sílice, elución con acetato de etilo/hexano (20:80, v/v), evaporación a sequedad y reconstitución del residuo en ACN/agua (80:20, v/v).</p>	<p><b>1- 1.6 mg/L<sup>1</sup></b> (1- 2.7; 2- 1.3; 3- 2.5; 4- 6.4; 5- 0.8; 6- 2.6; 7-3.3; 8- 0.9)</p>	<p>[182]</p>
<b>Herbicidas</b>					
<p>Glufosinato (Organofosforado)</p>	<p>Analito derivatizado con cloruro de dansilo. BGE: 2 mM tampón fosfato, pH 6.5 + 17 mM γ-CD Capilar: 50 µm d.i. x 69 cm l.e.; T<sup>a</sup>: 25°C; V: 30 kV; Inyección: 30 kV x 17-18 min; Detección: LIF (Excitación a 327 nm y emisión a 557 nm)</p>	<p>Determinación enantiomérica en agua de río</p>	<p>La muestra dopada y acidificada a pH 3 con TFA es mezclada con óxido de titanio y tras su filtración se introduce en un cartucho de extracción SPE. Posteriormente, lavado con agua, elución con amoníaco 75 mM, evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en carbonato sódico 10 mM.</p>	<p><b>2.6 nM<sup>1</sup></b> (2.5)</p>	<p>[187]</p>

Haloxifop (Piridina)	BGE: 75 mM tampón Britton-Robinson, pH 5.0 + 6 mM VC Capilar: 50 $\mu\text{m}$ d.i. x 33 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 20 kV; Inyección: 34.5 kPa x 2 s; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en suelo	Tamizado de la muestra dopada con una disolución metanólica del herbicida comercial de haloxifop etoxietil éster racémico, seguida de la hidrólisis a su correspondiente ácido. LLE con DCM del hidrolizado ácido mezclado con MeOH/HCl 1M (9:1, v/v) y agua. Evaporación parcial del extracto orgánico.	<b>0.5 <math>\mu\text{M}</math></b> (3.7)	[188]
1- Dicloroprop 2- Fenoprop (Fenoxiácidos)	BGE: 100 mM tampón fosfato, pH 5.6 + 1 mM $\beta$ -CD + 4 mM $\alpha$ -CD Capilar: 50 $\mu\text{m}$ d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 22°C; V: 25 kV; Inyección: presión x 4 s; Detección: UV 200 nm	Determinación enantiomérica simultánea en agua de lago	SPE con disco de membrana C <sub>18</sub> de la muestra dopada, elución con MeOH y evaporación parcial del extracto.	<b>&lt; 1 <math>\mu\text{g/L}</math></b> (1- 1.2; 2- 1.4)	[189]
Dicloroprop (Fenoxiácido)	BGE: 50 mM tampón acetato, pH 4.7 + 25 mM TM- $\beta$ -CD Capilar: 75 $\mu\text{m}$ d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 30°C; V: 20 kV; Inyección: hidrodinámica 30 nL x 5 s; Detección: UV 230 nm	Determinación enantiomérica: a- formulación comercial y b- suelos. Estudio de degradación de (-)-Dicloroprop en suelo	a- Formulación comercial: Dilución en agua. b- Suelo: Dopado de la muestra, extracción asistida por ultrasonidos con ACN/agua/HAc (80:20:2, v/v), centrifugación, decantación y LLE con diferentes porciones de DCM. Posteriormente, secado de la fase orgánica con sulfato sódico, lavado con DCM, evaporación de los extractos orgánicos a sequedad y reconstitución del residuo en ACN.	a- <b>0.1 mg/L</b> b- <b>0.5 mg/L</b> (2.0)	[175]

Metabolitos OXA y ESA de Metolaclo (Cloroacetinalidas)	BGE: 75 mM tampón borato, pH 9.0 + $\gamma$ -CD (2.5 %, p/v) + MeOH (20 %, v/v) Capilar: 75 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 30 kV; Inyección: 0.5 psi x 10 s; Detección: MS	Determinación enantiomérica y estudio de degradación de metolaclo en agua y suelo	Agua: SPE con cartucho de extracción C18 de la muestra dopada con OXA y ESA racémicos. Elución de metolaclo con acetato de etilo (análisis por HPLC-MS) y de OXA y ESA con MeOH (análisis por CE-MS). Evaporación y reconstitución del segundo extracto en MeOH:agua (50:50, v/v). Suelo: Los estudios de degradación se realizaron mediante extracción acelerada con isopropanol. Posteriormente, SPE del extracto como en el apartado anterior.	5 mg/L (--)	[176]
Dicloroprop (Fenoxiácido)	Fase móvil: 4 mM TEA/HAc en ACN/MeOH (9:1, v/v) Columna de CEC: fase estacionaria de (+)-1-(4-aminobutil)-(5R,8S,10R)-tergurida; 100 $\mu$ m d.i. x 25.5 cm l.e. ; T <sup>a</sup> : 25°C; V: -15 kV; Inyección: -2 kV x 3 s; Detección: UV 254 nm	Determinación enantiomérica y estudio de degradación estereoselectiva en suelo	Secado, tamizado, dopado de la muestra e incubación en oscuridad a 20-23°C durante 23 días. Diariamente, extracción de una porción con MeOH, centrifugación, dilución del sobrenadante con agua y ajuste a pH 2.0. LLE con DCM, evaporación de la fase orgánica hasta sequedad y reconstitución del residuo en MeOH.	0.5 ng <sup>l</sup> (1.8)	[177]
<b><i>Insecticidas</i></b>					
Cis-Bifentrina (Piretroide)	BGE: 100 mM tampón borato pH 8.0 + 20 mM TM- $\beta$ -CD + 100 mM SC + 2M Urea Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 15°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 2 s; Detección: UV 210 nm	Determinación enantiomérica en formulación comercial	Dilución de la formulación líquida comercial en MeOH	4.8 mg/L <sup>1</sup> (2.8)	[190]
Bioaletrina (Piretroide)	BGE: 100 mM tampón borato pH 8.0 + 15 mM Ac- $\beta$ -CD + 75 mM SDC + 2M Urea Capilar: 50 $\mu$ m d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 50 mbar x 2 s; Detección: UV 220 nm	Determinación enantiomérica en formulación comercial	Dilución de la formulación en forma de spray en MeOH	0.3 mg/L <sup>1</sup> (9.0)	[191]

1- Piraclofos 2- Profenofos 3- Protiofos 4- Sulprofos (Organofosforados)	BGE: 100 mM SC + 50 mM SDS + MeOH/ACN (4:1, v/v) Capilar: 50 µm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 30 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 200 nm	Separación quiral individual en suelo	La muestra es triturada, secada y seguidamente dopada con los racematos. Posteriormente, extracción con MeOH en presencia de carbón activo, filtración, dilución del extracto con MeOH, evaporación a sequedad y reconstitución de residuo en MeOH.	-- (1. > 2.0; 2- 1.8; 3- 1.8; 4- 1.8)	[181]
1- Malatión 2- Fentoato 3- Fenamifos 4- Isomalatión 5- Naled (Organofosforados)	1, 2, 3, 4- BGE: 25 mM Tris, pH 7.0 + 20 mM CM-β-CD 5- BGE: 25 mM tampón borato, pH 9.0 + 10 mM CM-β-CD Capilar: 75 µm d.i. x 61.5 cm l.e. (1-4) y 50 µm d.i. x 65 cm l.e. (5); T <sup>a</sup> : 25°C; V: 24 kV; Inyección: 50 mbar x 3 s; Detección: UV 5- 214 nm, 1- y 4- 230 nm y 2- y 3- 254 nm	Separación quiral individual. Aplicación a la determinación enantiomérica de malatión en agua de grifo	SPE en disco ISOLUTE (C8/ENV+) de la muestra dopada con los racematos. Elución con acetato de etilo/dietiléter (50:50, v/v), evaporación a sequedad del extracto y reconstitución del residuo en MeOH.	1- <b>50 mg/L</b> (1- 1.4; 2- 2.0; 3- 0.6; 4- (primer par de enantiómeros 2.5, segundo par de enantiómeros 1.1); 5- > 5.0)	[192]
<i>Nematicidas</i>					
1- Fenamifos y sus metabolitos (2- fenamifos sulfona, 3- fenamifos sulfóxido) (Organofosforados)	BGE: 50 mM acetato amónico, pH 5.0 + 25 mM CM-β-CD + 10 mM HP-α-CD + MeOH (5 %, v/v) Capilar: 50 µm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 25°C; V: 25 kV; Inyección: 0.5 psi x 5 s; Detección: UV 214 nm	Determinación enantiomérica simultánea en suelo	Secado, trituración y tamizado, seguido del dopado de la muestra con los racematos. Metodologías de Extracción: 1) PLE a 100°C, 1500 psi durante 5 min con etanol, acetato de etilo o heptano (individualmente o en mezcla) de la muestra dopada y seca con sulfato sódico. 2) Extracción de la muestra dopada con MeOH y centrifugación. Posteriormente, evaporación a sequedad del extracto obtenido en cada una de las dos metodologías, reconstitución en tampón 5 mM HAc/amoniaco (pH 5.0) - MeOH (15 %, v/v).	1- <b>4.7 mg/kg<sup>1</sup></b> 2- <b>0.9 mg/kg<sup>2</sup></b> 3- <b>0.6 mg/kg<sup>2</sup></b> (2.0)	[193]

*Mezclas de diferentes pesticidas*

1- Cruformato (Insecticida organofosforado) 2- Diclorprop (Herbicida fenoxiácido)	1- BGE: 20 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 40 mM HP-β-CD + 100 mM SDS + ACN (20 %, v/v) 2- BGE: 25 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 25 mM TM-β-CD + MeOH (20 %, v/v) Capilar: -; T <sup>a</sup> : -; V: 1- 20 kV y 2- 15 kV; Inyección: -; Detección: UV 1- 200 nm y 2- 230 nm	Determinación enantiomérica individual y estudios de degradación en suelo	Incubación de la muestra dopada con los racematos a 25°C durante 6 meses.	-- (-- )	[178]
1- Dicloroprop (Herbicida fenoxiácido) 2- Cruformato (Insecticida organofosforado) 3- Ácido bromocloroacético (Desinfectante de agua haloacético)	1- BGE: 25 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 25 mM TM-β-CD 2- BGE 20 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 40 mM HP-β-CD + 100 mM SDS + ACN (20 %, v/v) 3- BGE: 50 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 40 mM TM-β-CD Capilar: 75 μm d.i. x 50 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 23°C; V: 25 kV (15 kV para Dicloroprop); Inyección: hidrodinámica x 5 s; Detección: UV 2- y 3- 200 nm y 1- 230 nm	Determinación enantiomérica individual de 1- y 2- en lodo, y de 3- en agua de río	1, 2- Centrifugación y filtración de la muestra dopada con los racematos. Extracción con MeOH, dilución del extracto con agua, centrifugación y decantación. 3- Filtración y posterior dopado de la muestra con los racematos.	1- <b>3 mg/L</b> (2.0) 2- <b>5 mg/L</b> (2.0) 3- <b>1 mg/L</b> (2.0)	[194]

<p>1- Metalaxil (Fungicida fenilamida)  2- Imazaquin (Herbicida imidazolinona)  3- Dicloroprop (Herbicida fenoxiácido)  4- Fonofos (Insecticida organotiofosfato)  5- Crufomato (Insecticida organofosforado)</p>	<p>1- BGE: 30 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 40 mM <math>\gamma</math>-CD + 100 mM SDS + ACN (15 %, v/v)  2- BGE: 50 mM tampón acetato, pH 4.5 + 15 mM DM-<math>\beta</math>-CD  3- BG5: 25 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 25 mM TM-<math>\beta</math>-CD + 100 mM SDS + ACN (15 %, v/v)  4- BGE: 20 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 25 mM <math>\gamma</math>-CD + 100 mM SDS + ACN (15 %, v/v)  5-BGE: 30 mM tampón tetraborato, pH 8.5 + 40 mM HP-<math>\beta</math>-CD + 100 mM SDS + ACN (20 %, v/v)  Capilar: 75 <math>\mu</math>m d.i. x 50 cm l.e.; T<sup>a</sup>: 23°C;  V: 3- y 5- 15 kV, 2- y 4- 25 kV y 1- 30 kV;  Inyección: hidrodinámica x 5 s;  Detección: UV 2-, 3- y 4- 200 nm y 1- y 5- 230 nm</p>	<p>Determinación enantiomérica individual y estudio de degradación en condiciones aeróbicas en lodo</p>	<p>1, 2 y 4- Secado y tamizado de la muestra dopada con los tres racematos. Después de la adición de agua se deja en oscuridad y agitación durante 3 días. Posteriormente, centrifugación y congelación del sobrenadante hasta análisis.  3 y 5- Incubación de la muestra a 25°C durante 8 meses en oscuridad del suelo, seco, tamizado y dopado con los racematos y mezclado con agua. Posteriormente, centrifugación, filtrado y análisis del sobrenadante.</p>	<p>1- <b>2 mg/L</b><sup>1</sup>  (1- 1.6)  2- <b>2 mg/L</b><sup>1</sup>  (2- &gt; 2.0)  3- <b>2 mg/L</b><sup>1</sup>  (3- 2.0)  4- <b>2 mg/L</b><sup>1</sup>  (4- 1.2)  5- <b>2 mg/L</b><sup>1</sup>  (5- 2.0)</p>	<p>[179]</p>
---	---	---	---	--	--------------



1- Bioaletrina (Insecticida piretroide)	1- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM HP-β-CD + 50 mM SC				1- <b>0.4 µg/L</b> (1- 2.4)
2- Fenpropatrina (Insecticida piretroide)	2- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM γ-CD + 50 mM SDS				2- <b>1.0 µg/L</b> (2- 7.1)
3- Fenotrina (Insecticida piretroide)	3- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM DM-β-CD + 50 mM SC				3- <b>0.3 µg/L</b> (3- 1.5)
4- Propiconazol (Fungicida triazol)	4- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM TM-β-CD + 50 mM SDS	Determinación enantiomérica individual en agua de lago.	Filtración, dopado de la muestra con los racematos y ajuste a pH a 3. SPE con cartucho de extracción Oasis HLB, elución con MTBE/MeOH (90:10, v/v), evaporación del extracto a sequedad y reconstitución del residuo en MeOH.	[195]	4- <b>0.4 µg/L</b> (4- 1.5)
5- Bitertanol (Fungicida triazol)	5- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM TM-β-CD + 50 mM SDS				5- <b>0.4 µg/L</b> (5- 1.5)
6- Triadimenol (Fungicida triazol)	6- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM HP-γ-CD + 50 mM SDS				6- <b>0.6 µg/L</b> (6- 1.5)
7- Dimetomorf (Fungicida morfolina)	7- BGE: 50 mM tampón fosfato, pH 7.0 + 15 mM HP-γ-CD + 50 mM SC				7- <b>0.2 µg/L</b> (7- 8.7)
	Capilar: 50 µm d.i. x 40 cm l.e.; T <sup>a</sup> : 20°C; V: 20 kV; Inyección: 3.5 kPa x 2 s; Detección: UV 214 nm				

<sup>1</sup> Mayor LOD correspondiente a los dos enantiómeros del compuesto.

<sup>2</sup> LOD encontrado para los enantiómeros correspondientes a los diferentes metabolitos.

Ac-β-CD: Acetil-β-cilcodextrina; ACN: Acetonitrilo; CEC: Electro cromatografía capilar; CM-β-CD: Carboximetil-β-ciclodextrina; DCM: Diclorometano; DM-β-CD: heptakis(2,6-di-O-metil)-β-ciclodextrina; ESA: Ácido etanosulfónico; HP-β-CD: (2-hidroxiopropil)-β-ciclodextrina; HP-γ-CD: (2-hidroxiopropil)-γ-ciclodextrina; HAc: Ácido acético; HP-α-CD: (2-hidroxiopropil)-α-ciclodextrina; ISOLUTE (C8/ENV+): Sorbente de extracción polimérico e hidroxilado funcionalizado con cadenas C8; LIF: Fluorescencia inducida por láser; LLE: Extracción líquido-líquido; LOD: Límite de detección; M-β-Cd: β-ciclodextrina metilada; MeOH: Metanol; MES: Ácido n-(N-morfolino)etanosulfónico; MS: Espectrometría de masas; MTBE: Metil terc-butyl éter; ODS-6: Sorbente de extracción de sílice funcionalizado con cadenas C18; OXA: Ácido oxanílico; PLE: Extracción con líquidos presurizados; Rs: Resolución; S-β-CD: β-CD sulfatada; SBA15-C18: Sorbente de extracción mesoporoso funcionalizada con cadenas C18; SC: Colato sódico; SDC: Deoxicolato sódico; SDS: Dodecil sulfato sódico; SPE: Extracción en fase sólida; Suc-β-CD: Succinil-β-ciclodextrina; Suc-γ-CD: Succinil-γ-ciclodextrina; Tampón Britton-Robinson: 40 mM ácido bórico/40 mM ácido fosfórico/40 mM ácido acético; TEA: Trietilamina; TFA: Ácido trifluoroacético; TM-β-CD: Hexakis(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina; UV: Ultravioleta; VC: Vancomicina.

Sin embargo, ha sido el modo EKC con CDs como selectores quirales el más utilizado para la separación enantiomérica de compuestos de interés medioambiental de la misma forma que se ha comentado que ocurre para compuestos de interés farmacológico. En el caso de la determinación de fármacos, se han publicado únicamente dos artículos científicos dedicados a la determinación de los enantiómeros de antihipertensivos en agua de grifo, río y subterránea [183] y del analgésico ketoprofeno en aguas residuales [184] empleando una CD como selector quiral en el primer caso o un sistema dual de dos CDs y SDS como medio micelar en el segundo caso. En lo que respecta a la determinación de agroquímicos, los métodos desarrollados han permitido la separación enantioselectiva de los pesticidas mencionados anteriormente y pertenecientes en general a las familias de los azoles, fenoxiácidos, organofosforados y piretroides utilizando una CD [174-176, 179, 180, 185-187, 192, 194], un sistema dual de CDs [189, 193], una CD con un tensioactivo no quiral como SDS [178, 179, 194, 195] o una CD con un tensioactivo quiral como las sales biliares [190, 191, 195]. En cuanto al empleo de otros selectores quirales, únicamente el antibiótico vancomicina se utilizó con éxito en la determinación quiral del herbicida haloxifop en muestras de suelo [188]. En ocasiones, se emplearon MeOH y/o ACN como modificadores orgánicos [176, 179, 178, 185, 193, 194] o urea para mejorar la solubilidad en medio acuoso de analitos hidrofóbicos y mejorar la eficacia [186, 190, 191].

Como puede observarse en la **Tabla I.3**, el sistema de detección más empleado ha sido UV-DAD, con LODs entre los  $\mu\text{g/L}$ - $\text{mg/L}$  o  $\text{nM}$ . También se utilizaron la detección LIF y MS. En el primer caso, se hace necesario derivatizar el analito al no tener grupos fluorescentes en su estructura y los LODs fueron del orden de  $\text{nM}$  [187]. En el caso de MS, los LODs obtenidos fueron del orden de los  $\text{mg/L}$  [176].

Dadas las bajas concentraciones a las que los compuestos estudiados se encuentran en las muestras medioambientales, se han utilizado distintas técnicas de pre-concentración como SPE [176, 180-182, 183, 187, 189, 192, 195], LLE [175, 177, 188, 194] o PLE [193].

### **I.5. Organosílices mesoporosos como sorbentes para la extracción en fase sólida de compuestos de interés medioambiental**

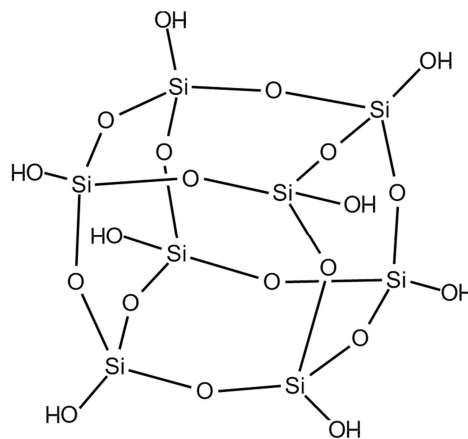
Como ya se ha comentado anteriormente, los bajos niveles a los que se encuentran numerosos compuestos de interés medioambiental en una gran variedad de muestras [196], hacen necesaria su preconcentración previa a su determinación, especialmente en el caso de utilizar detección UV que es uno de los sistemas de detección más empleados en las técnicas cromatográficas y electroforéticas. Una de las técnicas más empleadas con este fin es SPE que ha permitido alcanzar LODs con detección UV suficientes para proporcionar la sensibilidad necesaria para resolver una gran variedad de problemas analíticos. Entre los diferentes materiales desarrollados para ser utilizados como sorbentes en SPE se pueden destacar aquellos basados en sílice.

Debido a la gran diversidad de materiales de base de sílice que se pueden sintetizar, la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) optó por realizar una clasificación de acuerdo a la porosidad de los mismos denominándolos [197]:

- microporosos (tamaño de poro < 2 nm),
- mesoporosos (tamaño de poro entre 2 y 50 nm),
- macroporosos (tamaño de poro > 50 nm).

Los materiales mesoporosos se caracterizan por poseer una estructura de poro ordenada, es decir, con una distribución centrada en torno a un valor (y no amorfa) [198]. Estos materiales tienen alta superficie específica en torno a 1000 m<sup>2</sup>/g [199] y una elevada estabilidad térmica, química y mecánica. Asimismo, poseen gran porosidad con estrecha distribución de diámetro de poro y con distinta estructura (hexagonal, cúbica o laminar) y diferente morfología (esférica, cilíndrica, etc.) [199, 200].

La aplicación de sílices mesoporosas ha ido en aumento [201] desde que en 1992 fuera por primera vez sintetizada una fase mesoporosa conocida como MCM-41 [202, 203] y caracterizada por su mesoporosidad ordenada con distribución de poros cilíndricos (a diferencia de la fase SBA-15 cuya distribución de poro es hexagonal). Estas fases consisten en una estructura similar a un silsesquioxano con átomos de silicio unidos a tres grupos silanoles (-Si(OH)<sub>3</sub>) condensados para formar un enlace puente siloxano tridimensional (Si-O-Si) [204] tal y como puede apreciarse en la **Figura I.11** [205].



**Figura I.11.** Estructura tridimensional de un material mesoporoso tipo SBA-15.

La metodología estandarizada de síntesis de sílices mesoporosas consiste en el método hidrolítico sol-gel, el cual emplea reactivos basados en monómeros alcoxisilanos para dar lugar a una red de siloxanos. Como precursor principal de fuente de sílice se suele emplear tetraetilortosilicato (TEOS). Como reactivos secundarios, se emplean tensioactivos de naturaleza tanto neutra como catiónica o aniónica como agentes directores para formar los mesoporos. También se puede utilizar en algunos casos el copolímero Pluronic123® (P123).

Existen dos posibles mecanismos de síntesis [206, 207]:

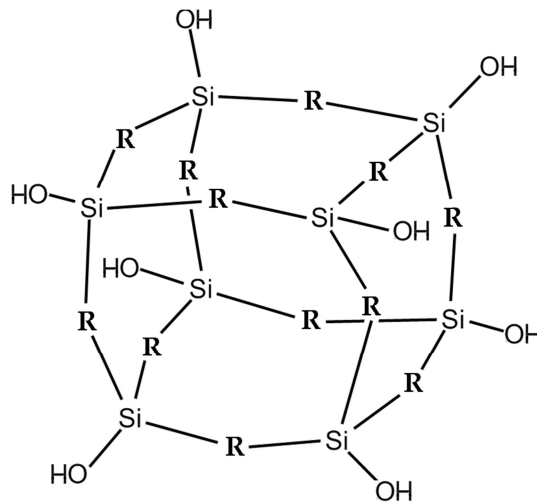
- “Plantilla de cristal líquido”, en la cual, en condiciones específicas, la concentración de tensioactivo es tan alta que permite obtener la mesoestructura sin necesidad de precursor inorgánico si bien éste se puede añadir posteriormente para que condense alrededor de los agregados previamente formados.
- “Auto-ensamblaje cooperativo”, que consiste en emplear unas condiciones de síntesis en las que hay una baja concentración de tensioactivo, que junto con el precursor inorgánico promueven simultáneamente la formación de la mesoestructura.

Independientemente del procedimiento de síntesis empleado, cabe resaltar que es posible controlar las dimensiones y las morfologías de los materiales resultantes en función de factores como son la temperatura, contenido en agua, pH, características de los tensioactivos y las concentraciones de la fuente de sílice [198].

A pesar de las estrictas condiciones de síntesis, tanto en la superficie [208] de estos materiales como en los mesoporos [209] tienden a quedar grupos silanoles que no han sufrido reacción, por lo que pueden ser funcionalizados [199]

con grupos orgánicos [210] vía enlace covalente mediante dos posibles rutas, conocidas como modificación post-síntesis y co-condensación [198, 211, 212], mejorando de este modo la funcionalidad de los materiales.

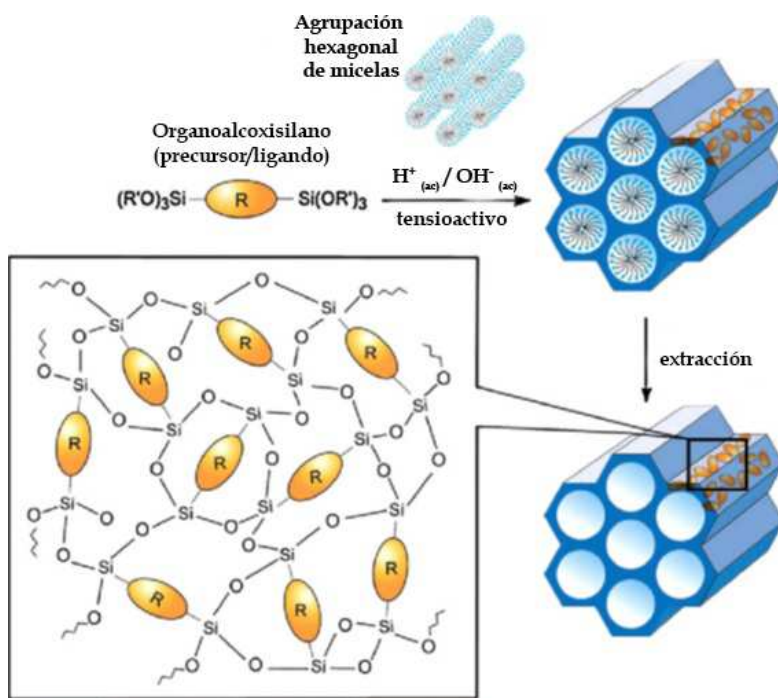
Cabe destacar los materiales conocidos como PMOs (organosílices periódicas mesoporosas) que se caracterizan por tener un grupo funcional orgánico ocupando posiciones puente en la red de sílice entre los átomos de silicio, formando enlaces covalentes Si-C, tal como se muestra en la **Figura I.12**, y sin bloquear los poros del material [213].



**Figura I.12.** Estructura tridimensional de un material basado en PMO (R corresponde al ligando).

El mecanismo sintético (**Figura I.13**) se basa en la policondensación hidrolítica de precursores organoalcoxisilanos como fuente de silicio que incorporan grupos como etano, etileno, metileno, vinileno, fenileno, etc., sobre las

micelas autoensambladas en disolución originadas por el empleo de tensioactivos como agentes directores de la estructura. Posteriormente, el material debe ser lavado mediante extracción con disolventes y sometido a secado a unos 50°C para eliminar los restos de tensioactivo que pudieran quedar en la red y que puedan taponar los poros [214].



**Figura I.13.** Esquema de preparación de PMOs. Reproducida con el permiso de [201].

Los PMOs presentan una superficie funcionalizable con grupos orgánicos, pudiéndose realizar incluso anclajes post-síntesis [215], debido a los grupos silanoles, metilsiloxanos o etilsiloxanos [216] existentes en el material que pueden

formar un fuerte enlace covalente con grupos funcionales orgánicos de manera uniforme, dando lugar a la preparación de materiales bifuncionalizados [217].

Una vez sintetizado el material, es necesario realizar su caracterización a través de distintas técnicas como son:

- Fisisorción de gases en sólidos: Esta técnica se basa en un proceso de fisisorción de un adsorbato, en este caso gas  $N_2$ , por parte del material, el cual se acumula en su capa interfacial, donde se originan fuerzas de Van der Waals entre el gas y los átomos de la superficie del material. De este modo se obtiene una isoterma de adsorción-desorción, en la cual se origina un ciclo de histéresis en función del tipo de condensación que se produzca en los poros (monocapa o multicapa), característica para cada tipo de material y, sobre todo, diferente dependiendo de los mesoporos existentes. Por tanto, mediante este estudio se obtiene información sobre el área específica del material, el volumen de poro y la distribución del tamaño de poro.
- Microscopía electrónica de barrido (SEM): Proporciona información muy relevante sobre la topografía de las partículas a escala de los nanómetros, es decir, su morfología y tamaño, y se basa en el barrido de la superficie de éstas mediante un haz de electrones que proporciona imágenes tridimensionales.
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM): Proporciona información muy relevante sobre el tamaño y distribución de poro. Está basada en la dispersión de un haz de electrones acelerados sobre el material al impactar sobre mismo.
- Resonancia magnética nuclear de sólidos de Si ( $^{29}\text{Si}$ -RMN) y C ( $^{13}\text{C}$ -RMN): Proporciona información complementaria sobre las superficies químicamente modificadas durante la síntesis con los diferentes grupos funcionales. Su



fundamento se basa en el estudio de los momentos magnéticos de los átomos activos cuando se aplica un campo magnético externo.

- Difracción de rayos X (XRD): Se fundamenta en la ley de Bragg. Se basa en el estudio de la periodicidad existente en la estructura a escala atómica. Mediante la incidencia de un haz de rayos X con cierto ángulo respecto a la superficie plana, este sufre una reflexión ocasionada por la nube de electrones alrededor de los átomos, por lo que se obtiene información sobre el grado de ordenación existente en la estructura cristalina.
- Espectroscopía infrarroja (FTIR): Esta técnica está basada en la interacción de la muestra con la radiación infrarroja, produciendo una serie de procesos moleculares de rotación y vibración que originan bandas características para cada grupo funcional y gran información de carácter cualitativo sobre la composición química.
- Análisis elemental (EA): Permite el análisis simultáneo del contenido en C, H, N y S de forma independiente. El proceso consiste en la combustión de la muestra en presencia de O<sub>2</sub> a 900°C, permite obtener información muy relevante sobre el contenido orgánico existente en la muestra.
- Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial (TGA y DTA): En TGA, mediante una balanza, se van registrando cambios de masa de la muestra, respecto a una inicial conocida, en función del aumento de temperatura controlado por un programa específico. En DTA, la temperatura de una sustancia en estudio se compara con la de un material térmicamente inerte y la diferencia de temperatura entre ambos materiales se representa en función de la temperatura o el tiempo permitiendo observar máximos o mínimos correspondiente a los procesos exotérmicos o endotérmicos, respectivamente.

Las interesantes propiedades de los materiales mesoporosos han dado lugar a numerosas aplicaciones en diversos campos, como son:

- Fases estacionarias cromatográficas [214] con gran estabilidad térmica, química y mecánica en amplio intervalo de pH [218],
- La liberación controlada de fármacos para el tratamiento de enfermedades [219-221],
- Aplicaciones industriales para la síntesis de nuevos biomateriales, sensores, dispositivos electrónicos y ópticos [222], baterías de litio [223], sector fotovoltaico [224],
- Procesos de catálisis dentro de los mesoporos [217, 223, 225],
- Producción y almacenamiento de H<sub>2</sub> [223, 224, 226] o retención de CO<sub>2</sub> [223],
- Sorbentes para la eliminación de contaminantes emergentes en medios naturales o para la pre-concentración de analitos [198, 223, 227].

La **Tabla I.4** muestra los PMOs utilizados como sorbentes para SPE o SPME de compuestos de interés medioambiental. Se observa que los ligandos orgánicos puente empleados se han basado en benceno [228], etano [229], propiltrimetilamonio [230] y 3-isocianato de propilo [231]. En algunos casos se realizó una bifuncionalización con dos ligandos orgánicos [232, 233]. Asimismo, se sintetizaron materiales PMOs basados en un ligando 3-cloropropilo con el grupo imidazol como líquido iónico [234] o con el ligando 3-isocianato de propilo empleando una plantilla con bisfenol A como membrana molecular [231]. En algunos trabajos se realizó una funcionalización de los silanoles de la superficie del material tras su síntesis, con los grupos fenilo [230] y clorodimetilo [229] para mejorar sus propiedades adsorbentes. Destacar los resultados obtenidos para un grupo de pesticidas a partir de extractos de uva, con recuperaciones superiores al

86 % y un factor de preconcentración de 500 [228] o para compuestos fenólicos a partir de muestras de agua con una eficacia entre 97 y 112 %, resultados que se compararon con MISPE en cuyo caso se obtuvieron recuperaciones entre 73 y 104 % [231].

**Tabla I.4** Aplicación de PMOs como sorbentes en SPE y SPME de compuestos de interés medioambiental.

Ligando	Funcionalización post-síntesis	Técnica y condiciones de extracción	Analitos	Recuperación (%)	FP	Muestra	Ref.
1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno y 1,2-bis(trimetoxisilil)etano	-  Feniltrimetoxisilano	SPE 200 mg de sorbente Acondicionamiento: - Muestra: 20 mL Flujo: 4 mL/min Elución: ACN Reconstitución: -	1- TNT 2- RDX	1- 40 2- 0  1- 0 2- 0	-	Agua de mar y de estanque	[232]
1,4-bis(trietoxisilil)benceno	-	SPE 30 mg de sorbente Acondicionamiento: 5 mL MeOH y 5 mL H <sub>2</sub> O Muestra: 100 mL Flujo: - Elución: 1 mL ACN Evaporación del eluato a sequedad y reconstitución en 200 µL de H <sub>2</sub> O	1- Atrazina 2- Carbarilo 3- Terbutrina	1- 90-100 2- 86-97 3- 91-97	500	Mosto de uva	[228]
1,2-bis(trimetoxisilil)etano	-  Cloro(dimetil)-octadecilsilano	SPE 100 mg de sorbente Acondicionamiento: 2x2 mL MeOH y 2x2 mL H <sub>2</sub> O Muestra: 20 mL Flujo: 1 mL/min Elución: 2x2 mL MeOH Evaporación del eluato a sequedad y reconstitución en 500 µL de MeOH	26 fármacos <sup>1</sup>	5-60   10-70	40	Carne de ternera	[229]

Cloruro de N-trimetoxisililpropil-N,N,N-trimetilamonio	-	SPE	Percloratos	18-63	-	Agua subterránea	[230]
		200 mg de sorbente Acondicionamiento: - Muestra: 50 mL Flujo: 1 mL/min Elución: 2 mL HCl 0.2M Reconstitución: -	Perclorato + Perrenato	26-52			
1,4-bis(trietoxisilil)benceno y trietoxivinil-silano	-	SPME	Benceno Tolueno Etilbenceno Xileno	-	-	-	[233]
		Fibra de PDMS de 25 µm recubierta con PMO Muestra: - Extracción: 10 min a 25°C con agitación Desorción térmica: 0.5 min					
(3-isocianatopropil)-trietoxisilano	-	SPE	1- Bisfenol F 2- Bisfenol A 3- HFBPA 4- Fenol	1- 104 2- 97-105 3- 106-112 4- 102 5- 103 6- 108	-	Agua	[231]
		80 mg de sorbente Muestra: 1 mL Flujo: Gravedad Lavado: 3 mL H <sub>2</sub> O Elución: 6 mL ACN Evaporación del eluato a sequedad y reconstitución en 1 mL de ACN	5- Resorcinol 6- 4,4'-Bifenol	1- 73 2- 95 3- 104 4- 92 5- 83 6- 87			
(3-isocianatopropil)-trietoxisilano con BPA	-	MISPE Cartucho: 80 mg de sorbente Muestra: 1 mL Flujo: Gravedad Lavado: 3 mL H <sub>2</sub> O Elución: 6 mL ACN Evaporación del eluato a sequedad Reconstitución del extracto en 1 mL de ACN					

		SPME			
		Fibra recubierta de PMO de 20 µm de grosor			
Imidazol con 3-cloropropiltrimetoxisilano	-	Muestra: 10 mL con NaCl (20 % p/v)	Hidrocarburos policíclicos aromáticos <sup>2</sup>	-	Agua residual [234]
		Extracción: 40 min a 500 rpm y 65°C			
		Desorción térmica: 2 min a 260°C			

<sup>1</sup> Cimaterol, Terbutalina, Salbutamol, Atenolol, Ractopamina, Clempropolol, Acebutolol, Metoprolol, Tulobuterol, Clembuterol, Brombuterol, Carazolol, Labetalol, Mabuterol, Propranolol, Betaxolol, α-Zearalanol, Ketoprofeno, Naproxeno, Meloxicam, Flunixinolida, Carprofeno, Diclofenaco, Ibuprofeno, Ácido tolfenámico, Vedaprofeno.

<sup>2</sup> Naftaleno, Metilnaftaleno, Bifenilo, Acenafteno, Fluoreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno.

ACN: Acetonitrilo; FP: Factor de preconcentración; H<sub>2</sub>O: Agua; HCl: Ácido clorhídrico; MeOH: Metanol; HFBPA: Hexafluorobisfenol A; MISPE: Extracción en fase sólida con polímero impreso; NaCl: Cloruro sódico; PDMS: Polidimetilsiloxano; PMO: Organosílice mesoporosa periódica; RDX: 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazaciclohexano; SPE: Extracción en fase sólida; SPME: Microextracción en fase sólida; TNT: 2,4,6-trinitrotolueno.

## **I.6. Objetivos**

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido desarrollar nuevas metodologías analíticas en el formato de la Electroforesis Capilar, que permitan la separación y determinación enantiomérica de fármacos y agroquímicos, con el fin de aplicarlas al análisis de formulaciones farmacéuticas, muestras medioambientales y medios de cultivo empleados para la evaluación de la estabilidad y toxicidad de contaminantes emergentes. Todo ello, utilizando una técnica considerada como “técnica limpia” por respetar los principios de la Química Verde debido al bajo consumo de reactivos y muestras necesario. Debido a las bajas concentraciones a las que estos compuestos se encuentran en las muestras medioambientales, el interés de este trabajo se ha centrado también en proponer nuevos métodos de preconcentración en el formato de la extracción en fase sólida con el fin de mejorar la sensibilidad obtenida para los compuestos estudiados cuando se utiliza detección UV en Electroforesis Capilar, instrumentación fácilmente accesible a muchos laboratorios de análisis.

La consecución de este objetivo general ha implicado el planteamiento de los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el potencial de discriminación quiral de distintas ciclodextrinas como selectores quirales en CE para llevar a cabo la separación de los enantiómeros de un fármaco antiurémico comercializado como enantiómero puro con el fin de establecer condiciones de partida para el desarrollo de un método analítico quiral en el modo CD-EKC para el control de formulaciones farmacéuticas.

- Desarrollar una metodología analítica por CE en el modo CD-EKC que permita la separación enantiomérica simultánea de una mezcla multicomponente de fármacos considerados contaminantes emergentes.
- Desarrollar una metodología analítica por CE en el modo CD-EKC que permita la separación enantiomérica simultánea de una mezcla multicomponente de herbicidas fenoxiácidos.
- Sintetizar, caracterizar y evaluar nuevas organosílices mesoporosas con ligandos neutros o catiónicos para su empleo como sorbentes en la extracción en fase sólida de fármacos considerados contaminantes emergentes y herbicidas fenoxiácidos, de aguas de río y depuradora, previa a su determinación por CD-EKC.
- Evaluar la estabilidad de contaminantes emergentes y sus mezclas mediante la cuantificación individual de sus enantiómeros por CD-EKC en muestras abióticas y bióticas utilizando dos organismos: la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna*.
- Determinar la toxicidad de contaminantes emergentes y sus mezclas mediante su cuantificación por CD-EKC en condiciones de ecotoxicidad utilizando la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna* con el fin de establecer el impacto de su presencia en muestras ambientales sobre organismos no diana.





## **CAPÍTULO II**

### **PARTE EXPERIMENTAL**



## II.1 Reactivos, patrones y muestras

### II.1.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados han sido de grado analítico. El agua empleada en la preparación de las disoluciones se purificó con un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Para la preparación de disoluciones tampón en los experimentos de CE, se utilizó ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) al 85 %, formiato amónico ( $NH_4COOH$ ), ácido fórmico ( $HCOOH$ ) e hidróxido sódico ( $NaOH$ ), todos adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Las CDs empleadas como selectores quirales en CE (**Tabla II.1**) se adquirieron en AraChem (Tilburg, Holanda), Sigma-Aldrich, Fluka (Buchs, Suiza) y Cyclolab (Budapest, Hungría).

**Tabla II.1** CDs empleadas en este trabajo.

CD	Acrónimo	Casa comercial
$\alpha$ -CD	$\alpha$ -CD	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -CD sulfatada	S- $\alpha$ -CD	Cyclolab
$\beta$ -CD	$\beta$ -CD	Fluka
$\beta$ -CD fosfatada	P- $\beta$ -CD	Cyclolab
$\beta$ -CD sulfatada	S- $\beta$ -CD	Sigma-Aldrich
$\gamma$ -CD sulfatada	S- $\gamma$ -CD	Cyclolab

---

(2-hidroxiopropil)- $\beta$ -CD	HP- $\beta$ -CD	Fluka
(2-hidroxiopropil)- $\gamma$ -CD	HP- $\gamma$ -CD	Cyclolab
Acetyl- $\beta$ -CD	Ac- $\beta$ -CD	Cyclolab
Carboxietil- $\beta$ -CD	CE- $\beta$ -CD	Cyclolab
Carboxietil- $\gamma$ -CD	CE- $\gamma$ -CD	Cyclolab
Carboximetil- $\alpha$ -CD	CM- $\alpha$ -CD	Cyclolab
Carboximetil- $\beta$ -CD	CM- $\beta$ -CD	Fluka
Carboximetil- $\gamma$ -CD	CM- $\gamma$ -CD	Cyclolab
Heptakis-(2,3-di-O-acetil-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD	HDAS- $\beta$ -CD	AraChem
Heptakis-(2,3-di-O-metil-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD	HDMS- $\beta$ -CD	Sigma- Aldrich
Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -CD	TM- $\beta$ -CD	Sigma- Aldrich
Heptakis-(2,6-di-O-metil)- $\beta$ -CD	DM- $\beta$ -CD	Sigma- Aldrich
Hidroxiopropilbuten- $\beta$ -CD	HP-B- $\beta$ -CD	Cyclolab
Succinil- $\beta$ -CD	Succ- $\beta$ -CD	Cyclolab
Succinil- $\beta$ -CD	Succ- $\beta$ -CD	Sigma- Aldrich
Succinil- $\gamma$ -CD	Succ- $\gamma$ -CD	Cyclolab

---

Las disoluciones patrón de los compuestos analizados en este trabajo se prepararon en metanol (MeOH) (Scharlau Chemie), dimetilsulfóxido (DMSO) (Scharlau Chemie, Merck (Darmstadt, Alemania)) y agua Milli-Q.

Las formulaciones farmacéuticas de colchicina se disolvieron en agua Milli-Q.

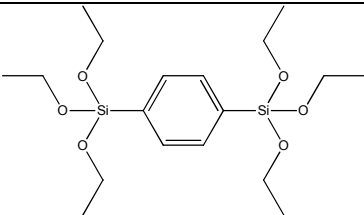
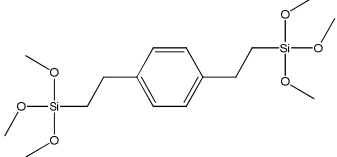
Para la extracción SPE de los compuestos estudiados (capítulos IV y V), se emplearon MeOH y acetonitrilo (ACN), ambos adquiridos en Scharlau Chemie.

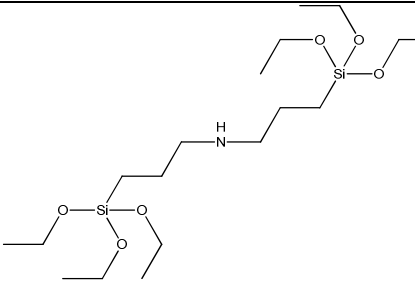
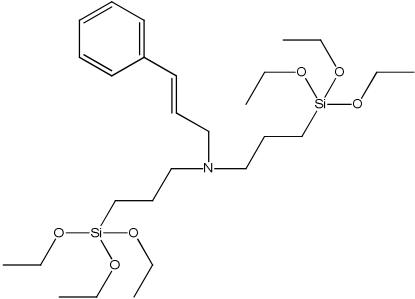
Para la realización de estudios por RMN (capítulo III), se utilizaron agua deuterada (D<sub>2</sub>O) con un grado de deuteración > 98 % y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*<sub>6</sub>) con un grado de deuteración > 99 % adquiridos en Sigma-Aldrich.

En la síntesis de PMOs (capítulos IV y V), se emplearon poli(etilenglicol) (EO<sub>20</sub>PO<sub>70</sub>EO<sub>20</sub>, Pluronic 123®, P123), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 98 % y tetraetilortosilicato (TEOS) al 98 % adquiridos en Sigma-Aldrich, mientras que ácido clorhídrico (HCl) al 37 %, solución de amoníaco (NH<sub>3</sub>), DMSO, ACN, MeOH, etanol (EtOH) al 99.5 % y acetato de etilo (EtOAc) fueron de Scharlau Chemie.

Los ligandos empleados en la síntesis de PMOs se agrupan en la **Tabla II.2**.

**Tabla II.2** Características de los ligandos empleados en la síntesis de PMOs.

Ligando	Acrónimo	Estructura	Casa comercial
1,4-bis(trietoxisilil)- benceno (95 %)	TESB		Gelest (Morrisville, PA 19067, USA)
1,4- bis(trimetoxisililetil)- benceno (85 %)	TMSEB		

Bis(3-trietoxisililpropil)-amina	TEPA		ABCR GmbH (Karlsruhe, Alemania)
Cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)-amonio	STPA		

Para la realización de los ensayos de toxicidad (capítulo VI), los medios de cultivo para la planta *Spirodela polyrhiza* y para el microcrustáceo *Daphnia magna*, se adquirieron en MicroBio Test Inc. (Bélgica).

El reactivo fluorescente diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína ( $\geq 97\%$ ) (capítulo VI), se adquirió en Sigma-Aldrich.

## II.1.2 Patrones

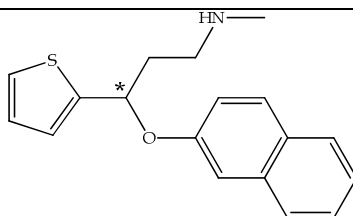
En la **Tabla II.3** se agrupa la estructura y casas comerciales en las que se han adquirido los patrones de los fármacos analizados (capítulos III, IV, VI). Todo ellos eran de alta pureza ( $> 99\%$ ) y comercializados como racémicos, a excepción de la (S)-Colchicina que se adquirió como enantiómero puro.

**Tabla II.3** Estructura y casas comerciales en las que se adquirieron los patrones de los fármacos.

Fármaco	Estructura	Casa comercial
( <i>R,S</i> )-Betaxolol		Sanofi (París, Francia)
<i>S</i> -Colchicina		Sigma-Aldrich
( <i>R,S</i> )-Colchicina		Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)

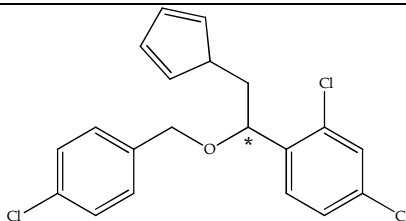


(*R,S*)-Duloxetina HCl



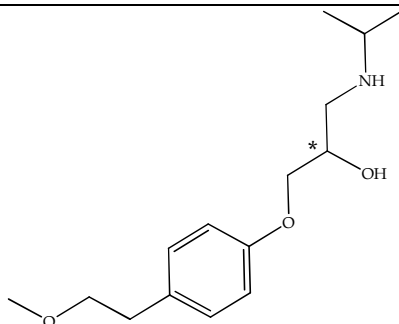
IS Chemical  
Technology  
(Shanghai, China)

(*R,S*)-Econazol



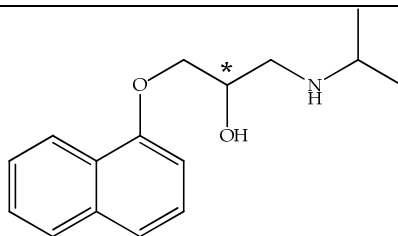
Sigma-Aldrich

(*R,S*)-Metoprolol  
tartrato



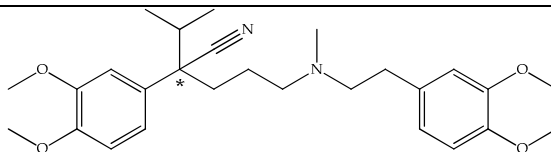
Astra  
(Hässleholm, Suecia)

(*R,S*)-Propranolol



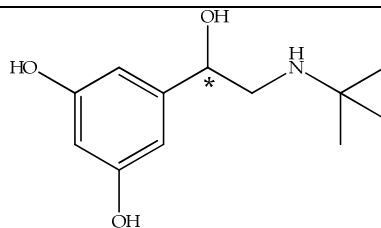
Sigma-Aldrich

(*R,S*)-Verapamil



Sigma-Aldrich

(*R,S*)-Terbutalina



Sigma-Aldrich

Los patrones de los herbicidas fenoxiácidos estudiados (capítulo V) se muestran en la **Tabla II.4** junto con sus estructuras. Todos ellos fueron de alta pureza (> 99 %) y comercializados como racémicos. Los ácidos (*R,S*)-2-(2,4,5-triclorofenoxi)propanoico (fenoprop), (*R,S*)-2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propanoico (mecoprop), (*R,S*)-2-(2,4-diclorofenoxi)propanoico (dicloroprop), (*R,S*)-2-(4-clorofenoxi)propanoico (4-CPPA) y (*R,S*)-2-(3-clorofenoxi)propanoico (3-CPPA) fueron de Sigma-Aldrich, mientras que el ácido (*R,S*)-2-fenoxipropanoico (2-PPA) fue adquirido en Chem Service (West Chester, EEUU).

**Tabla II.4** Estructuras de los patrones de los herbicidas.

Fármaco	Estructura	Sustituyentes			
		R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
( <i>R,S</i> )-2-PPA		H	H	H	H
( <i>R,S</i> )-3-CPPA		H	Cl	H	H
( <i>R,S</i> )-4-CPPA		H	H	Cl	H
( <i>R,S</i> )-Dicloroprop		Cl	H	Cl	H
( <i>R,S</i> )-Fenoprop		Cl	H	Cl	Cl
( <i>R,S</i> )-Mecoprop		CH <sub>3</sub>	H	Cl	H

### II.1.3 Muestras

Las formulaciones farmacéuticas de colchicina analizadas (capítulo III) se adquirieron en una farmacia en Alcalá de Henares, Madrid (España), con un contenido de 0.5 mg de colchicina por cápsula.

Las muestras de depuradora analizadas en el capítulo IV (afluentes y efluentes) se recogieron de diferentes plantas de tratamiento de aguas ubicadas en Sevilla y Guadalajara, mientras que las del capítulo V fueron recogidas de un

efluente de una planta de tratamiento de aguas de Cádiz y de Sevilla, y del río Henares (Alcalá de Henares). Las muestras se transportaron en hielo y en oscuridad hasta el laboratorio, siendo los pH de las mismas los siguientes:

Muestra afluyente de Sevilla, pH 7.3

Muestra efluente de Sevilla, pH 7.6

Muestra efluente de Guadalajara, pH 9.0

Muestra efluente de Cádiz, pH 7.6

Muestra de río de Río Henares, pH 7.8

Las muestras correspondientes a los estudios de estabilidad y toxicidad (capítulo VI) de duloxetina, econazol y sus mezclas, fueron proporcionadas por la Dra. Karina Boltes, del área de Ingeniería Química de la Universidad de Alcalá.

## **II.2 Instrumentación**

Los análisis realizados por CE se llevaron a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP<sup>3D</sup>CE de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) con un detector de absorción UV-Vis de diodos en serie (DAD). El control del equipo y el tratamiento de datos se realizaron con el software HP<sup>3D</sup>CE ChemStation de Agilent Technologies.

Los capilares de sílice fundida empleados para llevar a cabo las separaciones enantioméricas por CE eran de sílice fundida de Polymicro Technologies (Phoenix, AAZ, USA), con diámetro externo (d.e.) de 375  $\mu\text{m}$ , diámetro interno (d.i.) de 50  $\mu\text{m}$  y longitud total de 58.5 cm (longitud efectiva 50 cm).

Los experimentos de RMN realizados en el capítulo III se llevaron a cabo en un sistema de RMN modelo INNOVA 500 de Varian (Palo Alto, CA, USA), equipado con el software MestReNova versión 10.0.2 de Mestrelab Research (Santiago de Compostela, España).

Las isothermas de absorción-desorción de N<sub>2</sub> se obtuvieron con un analizador Micromeritics ASAP 2020 (Norcross, Atlanta, GA, USA).

La caracterización de los PMOs por microscopía electrónica de barrido (SEM) se realizó con un equipo XL20 ESEM de Philips (Reston, VA, USA) con un sistema de espectrometría de energía dispersiva (EDS), y la de microscopía electrónica de transmisión (TEM) con un microscopio modelo TECNAI 20 de Philips (Hillsboro, OR, USA).

Los experimentos de RMN de <sup>13</sup>C se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker Avance III/HD (Rheinstetten, Alemania) y los de <sup>29</sup>Si con un espectrómetro Bruker Avance III/HD 9.4T.

Los espectros de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se obtuvieron con un espectrofotómetro Perkin Elmer Frontier FTIR (Waltham, MA, USA).

Las medidas por difracción de rayos X (XRD) se realizaron con un difractómetro modelo PW3040/00 XPert MPD/MRD de Philips (Almelo, Holanda).

El análisis elemental se llevó a cabo mediante un analizador LECO CHNS-932 (St. Joseph, MI, USA).

Los análisis térmicos (TGA y DTA) se realizaron con un analizador termogravimétrico Setsys 18 A (Setaram, Caluire, Francia).

### **Otro equipamiento**

- Granatario modelo 440-35N de Kern (Balingen, Alemania).
- Balanza analítica AE260 Delta Range de Mettler (Toledo, España).
- Baños de ultrasonidos adquiridos en Penta Manufacturing Company (Livingston, NJ, USA) y J.P. Selecta (Barcelona, España).
- pH-metro modelo 744 de Metrohm (Herisau, Switzerland).
- Estufa modelo Conterm tipo Poupinel de J.P. Selecta S.A. (Barcelona, España).
- Reactor/autoclave de acero inoxidable con vaso de teflón adquirido en Parr Instrument Company (Moline, EEUU).
- Evaporador Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf Ibérica, S.L.U., Madrid, España).
- Sistema SPE de Waters (Barcelona, España) y cartuchos de extracción de 6 mL (65 mm de longitud y 11 mm de diámetro).

## **II.3. Procedimientos**

### **II.3.1 Electroforesis capilar**

Los capilares nuevos se acondicionaron a 1 bar de presión siguiendo el procedimiento siguiente: MeOH durante 5 min, NaOH 1M durante 25 min, agua Milli-Q durante 5 min (más HCl 0.1 M durante 10 min en caso de usar tampón ácido) y el tampón correspondiente durante 30 min.

Al inicio de cada día de trabajo, se siguió una rutina de lavado del capilar diferente en función de la metodología empleada:

- Para los análisis de colchicina (Cap. III), NaOH 0.1 M durante 10 min, agua Milli-Q durante 5 min y tampón borato durante 40 min.
- Para los análisis de fármacos (Cap. IV y VI), tampón fosfato durante 20 min y el medio de separación durante 10 min.
- Para los análisis de herbicidas fenoxiácidos (Cap. V), NaOH 0.1 M durante 5 min, agua Milli-Q durante 5 min, disolución tampón durante 5 min y medio de separación durante 10 min.

Entre inyecciones consecutivas, los capilares se acondicionaron de la forma siguiente:

- Para los análisis de colchicina (Cap. III) consistió en NaOH 0.1 M durante 2 min, tampón borato durante 2 min y el medio de separación durante 2 min.
- Para los análisis de fármacos (Cap. IV y VI) consistió en HCl 0.1 M durante 2 min, agua Milli-Q durante 1 min y el medio de separación durante 5 min.
- Para los análisis de herbicidas fenoxiácidos (Cap. V) consistió en agua Milli-Q durante 2 min, NaOH 0.1 M durante 2 min, agua Milli-Q durante 2 min y el medio de separación durante 5 min.

Al final de cada jornada de trabajo, los capilares se lavaron con NaOH 0.1 M durante 5 min y agua Milli-Q durante 5 min.

### **II.3.2 Preparación de tampones y medios de separación electroforéticos**

Para la preparación del tampón empleado en el Capítulo III de esta memoria se pesó la cantidad de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  necesaria para obtener la concentración deseada tras su disolución en agua Milli-Q y ajustando previamente el pH a 9.0 con NaOH 1 M. En el caso de los Capítulos IV y VI, se tomó el volumen adecuado de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  para obtener la concentración deseada en agua Milli-Q y se ajustó a pH 3.0 con NaOH 1 M. En el Capítulo V se prepararon varios tampones tomando el volumen adecuado de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  o pesando la cantidad adecuada de  $\text{NH}_4\text{COOH}$  de modo que al preparar las disoluciones en agua Milli-Q se obtuvieran las concentraciones deseadas, ajustando previamente el pH con NaOH 1 M o HCOOH a pH 3.0/7.0 o 5.0, respectivamente.

Los medios de separación se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada CD en el tampón correspondiente para obtener la concentración deseada.

Todos los medios de separación se filtraron previamente a su utilización con filtros de nylon de tamaño de poro de  $0.45\ \mu\text{m}$  (Scharlau Chemie) y se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$ .

### **II.3.3 Preparación de las disoluciones patrón y de las muestras**

Se preparó una disolución de colchicina racémica (Capítulo III) de concentración 1000 mg/L en agua Milli-Q/DMSO en proporción 1:1 (v/v). Asimismo, se preparó una disolución patrón del enantiómero puro de colchicina (*S*-colchicina) de concentración 500 mg/L en DMSO. Las disoluciones patrón de los fármacos estudiados en los Capítulos IV y VI y de los herbicidas fenoxiácidos analizados en el Capítulo V, se prepararon disolviendo cada uno de ellos en

MeOH, excepto duloxetina que se disolvió en DMSO, hasta obtener una concentración de 1000 mg/L. A partir de estas disoluciones patrón, se prepararon las correspondientes disoluciones de trabajo por dilución con agua Milli-Q, y posteriormente se almacenaron en oscuridad a 4°C.

Para el análisis de colchicina en formulaciones farmacéuticas, se trituraron 6 pastillas del fármaco en un mortero y se homogeneizó el polvo resultante pesando la cantidad adecuada del mismo, disolviéndolo en agua Milli-Q/DMSO 1:1 (v/v) y centrifugando durante 20 min a 25°C y 4000 rpm. Se recogió el sobrenadante y tras su dilución con agua Milli-Q, se filtró y se inyectó en el equipo de CE.

Las aguas residuales de depuradora y de río se filtraron mediante papel de filtro Whatman de grado 44/50 (Scharlau Chemie) y se almacenaron en frascos de vidrio a 4°C.

### **II.3.4 Síntesis de las organosílices mesoporosas**

Para la síntesis de las organosílices mesoporosas funcionalizadas con ligandos neutros, la relación molar de reactivos fue la siguiente: Ligando orgánico (TESB o TMSEB): 1; P123: 0.05; CTAB: 0.15; HCl: 7.14; EtOH: 56.4; Agua Milli-Q: 1471.4; TEOS: 5 (solo en uno de los materiales sintetizados con TMSEB (TMSEB-2)). De acuerdo a estas relaciones molares, para sintetizar PMO-TESB-1, se añadieron en un matraz de fondo redondo 7 g de P123 y 1.2 g de CTAB, que se disolvieron con agitación contundente tras añadir 80 mL de HCl 2 M, 591 mL de agua Milli-Q y 73 mL de EtOH. Después de una hora, se añadieron por goteo controlado con una micropipeta 8.85 mL del ligando TEB y la mezcla se agitó 1 h más.



Para el ligando TMSEB, se realizó la síntesis de dos materiales diferentes. Para la síntesis de PMO-TMSEB-1, se añadieron en un matraz de fondo redondo 5.9 g de P123 y 1 g de CTAB y se disolvieron en 67 mL de HCl 2 M, 500 mL de agua Milli-Q y 62 mL de EtOH, con agitación contundente durante 1 h. A continuación, se añadieron 6.55 mL del ligando TMSEB por goteo con micropipeta y la mezcla se agitó durante una hora más. Para la síntesis de PMO-TMSEB-2, se emplearon 2.1 g de P123, 0.4 g de CTAB y se disolvieron en 25 mL de HCl 2 M, 182 mL de agua Milli-Q y 23 mL de EtOH con agitación contundente durante 1 h, tras lo que se añadió una mezcla de 2.8 mL del ligando TMSEB y 7.7 mL de TEOS (como fuente adicional de sílice), nuevamente por goteo con micropipeta, tras lo que se agitó durante otra hora.

Cada mezcla se transfirió a un reactor autoclave de teflón que se calentó a 100°C durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se formó un precipitado blanco que se filtró en una placa filtrante y se lavó varias veces con agua Milli-Q y EtOH para eliminar completamente restos del tensioactivo CTAB que pudiera quedarse entre los mesoporos. El material PMO-TMSEB-1 se lavó adicionalmente varias veces a 60°C durante 48 h con EtOH, EtOAc y DMSO. Finalmente, los materiales se secaron a 60°C durante 6 h, y se sometieron a las correspondientes pruebas de caracterización.

Para la síntesis de organosilices mesoporosas funcionalizadas con ligandos catiónicos, la relación molar de reactivos fue la siguiente: Ligando orgánico (TEPA o STPA): 1; P123: 0.05; CTAB: 0.15; HCl: 7.14; EtOH: 56.4; Agua Milli-Q: 1471.4; TEOS: 5 (en el caso de TEPA), y 14 (en el caso de STPA).

Para sintetizar PMO-STPA, usando TEOS como fuente adicional de sílice, se añadieron en un matraz de fondo redondo 2.7 g de P123 y 0.5 g de CTAB, que se disolvieron con agitación contundente tras añadir 31 mL de NH<sub>3</sub> 2 M, 229 mL

de agua Milli-Q y 28 mL de EtOH. Después de una hora, se añadió por goteo controlado con una micropipeta una mezcla compuesta por 13.8 mL del ligando STPA y 27 mL de TEOS, y la mezcla se agitó durante 1 h más.

Para sintetizar PMO-TEPA utilizando TEOS como fuente adicional de sílice, se añadieron en un matraz de fondo redondo 4.6 g de P123 y 0.8 g de CTAB, que se disolvieron con 52 mL de  $\text{NH}_3$  2 M, 384 mL de agua Milli-Q y 48 mL de EtOH, con agitación contundente durante 1 hora, tras lo que se añadió una mezcla compuesta por 6.4 mL del ligando TEPA y 31.8 mL de TEOS, por goteo con micropipeta, y se agitó durante 1 h más.

Las mezclas se transfirieron a un reactor autoclave de teflón que se calentó a 100°C durante 16 h. Transcurrido este tiempo, se formó un precipitado blanco en el caso de PMO-TEPA y naranja en el caso de PMO-STPA, que fueron filtrados en placa y lavados varias veces con agua Milli-Q y EtOH para eliminar completamente restos del tensioactivo CTAB que pudieran quedarse entre los mesoporos. Finalmente, los materiales se secaron a 60°C durante 6 h y se sometieron a las pertinentes pruebas de caracterización.

### **II.3.5 Extracción en fase sólida**

Tanto para fármacos como para herbicidas fenoxiácidos, el proceso de SPE se realizó en un cartucho de extracción de 6 mL en el que se empaquetaron 100 o 200 mg de material mesoporoso depositado entre dos fritas de polietileno y con una membrana de filtro de nylon, con un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , insertada junto a la frita inferior en contacto con el material mesoporoso para evitar la pérdida de éste durante la extracción. El acondicionamiento del mismo se realizó con 5 mL de MeOH y 5 mL de agua Milli-Q. Seguidamente, se pasó un volumen

de agua Milli-Q o de muestra real de agua suplementadas con los analitos a un flujo de 1 mL/min. Posteriormente, se dejaron secar los cartuchos durante 20 min pasando aire para la eliminación de interferentes, y se procedió a la elución de los analitos retenidos con dos alícuotas de 4 mL de MeOH. Los eluatos se evaporaron hasta sequedad y se reconstituyeron en un volumen de 500  $\mu$ L de MeOH:agua Milli-Q (10:90, v/v).

La extracción se realizó en 3 cartuchos diferentes: Por dos de ellos se pasó una disolución de agua Milli-Q o una muestra real de agua enriquecidas con los analitos, mientras que por el tercero solo se pasó un volumen similar de agua Milli-Q o muestra real de agua que se suplementaron con los analitos tras la elución. Las cantidades de los analitos con las que se suplementaron las disoluciones y las muestras se calcularon teniendo en cuenta el factor de preconcentración (PF) obtenido en cada paso de optimización, de tal modo que a la hora de cuantificar los analitos, en la reconstitución del eluato se obtuviera una concentración por encima del LOQ instrumental del método.

Para obtener las mejores condiciones de extracción por SPE, se optimizaron la cantidad de sorbente, el volumen de ruptura, la naturaleza del eluyente y el volumen de elución.

### **II.3.6 Estudios de estabilidad de duloxetina, econazol y sus mezclas en los medios de cultivo correspondientes a *Spirodela polyrhiza* y *Daphnia magna***

La estabilidad de duloxetina y econazol se evaluó tanto de forma individual como en mezclas de ambos tóxicos en condiciones abióticas y bióticas tras un tiempo de incubación de 72 h (para *Spirodela polyrhiza*) y a 24, 48 y 72 h para *Daphnia magna*, a unas concentraciones que van desde 0.1 a 20 mg/L de

racemato de cada fármaco para la planta acuática y desde 3 a 30 mg/L para *Daphnia magna*. En el caso de *Spirodela polyrhiza*, la estabilidad de los compuestos estudiados se evaluó en condiciones de exposición a luz UV continua, mientras que para *Daphnia magna* los estudios se llevaron a cabo en oscuridad. Cada uno de los ensayos se llevó a cabo por triplicado. La estabilidad se evaluó por comparación de las concentraciones iniciales de los enantiómeros de los compuestos estudiados y dichas concentraciones tras el tiempo de incubación correspondiente. Todas las concentraciones de los enantiómeros se determinaron por EKC.

### II.3.7 Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad para el organismo *Spirodela polyrhiza* se realizaron, por duplicado, en incubadora según la normativa ISO20079 (ISO DIS 2005 para los tests de toxicidad para *Lemna* con modificaciones). Para ello, la planta se puso en contacto con 2 mL del medio de cultivo Steinberg y se añadieron los fármacos a diferentes concentraciones de forma individual y en mezclas. Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo control como referencia en el cual no se añadieron los fármacos a la planta.

Los ensayos de toxicidad para el organismo *Daphnia magna* se realizaron por cuadruplicado en oscuridad y a 20°C siguiendo la guía OECD 202. En cada determinación 5 organismos se pusieron en contacto con 10 mL del medio de cultivo y se adicionaron los tóxicos a diferentes concentraciones de forma individual y en mezclas. Paralelamente, se llevó a cabo un ensayo control como referencia en el cual no se añadieron los tóxicos.

## II.4 Tratamiento de datos

Los valores de resolución ( $R_s$ ) se calcularon con el software de la ChemStation según la ecuación:

$$R_s = 1.18 \frac{t_1 - t_2}{w_1 + w_2} \quad \text{(Ecuación II.1)}$$

donde  $t_1$  y  $t_2$  son los tiempos de migración de los picos correspondientes a cada uno de los enantiómeros y  $w_1$  y  $w_2$  sus respectivas anchuras a mitad de la altura.

Para compensar la variabilidad en las condiciones electroforéticas y mejorar la reproducibilidad de los resultados, se emplearon las áreas de pico corregidas ( $A_c$ ) respecto a los tiempos de migración, que se obtienen dividiendo el área de cada pico entre su correspondiente tiempo de migración.

Los límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) se obtuvieron experimentalmente en base a la concentración de analito correspondiente a una relación señal/ruido (S/N) de 3 o 10, respectivamente, o bien, a partir de las rectas de calibrado según las ecuaciones:

$$\text{LOD} = 3 \frac{S_a}{b} \quad \text{(Ecuación II.2)}$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S_a}{b} \quad \text{(Ecuación II.3)}$$

donde  $S_a$  es la desviación estándar de la ordenada en el origen y  $b$  es la pendiente de la recta de calibrado.

Los porcentajes de recuperación (R (%)) obtenidos tras el proceso de SPE se calcularon utilizando la siguiente ecuación:

$$R (\%) = \frac{A_R}{A_T} \times 100 \quad \text{(Ecuación II.4)}$$

donde  $A_R$  es el área de pico corregida para cada enantiómero después de su elución del cartucho SPE y  $A_T$  es el área de pico corregida que se debería obtener para cada enantiómero si hubiera sido retenido y eluído al 100 % del cartucho SPE.

Para el cálculo de los parámetros de toxicidad se empleó la siguiente ecuación del efecto medio y del índice de combinación (CI) [235]:

$$\frac{f_a}{1 - f_a} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m \quad \text{(Ecuación II.5)}$$

donde  $D$  es una concentración de tóxico que afecta a una fracción ( $f_a$ ) de una población de organismos;  $D_m$  es la concentración media efectiva y  $m$  representa la sigmoidicidad de la curva dosis-efecto.

Los valores de CI se obtuvieron de acuerdo a la siguiente ecuación para un porcentaje determinado “x” de inhibición [236]:

$$(CI)^n_x = \sum \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_j^n \frac{(D_x)_{1-n} - \{[D]_j / \sum_j^n [D]\}}{(D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}} \quad \text{(Ecuación II.6)}$$

donde  $(CI)^n_x$  es el índice de combinación para  $n$  tóxicos a una inhibición  $x$ ,  $(D_x)_{1-n}$  es la suma de las concentraciones de  $n$  tóxicos que producen un grado de inhibición  $x$  en una mezcla,  $\{[D]_j / \sum_j^n [D]\}$  es la relación de un tóxico ( $j$ )

determinado que induce una inhibición  $x$  en una mezcla, y  $(D_m)_j \{(f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j]\}^{1/m_j}$  es la dosis para cada tóxico individual que produce el mismo efecto.

### ***Programas empleados en el tratamiento de datos***

En el tratamiento de datos se emplearon los programas Excel Microsoft Office 2010, Statgraphics Plus 5.1 y Origin 6.0.

Los cálculos teóricos de fuerzas de Van der Waals y de carga iónica Hückel (capítulos IV y V) se realizaron mediante el software Chem3D Pro 12.0.

Los cálculos para obtener los valores de los CI de mezclas de tóxicos (capítulo VI) se realizaron con el software CompuSyn (Estados Unidos).

El tratamiento de las imágenes de las hojas correspondientes a la planta acuática *Spirodela polyrhiza* (capítulo VI) se realizó con el software Image J de National Institutes of Health (Estados Unidos).

## CAPÍTULO III

# SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DEL FÁRMACO ANTIURÉMICO COLCHICINA POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA





### **III.1 Introducción**

En la Introducción de esta memoria se ha destacado el elevado interés que presenta la separación enantiomérica de fármacos debido a la distinta actividad biológica que cada uno de ellos puede exhibir, así como el hecho de que un gran número de los fármacos que consumimos son quirales y existe una tendencia importante a comercializarlos como enantiómero puro. Todo ello pone de manifiesto la clara necesidad de desarrollar metodologías analíticas para llevar a cabo un adecuado control de calidad de las materias primas y formulaciones farmacéuticas basadas en fármacos quirales.

EKC es una técnica de separación en el formato de la CE que presenta un gran potencial en el campo de las separaciones quirales (ver el Capítulo I de esta memoria). En efecto, debido a que los dos enantiómeros de un compuesto quiral poseen la misma movilidad electroforética en entornos aquirales, su separación por CE con medios de separación convencionales no es posible. Por ello, es necesario adicionar un selector quiral al medio de separación de modo que tenga lugar el establecimiento de un reparto basado en principios cromatográficos que se superpone a la separación electroforética y que en el caso ideal permite la separación de los enantiómeros. Ello unido a que en EKC se utilizan reducidos volúmenes de muestra y de disolución electrolítica (lo que reduce enormemente el impacto medioambiental), se obtienen elevadas eficacias de separación y el selector quiral está libre en disolución favoreciéndose su interacción con los analitos, permite considerar esta técnica como una opción muy interesante para llevar a cabo separaciones quirales.

Por todo ello, en este capítulo se ha empleado EKC con el fin de investigar el potencial de discriminación quiral de distintas ciclodextrinas empleadas como

selectores quirales para llevar a cabo la separación de los enantiómeros del fármaco antiurémico colchicina.

La colchicina ((-)-N-[(7S)-1,2,3,10-tetrametoxi-9-oxo-5,6,7,9-tetrahidrobenzo[a]heptalen-7-il]acetamide) es un compuesto quiral con un centro asimétrico por lo que está constituido por dos enantiómeros. Ambos enantiómeros son activos, aunque S-colchicina es algo más potente que el enantiómero R [237]. De hecho, las formulaciones farmacéuticas de colchicina se comercializan como enantiómero puro por lo que se hace necesario disponer de metodologías analíticas adecuadas para asegurar su control de calidad y permitir la determinación de cantidades bajas de la impureza enantiomérica. Según la ICH (Conferencia Internacional de Armonización) las impurezas deben poder detectarse en nuevos fármacos a niveles del 0.1 % [24].

Se han descrito para colchicina diferentes actividades además del tratamiento de las crisis agudas de gota [238], como son el tratamiento de la fiebre mediterránea y enfermedades cardíacas [239] o de la piel y más recientemente como agente antineoplásico experimental [240].

Sin embargo, a pesar del enorme interés que presenta la separación enantiomérica de colchicina, en el momento de la realización de este trabajo de investigación únicamente se había publicado un artículo describiendo la separación de sus enantiómeros por Cromatografía Líquida Plana en 3.5 h. El método consistía en la utilización de una fase de sílica gel impregnada con ácido L-aspartico como selector quiral [241]. Además, no se encontró ninguna referencia a la determinación de colchicina en formulaciones farmacéuticas.

En este capítulo se presenta el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral con el fin de investigar el potencial de discriminación quiral de distintas

ciclodextrinas empleadas como selectores quirales en CE en su modo EKC con el fin de llevar a cabo la separación de los enantiómeros de colchicina para poder establecer condiciones de partida que permitan el desarrollo de un método analítico quiral en el modo CD-EKC para el control de formulaciones farmacéuticas de colchicina elaboradas como enantiómero puro.

### **III.2 Objetivos**

El objetivo de este capítulo ha sido investigar el potencial de discriminación quiral de distintas ciclodextrinas empleadas como selectores quirales en CE en su modo EKC con el fin de llevar a cabo la separación de los enantiómeros del fármaco antiurémico colchicina para poder establecer condiciones de partida que permitan el desarrollo de un método analítico quiral en el modo CD-EKC para el control de formulaciones farmacéuticas de colchicina elaboradas como enantiómero puro.

Con este fin se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudiar el potencial de discriminación quiral de un grupo de ciclodextrinas aniónicas en la separación enantiomérica de colchicina por EKC.
2. Investigar el orden de migración de los enantiómeros de colchicina en aquellos casos en los que haya sido posible separar los enantiómeros.
3. Optimizar las condiciones de separación enantiomérica de colchicina por CD-EKC con el fin de obtener los mejores resultados en cuanto a tiempo de análisis y resolución enantiomérica.

4. Establecer condiciones de partida que puedan servir de base para el desarrollo de una metodología analítica quiral en el modo CD-EKC para el control de formulaciones farmacéuticas de colchicina elaboradas como enantiómero puro.

### **III.3 Resultados y discusión**

Teniendo en cuenta que el fármaco colchicina es un compuesto neutro excepto a valores de pH muy ácidos (pKa 1.85), se seleccionó un grupo de ciclodextrinas cargadas negativamente como selectores quirales con el fin de estudiar por primera vez su potencial de discriminación frente a los enantiómeros de colchicina por EKC. En efecto, en ausencia de otros aditivos en el medio de separación, la ausencia de movilidad electroforética de un compuesto neutro lleva a la necesidad de formar complejos cargados que hagan posible su separación por esta técnica. La elección de estos selectores quirales se basó en el hecho de que las ciclodextrinas son los más utilizados en el formato de la CE y además han demostrado ampliamente poseer un gran poder de discriminación quiral.

Dado que las interacciones entre un soluto y una ciclodextrina pueden tener lugar a través de distintos mecanismos tales como su inclusión en la cavidad de la ciclodextrina o las interacciones con grupos de la superficie de la misma, se eligieron derivados aniónicos de las tres ciclodextrinas nativas que se caracterizan por el distinto tamaño de su cavidad:  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD. Así, se investigó el potencial de discriminación quiral de trece ciclodextrinas aniónicas: CM- $\alpha$ -CD, S- $\alpha$ -CD, CM- $\beta$ -CD, CE- $\beta$ -CD, Succ- $\beta$ -CD, S- $\beta$ -CD, P- $\beta$ -CD, HDAS- $\beta$ -CD, HDMS- $\beta$ -CD, CM- $\gamma$ -CD, CE- $\gamma$ -CD, Succ- $\gamma$ -CD y S- $\gamma$ -CD. Las condiciones iniciales seleccionadas para llevar a cabo estos experimentos consistieron en adicionar una ciclodextrina a una concentración 10 mM a un tampón borato 10 mM a pH 9.0 (con el fin de favorecer la existencia de un flujo electroosmótico con entidad

suficiente para arrastrar los complejos aniónicos formados hacia el extremo catódico del capilar en el que se encuentra el detector). Otras condiciones de partida fueron un voltaje de 20 kV, una temperatura de 20 °C y una longitud de onda de detección de 243 nm. En estas condiciones, de las trece ciclodextrinas investigadas, únicamente cuatro de ellas mostraron tener la capacidad de discriminar los enantiómeros de colchicina: CE- $\beta$ -CD, CE- $\gamma$ -CD, Succ- $\gamma$ -CD y S- $\gamma$ -CD, demostrando que ninguna de las ciclodextrinas derivadas de la  $\alpha$ -CD que es la que posee una menor cavidad, proporcionaban indicios de discriminación quiral hacia colchicina, mientras que tres de las ciclodextrinas derivadas de la que posee una mayor cavidad ( $\gamma$ -CD) sí que permitían obtener una separación enantiomérica de colchicina aunque con resoluciones inferiores a 0.8 excepto en el caso de la Succ- $\gamma$ -CD que dio lugar a una resolución enantiomérica de 1.1.

La investigación del orden de migración de los enantiómeros de colchicina con las cuatro ciclodextrinas mencionadas puso de manifiesto que dicho orden de migración no era igual para todas ellas. En efecto, pudo comprobarse que cuando se utilizaban CE- $\beta$ -CD, CE- $\gamma$ -CD y Succ- $\gamma$ -CD, el primer enantiómero en migrar era S-colchicina, el principio activo empleado en las formulaciones farmacéuticas de colchicina, mientras que si el selector quiral era S- $\gamma$ -CD, el orden de migración de los enantiómeros era opuesto, observándose que el enantiómero S migraba en segundo lugar siendo la impureza enantiomérica de colchicina (enantiómero R) la que migraba en primer lugar.

El orden de migración obtenido para los enantiómeros de colchicina con Succ- $\gamma$ -CD, que era el selector quiral que había demostrado un mayor poder de discriminación quiral frente a este fármaco, no pudo justificarse a partir de los valores de las constantes aparentes de los complejos de cada enantiómero con la ciclodextrina que fueron calculadas por RMN por el Dr. Antonio Salgado (Centro

de Apoyo a la Investigación de Química de la Universidad de Alcalá). En efecto, los estudios por RMN permitieron determinar valores de dicha constante superiores para el enantiómero S que para el enantiómero R. Sin embargo, si el enantiómero S forma complejos más estables debería migrar en segundo lugar, ya que al estar más unido a la ciclodextrina negativa que migra en contra del flujo electroosmótico, debería tardar más en salir del sistema electroforético. El hecho comprobado es que el enantiómero S de la colchicina migraba en primer lugar en estas condiciones. Ello permitió establecer que, además de la estabilidad de los complejos analito-ciclodextrina, la movilidad electroforética de los mismos debe jugar un papel importante en su migración, como ya ha sido postulado en trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación para otros compuestos [242].

Teniendo en cuenta que la mayor resolución enantiomérica para colchicina se obtuvo con Succ- $\gamma$ -CD, se procedió a llevar a cabo una optimización de la separación con este selector quiral. Con este fin, se estudió la influencia de la concentración del tampón borato, la concentración de la ciclodextrina, la temperatura, el tiempo de inyección y los parámetros de detección sobre la separación enantiomérica de colchicina.

La variación de la concentración de tampón borato entre 10 y 75 mM permitió seleccionar una concentración óptima de 50 mM como compromiso entre la intensidad de corriente generada y la resolución enantiomérica obtenida, concentración a la cual se llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración de Succ- $\gamma$ -CD sobre la separación de los enantiómeros de colchicina. La concentración de ciclodextrina se varió entre 5 y 20 mM observándose un incremento en la resolución enantiomérica con la concentración si bien se eligió una concentración de 7 mM por proporcionar la mejor resolución en el menor tiempo de análisis ( $R_s$

= 2.9 en 11 min). El estudio del efecto de la temperatura se llevó a cabo para valores de 16, 20 y 25 °C observándose un incremento de la resolución enantiomérica para colchicina al disminuir la temperatura con muy poco efecto en el tiempo de análisis que solo se incrementó en un minuto ( $R_s = 4.1$  en 12 min). La optimización del tiempo de inyección entre 5 y 20 s (a una presión de 50 mbar) mostró que un valor de 5 s mejoraba la resolución ( $R_s = 5.6$ ) sin pérdida de sensibilidad y finalmente, la variación en el ancho de banda en la detección UV entre 4 y 35 nm puso de manifiesto que este último valor daba lugar a un aumento de la relación señal/ruido por lo que fue seleccionado como óptimo.

En las condiciones optimizadas, Succ- $\gamma$ -CD permitió obtener la primera separación enantiomérica de colchicina por CE en 12 min con resolución de 5.6.

A pesar de que se considera deseable que la impureza enantiomérica de un fármaco migre en primer lugar para que su pico no se vea afectado por el ensanchamiento del pico de gran tamaño correspondiente al principio activo que es mayoritario, en este caso, dada la elevada resolución enantiomérica obtenida para colchicina con Succ- $\gamma$ -CD, estas condiciones se propusieron como punto de partida para desarrollar en nuestro grupo de investigación una metodología analítica para la determinación de los dos enantiómeros de colchicina en formulaciones farmacéuticas considerando que la migración en primer lugar de la S-colchicina no constituye un hecho que deba impedir la determinación de ambos enantiómeros y en especial, de la impureza enantiomérica (R-colchicina) en estas condiciones.

El posterior desarrollo de la metodología analítica mencionada por otros miembros de nuestro grupo de investigación permitió corroborar que, en efecto, la migración en segundo lugar de la impureza enantiomérica de colchicina no perjudicaba la determinación de ambos enantiómeros ya que fue posible alcanzar



un límite de detección de 0.3 mg/L para R-colchicina equivalente a un límite de detección relativo (para una concentración nominal de S-colchicina de 300 mg/L) de 0.1 % lo que permitía comprobar el cumplimiento de las normativas legales ICH que establecen dicho límite para las impurezas enantioméricas en fármacos comercializados como enantiómeros puros. De hecho, cuando se desarrolló un método analítico para la determinación enantiomérica de colchicina, también por otros miembros del grupo de investigación, basado en la utilización de S- $\gamma$ -CD como selector quiral, situación en la que R-colchicina era el primer enantiómero en migrar, el límite de detección relativo fue del 0.3 % (para una concentración nominal de S-colchicina de 90 mg/L) a pesar de que el límite de detección de R-colchicina en estas condiciones fue también de 0.3 mg/L. El límite de detección relativo en este caso no alcanzó a satisfacer los requerimientos de la normativa legal ICH confirmando una vez más que las condiciones de partida propuestas en esta Tesis Doctoral y basadas en el empleo de Succ- $\gamma$ -CD fueron las más idóneas para el posterior desarrollo de una metodología analítica para llevar a cabo la determinación tanto de S como de R-colchicina en formulaciones farmacéuticas.

Los resultados obtenidos en este capítulo de esta Tesis Doctoral junto con los obtenidos por otros miembros del grupo de investigación han dado lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

### **Artículo 1**

*“Enantiomeric separation of the antiuremic drug colchicine by Electrokinetic Chromatography. Method development and quantitative analysis”.*

N. Menéndez-López, J. Valimaña-Traverso, M. Castro-Puyana, A. Salgado, M. A. García, M.L. Marina.

**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 138 (2017) 189-196.

## **Artículo 1**

**“Enantiomeric separation of the antiuremic drug colchicine by electrokinetic chromatography. Method development and quantitative analysis”**

N. Menéndez-López, J. Valimaña-Traverso, M. Castro-Puyana, A. Salgado, M.A.

García, M.L. Marina.

J. Pharm. Biomed. Anal. 138 (2017) 189-196



## **Abstract**

Two analytical methodologies were developed by CE enabling the enantiomeric separation of colchicine, an antiuremic drug commercialized as pure enantiomer. Succinyl- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD were selected as chiral selectors after a screening with different anionic CDs. Under the optimized conditions, chiral resolutions of 5.6 in 12 min and 3.2 in 8 min were obtained for colchicine with Succinyl- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD, respectively. An opposite enantiomeric migration order was observed with these two CDs being S-colchicine the first-migrating enantiomer with Succinyl- $\gamma$ -CD and the second-migrating enantiomer with Sulfated- $\gamma$ -CD. H-NMR experiments showed a 1:1 stoichiometry for the enantiomer-CD complexes in both cases. However, the apparent and averaged equilibrium constants for the enantiomer-CD complexes could be calculated only for Succinyl- $\gamma$ -CD. The developed methods were applied to the analysis of pharmaceutical formulations but only the use of Succinyl- $\gamma$ -CD enabled to detect a 0.1 % of enantiomeric impurity in colchicine formulations.

**Keywords:** capillary electrophoresis / colchicine / quantitation / enantioseparation / enantiomer migration order / H-NMR.

**Abbreviations:** CE- $\beta$ -CD: Carboxyethylated- $\beta$ -CD; CE- $\gamma$ -CD: Carboxyethylated- $\gamma$ -CD; CM- $\alpha$ -CD: Carboxymethylated- $\alpha$ -CD; CM- $\beta$ -CD: Carboxymethylated- $\beta$ -CD; CM- $\gamma$ -CD: Carboxymethylated- $\gamma$ -CD, EMO: Enantiomer migration order; HDAS- $\beta$ -CD: Heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD; HDMS- $\beta$ -CD: Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD; Succ- $\beta$ -CD: Succinyl- $\beta$ -CD; Succ- $\gamma$ -CD: Succinyl- $\gamma$ -CD.

## Highlights

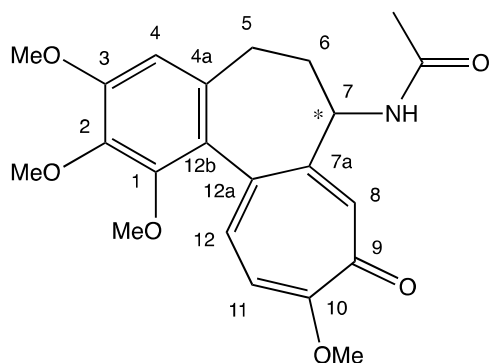
- The first enantiomeric separation of colchicine by CE is reported.
- The inversion in the enantiomeric migration order was studied by H-RMN experiments.
- Stoichiometry and equilibrium constants for enantiomer-CD complexes were determined.
- The analysis of pharmaceutical formulations samples is presented.
- Up to a 0.1 % of enantiomeric impurity (R-colchicine) can be detected.

## 1. Introduction

The impact of chirality in the pharmaceutical field has increased in the last years as shown by the development of an important number of drugs as single isomers instead of racemic active ingredients. In fact, drug properties are strongly dependent on the ingested enantiomer as a result of the inherent enantioselectivity of biological processes. Due to the potentially different bioactivity of the enantiomers of a chiral drug, it is mandatory for the pharmaceutical laboratories to justify the commercialization of a new drug, either as a pure enantiomer or as racemic mixture. Therefore, a rigorous quality control must be carried out to determine the drug enantiomeric impurities present in a pharmaceutical formulation, especially if they have adverse effects.

As many pharmaceutical compounds, colchicine ((-)-N-[(7S)-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxo-5,6,7,9-tetrahydrobenzo[a]heptalen-7-yl]acetamide) (**Figure 1**) is a chiral drug obtained from the corm and seeds of the autumn crocus, *Colchicum autumnale*, and other Liliaceae such as the glory lily, *Gloriosa superb*. This naturally occurring alkaloid has been used since 600 A.D., known for its ability to

bind to tubulin and inhibit microtubule polymerization so as to treat the sharp crisis of gout [1], for the treatment of Mediterranean fever, cardiac diseases [2], some skin diseases and more recently as an experimental antineoplastic agent [3].



**Figure 1.** Structure of colchicine. (\*) shows the asymmetric carbon.

Both enantiomers of colchicine are active but the S-enantiomer was found to be slightly more potent [4]. In fact, in earlier experiments, Corrodi and Hardegger prepared and assayed optically pure (+)-colchicine in an *in vitro* procedure as an inhibitor of mitosis and they found that this enantiomer was only 1/100<sup>th</sup> as potent as the natural alkaloid [5]. At the same time, Yeh at al. [6] investigated the different activities of the colchicine enantiomers. Thus, the assay of inhibition of tubulin by using unnatural (+)-colchicine prepared from (+)-deacetylcolchicine showed a low potency (32% versus 90% for the (-)-enantiomer) and it turned out much less toxic in mice (122.6 mg/kg versus 3.0 mg/kg for the (-)-enantiomer) [4]. Owing to that this drug is commercialized as a pure enantiomer in the treatment of these diseases, it is necessary to develop enantioselective methods to ensure the quality control of its enantiomeric purity. These methodologies must, on the one hand, separate the desired enantiomers of

a chiral drug, and on the other hand, detect low amounts of the enantiomeric impurity. According to International Conference on Harmonization (ICH) guideline Q2(R1) [7], the validation of an analytical procedure must be carried out in accordance with a certain convention. Moreover, ICH guideline on impurities establishes that they must be detected in new drug products on the level of 0.1 % [8].

CE is an effective choice for resolving enantiomers and analyzing enantiomeric impurities [9-11] because it offers many advantages such as high resolution power, low reagents and sample consumption, and high flexibility given the possibility to easily modify the chiral selector added to the BGE [10, 12]. CE is also an interesting technique to evaluate the interactions between a given CD and the analyte, even enabling to calculate the apparent and averaged equilibrium constants of the formed CD-analyte complex [15, 16]. In this sense, and in opposition to chromatographic techniques, the enantiomer migration order (EMO) in CE not only depends on the affinity pattern of the enantiomers towards the chiral selector but also on mobility effects present in the separation system [17]. This means that the enantiomer which binds stronger to the CD may migrate either in first or in second place, unlike in chromatographic techniques [18]. However, a disadvantage of CE is that this technique cannot provide any direct information concerning structural and chemical mechanisms of CD-analyte interactions [19]. To try to solve this problem, the use of complementary techniques such as NMR spectroscopy is required in order to obtain information about the average stoichiometry and the strength of the CD-analyte complexes. Since CE and NMR are liquid-phase techniques, having a similar freedom degree of the CD and the analyte, it could be assumed that information would be transferable from one technique to another [20].

Until now, the chiral enantiomeric separation of colchicine has only been reported by TLC employing a silica gel phase impregnated with L-aspartic acid as chiral selector [21]. In this case, the colchicine racemic mixture was separated into its enantiomers although analysis times of 3.5 h were needed. To the best of our knowledge, the determination of colchicine enantiomers in pharmaceutical formulations has never been described. Also, studies of the molecular mechanisms of the chiral recognition of colchicine with any chiral selector that justified the observed EMOs using different CDs have not been reported.

The aim of this work was to develop CE methodologies that enabled the enantioseparation of colchicine and to apply them to determine the content of S-colchicine and its enantiomeric impurity in pharmaceutical formulations. Investigations on the enantiomeric migration order of colchicine with different CDs by H-NMR and CE would be also conducted.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Reagents and samples*

All reagents were of analytical grade. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Boric acid and sodium hydroxide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The employed water was of Milli-Q quality (Millipore, Bedford, MA, USA). Deuterated water ( $D_2O$ , > 98% D) and deuterated dimethyl sulfoxide ( $DMSO-d_6$ , > 99% D) were also from Sigma.

Carboxymethylated- $\beta$ -CD (CM- $\beta$ -CD) (DS~3) and Sulfated- $\beta$ -CD (DS~7-11) were from Fluka (Buchs, Switzerland). Heptakis-(2,3-di-O-methyl-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD (HDMS- $\beta$ -CD) was from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Heptakis-(2,3-di-O-acetyl-6-O-sulfo)- $\beta$ -CD (HDAS- $\beta$ -CD) was from AraChem (Tilburg, The



Netherlands). Carboxyethylated- $\beta$ -CD (CE- $\beta$ -CD) (DS~3), Succinyl- $\beta$ -CD (Succ- $\beta$ -CD) (DS~3.5), Carboxymethylated- $\gamma$ -CD (CM- $\gamma$ -CD) (DS~3), Carboxyethylated- $\gamma$ -CD (CE- $\gamma$ -CD), Succinyl- $\gamma$ -CD (Succ- $\gamma$ -CD) (DS~3.5), Carboxymethylated- $\alpha$ -CD (CM- $\alpha$ -CD) (DS~3.5), Phosphated- $\beta$ -CD (DS~2-6), Sulfated- $\alpha$ -CD (DS~11) and Sulfated- $\gamma$ -CD (DS~14) were from Cyclolab (Budapest, Hungary).

(R,S)-colchicine was from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) and (S)-colchicine was from Sigma. The commercial pharmaceutical formulations were acquired in drug stores from Alcalá de Henares, Madrid (Spain). According to the labeled data, they contained 0.5 mg of colchicine per capsule.

## 2.2. Apparatus

Electrophoretic experiments were carried out in an HP <sup>3D</sup>CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD). Detection wavelength was 243 nm (bandwidth 35 nm for Succ- $\gamma$ -CD and 25 nm for Sulfated- $\gamma$ -CD) and detector response time was 1 s. The electrophoretic system was controlled with the HP <sup>3D</sup>CE ChemStation software that included the data collection and analysis. Separations were performed in uncoated fused-silica capillaries of 50  $\mu$ m I.D. and a total length of 58.5 cm (50 cm effective length) from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). pH measurements were performed in a pH-meter model 744 from Metrohm (Herisau, Switzerland). Degassing took place in an ultrasonic bath Ultrasons-H from J.P. Selecta (Barcelona, Spain).

All H-NMR spectroscopic experiments were performed using a Varian INNOVA 500 NMR System (Palo Alto, CA, USA), fitted with an inverse 5 mm HCX 500 MHz probe head, a variable temperature controller and z-gradient unit. The operating frequency of the spectrometer was 499.61 MHz. The spectral width

was 8012.8 Hz, and 16384 data points were acquired. For each experiment 16 scans were accumulated. The acquisition time was set at 2.045 s, with an interscan delay (d1) of 1 s. All experiments were done at 25°C. All spectra were processed with the MestReNova software (version 10.0.2, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Spain).

### *2.3. Procedure*

At the beginning of each working day the capillary was flushed with NaOH 0.1 M for 10 min, 5 min with Milli-Q water and 40 min with the buffer. In order to ensure the repeatability between injections, the capillary was flushed with NaOH 0.1 M for 2 min, 2 min with the buffer and 2 min with the BGE.

Buffer solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of boric acid in Milli-Q water, adjusting the pH to the desired value (pH 9.0) with 1 M NaOH before completing the volume with water to get the desired buffer concentration. Finally, BGEs were prepared by dissolving the appropriate amount of the different CDs in the buffer solution.

Stock standard solutions of colchicine were prepared by dissolving the appropriate amount of this drug in 1:1 MilliQ water/DMSO. These solutions were stored at 4 °C. Solutions of commercial pharmaceutical formulations were prepared by grinding 6 tablets and homogenizing the resulting power. The required amount for the analysis of the grinded powder was dissolved in a 1:1 MilliQ water/DMSO mixture solvent and centrifuged for 20 min with a rotational speed of 4000 rpm at 25 °C. The supernatant was taken and brought to a known volume. Afterwards, it was diluted to the required concentration employing MilliQ water. All these solutions (samples, buffers and standards) were filtered

through 0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon membrane filters before their injection in the CE system.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Screening with anionic CDs*

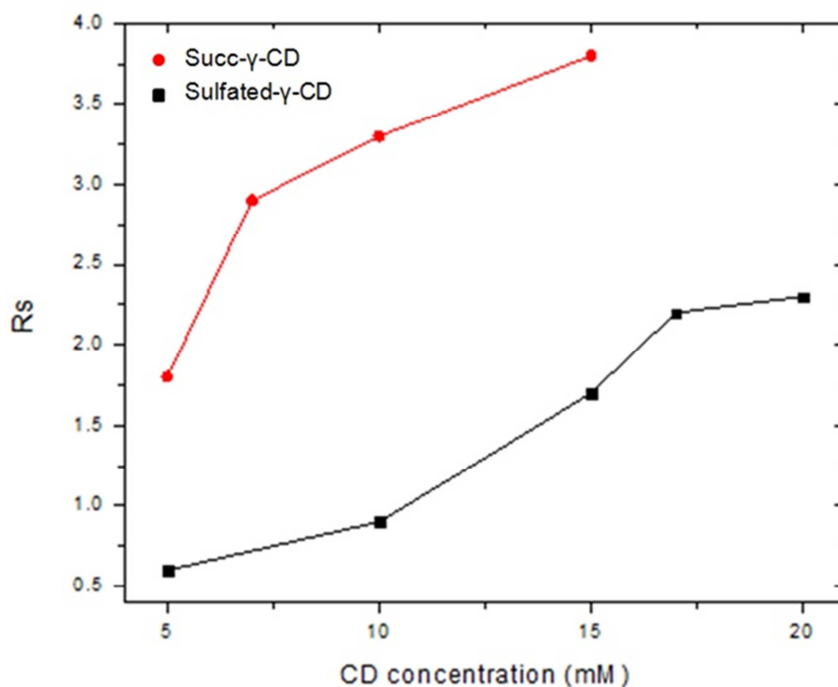
Since colchicine is a neutral compound except at very acidic pH (pKa 1.85) [22], a screening test with thirteen anionic CDs was carried out with the aim of selecting the most appropriate chiral selector to achieve the enantiomeric separation. Anionic CDs (CM- $\alpha$ -CD, Sulfated- $\alpha$ -CD, CM- $\beta$ -CD, CE- $\beta$ -CD, Succ- $\beta$ -CD, Sulfated- $\beta$ -CD, Phosphated- $\beta$ -CD, HDAS- $\beta$ -CD, HDMS- $\beta$ -CD, CM- $\gamma$ -CD, CE- $\gamma$ -CD, Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD) were employed at a concentration of 10 mM, in 10 mM borate buffer at pH 9.0. These experiments were carried out employing a voltage of 20 kV, a temperature of 20 °C, and a detection wavelength of 243 nm (bandwidth 4 nm). Among the CDs studied, only four of them enabled the chiral separation of colchicine enantiomers. On the one hand, CE- $\beta$ -CD and CE- $\gamma$ -CD provided resolution values  $< 0.8$  whereas Succ- $\gamma$ -CD gave rise to the highest enantiomeric resolution ( $R_s$  1.1). Using these three CDs as chiral selectors, the first-migrating enantiomer was S-colchicine. On the other hand, Sulfated- $\gamma$ -CD also originated chiral discrimination for colchicine ( $R_s$  0.6) but in this case, the enantiomeric migration order (EMO) was opposed, i.e., S-colchicine was the second-migrating enantiomer (being the enantiomeric impurity the first-migrating enantiomer). According to these results, both Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD were chosen as chiral selectors. Then, an optimization of the experimental conditions originating the maximum enantiomeric resolution for both CDs was performed.

The buffer concentration was varied from 10 to 75 mM (10, 25, 50 and 75 mM). Depending on the CD, an optimum buffer concentration was chosen as a compromise between current intensity and resolution (50 mM for Succ- $\gamma$ -CD and 25 mM for Sulfated- $\gamma$ -CD). The influence of CD concentration on the chiral resolution of colchicine enantiomers was investigated in the range from 5 to 20 mM. As it can be seen in **Figure 2**, the enantioresolution gradually improved when the concentration of both cyclodextrins was increased. The results obtained using a concentration of 7 mM for Succ- $\gamma$ -CD and 17 mM for Sulfated- $\gamma$ -CD gave rise to the highest values for resolution in the shortest analysis times (Rs 2.9 in 11 min for Succ- $\gamma$ -CD and Rs 2.2 in 10 min for Sulfated- $\gamma$ -CD).

The effect of the temperature was studied (16, 20, and 25 °C). For Succ- $\gamma$ -CD a temperature of 16°C was chosen since in this case a decrease in the temperature gave rise to an increase in the resolution with only slightly higher analysis times (Rs 4.1 in 12 min). For Sulfated- $\gamma$ -CD the resolution did not vary appreciably with the temperature, so 20 °C was chosen as optimum value.

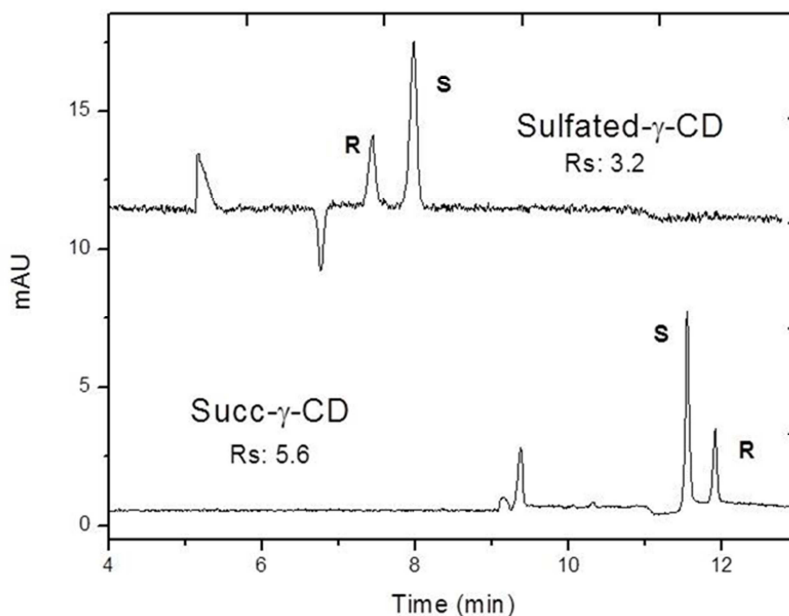
In order to study the influence of the injection time, values of 5, 10, 15, and 20 s were tested at 50 mbar. An injection time of 5 s was chosen for both CDs since the resolution increased without a loss in sensitivity (Rs 5.6 for Succ- $\gamma$ -CD and Rs 3.2 for Sulfated- $\gamma$ -CD).

Detection parameters were optimized for both CDs by changing the bandwidth (4, 10, 25, 30 and 35 nm). A value of 35 nm was chosen for Succ- $\gamma$ -CD due to the increase obtained for the S/N ratio (from 4.7 at 4 nm to 52 at 35 nm) while for Sulfated- $\gamma$ -CD the value selected was 25 nm due to the increase observed at this value for the S/N (from 9 at 4 nm to 20 at 25 nm).



**Figure 2.** Variation of the enantiomeric resolution of colchicine as a function of Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD concentration.

Under the optimized conditions for the two CDs, the enantioseparation of colchicine was completed in 12 min and a value of 5.6 for  $R_s$  with Succ- $\gamma$ -CD and in 8 min and a value of 3.2 for  $R_s$  with Sulfated- $\gamma$ -CD (**Figure 3**).



**Figure 3.** Electropherograms corresponding to the separation of a racemic mixture of colchicine spiked with the S-enantiomer in the presence of Succ- $\gamma$ -CD (Experimental conditions: BGE: 50mM borate buffer (pH 9.0) 7 mM Succ- $\gamma$ -CD; temperature: 16°C; voltage: 20kV;  $\lambda$ : 243 nm  $\pm$  35 nm) and Sufated- $\gamma$ -CD (Experimental conditions: BGE: 25 mM borate buffer (pH 9.0) 17 mM Sulfated- $\gamma$ -CD; temperature: 20 °C; voltage: 20 kV;  $\lambda$ : 243 nm  $\pm$  25 nm).[S-colchicine] 20 mg/L, [R-colchicine]: 10 mg/L. Other conditions: uncoated fused-silica capillary, 58.5 cm (50 cm effective length x 50  $\mu$ m id; hydrodynamic injection: 50 mbar x 5 s).

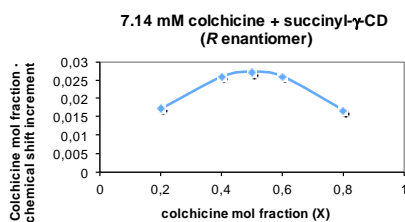
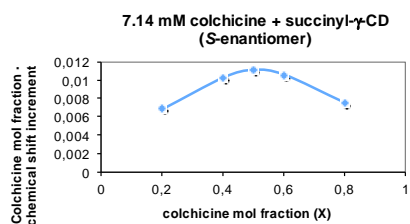
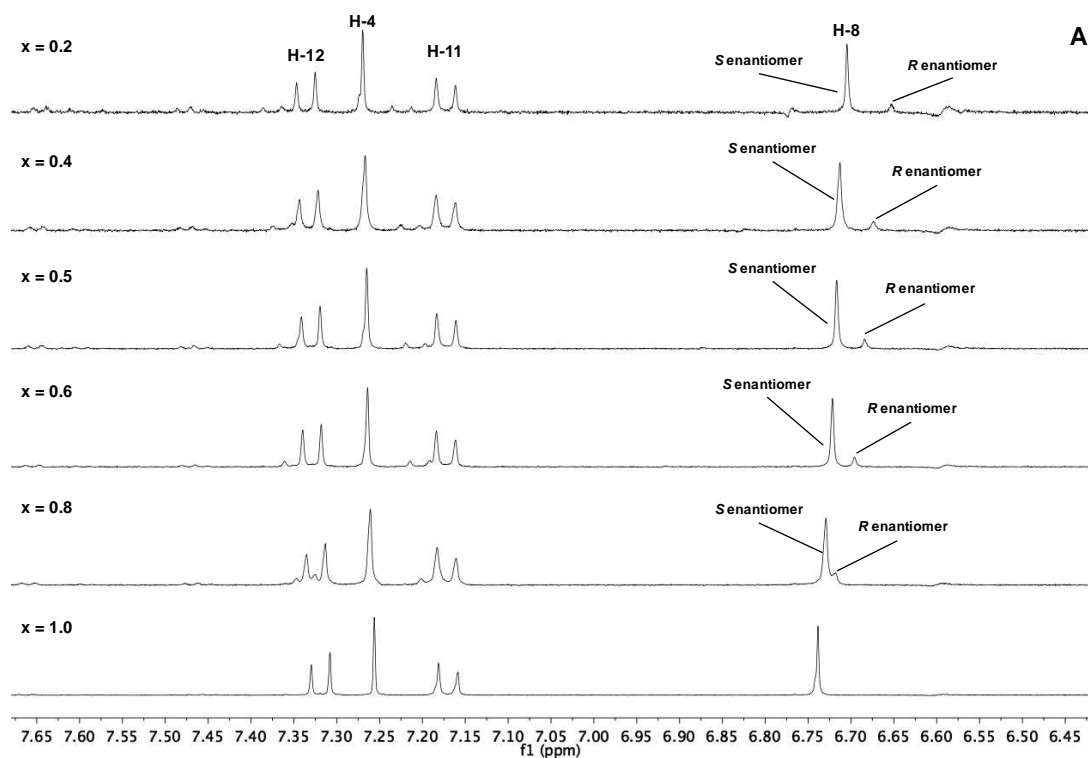
### 3.2. Study of the interactions colchicine-Succ- $\gamma$ -CD and colchicine-Sulfated- $\gamma$ -CD by H-NMR.

In order to investigate the different enantiomeric migration order observed for colchicine enantiomers with Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD, and to study the interactions between colchicine and these two CDs, some H-NMR experiments were carried out.

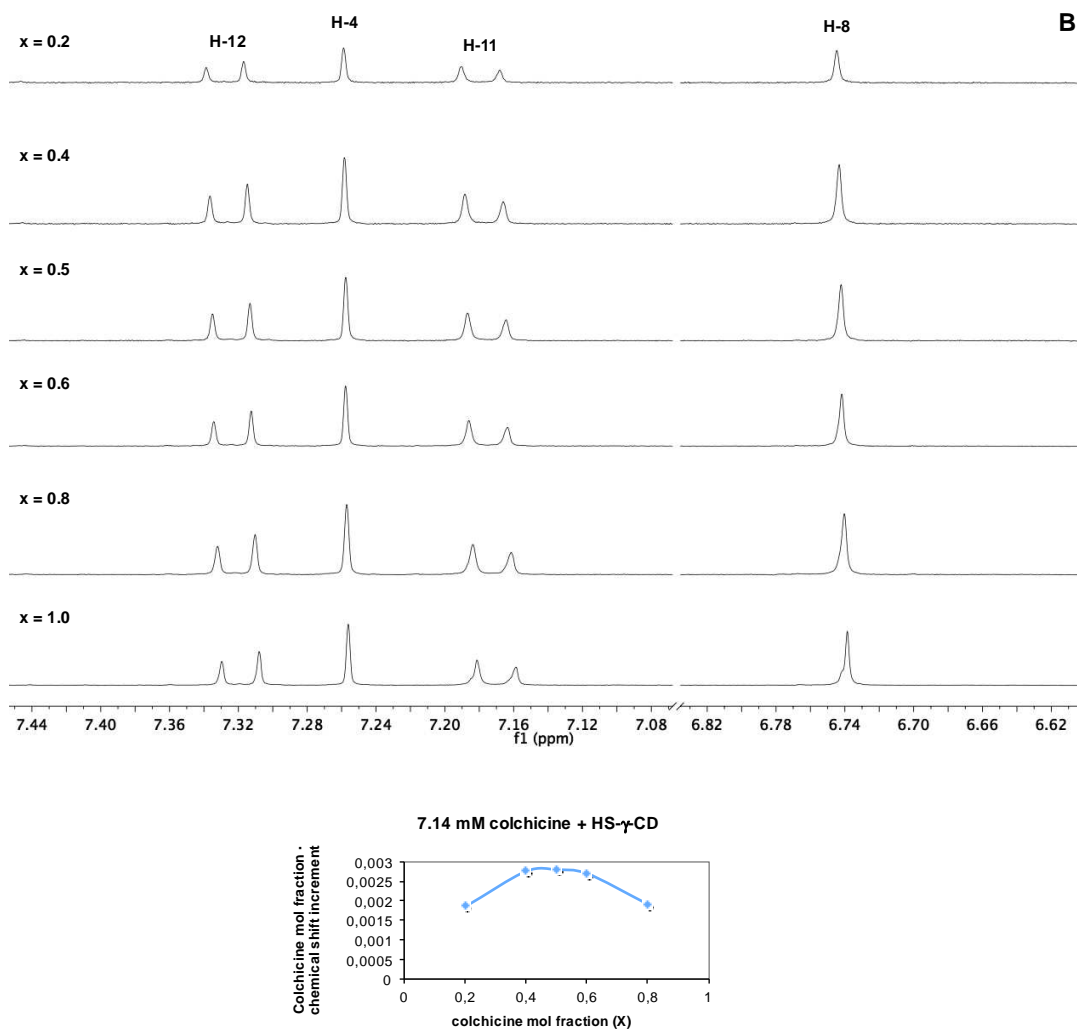
The determination of the averaged stoichiometric ratio between each enantiomer of colchicine and the chiral selector (Succ- $\gamma$ -CD or Sulfated- $\gamma$ -CD) by H-NMR was achieved by constructing the corresponding Job's plot [23]. Thus, stock solutions of racemic colchicine spiked with the S-enantiomer (ca. 90:10) and Succ- $\gamma$ -CD or Sulfated- $\gamma$ -CD (7.14 mM CD in 50 mM borate buffer at pH 9.0 in D<sub>2</sub>O) were prepared. It must be considered that H-NMR spectra of colchicine in the absence of the chiral selector have to be recorded in order to construct Job and Scott's plots. In the concentration range of H-NMR experiments (ca. 5-10 mM), colchicine racemate was very little soluble in the aqueous buffer, for which reason a 20 % v/v of DMSO-d<sub>6</sub> had to be added as co-solvent.

Solutions with different colchicine molar ratio ( $x = 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8$  and  $1.0$ ) were prepared by taking appropriate volumes of the stock solutions and strictly under the same temperature conditions. The signal at 2.5000 ppm (DMSO-d<sub>6</sub>) was used as internal reference for chemical shift measuring. As shown in **Figure 4**, some degree of complexation induced chemical shift (CICS) variation was observed, as the chemical shift of chosen signals varied upon modifying colchicine's molar ratio. However, only the solutions with Succ- $\gamma$ -CD gave some signal splitting due to distinct complexation of each enantiomer. The Job's plots for colchicine with both CDs gave maxima at a value of 0.5 for the colchicine

molar ratio, which implied that 1:1 complexes had been formed in every case. It is noteworthy that, as it can be observed in **Figure 4**, changes of the chemical shift of colchicine signals upon complexation with Sulfated- $\gamma$ -CD were hardly noticeable, whereas with Succ- $\gamma$ -CD substantial chemical shift variations resulted.







**Figure 4.** H-NMR spectra (detailed) and Job's plots for colchicine with (A) Succ- $\gamma$ -CD and (B) Sulfated- $\gamma$ -CD. H-NMR signal assignment was done by direct comparison to reported data [26].

The apparent and averaged equilibrium constants ( $K$ ) can be numerically determined from H-NMR titrations only when the stoichiometric ratios between

donor and acceptor (in this case enantiomer and chiral selector) are 1:1. The values of K can be thus calculated from the Scott's equation [24]:

$$\frac{[\text{selector}]}{\Delta\delta_{\text{obs}}} = \frac{[\text{selector}]}{\Delta\delta_s} + \frac{1}{K_a\Delta\delta_s}$$

where [selector] is the molar concentration of the chiral selector,  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  is the observed chemical shift difference between the  $^1\text{H}$  signals with and without the presence of the chiral selector at a given selector concentration, and  $\Delta\delta_s$  is the chemical shift difference at saturation concentration of the chiral selector. In every case, colchicine concentration was kept at 0.595 mM, whereas that of the chiral selector ranged from 0.595 to 4.760 mM. Again, the signal at 2.5000 ppm was used as reference. The Scott's plots of the solutions of S-spiked colchicine with Succ- $\gamma$ -CD gave acceptable regression lines ( $R^2 > 0.966$ ) (data not shown). This resulted in K values of 0.128 and 0.071  $\text{mM}^{-1}$  for S- and R-colchicine, respectively. Yet a different trend was observed for the mixtures in which Sulfated- $\gamma$ -CD was present, as no linearity was seen in the Scott's plots and no K values could be determined (data not shown). This was attributed to that both colchicine enantiomers formed weak complexes with Sulfated- $\gamma$ -CD and the presence of a high percentage (20 % v/v) of the strong solvent DMSO would dissociate these complexes. With Succ- $\gamma$ -CD, however, complexes would be more stable, and the presence of DMSO as co-solvent would not significantly affect them. In fact, the K value for the S-enantiomer in the buffer (again pH 9.0, 50 mM borate in  $\text{D}_2\text{O}$ , with only 0.5 % DMSO- $\text{d}_6$  as the internal reference) was 0.233  $\text{mM}^{-1}$ .

The highest K value obtained for S-colchicine with Succ- $\gamma$ -CD revealed a more stable complex than for R-colchicine with the same CD. This would suggest that the enantiomer originating the less stable complex should be the first-

migrating enantiomer if the stability of the complex were the most important factor influencing the enantiomeric migration order. However, as shown in **Figure 3**, S-colchicine reached the detector first ( $\mu_{\text{EOF}} = 2.56 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ;  $\mu_{\text{S-enantiomer}} = 2.12 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ;  $\mu_{\text{R-enantiomer}} = 2.03 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ), showing that the electrophoretic mobility of the complexes would be the predominant factor instead of their stability. With Sulfated- $\gamma$ -CD, however, even though no K values could be calculated, as no signal splitting was observed in the H-NMR titrations (**Figure 4**), and consequently both enantiomers would form complexes with very similar stability, the inversion of the enantiomeric migration order with respect to Succ- $\gamma$ -CD would rely on the higher enantiomeric mobility of the complex of R-colchicine with Sulfated- $\gamma$ -CD with respect to the complex formed with the S-enantiomer ( $\mu_{\text{EOF}} = 3.58 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ;  $\mu_{\text{S-enantiomer}} = 3.05 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ;  $\mu_{\text{R-enantiomer}} = 3.39 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ ).

### *3.3. Quantitation of colchicine in pharmaceutical formulations*

The developed methodologies were applied to the quantitation of S-colchicine in pharmaceutical formulations and to assess their enantiomeric purity. With this aim, the analytical characteristics of the developed methods were evaluated in terms of selectivity, linearity, precision, accuracy and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ). The separation selectivity was appropriate for both CDs since colchicine enantiomers were well separated and there was no evidence of interferences from the excipients present in the tablets. **Tables 1 and 2** show the results obtained for the linearity, recovery, precision, and LODs and LOQs when using Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD, respectively.

Linearity was established from six standard solutions at different concentration levels by plotting corrected peak areas ( $A_c$ ) as a function of the

analyte concentration in mg/L. As it can be seen in **Tables 1 and 2**, linearity was proved to be adequate in all cases as  $R^2$  values were  $\geq 99\%$  and confidence intervals for the slopes did not include the zero value while confidence intervals for the intercepts included the zero value (for a 95 % confidence level).

The Response Relative Factor (RRF), calculated dividing the slope of the calibration lines;  $\text{slope}_{\text{impurity}}/\text{slope}_{\text{main compound}}$ , was between 0.8 and 1.2, which is within European Pharmacopeia dictates [25] to demonstrate that R- and S-colchicine responses are equivalent for the two CDs.

Comparison of the slopes obtained by the external standard calibration method and the standard additions calibrations method (five known amounts of R- and S-colchicine were added to a pharmaceutical formulation sample containing a constant concentration of S-colchicine) showed that there were not matrix interferences ( $p\text{-value} > 0.05$ ), so the external calibration method can be used to quantify the content of colchicine in the pharmaceutical formulations.

The accuracy of the method was evaluated as the recovery obtained for colchicine enantiomers when spiking pharmaceutical samples solutions containing 60 or 30 mg/L of S-colchicine (to evaluate the methodology with Succ- $\gamma$ -CD or Sulfated- $\gamma$ -CD, respectively) with known concentrations of R-colchicine (4 or 5 mg/L depending on the CE methodology) and S-colchicine (40 or 20 mg/L depending on the CE methodology). As it can be observed in **Table 1 and 2**, the recovery values obtained were acceptable as the 100% value is included in all cases.

**Table 1.** Analytical characteristics of the CE methodology for the determination of colchicine enantiomers with Succinyl- $\gamma$ -CD.

	<b>R-colchicine</b>	<b>S-colchicine</b>
<b>External standard calibration method<sup>a</sup></b>		
Range	1-10 mg/L	5-360 mg/L
Slope $\pm t \times S_{\text{slope}}$	$0.144 \pm 0.006$	$0.169 \pm 0.004$
Intercept $\pm t \times S_{\text{intercept}}$	$0.007 \pm 0.039$	$0.108 \pm 0.282$
R <sup>2</sup>	99.5 %	99.7%
<b>Standard additions calibration method<sup>b</sup></b>		
Range	0-8 mg/L	0-90 mg/L
Slope $\pm t \times S_{\text{slope}}$	$0.143 \pm 0.005$	$0.168 \pm 0.025$
R <sup>2</sup>	99.7%	99.9%
<b>Accuracy</b>		
Recovery <sup>c</sup>	$98 \pm 3 \%$	$101 \pm 8 \%$
<b>Precision</b>		
Instrumental repeatability <sup>d</sup>		
t, RSD (%)	1.3	1.7
A <sub>c</sub> , RSD (%)	2.9	1.8
Method repeatability <sup>e</sup>		
t, RSD (%)	2.0	2.7
A <sub>c</sub> , RSD (%)	3.7	3.1
Intermediate precision <sup>f</sup>		
t, RSD (%)	3.4	2.8
A <sub>c</sub> , RSD (%)	4.9	5.2
LOD <sup>g</sup>	0.3 mg/L	
LOQ <sup>h</sup>	1.0 mg/L	

A<sub>c</sub> corrected area. <sup>a</sup> Six standard solutions at different concentration levels injected in triplicate. <sup>b</sup> Adding of five known amounts of R- and S-colchicine to a pharmaceutical formulation sample containing a constant concentration of S-colchicine. <sup>c</sup> Accuracy was evaluated as the recovery obtained from six pharmaceutical samples solutions (n=6) containing 60 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 4 and 40 mg/L of R- and S-colchicine, respectively. <sup>d</sup> Six consecutive injections(n=6) of a pharmaceutical sample solution containing 70 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 10 mg/L of R-colchicine. <sup>e</sup> Six pharmaceutical sample solutions containing 70 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 10 mg/L of R-colchicine injected in triplicate (n=6). <sup>f</sup> Three pharmaceutical sample solutions containing 70 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 10 mg/L of R-colchicine injected in triplicate in three different days (n=9). <sup>g</sup> LOD obtained experimentally for a S/N = 3. <sup>h</sup> LOQ obtained experimentally for a S/N = 10.

**Table 2.** Analytical characteristics of the CE methodology for the determination of colchicine enantiomers with Sulfated- $\gamma$ -CD.

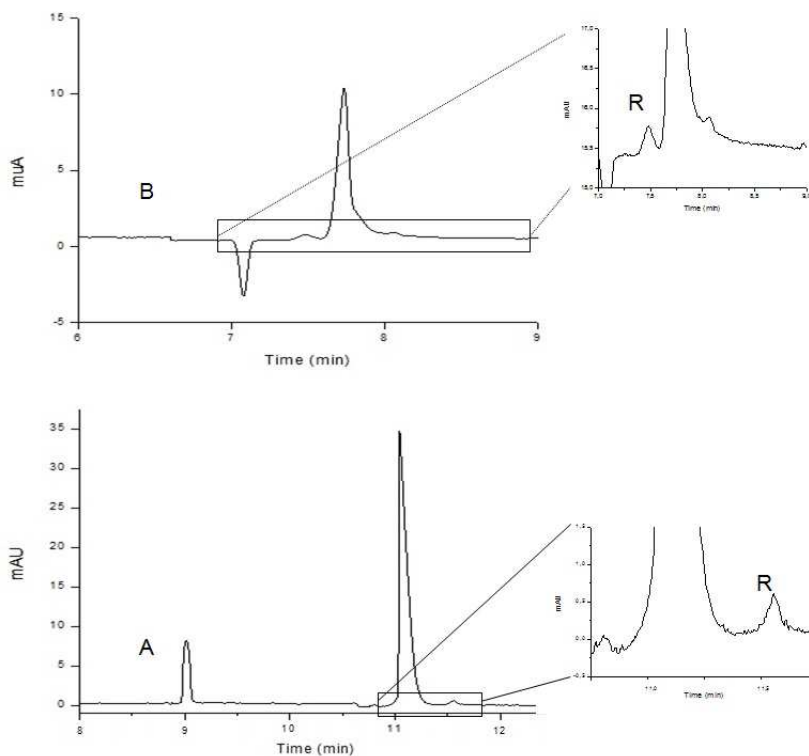
	<b>R-colchicine</b>	<b>S-colchicine</b>
<b>External standard calibration method<sup>a</sup></b>		
Range	1-10 mg/L	5-120 mg/L
Slope $\pm t \times S_{\text{slope}}$	0.129 $\pm$ 0.006	0.128 $\pm$ 0.005
Intercept $\pm t \times S_{\text{intercept}}$	0.026 $\pm$ 0.036	-0.037 $\pm$ 0.210
R <sup>2</sup>	99.9 %	99.8%
<b>Standard additions calibration method<sup>a</sup></b>		
Range	0-5 mg/L	0-60 mg/L
Slope $\pm t \times S_{\text{slope}}$	0.119 $\pm$ 0.014	0.127 $\pm$ 0.003
R <sup>2</sup>	99.9%	99.9%
<b>Accuracy</b>		
Recovery <sup>c</sup>	97 $\pm$ 5	102 $\pm$ 10
<b>Precision</b>		
Instrumental repeatability <sup>d</sup>		
t, RSD (%)	3.4	3.6
A <sub>c</sub> , RSD (%)	4.0	3.2
Method repeatability <sup>e</sup>		
t, RSD (%)	5.6	5.8
A <sub>c</sub> , RSD (%)	2.2	4.0
Intermediate precision <sup>f</sup>		
t, RSD (%)	5.0	5.2
A <sub>c</sub> , RSD (%)	5.8	8.2
LOD <sup>g</sup>	0.3 mg/L	
LOQ <sup>h</sup>	1.0 mg/L	

Ac corrected area. <sup>a</sup>Six standard solutions at different concentration levels injected in triplicate. <sup>b</sup> Adding of five known amounts of R- and S-colchicine to a pharmaceutical formulation sample containing a constant concentration of S-colchicine. <sup>c</sup> Accuracy was evaluated as the recovery obtained from six pharmaceutical samples solutions (n=6) containing 30 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 5 and 20 mg/L of R- and S-colchicine, respectively. <sup>d</sup> Six consecutive injection (n=6) of a pharmaceutical sample solution containing 35 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 5 mg/L of R-colchicine. <sup>e</sup> Six pharmaceutical sample solutions containing 35 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 5 mg/L of R-colchicine injected in triplicate (n=6). <sup>f</sup> Three pharmaceutical sample solutions containing 35 mg/L of S-colchicine (as labeled amount) spiked with 5 mg/L of R-colchicine injected in triplicate in three different days (n=9). <sup>g</sup> LOD obtained experimentally for a S/N = 3. <sup>h</sup> LOQ obtained experimentally for a S/N = 10.

Precision was evaluated considering the instrumental repeatability, method repeatability and intermediate precision. To do that, pharmaceutical sample solutions containing 70 mg/L of S-colchicine spiked with 10 mg/L of R-colchicine were used to evaluate the precision of the method which employs Succ- $\gamma$ -CD as chiral selector whereas pharmaceutical sample solutions containing 35 mg/L of S-colchicine spiked with 5 mg/L of R-colchicine were used when Sulfated- $\gamma$ -CD was used.

Thus, instrumental repeatability was determined from six consecutive injections of the corresponding pharmaceutical sample solutions. RSD values obtained were lower than 4.0 % for corrected peak areas and lower than 3.6 % for migration times. The method repeatability was assessed using six replicates of the pharmaceutical solutions at the appropriate concentration depending on the CE method evaluated, injected in triplicate and on the same day. RSDs were in this case lower than 4 and 5.8 % for corrected peak areas and migration times, respectively. Regarding the intermediate precision, it was evaluated by injecting in triplicate three pharmaceutical solutions at the corresponding concentration for each methodology during three consecutive days. RSD for peak areas were lower than 8.2 % whereas for migration times were lower than 5.2 %.

Finally, LOD and LOQ values (calculated as the minimum concentration yielding an S/N ratio of 3 and 10 times, respectively) were 0.3 and 1 mg/L with Succ- $\gamma$ -CD and with Sulfated- $\gamma$ -CD, respectively. These LODs were experimentally verified in both cases (see **Figure 5**).



**Figure 5.** Electrophoregrams corresponding to the LOD of R-colchicine (0.3 mg/L) in the presence of 300 mg/L or 90 mg/L of S-colchicine with (A) Succ- $\gamma$ -CD or (B) Sulfated- $\gamma$ -CD, respectively. Other experimental conditions as in **Figure 3**.

In spite of the fact that the enantiomeric impurity (R-colchicine) was the first-migrating enantiomer when using Sulfated- $\gamma$ -CD, the RLOD (calculated as (the LOD for the minor enantiomer divided by the concentration of the major enantiomer injected)  $\times$  100) obtained with Succ- $\gamma$ -CD (using a nominal value of 300 mg/L for S-colchicine) was 0.1 % (enabling to assess the accomplishment of the legal ICH regulations) while the RLOD obtained with Sulfated- $\gamma$ -CD was 0.3 % (nominal value of 90 mg/L for S-colchicine).



In summary, the two methodologies developed in this work with Succ- $\gamma$ -CD or Sulfated- $\gamma$ -CD as chiral selectors have been properly validated, demonstrating in both cases adequate values for the different analytical characteristics evaluated. This demonstrated the suitability of both methodologies for routine determination of the content of S-colchicine and its enantiomeric impurity in pharmaceutical formulations.

**Table 3** groups the results obtained for the determination of S-colchicine by the developed methods. The content of S-colchicine agreed with the labeled content and the content of R-colchicine was below the LOD of the methods for both samples.

**Table 3.** Results obtained in the analysis by both CE methodologies of two pharmaceutical formulations with an established content of 0.5 mg of colchicine per capsule. Experimental conditions as in **Figure 3**.

Sample	Succ- $\gamma$ -CD			Sulfated- $\gamma$ -CD		
	% R-colchicine	Colchicine content (mg/capsule)	% Established colchicine content	% R-colchicine	Colchicine content (mg/capsule)	% Established colchicine content
Capsule A	< 0.1 %	0.509 $\pm$ 0.023	102 $\pm$ 5	< 0.3 %	0.498 $\pm$ 0.012	98 $\pm$ 3
Capsule B	< 0.1 %	0.489 $\pm$ 0.013	98 $\pm$ 3	< 0.3 %	0.495 $\pm$ 0.018	99 $\pm$ 4

#### 4. Concluding remarks

Two chiral methodologies were developed in this work achieving for the first time the enantiomeric separation by CE of colchicine, an antiuremic drug commercialized as the pure S-enantiomer. Succ- $\gamma$ -CD and Sulfated- $\gamma$ -CD were

used as the chiral selectors, originating opposite enantiomeric migration order for colchicine. H-NMR experiments were carried out in order to study the separation mechanism with both CDs. A 1:1 stoichiometry for the enantiomer-CD complexes was obtained. However, the apparent and averaged equilibrium constants for the enantiomer-CD complexes could be calculated only for Succ- $\gamma$ -CD, suggesting that it was the electrophoretic mobility of the enantiomer-CD complexes, instead of the stability, the predominant factor in the enantiomer migration order.

In spite of that the enantiomeric impurity (R-colchicine) was the first-migrating enantiomer with Sulfated- $\gamma$ -CD, only Succ- $\gamma$ -CD enabled to detect up to 0.1 % of R-colchicine according to the ICH guidelines. Moreover, Succ- $\gamma$ -CD gave rise to a chiral resolution of 5.6 (in 12 min) compared to the resolution obtained for Sulfated- $\gamma$ -CD (3.2 in 8 min).

The analytical characteristics of the two developed methods were evaluated, showing a good performance for the quantitation of colchicine with a LOD  $\approx$  0.3 mg/L. The methods were successfully applied to the analysis of pharmaceutical formulations.

## **Acknowledgments**

Authors thank the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) for research project CTQ2013-48740-P. M.C.P. and J.V. also thank this Ministry for the Ramón y Cajal research contract (RYC-2013-12688) and the pre-doctoral contract (BES-2014-070532), respectively. N.M.L. thanks the Comunidad of Madrid for her research assistant contract. Authors thank A. Arturo Barral for technical assistance.

## 5. References

- [1] T. Graening, H.G. Schmalz, Total syntheses of colchicine in comparison: A journey through 50 years of synthetic organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 3230-3256.
- [2] S. Verma, J.W. Eikelboom, S.M. Nidorf, M. Al-Omran, N. Gupta, H. Teoh, O.J. Friedrich, Colchicine in cardiac disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *BMC Cardiovascular Disorders* 15 (2015) 1-15.
- [3] M. Ebadi, *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, second ed., CRC PRESS-TAYLOR & FRANCIS GROUP, Boca Raton, USA, 2007.
- [4] I. Manfred Rosner, H-G. Capraro, A.E. Jacobson, L. Atwell, A. Brossi, Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, an(+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 257-261.
- [5] H. Lettre, R. Lettre, Zur Antimitotischen wirksamkeit der pptischen antipoden des colchicins und eines colchicinderivates, *Naturwissenschaften* 53 (1966) 180-&.
- [6] H.J.C. Yeh, M. Chrzanowska, A. Brossi, The importance of the phenyl-tropolone as configuration in colchicines binding to tubulin, *FEBS Lett.* 229 (1988) 82-86.
- [7] Q2(R) "Validation of analytical procedures: Text and methodology". International Conference on Harmonisation. ICH Tripartite Guidelines 2005.

- [8] Q3B(R2), Impurities in new drug products, in: International Conference on Harmonization. ICH Harmonized Tripartite Guidelines, ICH, 2006.
- [9] E. Sánchez-López, C. Montealegre, M.L. Marina, A.L. Crego, Development of chiral methodologies by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometry Detection for duloxetine analysis in pharmaceutical formulations, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 356-362.
- [10] Y. Qi, X. Zhang, Determination of enantiomeric impurity of levamlodipine besylate bulk drug by capillary electrophoresis using carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin, *Cell Biochem. Biophys.* 70 (2014) 1633-1637.
- [11] L. Sánchez-Hernández, C. García-Ruiz, A.L. Crego, M.L. Marina, Sensitive determination of D-carnitine as enantiomeric impurity of levo-carnitine in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1217-1223.
- [12] M. Castro-Puyana, M.A. Garcia, M.L. Marina, Enantiomeric separation of bupropion enantiomers by electrokinetic chromatography: Quantitative analysis in pharmaceutical formulations, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 260-265.
- [13] L. Escuder-Gilabert, Y. Martín-Biosca, M.J. Medina-Hernández, S. Sagrado, Cyclodextrins in capillary electrophoresis: Recent developments and new trends, *J. Chromatogr. A* 1375 (2014) 2-23.
- [14] P. Rezanka, K. Navrátilová, M. Rezanka, V. Král, D. Sýkora, Application of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 35 (2014) 2701-2721.

- [15] E. Sánchez-López, A. Salgado, A.L. Crego, M.L. Marina, Investigation on the separation of duloxetine by capillary electrophoresis, NMR, and mass spectrometry, *Electrophoresis* 35 (2014) 2842-2847.
- [16] E.D. Vega, K. Lomsadze, L. Chankvetadze, A. Salgado, G.K.E. Scriba, E. Calvo, J.A. López, A.L. Crego, M.L. Marina, B. Chankvetadze, Separation of enantiomers of ephedrine by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral selectors: Comparative CE, NMR and high resolution MS studies, *Electrophoresis* 32 (2011) 2640-2647.
- [17] B. Chankvetadze, Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques: The story of 20 and a few more years, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 45-70.
- [18] B. Chankvetadze, Enantiomer migration order in chiral capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 23 (2002) 4022-4035.
- [19] B. Chankvetadze, Combined approach using capillary electrophoresis and NMR spectroscopy for an understanding of enantioselective recognition mechanisms by cyclodextrins, *Rev. Chem. Soc.* 33 (2004) 337-347.
- [20] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, N. Burjanadze, D. Bergenthal, H. Luftmann, G. Blaschke, Enantioseparation of chiral phenothiazine derivatives in capillary electrophoresis using cyclodextrin type chiral selectors, *Chromatographia* 53 (2001) 290-295.
- [21] R. Bhushan, I. Ali, Resolution of racemic mixtures of hyoscyamine and colchicine on impregnated silica-gel layers, *Chromatographia* 35 (1993) 679-680.
- [22] E. Bodoki, B.C. Lacob, R. Oprean, Capillary electromigration techniques for the quantitative analysis of colchicine, *Croat. Chem. Acta* 84 (2011) 383-39.

- [23] A. Salgado, B. Chankvetadze, Applications of nuclear magnetic resonance spectroscopy for the understanding of enantiomer separation mechanisms in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 95-144.
- [24] R.L. Scott, Some comments on the Benesi-Hildebrand equation, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 75 (1956) 787-789.
- [25] The European Pharmacopoeia Convention Inc. *European Pharmacopoeia*, fourth ed. Strasbourg, France, 2004, pp.3843-3849 (supplement 4.6).
- [26] D. Meksuriyen, L.-J. Lin, G. A. Cordell, NMR studies of colchicine and its photoisomers,  $\beta$ - and  $\lambda$ -lumicolchicines, *J. Nat. Prod.*, 50 (1988) 88-92.



## CAPÍTULO IV

**DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA  
SIMULTÁNEA DE UNA MEZCLA DE FÁRMACOS  
EN AGUAS POR CROMATOGRFÍA  
ELECTROCINÉTICA PREVIA EXTRACCIÓN EN  
FASE SÓLIDA CON NUEVAS ORGANOSÍLICES  
MESOPOROSAS SINTETIZADAS CON LIGANDOS  
NEUTROS**





## **IV.1 Introducción**

Como se ha comentado en el capítulo I de la presente memoria, el distinto comportamiento y la diferente toxicidad que pueden poseer los enantiómeros de un compuesto quiral presente en muestras medioambientales confiere un alto interés a la posibilidad de poder determinar de forma individual dichos enantiómeros en tales muestras.

El uso (y en algunos casos el abuso) importante de fármacos de uso común como los antidepresivos, antihipertensivos, broncodilatadores o antifúngicos, entre muchos otros, ha dado lugar a que estén presentes en muestras ambientales y ha hecho que sean considerados como contaminantes emergentes. Su presencia en matrices ambientales como las aguas de río o de depuradora, entre otras, ha puesto de manifiesto la necesidad de disponer de metodologías analíticas accesibles a muchos laboratorios para poder llevar a cabo el control de su presencia en dichas muestras. Muchos de estos fármacos presentes en matrices ambientales son quirales (más del 60 % de los fármacos utilizados en la actualidad [243]) y la determinación individual de sus enantiómeros permite obtener información relevante sobre la toxicidad real de dichas muestras, proporciona una herramienta muy valiosa para llevar a cabo estudios de toxicidad de cada uno de los enantiómeros así como investigar su biodegradación de forma independiente o detectar procesos de enriquecimiento enantiomérico en el medioambiente [6].

La CE se ha revelado como una técnica con un enorme potencial de separación quiral como se ha puesto de manifiesto en el capítulo I de esta memoria, siendo la EKC el modo más empleado con este fin dada su flexibilidad y sencillez para desarrollar métodos. Sin embargo, cuando se lleva a cabo una separación enantiomérica en el formato de la CE con detección UV, la sensibilidad

de detección en concentración puede ser limitada debido al pequeño paso óptico que supone el diámetro del capilar empleado para llevar a cabo la separación. Por ello, se hace necesario establecer una etapa de preparación de muestra con fines a llevar a cabo la preconcentración de los analitos de forma previa a su determinación por EKC con detección UV, dando lugar a metodologías analíticas fácilmente implementables en todo laboratorio de análisis. En este sentido, SPE ha sido una de las técnicas de preparación de muestra más ampliamente utilizada con estos fines y es frecuente que se lleven a cabo trabajos de investigación con el fin de desarrollar nuevos materiales que puedan ser usados como sorbentes en SPE con buenos resultados para la preconcentración de los analitos de interés de forma rápida y económica [244, 245].

Las sílices mesoporosas constituyen una alternativa interesante a los materiales utilizados como sorbentes en SPE. Los materiales mesoporosos o mesoestructurados, de acuerdo con la IUPAC, son aquellos que poseen un tamaño de poro comprendido entre 20 y 500 Å, es decir, comprendido entre los materiales microporosos y los macroporosos. Además, poseen una elevada superficie específica, una distribución de poro regular y la presencia de grupos silanoles en su superficie permite su funcionalización con distintos tipos de ligandos [246, 247] que les confieren diferentes características que pueden ser explotadas para la extracción por SPE de distintos tipos de analitos. La modificación de las condiciones de síntesis de las sílices mesoporosas permite alterar las características de estos materiales [248].

La funcionalización de las sílices mesoporosas con ligandos orgánicos ha dado lugar a las organosílices mesoporosas o materiales mesoporosos híbridos que han abierto nuevas posibilidades para su utilización como sorbentes en SPE. Estos materiales combinan la funcionalidad de distintos compuestos orgánicos

con la estabilidad térmica de la parte inorgánica dando lugar a unas características de gran interés y potencial en distintas áreas [247, 249, 250]. Dentro de estos materiales híbridos se encuentran las organosílices mesoporosas periódicas (PMOs) que contienen grupos orgánicos incorporados como componentes puente en las paredes de sus poros y presentan elevadas áreas superficiales, gran estabilidad térmica y una estrecha distribución de tamaño de poro [251].

En este capítulo se presenta el trabajo de investigación desarrollado en esta Tesis Doctoral para llevar a cabo la síntesis de tres PMOs utilizando ligandos neutros y su evaluación como sorbentes para la extracción y preconcentración por SPE de un grupo de fármacos de uso común, considerados contaminantes emergentes, en aguas. Dos de las organosílices se han sintetizado por primera vez en este trabajo y se basan en el empleo del ligando 1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno (TMSEB) y la tercera, escasamente utilizada con anterioridad [228, 252], se basa en el empleo del 1,4-bis(trietoxisilil)benceno (TESB) como ligando. De las dos organosílices sintetizadas con TMSEB, para una de ellas se utilizó una fuente adicional de sílice (tetraetilortosilicato).

Los fármacos estudiados han sido duloxetina (antidepresivo), terbutalina (broncodilatador), econazol (antifúngico), propranolol (antihipertensivo), verapamil (antihipertensivo, angina de pecho, arritmia, dolor de cabeza, vasodilatador), metoprolol (antihipertensivo, infarto agudo de miocardio) y betaxolol (antihipertensivo). La separación enantiomérica simultánea de estos siete fármacos no se había descrito en el formato de la CE con anterioridad a este trabajo y su determinación enantiomérica en aguas no se había llevado a cabo en el formato de la CE, como se observa en la Tabla I.3 del capítulo I de esta memoria, excepto en el caso de propranolol y metoprolol cuya determinación en

aguas por CE había sido descrita en un único trabajo realizado por nuestro grupo de investigación [183].

La síntesis de las tres PMOs utilizadas en el trabajo de investigación descrito en este capítulo se realizó durante una estancia en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) (Móstoles, España) bajo la dirección de los Dres. Isabel Sierra Alonso, Sonia Morante Zarcero y Damián Pérez Quintanilla, participantes en el proyecto de investigación del MINECO al que se encuentra asociado el contrato predoctoral del autor de esta memoria.

## **IV.2 Objetivo**

El objetivo del trabajo de investigación que se presenta en este capítulo ha sido el desarrollo de una nueva metodología analítica para la determinación enantiomérica simultánea de una mezcla de fármacos de uso común en aguas por EKC previa extracción y preconcentración de los mismos por SPE utilizando PMOs sintetizadas con ligandos neutros.

Con el fin de conseguir este objetivo, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar una metodología analítica por EKC utilizando ciclodextrinas como selectores quirales, que permita la separación simultánea de los 14 enantiómeros de los siete fármacos de uso común estudiados en este trabajo.
2. Sintetizar tres PMOs utilizando ligandos neutros, dos de ellas nuevas y basadas en el empleo del ligando 1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno (TMSEB) (para una de ellas se utilizó una fuente adicional de sílice, tetraetilortosilicato),

y la tercera, escasamente utilizada con anterioridad, basada en el empleo del 1,4-bis(trietoxisilil)benceno (TESB) como ligando.

3. Caracterizar las PMOs periódicas sintetizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental (EA), difracción de rayos X (XRD) y espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).
4. Evaluar las PMOs sintetizadas para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los siete fármacos estudiados en aguas por SPE.

### **IV.3 Resultados y discusión**

#### **IV.3.1 Desarrollo de una metodología analítica por Cromatografía Electrocinética para la separación enantiomérica simultánea de una mezcla de siete fármacos de uso común.**

Con el fin de desarrollar una metodología analítica por EKC que permitiera la separación simultánea de los enantiómeros de los siete fármacos estudiados, se seleccionó un grupo de derivados de ciclodextrinas neutros y aniónicos para realizar un screening inicial con los siete fármacos. Estos selectores se utilizaron debido a su reconocido poder de discriminación quiral para un gran número de compuestos de distinta naturaleza y por los resultados previos que se habían descrito para algunos de ellos frente a algunos de los fármacos estudiados cuando se investigaba su separación enantiomérica de forma individual.

Se probaron cuatro CDs neutras (HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, HP-B- $\beta$ -CD, Ac- $\beta$ -CD) y cuatro aniónicas (Suc- $\beta$ -CD, Suc- $\gamma$ -CD, S- $\beta$ -CD, S- $\gamma$ -CD), todas ellas a una

concentración del 2 % (w/v) en el medio de separación que consistió en una disolución electrolítica 25 mM en tampón fosfato a pH 3.0 con el fin de tener los fármacos estudiados cargados positivamente para hacer posible su separación con CDs neutras e incrementar sus interacciones con las CDs aniónicas.

Únicamente la S- $\beta$ -CD dio lugar a una separación enantiomérica aceptable para todos los compuestos estudiados en un tiempo de 16 min con resoluciones de 8.3 (duloxetina), 8.4 (terbutalina), 8.5 (econazol), 4.1 (propranolol), 3.7 (verapamil), 2.5 (metoprolol) y 2.4 (betaxolol) destacando las elevadas resoluciones obtenidas en un tiempo de análisis aceptable teniendo en cuenta que fue posible separar simultáneamente por primera vez los 14 enantiómeros de estos fármacos. Destacar además que algunas de las resoluciones obtenidas han sido las más altas en los tiempos de análisis más cortos de todas las descritas en la literatura. Este es el caso de duloxetina (Rs 8.3 en 6 min), terbutalina (Rs 8.4 en 6 min) o econazol (Rs 8.5 en 8 min).

Con fines a aplicar el método desarrollado a la determinación de los fármacos estudiados, se evaluaron las características analíticas del método y se puso de manifiesto que éstas eran adecuadas en términos de linealidad, precisión, y exactitud con LODs y LOQs instrumentales comprendidos entre 0.4 y 1.5 mg/L y entre 1.3 y 5.0 mg/L, respectivamente para todos los enantiómeros.

El método desarrollado para la separación enantiomérica simultánea de los siete fármacos estudiados por CD-EKC se utilizó para evaluar el comportamiento de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas en este trabajo como sorbentes para la extracción y preconcentración de los fármacos estudiados en aguas.

### **IV.3.2 Síntesis de tres organosílices mesoporosas periódicas basadas en ligandos neutros.**

En este trabajo de investigación se han sintetizado dos PMOs nuevas (PMO-TMSEB-1 y PMO-TMSEB-2) usando el ligando neutro 1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno (TMSEB) y una tercera (PMO-TESB-1) que había sido escasamente utilizada con anterioridad, como ya se ha comentado, y que estaba basada en la utilización del ligando neutro 1,4-bis(trietoxisilil)benceno (TESB). De las dos organosílices sintetizadas con TMSEB, para una de ellas se utilizó una fuente adicional de sílice (tetraetilortosilicato) (PMO-TMSEB-2).

Para la síntesis de las PMOs, en este trabajo de investigación se describe un método de síntesis sencillo en un solo paso. Para ello, se disolvió Pluronic 123 y CTAB a las proporciones adecuadas para cada material en una disolución de HCl, etanol y agua también a proporciones que dependían del tipo de material a sintetizar. Tras agitar la mezcla (y añadir TEOS en el caso del material TMSEB-2), se añadió el ligando en los tres casos, se transfirió la disolución a un autoclave y se calentó a 100°C durante 16 h. El precipitado blanco se filtró y se lavó con agua Milli-Q y etanol, y se secó a 60°C durante 6 h. Los restos de CTAB que pudieran quedar en el interior de los poros, se eliminaron lavando varias veces a 60°C durante 48 h con etanol, acetato de etilo y dimetilsulfóxido.

### **IV.3.3 Caracterización de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos neutros.**

Los tres materiales sintetizados se caracterizaron mediante la realización de isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental, SEM, TEM y FTIR.



En el caso del material PMO-TESB-1, además, se llevó a cabo un estudio XRD en polvo y RMN.

Las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> para el material PMO-TESB-1 fueron del tipo IV correspondiente a un material mesoporoso de acuerdo con la clasificación de la IUPAC [197]. Además, mostraron la existencia de mesoestructuras de canal largo con distribución de tamaño de poro estrecho y poros con forma cilíndrica demostrando todo ello que este material es bastante ordenado. Por otra parte, el material sintetizado en este trabajo presentaba mayores diámetro y volumen de poro que cuando se sintetizó previamente por otros autores [228, 252] lo que le hacía más atractivo para ser utilizado como sorbente en SPE ya que ambas características facilitan la difusión de los analitos a través de los poros.

En contraposición a lo observado para el material PMO-TESB-1, las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> para el material PMO-TMSEB-1 mostraron zonas amorfas no mesoestructuradas y falta de uniformidad en la distribución de tamaño de poro de acuerdo a las propiedades de este material mostrando que el ligando TMSEB da lugar a materiales menos ordenados que el TESB. Con el fin de mejorar las propiedades texturales del material PMO-TMSEB-1 se sintetizó otro material con el mismo ligando TMSEB pero utilizando TEOS como fuente adicional de sílice. Las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> para este material TMSEB-2 mostraron que seguían existiendo zonas amorfas no mesoestructuradas y falta de uniformidad de tamaño de poro. Sin embargo, las propiedades texturales mejoraron respecto al material PMO-TMSEB-1 al utilizar TEOS como fuente adicional de sílice.

El análisis elemental permitió calcular el % de C con el fin de establecer la cantidad de ligando orgánico incorporado en la sílice. El grado de

funcionalización fue mayor para el material PMO-TESB-1 seguido del PMO-TMSEB-1 y finalmente del PMO-TMSEB-2 poniendo de manifiesto que el ligando se incorpora al material en los tres casos y que la cantidad de ligando TMSEB que se incorpora es menor debido a su mayor voluminosidad con respecto a TESB. En el caso de los dos materiales funcionalizados con TMSEB, el menor grado de funcionalización de PMO-TMSEB-2 se justifica por la menor proporción de ligando utilizado en la síntesis al usarse TEOS como fuente adicional de sílice. Finalmente, el análisis elemental permitió poner de manifiesto que ninguno de los materiales contenía nitrógeno en su estructura demostrando que el proceso de lavado para eliminar el CTAB residual fue correcto.

Con el fin de estudiar la morfología y tamaño de partícula de los materiales se utilizó SEM. Los resultados revelaron que la morfología de los tres materiales no estaba bien definida ya que parte de las partículas eran esféricas mientras otras eran quasi-esféricas o amorfas siendo el material PMO-TESB-1 el que presentaba una forma de partícula mejor definida con baja dispersión de tamaños. Por el contrario, los materiales PMO-TMSEB-1 y PMO-TMSEB-2 mostraban partículas con forma no definida y una mayor dispersión de tamaño. Además, las imágenes TEM para los tres materiales mostraban una estructura porosa con canales tipo “gusano” sugiriendo que el empleo de dos ligandos diferentes y una fuente adicional de sílice en uno de ellos no contribuye a modificar de forma significativa la distribución de poro de los materiales.

El estudio de los tres materiales por FTIR puso de manifiesto una pauta similar para todos ellos confirmando la existencia de puentes bencilo en sus estructuras y mostrando que el ligando orgánico se había introducido correctamente en la red de la PMO.

Para el material PMO-TESB-1 se llevó a cabo una caracterización adicional por XRD en polvo y RMN. Los resultados obtenidos por XRD mostraron que la incorporación del grupo fenileno en el material como puente permite obtener un material bien ordenado y mesoporoso, de acuerdo con los resultados observados en las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>. La presencia de los grupos fenileno en la estructura del material PMO-TESB-1 se corroboró mediante RMN de sólidos de <sup>13</sup>C y de <sup>29</sup>Si.

En resumen, todos los materiales se caracterizaron por distintas técnicas comprobando su funcionalización por los ligandos neutros y estableciendo su morfología y propiedades texturales, así como comprobando la ausencia de restos del tensioactivo CTAB en el interior de los poros que pudieran contaminar posteriores análisis con dichos materiales.

#### **IV.3.4 Evaluación de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los siete fármacos estudiados en aguas por SPE.**

Las tres PMOs sintetizadas con ligandos neutros y caracterizadas en esta Tesis Doctoral fueron evaluadas como sorbentes para la extracción y preconcentración por SPE de los siete fármacos estudiados en aguas. Los anillos aromáticos presentes en los ligandos utilizados para funcionalizar las sílices mesoporosas pueden dar lugar a interacciones moleculares entre dichos anillos y las zonas polares de los fármacos por lo que se espera que dichos materiales puedan ser buenos sorbentes para su extracción por SPE. Además, los fármacos estudiados poseen átomos de oxígeno que pueden permitir también la adsorción a través de interacciones polares con los grupos silanol de la superficie de la sílice. La combinación de estos dos tipos de interacciones (fuerzas de Van der Waals y

puentes de hidrógeno) puede incrementar la capacidad de estos materiales como sorbentes.

Con el fin de evaluar el potencial de los tres materiales sintetizados, se partió de una cantidad de 100 mg de cada uno de ellos que se puso en contacto con 100 mL de una disolución estándar que contenía los 14 enantiómeros de los fármacos estudiados obteniéndose recuperaciones comprendidas entre el 80 y el 100 % para todos los fármacos con el material PMO-TESB-1 excepto para terbutalina, para la que se obtuvieron recuperaciones del 30 %. Para PMO-TMSEB-1 se obtuvieron resultados similares excepto para duloxetina y terbutalina cuyas recuperaciones se redujeron al 40 % en el primer caso y aumentaron al 80 % en el segundo. PMO-TMSEB-2 dio lugar a los peores resultados lo que se justificó teniendo en cuenta la pobre distribución de poro de este material y su falta de homogeneidad en el mismo.

El empleo de una cantidad de material de 200 mg no mejoró los resultados de recuperación de los analitos, sino que, por el contrario, fueron peores para los tres materiales.

Con el fin de estudiar el máximo volumen de muestra que puede pasarse a través del sorbente sin una pérdida significativa de la recuperación de los analitos, se determinaron dichas recuperaciones para los tres materiales (100 mg) y volúmenes de la disolución estándar de los fármacos de 100, 150, 200 y 250 mL observándose los mejores resultados para el material PMO-TESB-1 y para 200 mL de disolución (factor de preconcentración 400) si bien la terbutalina no se recuperaba a partir de 150 mL debido a su baja afinidad por este sorbente.

El estudio del efecto de la polaridad del disolvente de elución se llevó a cabo para el material PMO-TESB-1 utilizando 100 mg del mismo y un volumen de

200 mL de disolución. Al comparar metanol y acetonitrilo se observó que este último no daba lugar a la elución de los analitos por lo que se eligió metanol como medio de elución seleccionándose 2 x 4 mL como condiciones óptimas de elución.

En las condiciones optimizadas fue posible obtener límites de cuantificación para el método comprendidos entre 5.6 y 21.9 µg/L para 12 de los enantiómeros estudiados excluyendo terbutalina y con valores de recuperación de los fármacos en muestras de agua de depuradora entre 73.9 y 102.9 % excepto para econazol con valores de recuperación entre 58.5 y 72.4 %.

Los resultados obtenidos en este capítulo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

## **Artículo 2**

*“Periodic mesoporous organosilica materials as sorbents for solid-phase extraction of drugs prior to simultaneous enantiomeric separation by capillary electrophoresis”.*

J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M. A. García, I. Sierra, M.L. Marina.

**Journal of Chromatography A** 1566 (2018) 135-145.

## **Artículo 2**

**“Periodic mesoporous organosilica materials as sorbents for solid-phase extraction of drugs prior to simultaneous enantiomeric separation by capillary electrophoresis”**

J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M.A. García, I. Sierra and M.L. Marina

J. Chromatogr. A 1566 (2018) 135-145



## **Abstract**

Two novel periodic mesoporous organosilica materials were synthesized with a neutral phenylene-bridged ligand, 1,4-bis(trimethoxysilyl)ethyl)benzene, one of them using tetraethyl orthosilicate as additional silica source (PMO-TMSEB-1 and PMO-TMSEB-2). A third material was also synthesized with 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene ligand (PMO-TESEB-1) which use has scarcely been reported. The three materials were evaluated as solid-phase extraction (SPE) sorbents for the off-line extraction of a mixture of seven drugs of different nature (duloxetine, terbutaline, econazole, propranolol, verapamil, metoprolol, and betaxolol) from water samples. Subsequent simultaneous enantiomeric analysis by CE, using sulfated- $\beta$ -cyclodextrin (2 % w/v) dissolved in a 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) and a voltage of -20 kV (negative polarity) was carried out. Enantiomeric resolutions ranging from 2.4 to 8.5 were obtained in an analysis time of 16 min. After optimization of SPE parameters, it was shown that using just 100 mg of PMO-TESEB-1 as sorbent, a preconcentration factor of 400 with 200 mL solution was achieved, allowing recoveries between 80.5 and 103.1 % (except for terbutaline), with good repeatability (% RSD = 2 - 8 %, n = 5). Analytical characteristics of the method were evaluated in terms of precision, linearity and accuracy with method quantitation limits between 5.6 and 21.9  $\mu\text{g/L}$ . The developed method was applied to the analysis of spiked wastewater samples collected in different treatment plants, with recoveries between 73.9 and 102.9 % except for econazole with recovery values ranging between 58.5 and 72.4 %.

**Keywords:** Periodic mesoporous organosilica, Solid-phase extraction, Chiral drugs, Capillary electrophoresis, Simultaneous enantioseparation.



## Highlights

- New periodic mesoporous organosilica materials were prepared as sorbents for SPE.
- 1,4-bis(trimethoxysilyl)ethyl)benzene; 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene were employed.
- Solid-phase extraction of chiral drugs from water samples gave good recoveries.
- Simultaneous enantiomeric separation of seven chiral drugs by CE in 16 min.
- Enantiomeric resolutions from 2.4 to 8.5 for the seven drugs were obtained by CE.

## 1. Introduction

Nowadays, more than 60 % of commonly used pharmaceuticals are chiral [1]. These chiral drugs tend to exhibit different therapeutic activity depending on the enantiomer in an order of 50- to 500-fold effect [2] but also different toxicities [3]. This fact together with their ubiquitous presence in waters and other environmental samples make necessary to develop adequate analytical methodologies to individually analyse the enantiomers of a chiral drug in these samples enabling the correct assessment of their toxicity. Moreover, selective sorption, microbial degradation, and biologically catalysed chiral inversion can originate an enantiomer enrichment [3]. Although legal limits are not established for pharmaceuticals in waters [4], uncertainties in risk assessment of chiral pharmaceuticals as emerging environmental pollutants should be minimized [3].

Among the different analytical techniques enabling chiral separations (HPLC, GC, SFC, CE), CE has widely been employed to carry out the

enantiomeric separation of many drugs due to its inherent advantages such as versatility and low volume of reagents and samples needed. Among the different chiral selectors employed in CE (cyclodextrins (CDs), proteins, surfactants, antibiotics, polysaccharides, etc.), CDs are the most widely used [5,6].

Pharmaceuticals are found in waters at concentrations generally ranging from ng to  $\mu\text{g}$  per liter [3,7], so that it is usually necessary to use a preconcentration technique, such as solid-phase extraction (SPE), prior to their analysis. SPE involves the use of adsorbing targets onto a solid support and it has been widely used to clean samples and to extract different types of analytes [8,9].

A family of mesoporous materials called PMOs (periodic mesoporous organosilicas) was reported for the first time in 1999 [10]. These PMOs are organic-inorganic hybrid materials that combine the properties of the organic functionality and the chemical stability of the inorganic silica and some other desirable characteristics like great surface area and ordered and narrow pores distribution [11]. Generally, PMOs are synthesized by the sol-gel method, using bridged organosilane precursors of the type  $(\text{R}'\text{O})_3\text{Si-R-Si}(\text{R}'\text{O})_3$ , as Si source and at the same time as organic moiety in which R is the organic functional group, and a directing agent [12]. In contrast to other modified mesoporous silicas, PMOs incorporate the organic functionalities directly into the silica framework, as molecular bridging ligands. This aspect allows higher degrees of organic functionality and improves the chemical and thermal properties of the materials. Moreover, the problems of channel blockage or diffusion of analytes are reduced in comparison with other mesoporous materials functionalized with the post-synthesis method [13]. On the other hand, PMOs can be modified or tuned with different organic moieties (such as methylene, ethylene, ethenylene, phenylene) and other more complex functionalities like thiol, metal complexes, chiral groups,

ionic entities or disulfide groups [14,15]. These organic functionalizations allow the modification and optimization of their hydrophobic/hydrophilic behavior [16] or the ability to form metal complexes, among others [15]. All these properties stated above confer to these materials a great variety of applications such as catalysis, drug delivery, sensing, preparation of stationary phases for chromatography, etc, [17,18]. Moreover, PMOs were employed for adsorption of different analytes (drugs, mercury, lead, copper) [18-22], the extraction of peptides and proteins [23,24], and to be anchored into the fiber in SPME of PAHs [25].

In this article, a simple method of synthesis, with only one step, is described for the preparation of two new PMOs using 1,4-bis(trimethoxysilylethyl)benzene (TMSEB) bridges as silica source, one of them with tetraethylorthosilicate (TEOS) as an additional silica source. A third PMO material was also prepared with 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene (TESB) as ligand (**Fig. S1** in supplementary material). All the materials have been thoroughly characterized and evaluated as SPE sorbents for the extraction of seven drugs with different pharmacological activity ((*R,S*)-duloxetine (antidepressant), (*R,S*)-terbutaline (bronchodilator), (*R,S*)-econazole (antifungal), (*R,S*)-propranolol (antihypertensive), (*R,S*)-verapamil (antihypertensive, angina pectoris, arrhythmia, headache, vasodilator), (*R,S*)-metoprolol tartrate (antihypertensive, acute myocardial infarction), and (*R,S*)-betaxolol (antihypertensive)) from water samples prior to their simultaneous enantiomeric separation by CE. The effect of the combination of two silica sources to obtain mesoporous materials and of the presence of an alkyl chain join to the benzene ring on the performance of the synthesized materials as SPE sorbents was also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and samples

Poly(ethylene glycol) (EO20PO70EO20, Pluronic 123), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 98 % and TEOS 98 %, were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TESB 95 % and TMSEB 85 % were obtained from Gelest (Morrisville, PA 19067, USA). Orthophosphoric acid 85 %, sodium hydroxide (NaOH), sulfated- $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD, DS 7-11), succinyl- $\beta$ -CD (Suc- $\beta$ -CD, DS 3.5) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (HCl) 37 %, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetonitrile (ACN), methanol (MeOH), ethanol (EtOH) 99.5 % and ethyl acetate (EtOAc) were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). The employed water was Milli-Q quality (Millipore, Bedford, MA, USA). Hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD, degree of substitution (DS) 0.6), hydroxypropyl- $\gamma$ -CD (HP- $\gamma$ -CD, DS 3.2), acetyl- $\beta$ -CD (Ac- $\beta$ -CD, DS 7), sulfated- $\gamma$ -CD (S- $\gamma$ -CD, DS 14), hydroxypropyl-buten- $\beta$ -CD (HP-B- $\beta$ -CD, DS not reported) and succinyl- $\gamma$ -CD (Suc- $\gamma$ -CD, DS 3.5) were purchased in Cyclolab (Budapest, Hungary).

Standard compounds with high purity (> 99 %) were purchased: (*R,S*)-duloxetine HCl from IS Chemical Technology (Shanghai, China), (*R,S*)-terbutaline, (*R,S*)-econazole, (*R,S*)-propranolol, and (*R,S*)-verapamil from Sigma-Aldrich; (*R,S*)-metoprolol tartrate from Astra (Hässleholm, Sweden) and (*R,S*)-betaxolol from Sanofi (Paris, France).

Influent and effluent wastewater samples analyzed in this work were collected from wastewater treatment plants located in different regions of Spain. Standard sampling method was employed. Wastewater samples were taken after

primary (influent) and secondary (effluent) treatments. Pre-cleaned sampling glass vessels and automatic samplers (one sample per h) were used to collect 24 h composite, proportional to flow. Collected samples we transported to the laboratory on ice and in the dark. Wastewater sample 1 (influent, pH 7.3) and wastewater sample 2 (effluent, pH 7.6) were obtained in Sevilla. Wastewater sample 3 (effluent, pH 9.0) was collected in Guadalajara.

## 2.2. Preparation of stock and sample solutions

Stock standard solutions were prepared in MeOH, except for duloxetine that was prepared in DMSO, and then diluting with Milli-Q water until desired concentration, and were stored at 4°C. All working solutions were filtered through a 0.45 µm pore size nylon filter membrane before analysis. In the drug mixture, terbutaline and econazole were analyzed at a racemic concentration of 20 mg/L, and the rest of drugs at 10 mg/L.

Wastewater samples were filtered firstly through a Whatman filter paper grade 44/50 followed by a 0.45 µm nylon filter and stored in glass bottles at 4°C before being analyzed.

## 2.3. Synthesis of periodic mesoporous organosilicas

For the synthesis of the PMO materials, chemicals were added in a molar ratio as follows: 1 (ligand): 0.05 Pluronic 123: 0.15 CTAB: 7.14 HCl: 56.4 EtOH: 1471.4 H<sub>2</sub>O: 5 TEOS (if required). For the synthesis of the organosilica with TESB as silica source (denoted PMO-TESB-1), 7 g of Pluronic 123 and 1.2 g of CTAB were dissolved in a solution formed by mixing 80 mL of 2 M HCl, 591 mL H<sub>2</sub>O and 73 mL EtOH. After 1 hour of stirring, 8.85 mL of the ligand TESB was added

with a dropwise and stirring for 1 hour. In the case of the synthesis of the PMOs employing TMSEB as organic ligand two materials were prepared, one of them using TMSEB as unique silica source (denoted PMO-TMSEB-1) and the other one with TMSEB and TEOS as silica sources (denoted PMO-TMSEB-2). To obtain the PMO-TMSEB-1 material, 5.9 g of Pluronic 123 and 1 g of CTAB were dissolved in a solution formed by mixing 67 mL of 2 M HCl, 500 mL H<sub>2</sub>O and 62 mL EtOH and, after stirring for 1 h, 6.55 mL of the ligand TMSEB was added dropwise. To obtain the PMO-TMSEB-2 material, 2.1 g of Pluronic 123 and 0.4 g of CTAB were dissolved in a solution formed by mixing 25 mL of 2 M HCl, 182 mL H<sub>2</sub>O and 23 mL EtOH. After stirring for 1 h, a mixture of 7.7 mL of TEOS and 2.8 mL of TMSEB (with a molar ratio 5:1) were added with droplet system. After the addition of the ligand, each solution was transferred into a teflon-lined steel parr autoclave and heated at 100°C for 16 h. The white precipitate was filtered off and, washed with Milli-Q water and EtOH, and dried at 60°C for 6 h. In order to eliminate completely the rests of CTAB inside the pores, the materials were rewashed several times at 60°C during 48 h with EtOH, EtOAc and DMSO.

#### *2.4. Characterization of periodic mesoporous organosilicas*

Powder X-ray diffraction (XRD) pattern of the silicas was obtained on a Philips diffractometer model PW3040/00 X'Pert MPD/MRD (Almelo, The Netherlands) at 45 kV and 40 mA, using a wavelength Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) over a range  $0.4^\circ < 2\theta < 10^\circ$  at room temperature. N<sub>2</sub> gas adsorption-desorption isotherms were obtained using a Micromeritics ASAP 2020 analyzer (Norcross, Atlanta, GA, USA). Adsorption isotherms were measured at -196°C over the interval of relative pressures (P/P<sub>0</sub>) from 10<sup>-4</sup> to 0.993. Prior to each adsorption analysis the samples were outgassed at 90°C in vacuum during 10 h in the port of

degasification of the instrument. Such temperature was chosen to avoid any degradation of the organic ligands and to remove adsorbed species, solvents and water. The specific surface areas were calculated using the Brunauer, Emmett and Teller (BET) model. The pore size distributions were calculated using the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) model on the desorption branch. Elemental analysis (% C, % N, % H) was performed with a LECO CHNS-932 analyzer (St. Joseph, MI, USA).  $^{13}\text{C}$  CP NMR was recorded on a Bruker Avance III/HD Spectrometer (Rheinstetten, Germany) at 100.53 MHz as resonance frequency (2000 transients, spinning speed of 12 KHz, contact time 3 ms, pulse delay 5 s) and  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR spectra was recorded on a Bruker Avance III/HD 9.4T Spectrometer (Rheinstetten, Germany) at 79.49 MHz as resonance frequency and  $^1\text{H}$  resonance frequency of 400 MHz (1000 transients, spinning speed of 5 KHz, contact time 3 ms, pulse delay 60 s), using high power decoupling pulse program and a Varian sounding line arranged to a Bruker 7.5 mm T3 HX. Scanning electron microscopy (SEM) was carried out on a XL20 ESEM Philips (Reston, VA, USA) with an energy-dispersive spectrometry system (EDS). Conventional transmission electron microscopy (TEM) was carried out on a TECNAI 20 Philips microscope (Hillsboro, OR, USA) operating at 200 KV. Finally, infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Frontier FTIR spectrophotometer (Waltham, MA, USA) in the region 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  by using spectra quality KBr powder, to determine the presence of functional groups in the mesoporous structure.

### 2.5. CE conditions

Electrophoretic experiments were carried out on a HP  $^{3\text{D}}$ CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD). The electrophoretic system was controlled by HP  $^{3\text{D}}$ CE ChemStation software

included the data collection and analysis. Background electrolyte (BGE) employed in the CE-DAD experiments consisted of 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) containing 2 % (w/v) of each of the eight neutral and anionic CDs studied. Separations were performed in an uncoated fused-silica capillary of 50  $\mu\text{m}$  I.D. and a total length of 58.5 cm (50 cm effective length), acquired in Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) at -20 kV and 20°C. Injections were carried out applying 50 mbar for 10 s. Detector parameters were: a response time of 1.0 s and a wavelength of 194 nm (metoprolol and betaxolol), 200 nm (terbutaline, econazole and verapamil), 215 nm (propranolol) and 220 nm (duloxetine) (bandwidth 5 nm). At the beginning of each working day the capillary was flushed with buffer solution for 20 min and 10 min of BGE, and at the end of the day it was flushed with NaOH 0.1 M and Milli-Q water, both of them for 5 min. In order to ensure the repeatability between injections, the capillary was flushed (at 1 bar pressure) with HCl 0.1 M for 2 min, Milli-Q water for 1 min and BGE for 5 min.

## *2.6. SPE methodology*

The extraction procedure was carried out in a 20-position extraction manifold purchased from Waters (Barcelona, Spain), at a flow rate of 1 mL/min, connected to a vacuum pump at 16 inHg. PMO materials were weighed in 6 mL SPE cartridges (65 mm length, 11 mm diameter) that were packed carefully with 100 or 200 mg of each PMO and plugged with polyethylene frits at both ends along with a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon filter membrane inserted at the bottom of the mesoporous silica bed in order to avoid material loss during sample loading. The conditioning process previous to sample loading was carried out with 5 mL MeOH and 5 mL Milli-Q water. Once the sample was loaded, cartridges were



dried by passing air for 20 min. Elution was performed by passing 2 x 4 mL MeOH. The eluate was evaporated to dryness in an Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, Spain) (1400 rpm, 250 RCF, 30°C) coupled with a 6 cone-shaped tube rotor and re-dissolved in 500  $\mu$ L of MeOH:Milli-Q water (10:90, v/v).

The optimization of the extraction procedure (sorbent amount, breakthrough volume, eluent volume and nature) was carried out using three different standard solutions of the seven racemic drugs. Two of these standard solutions were prepared by spiking a given volume of Milli-Q water before the extraction process at a concentration enabling to obtain (after the extraction process) a final extract of 500  $\mu$ L of MeOH:Milli-Q water (10:90, v/v) with a racemic concentration of 20 mg/L for terbutaline and econazole and 10 mg/L for the rest of drugs. The third solution was prepared by passing a given volume of the eluent (methanol) through the extraction cartridge and then adding the mixture of the racemic drugs (at a racemic concentration of 20 mg/L for terbutaline and econazole and 10 mg/L for the rest of drugs). Recovery values were calculated by comparing the corrected peak areas corresponding to the analysis of the standard solutions spiked before the extraction process and those obtained by spiking the methanol solutions after passing through the extraction cartridge.

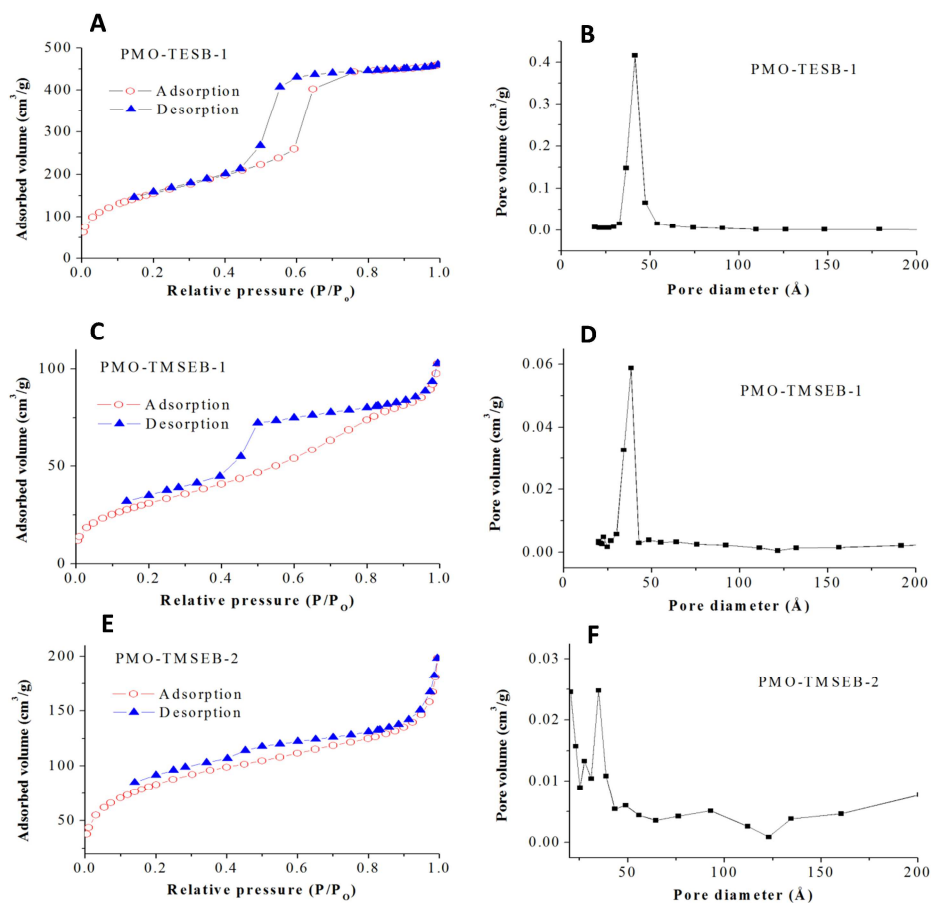
When spiked wastewater samples from treatment plants were analyzed, method accuracy was evaluated as the recovery obtained for the drugs studied at low and high concentrations levels when comparing the spiked amounts added to the wastewater sample before SPE treatment and the determined drug concentrations after SPE treatment by using the developed CE methodology.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Synthesis and characterization of the mesoporous organosilica materials

PMO-TMSEB-1, PMO-TMSEB-2 and PMO-TEB-1 materials were synthesized in this work. N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms are shown in **Fig. 1A, C and E**. For PMO-TEB-1 material (**Fig. 1A**), the isotherm is a typical type IV isotherm, which corresponds with mesoporous materials, according to the IUPAC classification [26]. The isotherm has a very prominent adsorption step at around 0.6 relative pressure ( $P/P_0$ ), showing that the capillary condensation of nitrogen takes place in highly uniform mesopores [27]. This fact is also confirmed by the narrow pore size distribution of the material (**Fig. 1B**) with most of the pores centered at 42 Å. The isotherm also has a H1 type hysteresis loop with almost parallel branches confined to relative pressures between 0.5 and 0.7, this fact indicates the irreversibility of the adsorption-desorption behavior in primary mesopores [28]. All these features are characteristic of large channel mesostructures with narrow pore size distribution and pores with cylindrical shape, so it can be concluded that PMO-TEB-1 is quite ordered. In addition, with this synthesis we have obtained a higher pore diameter and pore volume compared with the previous synthesis of the same material carried out by Esquivel *et al.* [29,30], which are desirable textural properties to facilitate the diffusion of the analytes through the pores of the silica. By contrast, the N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms of the material PMO-TMSEB-1 (**Fig. 1C**) show a hysteresis loop where the desorption branch of the material has a tailing before it reaches the adsorption branch (the hysteresis loop is not completely close), and there is not plateau at high relative pressures. This indicates that there are some amorphous non-mesostructured domains in the material and the pore size

distribution of the material (**Fig. 1D**) has some non-uniformity of pore opening sizes [28].



**Figure 1.** N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms (A, C, E) and pore-size distribution (B, D, F) of PMO-TESB-1, PMO-TMSEB-1 and PMO-TMSEB-2, respectively.

For PMO-TMSEB-1, the hysteresis loop observed is type H2, which is typical for porous materials that have large voids and narrow constrictions. The hysteresis loop of PMO-TMSEB-1 is not confined as it was in the case of PMO-TESB-1 starting from relative pressure of 0.2 and ending in the saturation vapor

pressure. This fact could be attributed to the presence of secondary mesopores [28], which are pores between particles of the hexagonally ordered phase. The presence of these non-mesostructured domains and secondary mesopores are in agreement with the textural properties found for this material (see **Table 1**) where PMO-TMSEB-1 shows that the structure is more shrink and there is a lack of textural properties with lower surface area, pore volume and pore diameter compared with PMO-TESEB-1 (the mesostructured order of PMO-TMSEB-1 is poor compared with PMO-TESEB-1, and the ligand TMSEB lead to a less ordered materials compared with the materials obtained using ligand TESEB). In order to enhance the textural properties of the material PMO-TMSEB-1 we synthesized a new material with the same ligand but using TEOS as co-source of silica denoted as PMO-TMSEB-2. The N<sub>2</sub> adsorption-desorption of this material and its textural properties are shown in **Fig. 1E** and **Table 1**. As we can see from its N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherm, this material still presents a hysteresis loop, where the desorption branch of the material has a tailing before it reaches the adsorption branch. There is also not plateau at high relative pressures, which as for PMO-TMSEB-1, indicates that there are some amorphous non-mesostructured domains in the material and the pore size distribution of the material has some non-uniformity of pore opening sizes, as can be clearly see in the pore size distribution of PMO-TMSEB-2 (see **Fig. 1F**). Nevertheless, with these results it can be concluded that the textural properties ( $S_{\text{BET}}$  and pore volume) of PMO-TMSEB-2 have been improved compared to PMO-TMSEB-1 with the introduction of TEOS as co-source of silica (**Table 1**).

In order to quantify the amount of organic ligand incorporated into the silica framework, by means of elemental analysis, the % C was calculated. As shown in **Table 1**, all the materials prepared showed no amount of nitrogen in its structure demonstrating that the washing process to remove rest of surfactant

molecules of CTAB was successful and the three materials are free of surfactant that could be released in future analysis and contaminate them. As for % C, it showed PMO-TESEB-1 has a functionalization degree of 5.34 mmol/g material, in PMO-TMSEB-1 was 4.01 mmol/g and in PMO-TMSEB-2 was 2.27 mmol/g, so that means that ligands were successfully incorporated in the framework of each material.

**Table 1.** Textural properties of the PMO materials synthesized in this work.

Material	$S_{\text{BET}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ ) <sup>a</sup>	Pore volume ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) <sup>b</sup>	Pore size ( $\text{\AA}$ ) <sup>c</sup>	Elemental analysis (%)			
				C	N	H	(mmol ligand/g) <sup>d</sup>
PMO-TESEB-1	569	0.70	42	38.3	0.0	4.4	5.34
PMO-TMSEB-1	115.2	0.14	38	48.2	0.0	5.6	4.01
PMO-TMSEB-2	302	0.24	35	27.2	0.0	4.0	2.27

<sup>a</sup> BET are (Brunauer, Emmett and Teller).

<sup>b</sup> Total pore volume was measured at relative pressure ( $P/P_0$ ) = 0.97.

<sup>c</sup> Pore diameter estimated by using the BJH (Barrett, Joyner and Halenda) model applied on the desorption branch of the isotherm.

<sup>d</sup> mmol of ligand per g of PMO calculated with the % C obtained by elemental analysis.

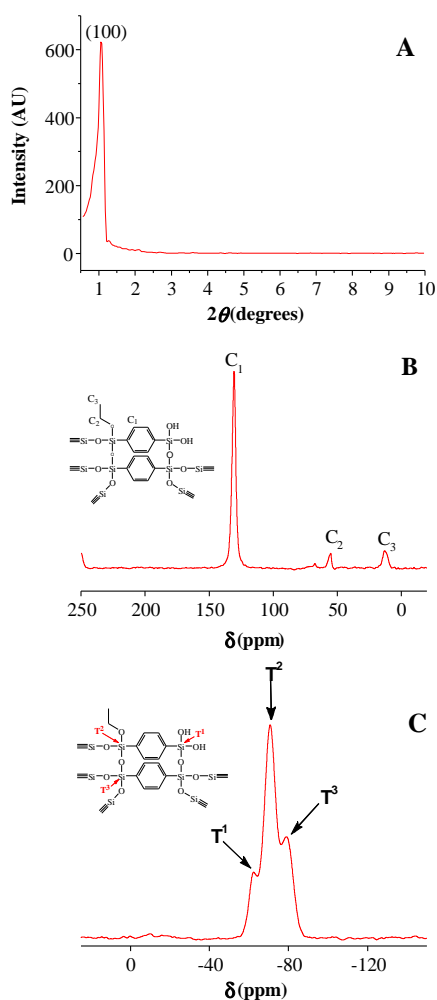
What is more, the decrease in the amount of the ligand TMSEB, incorporated into the silica framework in PMO-TMSEB-1 compared with PMO-TESEB-1 is due to the higher steric hindrance of the more voluminous TMSEB than TESEB. On the other hand, the lowest amount of TMSEB in PMO-TMSEB-2 is a consequence of the lower ratio of TMSEB in the synthetic process due to the use of TEOS as co-source of silica.

SEM was used to study the morphology and size of the particles of the materials prepared (see **Fig. S2 A, C and E** in supplementary material). The SEM micrograph shows that the morphology of these materials is not well defined, where part of the particles is spherical and some other quasi-spherical or amorphous type being the PMO-TESB-1 the one which present shape particles best defined (see **Fig S2 A**). The dispersion in the size of the particles in the case of PMO-TESB-1 is low with particles with a size from 3.32 to 5.80  $\mu\text{m}$ . On the other hand, the materials PMO-TMSEB-1 and PMO-TMSEB-2 (**Fig. S2 C and E** in supplementary material) show particles with a non-defined shape and bigger particle size dispersion that goes from 5 to 17  $\mu\text{m}$  in PMO-TMSEB-1 and from 1 to 9  $\mu\text{m}$  in the case of PMO-TMSEB-2. TEM images of PMO-TESB-1, PMO-TMSEB-1 and PMO-TMSEB-2 (see **Fig S2 B, D and F**, respectively, in supplementary material) show that the three materials have a porous structure with a wormhole-like arrangement of channels. These results suggest that the use of two different ligands TESB and TMSEB and the incorporation in the synthesis of two source of silica TMSEB and TEOS in material PMO-TMSEB-2 are not contributing to a significant change or disruption of the pore arrangement of the three materials after these modifications in the synthesis conditions.

In **Fig. S3** (supplementary material) the FTIR of three materials is depicted, a similar pattern was observed for each material, with most remarkable peaks in the fingerprint region. At 3400 and 3000  $\text{cm}^{-1}$  appears a wide peak belonging to O-H stretching of physisorbed  $\text{H}_2\text{O}$ . The three materials exhibited several bands in the range 2800–2975  $\text{cm}^{-1}$ , these bands could be attributed to C-H stretching vibrations of possible rest of the surfactant (Pluronic 123), or most probable non-hydrolysed ethoxy or methoxy groups. These bands are more intense in the spectra of PMO-TMSEB-1 and PMO-TMSEB-2 that is in agreement with the  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  chains that the TMSEB ligand have in its structure. Stretching

bands between 1645 and 1379  $\text{cm}^{-1}$  as well as, C-H bend bands at 1456  $\text{cm}^{-1}$ , confirmed the presence of the benzyl bridges in the solid framework of all the materials. These FTIR spectra showed that the organic ligand was correctly introduced in the PMO network. All remaining peaks belonged only to Si-O bonds, as observed in the intense peak at 1155, 1090, 923 and 773  $\text{cm}^{-1}$  owing to Si-O-Si bending and stretching process, as well as Si-O-Si rocking at 526  $\text{cm}^{-1}$ .

Finally, for PMO-TESB-1 material, additional characterization was carried out by powder XRD (**Fig. 2A**) and NMR (**Fig. 2B and 2C**). XRD pattern of PMO-TESB-1 indicates that this material displays a well-resolved pattern at low  $2\theta$  values with a very sharp basal diffraction peak around 1.1 Å indexed as (100) index Miller showing that the incorporation of phenylene moiety into the material as a bridge-bonded group allows to obtain a well-ordered and mesoporous material, which is in good agreement with the results obtained in the  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherms. These XRD patterns are typical in materials with uniform pores in the mesoporous range and non-symmetrical 3D wormhole-like structure of the porous framework, with a pore structure lacking long-range order [31]. The material has a  $d_{100}$  spacing of 80.5 Å obtained from the (100) reflection assigned to the pore-to-pore centre correlation distance with a unit cell dimension  $a_0 = 93$  Å, and a wall thickness of 51 Å estimated from  $a_0$ -BJH pore diameter [32].



**Figure 2.** A) XRD diffraction pattern, B)  $^{13}\text{C}$  NMR spectra and C)  $^{29}\text{Si}$  NMR spectra of PMO-TESB-1 sorbent.

This spectrum displays three T site peaks around -79 ppm, -71 ppm and -62 ppm which could be assigned as  $\text{T}^3$  [ $\text{SiC}(\text{OSi})_3$ ],  $\text{T}^2$  [ $\text{SiC}(\text{OEt})(\text{OSi})_2$ ] and  $\text{T}^1$  [ $\text{SiC}(\text{OH})_2(\text{OSi})$ ] organosiliceous species, respectively. These T sites verify the



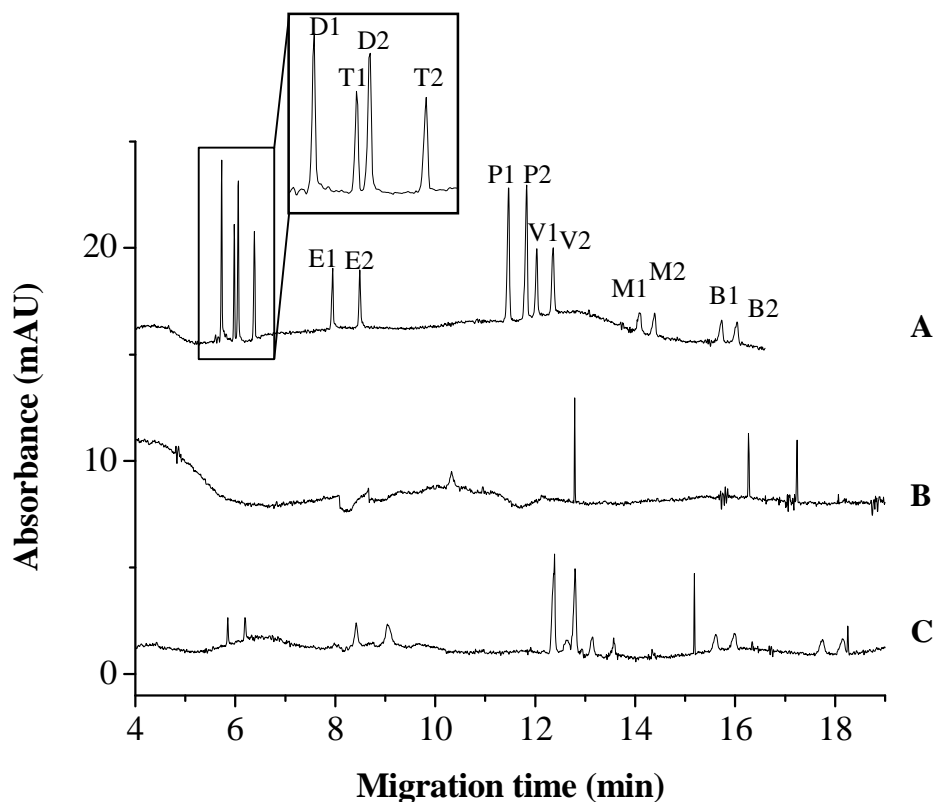
presence of the functional groups in the framework of the silica. In addition, the absence of Q<sup>n</sup> sites in the <sup>29</sup>Si NMR spectra is an indicative of no cleavage of Si-C bonds during the synthesis [35]. The high proportion of T<sup>3</sup> sites indicates a high grade of condensation and a good uniformity of the synthesized material.

The presence of the phenylene groups in the framework of the PMO-TESB-1 material was corroborated by solid-state <sup>13</sup>C and <sup>29</sup>Si NMR spectroscopy (**Figs. 2B and 2C**). Solid-state <sup>13</sup>C CP-MAS NMR spectrum (**Fig. 2B**) of the PMO-TESB-1 displays three peaks, an intense resonance peak at  $\delta$  ca 130 ppm that corresponds to the sp<sup>2</sup> carbons of the phenylene moieties of the PMO-TESB-1 material (C1) [20,33] and two other less intense peaks at  $\delta$  12 ppm and  $\delta$  55 ppm due to the signal of sp<sup>3</sup> carbons of the methylene (C2) and the methyl groups (C3) of the ethoxy groups, respectively, that were not completely hydrolyzed after the synthesis [34]. The high ratio between the peak area signals of C1/C2 and C1/C3 clearly demonstrated a great degree of condensation of the PMO-TESB-1 material, where most of the TESB ligand is homogenously distributed into the PMO material framework, which is in good agreement with the characterization stated above. In addition, the absence of other peaks in the NMR spectra indicates the complete absence of rest of surfactants (CTAB and Pluronic 123) in the material, which shows that the washing procedure employed in this synthesis is more successful than other PMOs synthesis reported in the literature before [14,30]. The <sup>29</sup>Si MAS NMR spectrum of PMO-TESB-1 is shown in **Fig. 2C**.

### *3.2. Enantiomeric separation of a mixture of drugs by CE*

With the aim of developing a CE method enabling the simultaneous enantiomeric separation of the seven chiral drugs with different pharmacological activities (duloxetine, terbutaline, econazole, propranolol, verapamil, metoprolol

and betaxolol) with good enantioselectivity and enantioresolution ( $R_s$ ), different CDs were tested due to the high discrimination power of these chiral selectors. Based on previous results reported by several researchers who employed a wide range of chiral selectors to individually separate the enantiomers of these compounds [36-43], an initial screening of CDs was carried out using neutral (HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, HP-B- $\beta$ -CD, Ac- $\beta$ -CD) and anionic (Suc- $\beta$ -CD, Suc- $\gamma$ -CD, S- $\beta$ -CD, S- $\gamma$ -CD) CDs at an initial concentration of 2 % (w/v). An acidic BGE was employed in order to guarantee the presence of the charged forms of the analytes, necessary for their separation with neutral CDs, and enabling to improve their interaction with the anionic chiral selectors. Thus, a 25 mM phosphate buffer at pH 3.0 and 2 % (w/v) CD was employed to carry out the screening with the above-mentioned CDs. The results obtained showed that only S- $\beta$ -CD offered an acceptable simultaneous enantiomeric separation for all compounds in an analysis time of 16 min (see **Figure 3A**) with the following enantiomeric resolutions: duloxetine (8.3), terbutaline (8.4), econazole (8.5), propranolol (4.1), verapamil (3.7), metoprolol (2.5) and betaxolol (2.4). In comparison with other previous works, where individual enantiomeric separations of these analytes were reported using the same chiral selector with the same [36, 40, 41, 43] or different degree of substitution [37, 38], for most of the compounds studied, a notable improvement in the enantioresolution and shorter analysis times were obtained under the above-mentioned conditions. Moreover, this is the first time that the simultaneous separation of all the enantiomers of the studied drugs is reported by CE.



**Figure 3.** Electropherograms corresponding to the enantiomeric separation of: (A) a standard solution containing the seven racemic drugs at concentrations of 20 mg/L for terbutaline and econazole and 10 mg/L for the other drugs, (B) wastewater sample 1 (after SPE treatment), and (C) wastewater sample 1 spiked before SPE treatment with the seven racemic drugs at the following enantiomeric concentrations: D and P (2.5  $\mu\text{g/L}$ ), E (8.2  $\mu\text{g/L}$ ), T and V (5.0  $\mu\text{g/L}$ ), M and B (6.2  $\mu\text{g/L}$ ), using 100 mg of PMO-TESB-1 sorbent and 200 mL of sample volume. D: duloxetine, T: terbutaline, E: econazole, P: propranolol, V: verapamil M: metoprolol, B: betaxolol; 1, First-migrating enantiomer; 2, Second-migrating enantiomer. Experimental conditions: BGE, 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) and 2 % (w/v) S- $\beta$ -CD, capillary (50  $\mu\text{m}$  I.D., total length of 58.5 cm (50 cm effective length)), injection: 50 mbar  $\times$  10 s, temperature: 20°C, separation voltage: -20 kV, UV detection at  $210 \pm 5$  nm.

### *3.3. Evaluation of periodic mesoporous organosilica materials for solid-phase extraction*

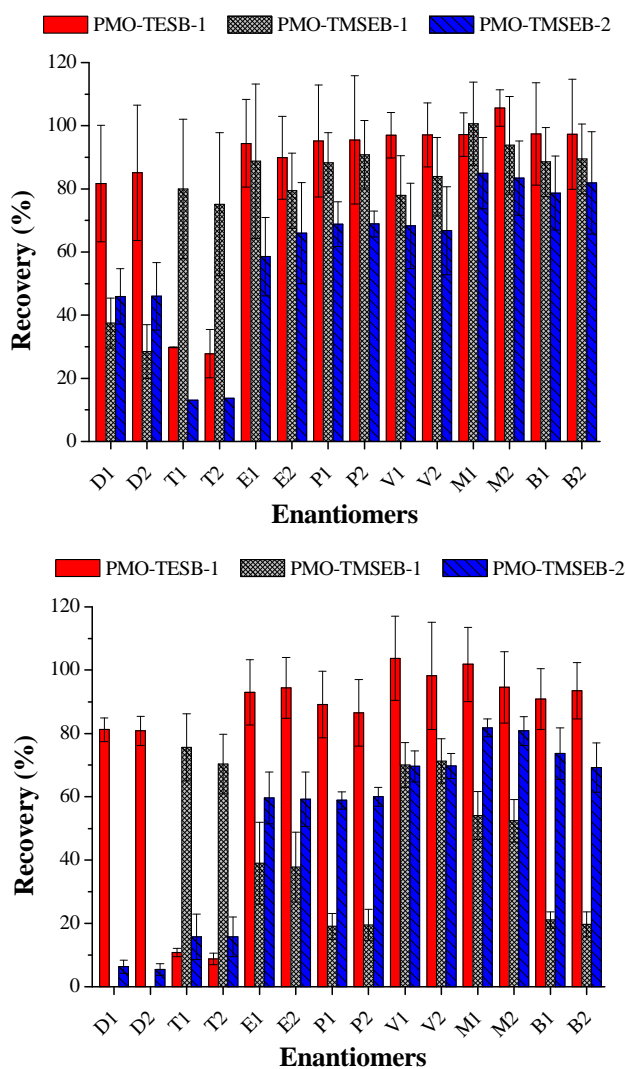
The three PMOs synthesized in this work were evaluated as sorbents for the extraction of the seven chiral drugs studied. In fact, the organic moieties that are inside the silica network (ligands TESB and TMSEB) contain aromatic rings that can present molecular interactions (Van der Waals forces) between the electronic cloud of the ring and the polar part of the drugs. On the other hand, analytes have oxygen heteroatoms, which permit adsorption through polar interactions (a hydrogen-bonding mechanism) with the silanol groups that exist in the silica walls (when TEOS is used as co-silica source). The combination of these two types of mechanisms can improve the adsorption capacity of these materials.

Initially, with 100 mg of PMOs and 100 mL of a standard solution containing the seven drugs (at concentrations enabling to obtain final concentrations (after the SPE process) of 20 mg/L for terbutaline and econazole, and 10 mg/L for the other drugs analyzed), recovery values between 80 and 100 % were achieved, using PMO-TESB-1, except for terbutaline with values of 30 % (**Fig. 4A**). PMO-TMSEB-1 showed a similar behavior for most analytes except for duloxetine and terbutaline, with a decrease to less than 40 % and an increase to near 80 % in the recovery, respectively, compared with the recovery values obtained with PMO-TESB-1. PMO-TMSEB-2 provided the worst recoveries for all the analytes in comparison with the two previous ones. This result could be justified by the poor and non-homogeneous pore distribution of this material inside its mesoporous structure.

The amount of sorbent in the cartridge was increased up to 200 mg in order to study if this increase could improve the recovery values. However,

recovery values obtained (see **Fig. 4B**) were similar to those obtained with 100 mg of sorbent in the case of PMO-TESB-1, being lower for terbutaline (10 %). As for PMO-TMSEB-1, each compound suffered a notable recovery decrease with 200 mg of sorbent, with no recovery at all for duloxetine and similar terbutaline recovery as compared with 100 mg; and as for PMO-TMSEB-2, this material showed flow problems due to sorbent packing which made difficult the solution passing through it. In this way, PMO-TESB-1 showed to be the best sorbent with the highest recovery values for analytes (except for terbutaline) in an amount of 100 mg. These good results can be attributed to its higher  $S_{BET}$ , pore volume, pore size and functionalization degree that allow a better retention of the target analytes and to achieve an excellent recovery. In the case of terbutaline, the low recovery obtained for this drug with the PMO-TESB-1 material could be explained taking into account the interaction between analytes and the organic sorbent due to Van der Waals forces (**Table S1** in supporting material) where a significant decrease in these forces can be observed for terbutaline with respect to the other analytes studied.

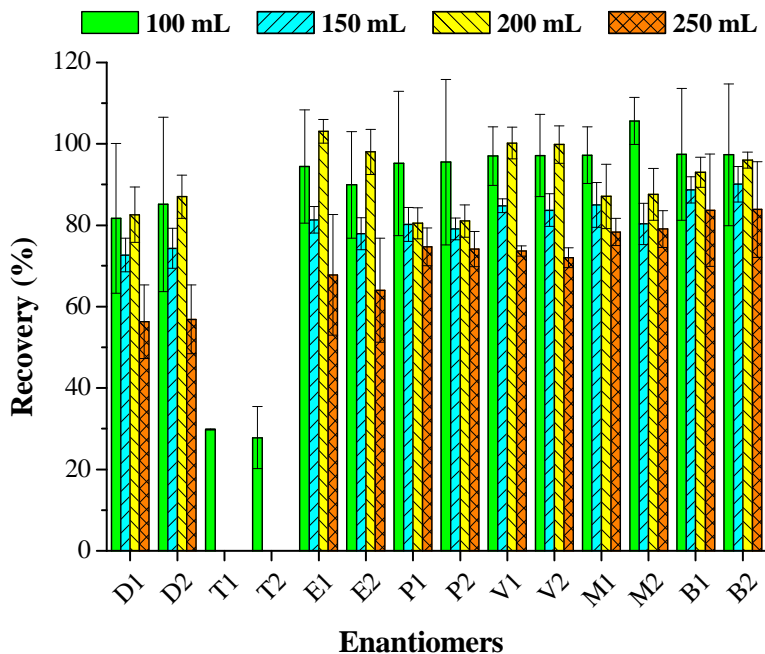
The next step was to study the breakthrough volume, parameter that determines the maximum volume of sample that can be passed through the sorbent without a significant loss in the recovery. This study was carried out with the three PMO materials to compare the results obtained, and the volume of standard solution was increased from 100 to 150, 200 and 250 mL.



**Figure 4.** Recovery percentages and error bars obtained for each enantiomer of the drugs with 100 mg (A) and 200 mg (B) of sorbent packing and 100 mL of a standard solution of the racemic drugs at a concentration of 100  $\mu\text{g/L}$  for terbutaline and econazole, and 50  $\mu\text{g/L}$  for the other drugs. D: duloxetine, T: terbutaline, E: econazole, P: propranolol, V: verapamil, M: metoprolol, B: betaxolol; 1, First-migrating enantiomer; 2, Second-migrating enantiomer. Other experimental conditions as in Fig 3.

Best results were obtained for PMO-TESB-1 (see **Fig 5**), where recoveries were similar up to 200 mL (PF was 400), even though terbutaline was lost at 150 mL because its low affinity for this sorbent. As a consequence, 200 mL was the optimum value for all the other analytes since 250 mL gave rise to recovery percentages decreased until 56 and 84 %. Other sorbents (see **Fig. S4** in supplementary material) also originated acceptable recoveries, within 80-90 % at 200 mL of solution passing through the cartridge with PMO-TMSEB-1, although duloxetine and terbutaline showed the lowest affinity only with 15-20 % of recovery. PMO-TMSEB-2 showed a similar behavior but with a complete loss of terbutaline recovery, 15 % of duloxetine and 80 % for the other drugs.

Using PMO-TESB-1 as the best sorbent with a packing of 100 mg and a breakthrough volume of 200 mL, a study of the effect of the polarity of the elution solvent was carried out using MeOH and ACN. It was observed that no elution occurred with ACN as elution solvent since no peaks were detected in the electropherograms (results not shown). Therefore, MeOH was chosen as elution solvent to follow the optimization process being the elution with 2 x 4 mL MeOH the conditions selected.



**Figure 5.** Recovery percentages and error bars obtained for each enantiomer of the drugs taking into account the breakthrough volume loaded in the cartridges ( $n = 6$ ) at 100, 150, 200 and 250 mL of a standard solution of racemic drugs at using 100 mg of PMO-TESB-1 as sorbent. An amount of 10  $\mu\text{g}$  for terbutaline and econazole and of 5  $\mu\text{g}$  for the other drugs was present in the different volumes of solution tested. D: duloxetine, T: terbutaline, E: econazole, P: propranolol, V: verapamil, M: metoprolol, B: betaxolol; 1, First-migrating enantiomer; 2, Second-migrating enantiomer. Other experimental conditions as in Fig 3.

#### 3.4. Analytical characteristics of the developed SPE-CE method

Analytical characteristics of the developed method using PMO-TESB-1 as sorbent were evaluated in terms of linearity, precision, accuracy, instrumental limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ), and method limits of detection (MDL) and quantitation (MQL) (see Tables 2 and 3).



**Table 2.** Analytical characteristics of the developed CE method for the simultaneous enantiomeric determination of seven drugs.

Analyte	Linearity				Precision				LOD (mg/L) for each enantiomer	LOQ (mg/L) for each enantiomer
	Linear range (mg/L)	Linear equation bx + a (R <sup>2</sup> )	Sb Sa	b ± t Sb	Instrumental repeatability (n=6)		Intermediate precision (n=6)			
					Ac // Tm (RSD (%))		Ac // Tm (RSD (%))			
					Low concentration	High concentration	Low concentration	High concentration		
Duloxetine (D1)	1-15	0.36x - 0.08 0.9963	0.03 0.09	0.36 ± 0.08	5.2 // 1.6	0.9 // 0.9	7.9 // 1.0	6.5 // 0.8	0.5	1.7
Duloxetine (D2)		0.34x - 0.06 0.9966	0.03 0.07	0.34 ± 0.08	2.6 // 2.1	1.0 // 0.6	7.4 // 1.0	7.5 // 0.9		
Terbutaline (T1)	2-25	0.63x - 0.36 0.9975	0.02 0.27	0.63 ± 0.05	5.0 // 2.1	0.4 // 0.7	6.0 // 0.8	3.1 // 1.2	0.7	2.3
Terbutaline (T2)		0.62x - 0.26 0.9974	0.01 0.21	0.62 ± 0.03	4.9 // 1.8	0.2 // 1.0	6.5 // 0.9	4.4 // 1.3		
Econazole (E1)	3-15	0.49x - 0.49 0.9961	0.02 0.62	0.49 ± 0.06	6.0 // 2.5	2.0 // 1.3	16.1 // 3.5	6.2 // 2.5	1.5	5.0
Econazole (E2)		0.48x - 0.52 0.9950	0.02 0.62	0.48 ± 0.06	5.1 // 2.3	2.0 // 1.4	17.0 // 3.8	5.2 // 2.7		
Propranolol (P1)	1-20	0.49x - 0.08 0.9960	0.01 0.04	0.49 ± 0.03	5.1 // 2.7	2.0 // 1.8	13.9 // 2.2	2.2 // 5.5	0.4	1.3
Propranolol (P2)		0.49x - 0.04 0.9967	0.02 0.04	0.49 ± 0.05	8.0 // 2.9	2.4 // 1.5	12.5 // 2.2	1.4 // 5.7		
Verapamil (V1)	2-15	0.68x - 0.07 0.9952	0.04 0.20	0.68 ± 0.09	5.2 // 2.4	2.7 // 1.8	11.1 // 1.2	8.8 // 3.0	0.6	2.0
Verapamil (V2)		0.68x - 0.06 0.9925	0.04 0.14	0.68 ± 0.10	5.2 // 2.6	3.0 // 1.6	17.0 // 1.2	8.5 // 3.0		
Metoprolol (M1)	2.5-12	0.60x - 0.08 0.9974	0.07 0.16	0.60 ± 0.19	8.8 // 3.3	3.0 // 2.1	10.0 // 1.0	4.5 // 1.7	0.7	2.3
Metoprolol (M2)		0.61x - 0.07 0.9961	0.07 0.21	0.61 ± 0.19	4.6 // 3.4	1.0 // 2.2	9.2 // 1.1	6.8 // 1.7		
Betaxolol (B1)	2.5-12	0.56x - 0.18 0.9980	0.02 0.06	0.56 ± 0.06	5.8 // 3.3	2.0 // 2.2	6.8 // 4.5	2.0 // 1.8	0.8	2.6
Betaxolol (B2)		0.56x - 0.13 0.9966	0.05 0.12	0.56 ± 0.14	5.0 // 3.3	2.0 // 2.1	8.1 // 4.6	1.5 // 1.8		

a: intercept. b: slope. Sa: intercept standard deviation. Sb: slope standard deviation. Confidence interval at 95% as confidence level (n = 6). E1: first-migrating enantiomer. E2: second-migrating enantiomer. Ac: corrected area. Tm: migration time. LOD: instrumental limit of detection. LOQ: instrumental limit of quantitation. Low and high concentration levels respectively, for each enantiomer (mg/L): Duloxetine (1 and 15), Terbutaline (2 and 25), Econazole (3 and 15), Propranolol (1 and 20), Verapamil (2 and 15), Metoprolol (2.5 and 12) and Betaxolol (2.5 and 12). Experimental conditions as in **Figure 3**.

**Table 2** shows the analytical characteristics of the developed CE method for the simultaneous enantiomeric determination of seven drugs. Linearity was determined by plotting the corrected peak area as a function of the enantiomer concentration for each compound with a total of six standard solutions injected by triplicate. In all cases  $R^2$  values were  $\geq 0.993$ , being this procedure repeated during three different days. Linear equations were expressed according to a confidence range taking into account the mean value of slope and its statistical error at 95 % confidence level. Results expressed very low error values and an acceptable linearity. Instrumental LODs and LOQs were calculated considering 3 and 10 times the S/N ratio, respectively. LODs were experimentally tested and when differing from the calculated ones, the experimental values were considered and included in **Table 2**. LODs ranged from 0.4 to 1.5 mg/L and LOQs from 1.3 to 5.0 mg/L. Precision of the method was evaluated in terms of instrumental repeatability and intermediate precision. The first one was determined from nine repeated injections of a standard solution in Milli-Q water at low and high concentration levels (1 and 15 mg/L for duloxetine; 2 and 25 mg/L for terbutaline; 3 and 15 mg/L for econazole; 1 and 20 mg/L for propranolol; 2 and 15 mg/L for verapamil; 2.5 and 12 mg/L for metoprolol; 2.5 and 12 mg/L for betaxolol) without employing the SPE procedure, that is, directly injecting the standard solutions in the CE system. RSD values (%) were lower than 8.8 % for corrected peak areas and 3.4 % for migration times at both concentration levels, respectively. Intermediate precision was determined also at the above-mentioned concentration levels for three consecutive days by injecting each standard solution by triplicate each day, with RSD values ranging from 1.4 to 17.0 % for corrected peak areas and from 0.8 to 5.7 % for migration times.

Accuracy was evaluated as recovery values obtained for spiked wastewater samples 1 and 2 (pH near to 7.5), at low and high concentration levels

( $\mu\text{g/L}$ ) (**Table 3**). Since drugs analyzed were not detected in these wastewater samples, they were spiked at a concentration so that after SPE preconcentration process, analytes were detected and quantified just beyond their LOD and LOQ. As observed in **Table 3**, accuracy was acceptable (with similar results at both concentration levels) with values for wastewater 1 (influent water) from 73.9 to 102.9 % and for wastewater 2 (effluent water) from 81.8 to 100.9 % except for econazole for which recovery values for both wastewater samples were the lowest and ranged from 58.5 to 67.0 % (wastewater 1) and from 64.8 and 72.4 % (wastewater 2). Additionally, recovery values were calculated for spiked effluent wastewater with pH 9.0 (wastewater sample 3) obtaining values from 75.8 to 102.3 % for all drugs except for econazole (with recoveries ranging from 66.8 to 69.9 %) (**Table S3**, supplementary material). These results were similar to those obtained for wastewater samples at pH near to 7.5 (wastewater samples 1 and 2). The lower recovery obtained for econazole at both pH values (7.5 and 9.0) could be related with the fact that econazole has the lowest pKa value (6.7) among all the compounds studied so at pH 7.5 and 9.0 it is a neutral compound while the other drugs studied can be positively charged (pH 7.5) or be partially ionized (pH 9.0) and they could increase their interactions with the sorbent through electrostatic forces with the negatively charged silanol groups that remain in the material.

**Table S2** (supplementary material) groups the preconcentration factors (PFs) reported previously for the drugs studied in this work from water samples when other commercial and non-commercial SPE sorbents were used and the concentrations found for these drugs in some water samples around the world [2, 44-62].

**Table 3.** Recovery values and method limits of detection and quantification obtained for the drugs studied from spiked wastewater samples 1 and 2 using 100 mg PMO-TESEB-1 sorbent and 200 mL sample volume (n = 6).

Analyte	Water sample 1					Water sample 2				
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	MDL/ MQL (µg/L)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	MDL/ MQL (µg/L)
	Low concentration		High concentration			Low concentration		High concentration		
Duloxetine (D1)	98.4	4.4	102.9	2.0	2.4 / 8.0	99.3	3.3	81.8	4.2	1.7 / 5.8
Duloxetine (D2)	97.1	2.3	98.9	2.2	2.4 / 7.8	98.0	2.5	84.4	2.0	1.8 / 5.9
Terbutaline (T1)	ND	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-
Terbutaline (T2)	ND	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	-
Econazole (E1)	61.5	3.7	61.0	1.3	6.3 / 21.1	64.8	12.7	70.8	3.4	5.8 / 18.3
Econazole (E2)	58.5	4.1	67.0	1.4	6.6 / 21.9	65.2	13.3	72.4	1.7	5.9 / 19.5
Propranolol (P1)	92.2	4.0	80.1	1.7	1.9 / 6.2	97.4	6.5	90.8	2.9	1.9 / 6.3
Propranolol (P2)	97.1	4.6	79.7	1.2	2.0 / 6.6	85.4	4.6	89.7	1.6	1.7 / 5.6
Verapamil (V1)	75.9	1.6	81.5	1.9	2.4 / 7.9	100.9	3.5	87.7	1.8	2.9 / 9.8
Verapamil (V2)	73.9	6.1	84.3	3.7	2.5 / 8.3	98.0	4.4	89.8	2.3	3.0 / 10.1
Metoprolol (M1)	101.3	1.7	88.6	3.4	3.7 / 12.4	94.0	4.8	95.6	2.3	4.6 / 15.3
Metoprolol (M2)	99.7	2.5	86.4	3.0	3.5 / 11.8	92.5	4.9	96.1	1.9	5.1 / 16.8
Betaxolol (B1)	88.9	4.6	82.7	1.9	3.3 / 11.1	89.6	1.9	84.6	2.1	4.3 / 14.5
Betaxolol (B2)	87.8	3.8	85.1	4.3	3.2 / 10.6	93.4	2.8	90.9	0.7	4.4 / 14.6

Water sample 1: influent water treatment plant of Sevilla; Water sample 2: effluent water treatment plant of Sevilla. MDL: method limit of detection; MQL: method limit of quantitation. Concentration levels for each enantiomer (µg/L): Duloxetine (2.5 and 37.5), Terbutaline (5.0 and 62.5), Econazole (7.5 and 37.5), Propranolol (2.5 and 50), Verapamil (5 and 37.5), Metoprolol (6.25 and 30) and Betaxolol (6.25 and 30). Experimental conditions as in **Figure 3**.

Different types of materials have been employed, such as commercial Oasis HLB [44-46, 53-56], Oasis MCX [47, 48, 57, 58], MIP4SPE [49], SupelMIP [50], MWCNTs [60] or mesoporous non-commercial, SBA-15-C<sub>18</sub> [2] and MCM-41 [59]. Commercial sorbents provided lower PFs than that obtained in this work except for Oasis MCX [47, 57] (recovery values =40-85 % for propranolol and metoprolol with PF 2000 ( surface water) and 71-87 % for metoprolol with PF 500 (river and wastewater samples), and Oasis HLB [53] (recovery 81-103 % for metoprolol with PF 2000 (wastewater sample)). However, mesoporous non-commercial materials SBA-15-C<sub>18</sub> and MCM-41 provided lower PF values (100-300) in tap, river or ground water samples with similar recovery values for propranolol [2], metoprolol [2, 59] and betaxolol [59] (77-118 %). Comparing these results with those obtained in this article, a multiple recovery has been achieved for six analytes in a mixture (excluding terbutaline) in spiked wastewaters with acceptable results in a range from 80 to 100 % and a PF of 400, depending on the physical-chemical characteristics of both, drugs and sorbents.

MDLs and MQLs were calculated considering 3 and 10 times the S/N ratio, respectively, estimated from the lowest concentration level of spiked wastewater samples (samples were spiked before SPE treatment) and applying the corresponding PF of the SPE process. Values for MDLs ranged from 1.9 to 6.6 µg/L and from 1.7 to 5.9 µg/L for wastewater samples 1 and 2, respectively, and values from 6.2 to 21.9 µg/L and 5.6 to 19.5 µg/L for MQLs for the same wastewater samples, respectively (**Table 3**). These values of MQLs can enable the determination of the drugs studied in wastewater samples since higher concentrations were found in some wastewater samples around the world. In fact, as shown in **Table S2** in supplementary material, propranolol can be found in water samples at levels ranging from pg/L to 6.5 µg/L [46], 37.5 µg/L [51] or 603 µg/L [52] (MQLs obtained in this work for its enantiomers range from 5.6 to 6.6

$\mu\text{g/L}$ ); metoprolol can be found in water samples at levels ranging from  $\text{pg/L}$  to  $26 \mu\text{g/L}$  [62] or  $950 \mu\text{g/L}$  [61] (MQLs obtained in this work for its enantiomers range from  $11.8$  and  $16.8 \mu\text{g/L}$ ); and econazole can be found in water samples at levels ranging from  $1.2$  to  $28 \mu\text{g/L}$  [52] (MQLs obtained in this work for its enantiomers range from  $18.3$  and  $21.9 \mu\text{g/L}$ ).

**Fig. 3B and 3C** show the electropherograms corresponding to wastewater sample 1 (**Fig. 3B**) and to the same sample spiked (before SPE treatment) at the  $\mu\text{g/L}$  level with racemic standards of the seven drugs studied in this work (**Fig. 3C**) using in both cases a SPE treatment with  $100 \text{ mg}$  of PMO-TESB-1 sorbent,  $200 \text{ mL}$  of sample volume and elution with  $2 \times 4 \text{ mL MeOH}$ . No peaks were observed in the electropherogram corresponding to wastewater sample 1 (**Fig. 3B**) indicating that the drugs studied were not present in the sample or were present below the method detection limits grouped in **Table 3**. **Fig. 3C** shows that only the peaks corresponding to the enantiomers of six of the seven drugs could be observed since terbutaline showed low recoveries as above-mentioned. Peaks corresponding to  $2.5 \mu\text{g/L}$  duloxetine and propranolol,  $5 \mu\text{g/L}$  verapamil, and  $6.2 \mu\text{g/L}$  metoprolol and betaxolol can be observed in this Figure, concentrations that correspond to those found in some cases in wastewater samples (**Table S2** in supplementary material).

#### 4. Conclusions

Two novel materials based on mesoporous organosilica with neutral phenylene-bridged ligand, 1,4-bis(trimethoxysilyl)ethyl)benzene, were synthesized in this work, one of them using tetraethyl orthosilicate as additional silica source. A third material was also synthesized with 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene ligand which use has scarcely been reported

previously. The material with 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene ligand was found to be the best sorbent for the off-line solid-phase extraction of seven common drugs with different pharmacological activities. However, interesting characteristics with good recovery values were also shown by 1,4-bis(trimethoxysilylethyl)benzene mesoporous organosilica materials, especially that synthesized without additional silica source. Optimized conditions for SPE with 1,4-bis(triethoxysilyl)benzene enabled preconcentration factors of 400 with 100 mg sorbent and 200 mL solution allowing high recovery values for the drugs studied from spiked wastewater samples from treatment plants except for terbutaline and enabling method quantitation limits from 5.6 to 21.9 µg/L using CE for the simultaneous enantiomeric separation of the six drugs in 16 min. The results presented in this article show the potential of the use of periodic mesoporous organosilica materials as sorbents for off-line SPE prior to CE separation in the simultaneous chiral analysis of drugs from water samples.

## **Acknowledgments**

Authors thank the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) for research project CTQ2013-48740-P. J.V.T also thanks this Ministry for his pre-doctoral contract (BES-2014-070532). The Research Support Center for Chemistry (University of Alcalá) is gratefully acknowledged for the availability of CE equipment for sample analysis.

## **5. References**

[1] X. Wang, Y. Sun, K. Sun, Y. Ding, R. Yuan, Separation and pharmacology of chiral compounds in traditional chinese medicine, *Anal. Lett.* 50 (2017) 33-49.

- [2] M. Silva, S. Morante-Zarcelo, D. Perez-Quintanilla, M.L. Marina, I. Sierra, Preconcentration of  $\beta$ -blockers using functionalized ordered mesoporous silica as sorbent for SPE and their determination in waters by chiral CE, *Electrophoresis* 38 (2017) 1905-1912.
- [3] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, J. Gan, Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes, *Water Res.* 124 (2017) 527-542.
- [4] EU. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000, Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. *Off J L* 2000;327:1-73. [22.12.2000].
- [5] J.M Saz, M.L. Marina, Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 79-94.
- [6] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Eds., *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [7] H. Zhou, Q. Zhang, X. Wang, Q. Zhang, L. Ma. Y. Zhan, Systematic screening of common wastewater-making pharmaceuticals in urban aquatic environments: implications for environmental risk control, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 7113-7129.
- [8] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerda, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 641-654.



- [9] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerda, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part II). *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655–667.
- [10] T. Asefa, M. MacLachlan, N. Coombs, G. Ozin, Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls, *Nature* 402 (1999) 867–871.
- [11] Y. Wei, X. Li, R. Zhang, Y. Liu, W. Wang, Y. Ling, A.M. El-Toni, D. Zhao, Periodic mesoporous organosilica nanocubes with ultrahigh surface areas for efficient CO<sub>2</sub> adsorption, *Sci. Rep.* 6:20769 (2016).
- [12] D. Perez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Preparation and characterization of mesoporous silicas modified with chiral selectors as stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 14–23.
- [13] H. Wu, C. Liao, Y. Pan, C. Yeh, H. Kao, Synthesis and characterization of cubic thiol-functionalized periodic mesoporous organosilicas as effective mercury ion adsorbents, *Microporous Mesoporous Mater.* 119 (2009) 109–116.
- [14] D. Esquivel, E. De Canck, C. Jimenez-Sanchidrian, F.J. Romero-Salguero, P. Van der Voort, Pyrrole PMOs incorporating new N-heterocyclic compounds on an ethene-PMO through Diels-Alder reactions, *Mater. Chem. Phys.* 148 (2014) 403–410.
- [15] M. Imamoglu, D. Perez-Quintanilla, I. Sierra, Bifunctional periodic mesoporous organosilicas with sulfide bridges as effective sorbents for Hg(II) extraction from environmental and drinking waters, *Microporous Mesoporous Mater.* 229 (2016) 90–97.

- [16] C. Sanchez, F. Jeremias, S. Ernst, S.K. Henninger, Synthesis, functionalization and evaluation of ethylene-bridged PMOs as adsorbents for sorption dehumidification and cooling systems, *Microporous Mesoporous Mater.* 244 (2017) 151-157.
- [17] M.A. Wahab, J.N. Beltramini, Recent advances in hybrid periodic mesostructured organosilica materials: opportunities from fundamental to biomedical applications, *Rsc Adv.* 5 (2015) 79129-79151.
- [18] M. Gao, S. Han, Y. Hu, L. Zhang, Enhanced fluorescence in tetraylnitrilomethyldiyne-hexaphenyl derivative-functionalized periodic mesoporous organosilicas for sensitive detection of copper(II), *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 9299-9307.
- [19] R. Vathyam, E. Wondimu, S. Das. Ch. Zhang, S. hayes, Z. Tao, T. Asefa, Improving the adsorption and release capacity of organic-functionalized mesoporous materials to drug molecules with temperature and synthetic methods, *J. Phys. Chem. C* 115 (2011) 13135-13150.
- [20] M.A.O. Lourenco, P. Figueira, E. Pereira, J.R.B. Gomes, C.B. Lopes, P. Ferreira, Simple, mono and bifunctional periodic mesoporous organosilicas for removal of priority hazardous substances from water: The case of mercury(II), *Chem. Eng. J.* 322 (2017) 263-274.
- [21] P. Figueira, M.A.O. Lourenco, E. Pereira, J.R.B. Gomes, P. Ferreira, C.B. Lopes, Periodic mesoporous organic with low thiol density - a safer material to Hg(II) from water, *J. Environ. Chem. Eng.* 5 (2017) 5043-5053.
- [22] R. He, W. li, D. deng, W. Chen, H. Li, Ch. Wei, Y. Tang, Efficient removal of lead from highly acidic wastewater by periodic ion imprinted mesoporous SBA-

15 organosilica combining metal coordination and co-condensation. *J. Mater. Chem. A* 3 (2015) 9789-9798.

[23] J. Wan, K. Qian, J. Zhang, F. Liu, Y. Wang, P. Yang, B. Liu, Ch. Yu, Functionalized periodic mesoporous organosilicas for enhanced and selective peptide enrichment, *Langmuir* 26 (2010) 7444-7450.

[24] K. Qian, L. Zhou, J. Zhang, Ch. Lei, Ch. Yu, A combo-pore approach for the programmable extraction of peptides/proteins, *Nanoscale* 6 (2014) 5121-5125.

[25] M.M. Abolghasemi, B. Karimi, V. Yousefi, Periodic mesoporous organosilica with ionic liquid framework as a novel fiber coating for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 280-286.

[26] K. Sing, D. Everett, R. Haul, L. Moscou, R. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, Reporting physisorption data for gas solid systems with special reference to the determination of surface-area and porosity (Recommendations 1984), *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603-619.

[27] Y. Ji, L. Black, R. Koester, M. Janek, Hydrophobic coagulation and aggregation of hematite particles with sodium dodecylsulfate, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 298 (2007) 235-244.

[28] M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari, Relations between pore structure parameters and their implications for characterization of MCM-41 using gas adsorption and X-ray diffraction, *Chem. Mater.* 11 (1999) 492-500.

[29] A. Carpio, D. Esquivel, L. Arce, F.J. Rornero-Salguero, P. Van der Voort, C. Jimenez-Sanchidrian, M. Valcarcel, Evaluation of phenylene-bridged periodic

mesoporous organosilica as a stationary phase for solid phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1370 (2014) 25-32.

[30] D. Esquivel, C. Jimenez-Sanchidrian, F.J. Romero-Salguero, Thermal behaviour, sulfonation and catalytic activity of phenylene-bridged periodic mesoporous organosilicas, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 724-733.

[31] D. Perez-Quintanilla, A. Sanchez, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra, Synthesis and characterization of novel mesoporous silicas of the MSU-X family for environmental applications, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9 (2009) 4901-4909.

[32] D. Perez-Quintanilla, A. Sanchez, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra, Functionalized HMS mesoporous silica as solid phase extractant for Pb(II) prior to its determination by flame atomic absorption spectrometry, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1556-1567.

[33] M.A.O. Lourenco, J.R.B. Gomes, P. Ferreira, Optimization of the time and temperature of the microwave-assisted amination of phenylene-PMO, *Rsc Adv.* 5 (2015) 9208-9216.

[34] D. Perez-Quintanilla, I. del Hierro, M. Fajardo, I. Sierra, Adsorption of cadmium(II) from aqueous media onto a mesoporous silica chemically modified with 2-mercaptopyrimidine, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 1757-1764.

[35] M. Kapoor, N. Setoyama, Q. Yang, M. Ohashi, S. Inagaki, Oligomeric polymer surfactant driven self-assembly of phenylene-bridged mesoporous materials and their physicochemical properties, *Langmuir* 21 (2005) 443-449.

[36] Y. Wu, H. Lee, S. Li, High-performance chiral separation of fourteen triazole fungicides by sulfated  $\beta$ -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 171-179.

- [37] L. Liu, M. Nussbaum, Systematic screening approach for chiral separations of basic compounds by capillary electrophoresis with modified cyclodextrins, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 679-694.
- [38] M. Vescina, A. Fermier, Y. Guo, Comparing cyclodextrin derivatives as chiral selectors for enantiomeric separation in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 973 (2002) 187-196.
- [39] G. Yang, D. Chen, Y. Yang, B. Tang, J. Gao, H. Aboul-Enein, B. Koppenhoefer, Enantioseparation of some clinically used drugs by capillary electrophoresis using sulfated  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector, *Chromatographia* 62 (2005) 441-445.
- [40] F. Wang, M. Khaledi, Non-aqueous capillary electrophoresis chiral separations with sulfated  $\beta$ -cyclodextrin, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 187-197.
- [41] M. Ye, H. Zou, Z. Lei, R. Wu, Z. Liu, J. Ni, Enantiomer separation by strong anion-exchange capillary electrochromatography with dynamically modified sulfated  $\beta$ -cyclodextrin, *Electrophoresis* 22 (2001) 518-525.
- [42] N. Matthijs, S. Van Hemelryck, M. Maftouh, D. Massart, Y. Vander Heyden, Electrophoretic separation strategy for chiral pharmaceuticals using highly-sulfated and neutral cyclodextrins based dual selector systems, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 247-263.
- [43] [26] A. Stalcup, K. Gahm, Application of sulfated cyclodextrins to chiral separations by capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1360-1368.
- [44] M. Papageorgiou, C. Kosma, D. Lambropoulou, Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals

and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece, *Sci. Total Environ.* 543 (2016) 547-569.

[45] A. Svan, M. Hedeland, T. Arvidsson, J.T. Jasper, D.L. Sadlak, C.E. Pettersson, Rapid chiral separation of atenolol, metoprolol, propranolol and the zwitterionic metoprolol acid using supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry - Application to wetland microcosms, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 251-258.

[46] M.J. Gómez, O. Malato, I. Ferrer, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 718-729.

[47] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy, Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132-145.

[48] A.A. Salem, I.A. Wasfi, S.S. Al-Nassibi, Trace determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta_2$ -agonists in distilled and waste-waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction, *J. Chromatogr. B* 908 (2012) 27-38.

[49] M. Gros, T.M. Pizzolato, M. Petrovic, M.J.L. de Alda, D. Barceló, Trace level determination of  $\beta$ -blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 374-384.

- [50] S. Morante-Zarcelo, I. Sierra, Comparative HPLC methods for  $\beta$ -blockers separation using different types of chiral stationary phases in normal phase and polar organic phase elution modes. Analysis of propranolol enantiomers in natural waters, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62 (2012) 33-41.
- [51] A. Mendoza, J. Aceña, S. Pérez, M.L. de Alda, D. Barceló, A. Gil, Y. Valcárcel, Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard, *Environ. Res.* 140 (2015) 225-241.
- [52] Y. Perrodin, B. Christine, B. Sylvie, D. Alain, B.K. Jean-Luc, C.O. Cécile, R. Audrey, B. Elodie, *A priori* assessment of ecotoxicological risks linked to building a hospital, *Chemosphere*, 90 (2013) 1037-1046.
- [53] V.K.H. Barclay, N.L. Tyrefors, I.M. Johansson, C.E. Pettersson, Chiral analysis of metoprolol and two of its metabolites, alpha-hydroxymetoprolol and deaminated metoprolol, in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 208-217.
- [54] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, W. Simons, L. Bervoets, R. Blust, P.G. Jorens, H. Neels, A. Covaci, Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 2211-2222.
- [55] X. Yuan, Z. Qiang, W. Ben, B. Zhu, J. Liu, Rapid detection of multiple class pharmaceuticals in both municipal wastewater and sludge with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Environ. Sci.* 26 (2014) 1949-1959.

[56] R. Grabic, J. Fick, R.H. Lindberg, G. Fedorova, M. Tysklind, Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry, *Talanta* 100 (2012) 183-195.

[57] N.A. Al-Odaini, M.P. Zakaria, M.I. Yaziz, S. Surif, Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6791-6806.

[58] M.M. Galera, P.P. Vazquez, M.M.P. Vazquez, M.D.G. Garcia, C.F. Amate, Analysis of beta-blockers in groundwater using large-volume injection coupled-column reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1796-1804.

[59] S. Dahane, M. Martinez Galera, M.E. Marchionni, M.M. Socias Viciano, A. Dourdour, M.D. Gil Garcia, Mesoporous silica based MCM-41 as solid-phase extraction sorbent combined with micro-liquid chromatography-quadrupole-mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals in waters, *Talanta* 152 (2016) 378-391.

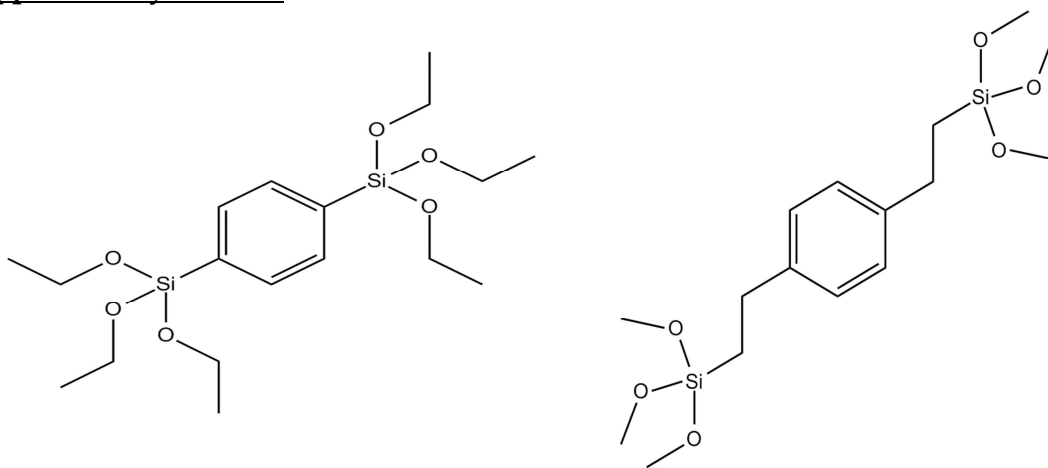
[60] S. Dahane, M.D.G. García, M.J.M. Bueno, A.U. Moreno, M.M. Galera, A. Dourdour, Determination of drugs in river and wastewaters using solid-phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 17-28.



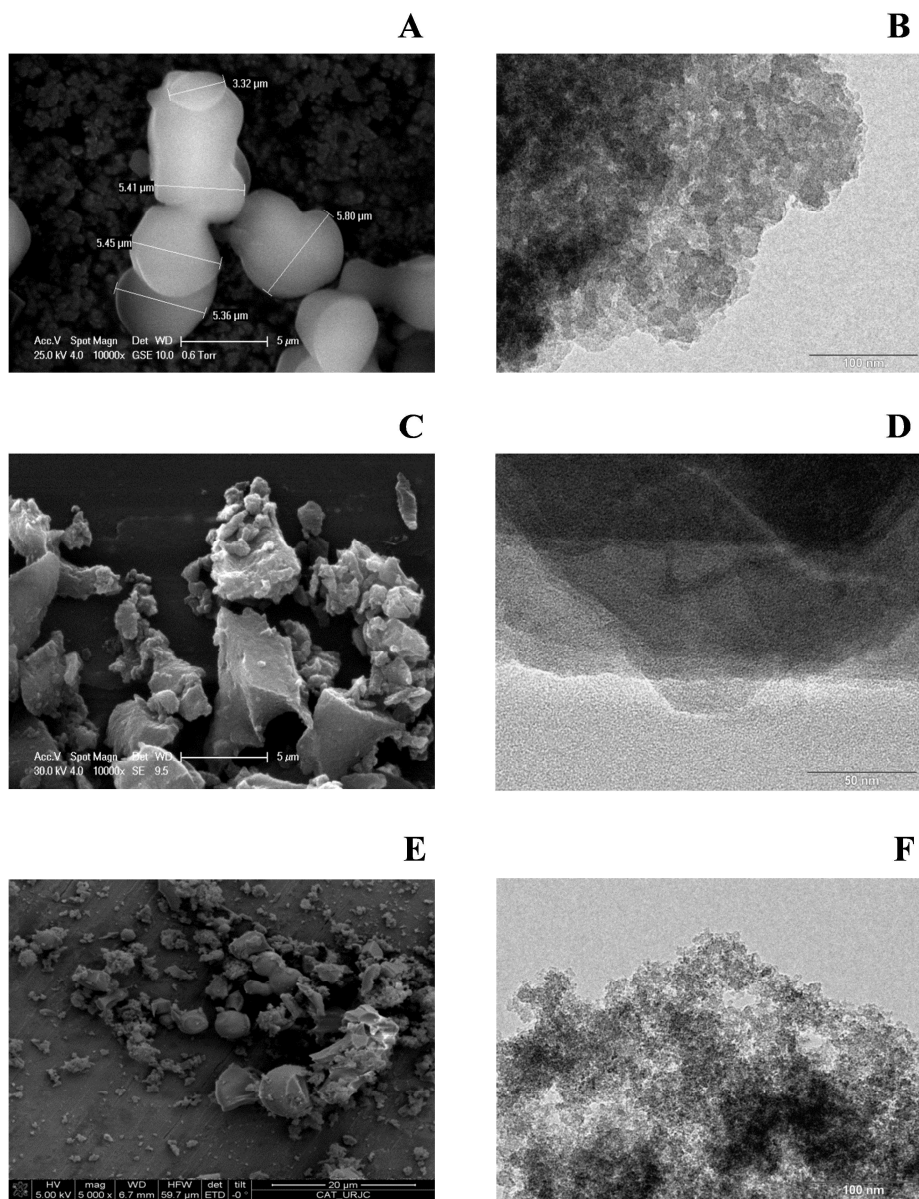
[61] P.K. Mutiyar, A.K. Mittal, Risk assessment of antibiotic residues in different water matrices in India: key issues and challenges, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 7723-7736.

[62] M. Al Aukidy, P. Verlicchi, N. Voulvoulis, A framework for the assessment of the environmental risk posed by pharmaceuticals originating from hospital effluents, *Sci. Total Environ.* 493 (2014) 54-64.

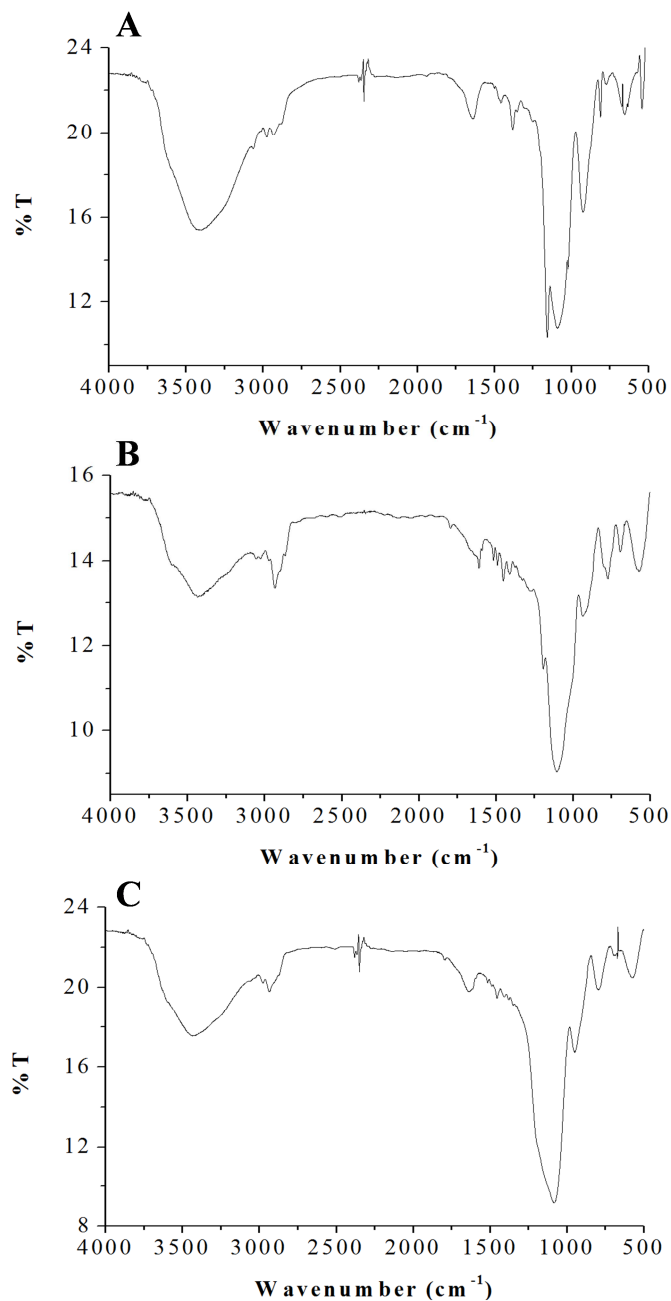
### **Supplementary material**



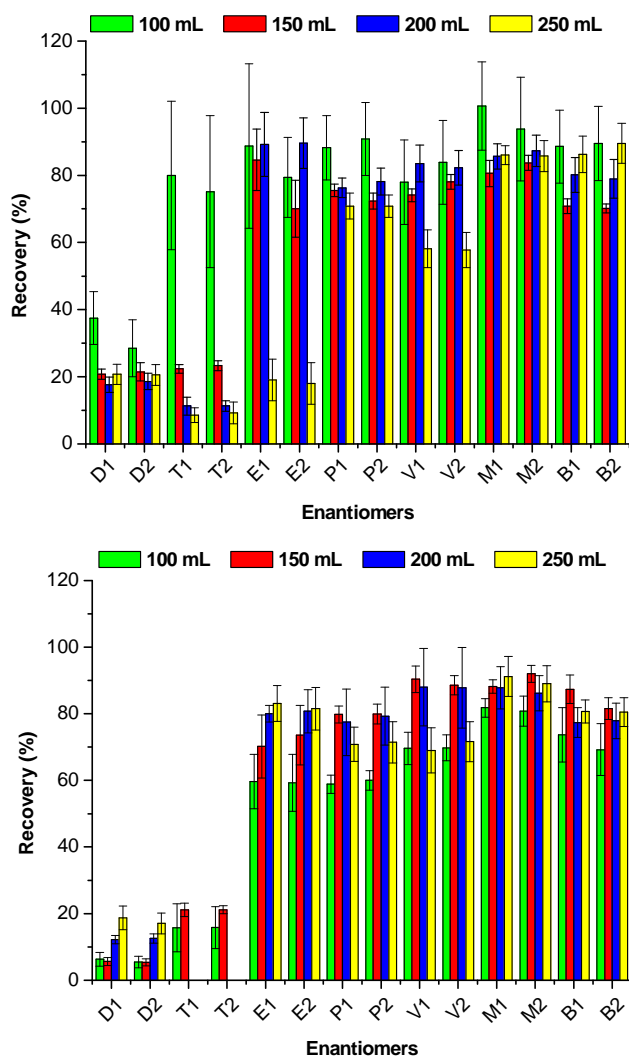
**Figure S1.** Ligands used for PMOs synthesis: TESB (left) and TMSEB (right).



**Figure S2.** SEM micrographs (A, C, E) and TEM pictures (B, D, F) for PMO-TESB-1, PMO-TMSEB-1, PMO-TMSEB-2, respectively.



**Figure S3.** FTIR spectra of PMOs synthesized, PMO-TESB-1 (A), PMO-TMSEB-1 (B) and PMO-TMSEB-2 (C).



**Figure S4.** Recovery percentages and error bars obtained for each enantiomer of the drugs studied as a function of the breakthrough volume loaded in the cartridges ( $n = 6$ ) at 100, 150, 200 and 250 mL of a standard solution of racemic drugs. (A) 100 mg PMO-TMSEB-1, (B) 200 mg PMO-TMSEB-2. An amount of 10  $\mu\text{g}$  for terbutaline and econazole and of 5  $\mu\text{g}$  for the other drugs was present in the different volumes of solution tested. D: Duloxetine; T: Terbutaline; E: Econazole; P: Propranolol; V: Verapamil; M: Metoprolol; B: Betaxolol; 1: First-migrating enantiomer; 2: Second-migrating enantiomer. Other conditions as in Figure 3.

**Table S1.** Comparison between the recovery percentages using PMO-TESB-1 and Van der Waals force for each drug.

Analyte	Recovery (%) <sup>(*)</sup>	Van der Waals force (Kcal/mol)
Terbutaline	30	7.4
Duloxetine	83	17.6
Econazole	92	19.4
Propranolol	95	18.9
Verapamil	97	38.1
Metoprolol	101	17.8
Betaxolol	97	30.6

(\*) Recovery values for the drugs studied expressed as the mean of the values obtained for both enantiomers employing PMO-TESB-1 with 100 mg and a standard solution volume of 100 mL and elution with 2 x4 mL MeOH.

**Table S2.** Preconcentration factors reported for the drugs studied using other commercial and non-commercial materials for their SPE extraction from water samples and concentrations found for these drugs in some water samples around the world.

Analyte	Sorbent	Recovery (%)	PF	Sample	Quantified concentration	Technique	Ref.
<b>Propranolol</b>	SBA-15-C <sub>18</sub>	86-114	300	Tap, river and ground water	6,7-333 µg/L (spiked)	CE-UV*	[2]
		75-89	300	Wastewater	21.8-67.7 ng/L	LC-MS/MS	[44]
	Oasis HLB	65-80	40	Wetland	1 µg/L	SFC-MS*	[45]
		100	91	Wastewater	0.2 - 6.5 µg/L	LC-TOF-MS	[46]
	Oasis MCX	40-69	2000	Surface water	5-7 ng/L	UPLC-MS/MS	[47]
		80	200	Wastewater	1.79-370.7 pg/L	LC-ESI-MS/MS	[48]
	MIP4SPE	60-112	25	Wastewater	74-144 ng/L	LC-MS/MS	[49]
	SupelMIP	97-109	100	River water	0.4 µg/L	HPLC-UV*	[50]
	-	-	-	Wastewater	15.5-37.5 µg/L	HPLC-MS/MS	[51]
	-	-	Wastewater	30-603 µg/L	LC-MS/MS	[52]	
<b>Metoprolol</b>	SBA-15-C <sub>18</sub>	85-118	300	Tap, river and ground water	6,7-333 µg/L (spiked)	CE-UV*	[2]
		81-103	2000	Wastewater	0.6-1.3 µg/L	HPLC-MS/MS*	[53]
		94-103	100	Wastewater	0.25-1.19 µg/L	HPLC-MS/MS	[54]
	Oasis HLB	75-90	200	Wastewater	0.44 ng/L (spiked)	UPLC-MS/MS	[55]
		99-151	100	Effluent and Surface water	0.55-3.65 µg/L	LC-MS/MS	[56]
		85-94	300	Wastewater	--	LC-MS/MS	[44]
		70-77	40	Wetland	1 µg/L	SFC-MS*	[45]
		55-85	2000	Surface water	7-155 ng/L	UPLC-MS/MS	[47]
	Oasis MCX	71-87	500	River and wastewater	364 ng/L	LC-ESI-MS/MS	[57]
		83	200	Groundwater	0.25 ng/L	LC-TOF-MS	[58]
	90	200	Wastewater	2.94-328.7 pg/L	LC-ESI-MS/MS	[48]	

(Continued)

Analyte	Sorbent	Recovery (%)	PF	Sample	Quantified concentration	Technique	Ref.
<b>Metoprolol</b>	MCM-41	100	100	River water	--	μLC-MS/MS	[59]
	MIP4SPE	40-91	25	Wastewater	0.08-3.05 μg/L	LC-MS/MS	[49]
	MWCNTs	80-87	100	River and wastewater	42 ng/L	LC-MS/MS	[60]
	-	-	-	Wastewater	800-950 μg/L	LC-MS/MS, GC-MS	[61]
	-	-	-	Wastewater	0.018-26 μg/L	LC-MS/MS	[62]
<b>Terbutaline</b>	Oasis HLB	19-38	100	Effluent and Surface water	1.1-5.3 ng/L	LC-MS/MS	[56]
<b>Verapamil</b>	Oasis HLB	99-122	100	Effluent and Surface water	ND	LC-MS/MS	[56]
<b>Duloxetine</b>	Oasis HLB	75-109	300	Wastewater	--	LC-MS/MS	[44]
<b>Betaxolol</b>	MCM-41	77-92	100	River water	26 ng/L	μLC-MS/MS	[59]
	MIP4SPE	60-101	25	Wastewater	--	LC-MS/MS	[49]
	MWCNTs	69-92	100	River and wastewater	--	LC-MS/MS	[60]
<b>Econazole</b>	-	-	-	Wastewater	1.2-28 μg/L	LC-MS/MS	[52]

\* Enantiomeric separation; PF: Pre-concentration factor; UPLC: Ultra Performance Liquid Chromatography; SFC: Supercritical Fluid Chromatography; ESI: Electrospray Ionization; TOF: Time-of-flight; μLC: μ-Liquid Chromatography; MWCNTs: Multiwalled carbon nanotubes.

**Table S3.** Recovery values obtained for the drugs studied in water sample 3 (effluent water sample at pH 9.0) using 100 mg PMO-TESB-1 sorbent and 200 mL sample volume (n = 6).

Analyte	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
	Low concentration		High concentration	
Duloxetine (D1)	96.2	3.0	97.4	2.3
Duloxetine (D2)	102.3	3.3	100.7	2.2
Terbutaline (T1)	ND	-	ND	-
Terbutaline (T2)	ND	-	ND	-
Econazole (E1)	69.9	9.3	66.8	5.2
Econazole (E1)	67.7	7.4	67.4	5.6
Propranolol (P1)	84.3	9.4	91.0	4.2
Propranolol (P2)	85.3	8.6	91.2	5.3
Verapamil (V1)	76.6	8.8	86.3	3.7
Verapamil (V2)	75.8	11.0	89.0	4.1
Metoprolol (M1)	80.7	9.5	99.8	5.2
Metoprolol (M2)	82.5	10.6	100.5	3.0
Betaxolol (B1)	84.3	2.8	91.8	4.5
Betaxolol (B2)	84.0	2.4	92.0	4.0

**Experimental conditions:** BGE: 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) / 2% (w/v) S- $\beta$ -CD, injection: 50 mbar x 10 s, voltage: -20 kV, temperature: 20 °C, capillary: 58.5 cm (50 cm effective length) x 50  $\mu$ m I.D. Concentration levels for each enantiomer ( $\mu$ g/L): Duloxetine (2.5 and 37.5), Terbutaline (5.0 and 62.5), Econazole (7.5 and 37.5), Propranolol (2.5 and 50), Verapamil (5 and 37.5),





## CAPÍTULO V

**DETERMINACIÓN ENANTIOMÉRICA  
SIMULTÁNEA DE UN GRUPO DE HERBICIDAS  
FENOXIÁCIDOS EN AGUAS POR  
CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA PREVIA  
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON NUEVAS  
ORGANOSÍLICES MESOPOROSAS  
SINTETIZADAS CON LIGANDOS CATIONICOS**



## **V.1 Introducción**

La utilización de agroquímicos comerciales quirales como racematos origina la adición al medioambiente del doble de la cantidad necesaria de los mismos en los casos en los que solo uno de los enantiómeros del agroquímico es activo. Por ello, existe una tendencia a la comercialización de los agroquímicos como enantiómeros puros y debe ser una exigencia para la protección del medioambiente, si bien la comercialización de estos productos como racematos es más rentable económicamente por lo que es necesario desarrollar metodologías analíticas que permitan un control de estos productos y de las muestras medioambientales.

Los herbicidas son un tipo de pesticidas muy utilizado en agricultura. En el caso de los herbicidas fenoxiacidos, el enantiómero R es el que posee la actividad herbicida mientras que el enantiómero S puede ser inactivo o tener menor actividad como herbicida que el isómero R. El extensivo uso de los ácidos fenoxialcanoicos como herbicidas ha dado lugar a su presencia en aguas subterráneas que pueden llegar a estar contaminadas con concentraciones de estos compuestos a niveles de  $\mu\text{g/L}$ . La determinación de estos compuestos a estos niveles de concentración puede hacer necesario con frecuencia el empleo de técnicas de preconcentración tales como la SPE.

El desarrollo de nuevos materiales como sorbentes para SPE tiene un gran interés en la actualidad. En este contexto, la síntesis de materiales mesoporosos ha demostrado tener un alto potencial para la extracción y preconcentración de distintos compuestos por SPE [253, 254]. Como se ha comentado en el capítulo I de esta memoria, las PMOs presentan importantes ventajas por su estabilidad y posibilidad de funcionalizar dichos materiales con una amplia variedad de

ligandos que les confieren distintas características de retención frente a compuestos con propiedades variadas.

En este capítulo se presenta el trabajo de investigación desarrollado en esta Tesis Doctoral para llevar a cabo la síntesis de dos nuevas PMOs utilizando ligandos catiónicos y su evaluación como sorbentes para la extracción y preconcentración por SPE de un grupo de herbicidas fenoxiácidos en aguas. Los ligandos catiónicos empleados han sido cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio (PMO-STPA) y bis(3-trietoxisililpropil)amina (PMO-TEPA) con el fin de obtener materiales que permitan trabajar en el modo mixto fase reversa/intercambio aniónico fuerte o intercambio aniónico fuerte, respectivamente.

Dado el enorme potencial de la CE para llevar a cabo separaciones quirales, en este trabajo de investigación se llevó a cabo la separación de los enantiómeros de una mezcla de herbicidas fenoxiácidos con el fin de utilizar el método desarrollado para la evaluación de las organosílices mesoporosas sintetizadas y poder aplicar el método SPE-CE-UV desarrollado a la determinación de dichos compuestos en aguas de río y de depuradora.

Los herbicidas fenoxiácidos estudiados han sido fenoprop, mecoprop, dicloroprop, 4-CPPA, 3-CPPA y 2-PPA. La separación enantiomérica simultánea de estos seis herbicidas fenoxiácidos no se había llevado a cabo en el formato de la CE con anterioridad a este trabajo y su determinación enantiomérica en aguas, como se observa en la Tabla I.3 del capítulo I de esta memoria, no se había realizado excepto en el caso de fenoprop y dicloroprop cuya determinación enantiomérica en aguas por CE únicamente se había descrito en un trabajo [255].

La síntesis de las dos PMOs utilizadas en el trabajo de investigación descrito en este capítulo se realizó durante una estancia en el Departamento de Tecnología Química y Ambiental de la Universidad Rey Juan Carlos (URJC) (Móstoles, España) bajo la dirección de los Dres. Isabel Sierra Alonso, Sonia Morante Zarcero y Damián Pérez Quintanilla, participantes en el proyecto de investigación del MINECO al que se encuentra asociado el contrato predoctoral del autor de esta memoria.

## **V.2 Objetivos**

El objetivo del trabajo de investigación que se presenta en este capítulo ha sido el desarrollo de una nueva metodología analítica para la determinación enantiomérica simultánea de una mezcla de herbicidas fenoxiácidos en aguas por Cromatografía Electrocinética previa extracción y preconcentración de los mismos por SPE utilizando organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos catiónicos.

Con el fin de conseguir este objetivo, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar una metodología analítica por EKC utilizando ciclodextrinas como selectores quirales, que permita la separación simultánea de los 12 enantiómeros de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo.
2. Sintetizar dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas utilizando ligandos catiónicos, cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio (PMO-STPA) y bis(3-trietoxisililpropil)amina (PMO-TEPA), para obtener

materiales que permitan trabajar en el modo mixto fase reversa/intercambio aniónico fuerte o intercambio aniónico fuerte, respectivamente.

3. Caracterizar las PMOs sintetizadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental (EA), RMN de sólidos de <sup>13</sup>C y <sup>29</sup>Si y análisis termogravimétrico (TGA).
4. Evaluar las PMOs sintetizadas para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en aguas por SPE.

### **V.3 Resultados y discusión**

#### **V.3.1 Desarrollo de una metodología analítica por Cromatografía Electrocinética para la separación enantiomérica simultánea de una mezcla de seis herbicidas fenoxiácidos.**

El desarrollo de una metodología analítica por EKC para llevar a cabo la separación enantiomérica simultánea de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo se abordó seleccionando un conjunto de 6 ciclodextrinas neutras como selectores quirales y realizando un screening con las mismas utilizando como medio de separación un tampón formato 50 mM a pH 5.0 al cual los compuestos de interés se encuentran cargados positivamente. Las ciclodextrinas ensayadas de forma individual fueron dos ciclodextrinas nativas,  $\alpha$ -CD y  $\beta$ -CD, y otros cuatro derivados de ciclodextrinas, DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y HP- $\gamma$ -CD, todas ellas a una concentración de 15 mM. Entre todas las ciclodextrinas ensayadas, el empleo de  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y TM- $\beta$ -CD dio lugar a los

mejores resultados mostrando que la  $\beta$ -CD y sus derivados dan lugar a un mayor poder de discriminación quiral para estos compuestos que la  $\alpha$ -CD y derivados de  $\gamma$ -CD, de acuerdo a lo ya descrito con anterioridad para otros compuestos [256]. En efecto,  $\beta$ -CD permitió obtener resoluciones enantioméricas entre 0.7 y 4.4 excepto para dicloroprop, cuyos enantiómeros no se separaron, con un tiempo de análisis de 27.5 min; HP- $\beta$ -CD dio lugar a resoluciones enantioméricas entre 1.4 y 2.7 excepto para fenoprop que no se separó enantioméricamente, con un tiempo de análisis de 27.4 min; y finalmente, TM- $\beta$ -CD originó resoluciones enantioméricas entre 0.8 y 5.2 excepto para 2-PPA, en un tiempo de análisis de 36.7 min.

Con el fin de mejorar la separación enantiomérica obtenida para los fenoxiácidos estudiados, se utilizaron mezclas duales de las tres CDs que habían dado lugar a los mejores resultados, y se mantuvo para cada una de ellas una concentración de 15 mM en el mismo medio de separación. De las tres combinaciones posibles ( $\beta$ -CD+HP- $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD+TM- $\beta$ -CD y HP- $\beta$ -CD+TM- $\beta$ -CD), fue el sistema dual constituido por HP- $\beta$ -CD+TM- $\beta$ -CD el que dio lugar a la separación enantiomérica simultánea de cinco de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados.

A continuación, se investigó el efecto de la concentración de las CDs en la mezcla dual ensayando concentraciones de 10, 15 y 20 mM de cada una. Los resultados obtenidos permitieron observar que para cuatro de los compuestos estudiados (fenoprop, mecoprop, dicloroprop y 4-CPPA), la resolución enantiomérica aumentaba a bajas concentraciones de HP- $\beta$ -CD mientras que para 3-CPPA y 2-PPA su resolución enantiomérica mejoraba a altas concentraciones de TM- $\beta$ -CD. A la vista de estos resultados se seleccionó una mezcla 10 mM en HP- $\beta$ -CD y 20 mM en TM- $\beta$ -CD que permitió llevar a cabo la separación simultánea



de los 12 enantiómeros de los fenoxiácidos estudiados con valores de resolución comprendidos entre 1.1 y 3.0 en un tiempo de análisis inferior a 35 min. El empleo de un tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 dio lugar a una reducción importante del tiempo de análisis a 11 min con resoluciones enantioméricas comprendidas entre 0.6 y 1.7, y el estudio del efecto de la temperatura (15, 20 y 25°C) reveló que a 15°C era posible aumentar la resolución enantiomérica de los compuestos (entre 0.9 y 2.4) aunque en un tiempo algo mayor (16 min). Finalmente, con el fin de incrementar la resolución enantiomérica obtenida para fenoprop, que era la más baja, se probaron mezclas en las cuales la concentración de HP- $\beta$ -CD era de 5 o de 7 mM (5 mM en HP- $\beta$ -CD + 20 mM en TM- $\beta$ -CD y 7 mM en HP- $\beta$ -CD + 20 mM en TM- $\beta$ -CD) observando los mejores resultados a una concentración 7 mM en HP- $\beta$ -CD, a la cual las resoluciones enantioméricas obtenidas estaban comprendidas entre 1.1 y 2.9 en 16 min.

Un incremento en el valor del potencial a 25 kV permitió reducir el tiempo de análisis a 11 min con resoluciones enantioméricas de 2.7 para mecoprop, de 2.0 para dicloroprop, de 1.7 para 4-CPPA, de 1.6 para 2-PPA y de 1.2 para fenoprop y 3-CPPA, si bien en estas condiciones se observó una co-elución parcial entre el enantiómero del mecoprop que eluye en segundo lugar y el enantiómero del dicloroprop que eluye en primer lugar que no impidió la determinación individual de los enantiómeros correspondientes de cada compuesto.

La evaluación de las características analíticas del método desarrollado puso de manifiesto que la linealidad, precisión y exactitud del método eran adecuadas y que los valores de los LODs y LOQs instrumentales estaban comprendidos entre 0.7 y 1.5 mg/L y 2.2 y 5.0 mg/L, respectivamente.

El método desarrollado para separar los 12 enantiómeros de los herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo se aplicó a la evaluación de las dos

organosílices mesoporosas sintetizadas en este trabajo para llevar a cabo su extracción y preconcentración de aguas por SPE.

### **V.3.2 Síntesis de dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas basadas en ligandos catiónicos.**

En este trabajo de investigación se han sintetizado dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas basadas en ligandos catiónicos cuya síntesis no había sido descrita con anterioridad. Los ligandos utilizados han sido cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio (STPA) y bis(3-trietoxisililpropil)amina (TEPA) que han dado lugar a la obtención de materiales que permiten trabajar en el modo mixto fase reversa/intercambio aniónico fuerte o intercambio aniónico fuerte, respectivamente.

En comparación con el empleo de medios ácidos para sintetizar este tipo de materiales, la innovación que se presenta en este trabajo es la utilización de un medio básico. En efecto, en medio ácido no fue posible obtener las organosílices mesoporosas periódicas con los ligandos catiónicos STPA y TEPA. Este resultado podría justificarse si se tiene en cuenta que estos ligandos (que nunca habían sido empleados con anterioridad para la síntesis de PMOs) están cargados positivamente en medio ácido fuerte debido a la presencia de grupos amino en su estructura. Estas cargas positivas en los ligandos podrían dar lugar a repulsiones electrostáticas con los iones del CTAB alterando la correcta formación de las micelas, necesaria para obtener una estructura mesoporosa.

La síntesis de las organosílices mesoporosas se llevó a cabo utilizando en ambos casos TEOS como fuente de sílice. Se disolvió Pluronic 123 y CTAB a las proporciones adecuadas para cada material en una disolución de  $\text{NH}_3$ , agua y

etanol también a proporciones que dependían del tipo de material a sintetizar. Tras agitación, se añadió una mezcla del ligando y TEOS a la proporción adecuada para cada material, se transfirió la disolución a un autoclave y se calentó a 100°C durante 16 h. El precipitado blanco (PMO-TEPA) o naranja (PMO-STPA) se filtró y se lavó con agua Milli-Q y etanol, y se secó a 60°C durante 6 h.

### **V.3.3 Caracterización de las nuevas organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos catiónicos.**

Las dos organosílices mesoporosas sintetizadas con ligandos catiónicos se caracterizaron mediante la realización de isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub>, análisis elemental, SEM, TEM, FTIR y TGA. En el caso del material PMO-STPA se llevó a cabo también su caracterización adicional por RMN de sólidos de <sup>13</sup>C y de <sup>19</sup>Si.

Las isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> para ambos materiales fueron del tipo IV correspondiente a un material mesoporoso de acuerdo con la clasificación de la IUPAC. En el caso de PMO-STPA, además, mostraron la existencia de mesoporos altamente uniformes, aunque podrían estar presentes algunas zonas no-mesoestructuradas amorfas con alguna no uniformidad en la distribución de tamaño de poro. Todo ello compatible con la amplia distribución de tamaño de poro que presenta el material, con la mayoría de poros centrados en 235 Å, lo que podría explicarse por el gran tamaño del ligando STPA. La isoterma también indicó la presencia de mesoestructuras de grandes canales y poros de forma cilíndrica. En el caso del material PMO-TEPA, las isothermas mostraron mesoporos más uniformes que para PMO-STPA lo que se confirma por una distribución de poro más estrecha, con la mayor parte de los poros centrados en 125 Å, lo que está de acuerdo con el menor tamaño del ligando TEPA. También se

confirmó para este material la existencia de mesoestructuras de grandes canales y con poros de forma cilíndrica.

Las micrografías SEM para estos materiales mostraron una morfología no bien definida en la cual pocas partículas son esféricas siendo la mayoría amorfas o con forma de prisma lo que podría explicarse si se tiene en cuenta el tamaño y forma de los ligandos STPA y TEPA y el pH básico empleado en la síntesis, tal y como había sido indicado previamente por otros autores [257, 258]. La dispersión en el tamaño de partícula es bastante grande para ambos materiales (entre 16 y 30  $\mu\text{m}$  para PMO-STPA y entre 12 y 40  $\mu\text{m}$  para PMO-TEPA), siendo el TEPA el ligando que da lugar a mayor tamaño de partícula.

Las imágenes TEM pusieron de manifiesto que ambos materiales poseen una estructura porosa con canales tipo gusano. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en trabajos previos en los que observó que altos ratios de tensioactivo (respecto al contenido total de tensioactivo y fuente de sílice) dan lugar a un ordenamiento de poros no hexagonal [259, 260].

Los espectros FTIR de los dos materiales sintetizados mostraron pautas similares confirmando que el ligando orgánico estaba correctamente introducido en la red del material PMO, hecho también corroborado por análisis elemental que permitió calcular el % de nitrógeno que puso de manifiesto un mayor grado de funcionalización para PMO-TEPA que para PMO-STPA, de acuerdo al mayor volumen del ligando STPA.

La presencia del ligando en la red PMO se corroboró también por TGA que además permitió confirmar la estabilidad térmica de los materiales que se correspondía con la observada en trabajos previos para otras organosílices funcionalizadas [247].

La caracterización adicional de PMO-STPA por RMN de sólidos de  $^{13}\text{C}$  y de  $^{29}\text{Si}$  confirmó la presencia del ligando STPA en el material.

En resumen, la caracterización de las dos nuevas organosílices mesoporosas por distintas técnicas permitió asegurar su funcionalización por los ligandos catiónicos y estudiar su morfología y propiedades.

#### **V.3.4 Evaluación de las organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas con ligandos catiónicos para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en aguas por SPE.**

Una vez sintetizadas y caracterizadas las dos PMOs con ligandos catiónicos, se procedió a su evaluación como sorbentes para la extracción y preconcentración por SPE de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en aguas.

Destacar que el mecanismo de retención para el material PMO-STPA es mixto combinando fase inversa e intercambio iónico debido al grupo estirilmetil que interacciona mediante fuerzas de Van der Waals con el anillo aromático de los fenoxiácidos al tiempo que tiene lugar una interacción iónica entre los grupos carboxilo y los grupos amino cargados positivamente. Sin embargo, para PMO-TEPA, la retención únicamente tiene lugar mediante intercambio aniónico.

Inicialmente se utilizaron cantidades de 100 y 200 mg de sorbente y distintos valores de pH del disolvente de elución (2 x 4 mL de metanol a pH 5.6 o 1.8) cuando se hacían pasar volúmenes de 100 mL de una disolución acuosa standard de los compuestos estudiados a pH 6.3. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que las recuperaciones obtenidas a pH 5.6 para PMO-STPA fueron elevadas tanto cuando se utilizaban 100 mg de sorbente como

cuando la cantidad del mismo era 200 mg. Sin embargo, en el caso de PMO-TEPA las recuperaciones fueron muy bajas cuando se utilizó una cantidad de 100 mg de sorbente (excepto para fenoprop) y mejoraban para 200 mg de sorbente utilizado. La utilización de un pH 1.8 en el disolvente de elución se tradujo en un aumento en las recuperaciones con PMO-TEPA cuando se utilizaba una cantidad de 100 mg de sorbente ya que a este pH el grupo carboxilo de los fenoxiácidos estaba protonado y se reducían las interacciones iónicas con los grupos amino del sorbente. Aun así, las mejores recuperaciones se obtuvieron para PMO-STPA por lo que se seleccionó este material con el fin de optimizar las condiciones de extracción de los compuestos estudiados.

Utilizando 100 mg del material PMO-STPA se investigó el máximo volumen que es posible pasar por el sorbente sin que la recuperación de los analitos se reduzca de modo apreciable. Los volúmenes ensayados fueron 100, 200, 500, 750 y 1000 mL de disolución acuosa estándar de los fenoxiácidos. Las recuperaciones más altas se obtuvieron con un volumen de 750 mL (factor de preconcentración de 1500) lo que puso de manifiesto la capacidad de esta organosílice mesoporosa para preconcentrar los compuestos estudiados.

Los LODs y LOQs del método obtenidos con muestra de agua de río y de depuradora enriquecidas con los herbicidas fenoxiácidos y teniendo en cuenta el factor de preconcentración de 1500 estaban comprendidos entre 0.1 y 4.3  $\mu\text{g/L}$  y entre 0.4 y 14.3  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente y las recuperaciones obtenidas para aguas de río y de depuradora variaron entre 78.3 a 107.5 %.

La comparación de los porcentajes de recuperación y del factor de preconcentración obtenidos para los herbicidas fenoxiácidos con 100 mg del material PMO-STPA como sorbente en SPE con trabajos previos llevados a cabo con otros sorbentes, ha puesto de manifiesto los excelentes resultados obtenidos

con la nueva organosílice mesoporosa sintetizada en este trabajo utilizando una cantidad de material mucho menor de la que usualmente se utiliza para la extracción de los compuestos estudiados por SPE.

Es posible concluir por tanto que la existencia de un mecanismo mixto de fase inversa e intercambio iónico permite incrementar la retención de los herbicidas fenoxiácidos en el material PMO-STPA resultando un material con características ventajosas para llevar a cabo la extracción y preconcentración de dichos compuestos en agua por SPE.

Los resultados obtenidos en este capítulo de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la publicación del siguiente artículo científico:

### **Artículo 3**

*“Cationic amine-bridged periodic mesoporous organosilica materials for off-line solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples prior to their simultaneous enantiomeric determination by capillary electrophoresis”.*

J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M. A. García, I. Sierra, M.L. Marina.

**Journal of Chromatography A** 1566 (2018) 146-157.

### Artículo 3

**“Cationic amine-bridged periodic mesoporous organosilica materials for off-line solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples prior to their simultaneous enantiomeric determination by capillary electrophoresis”**

J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M.A. García, I. Sierra and M.L. Marina

J. Chromatogr. A 1566 (2018) 146-157





## **Abstract**

Two novel materials based on periodic mesoporous organosilica (PMO) with cationic amine-bridged ligands, (styrylmethyl)bis(triethoxysilylpropyl)-ammonium chloride (PMO-STPA) and bis(3-triethoxysilylpropyl)amine (PMO-TEPA), were synthesized in this work to obtain materials with reverse-phase/strong anionic exchange mixed-mode or strong anionic exchange retention mechanism, respectively. The resulting materials were comprehensively characterized and showed functionalization with cationic amine-bridged ligands, and values of surface areas characteristic of mesoporous materials (higher than 100 m<sup>2</sup>/g). These materials were evaluated for the off-line solid-phase extraction (SPE) of a mixture of six phenoxy acid herbicides (fenoprop, mecoprop, dichlorprop, 2-(4-chlorophenoxy)propionic acid (4-CPPA), 2-(3-chlorophenoxy)propionic acid (3-CPPA), 2-phenoxypropionic acid (2-PPA)) from water samples previous to their analysis by CE with diode-array detection using a dual chiral selector system (20 mM of heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -CD (TM- $\beta$ -CD) and 7 mM of (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) dissolved in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) which enabled the simultaneous enantiomeric separation of the six phenoxy acid herbicides in 11 min. SPE parameters were optimized and recoveries obtained for PMO-STPA and PMO-TEPA sorbents were compared. Under the optimized conditions, it was demonstrated that using 100 mg of PMO-STPA sorbent, a maximum preconcentration factor (PF) of 1500 was achieved with 750 mL of standard solution, allowing recoveries between 75.5 and 112.2 %, with good repeatability (RSD =1.9-8.7 %, n= 6). Analytical characteristics of the method were evaluated in terms of precision, linearity and accuracy with method quantitation limits (MQL) between 0.4 and 14.3  $\mu$ g/L. The developed

method was applied to the analysis of river samples and effluents from wastewater treatment plants, with recoveries ranging from 78.3 to 107.5 %.

**Keywords:** Periodic mesoporous organosilica, Cationic amine-bridged ligands, Solid-phase extraction, Capillary electrophoresis, Chiral phenoxy acid herbicides, Simultaneous enantioseparation.

## Highlights

- Two novel PMOs were synthesized for phenoxy acid herbicides solid-phase extraction
- A preconcentration factor of 1500 enabled to detect phenoxy acids at  $\mu\text{g/L}$  levels
- The use of a mixture of two CDs allowed acceptable chiral resolution for herbicides
- The simultaneous enantiomeric separation of six phenoxy acids is obtained in 11 min

## 1. Introduction

Nowadays, many commercial agrochemicals are chiral and about 30 % of them are pesticides with active ingredients containing one or more chiral centers, being herbicides a type of pesticide that is currently among the most commonly used [1]. Some chiral herbicides are sold as pure active stereoisomers, but for economic reasons, many other are still used as racemates, being commonly only one enantiomer active [1]. In the case of phenoxy acid herbicides, the *R*-enantiomer is biologically active [1, 2], whereas the other isomer is inactive or less

active enantiomer, which simply contributes to the chemical load that pollutes the environment. For these reasons, analytical methods are needed to separate the stereoisomers of these compounds and to evaluate the pollution grade.

Phenoxyalkanoic acids are extensively used in agriculture and their behavior in soils is governed by their chemical structures. A filtering process may occur through the soils originating that these herbicides can achieve ground waters which can be polluted at concentrations in the  $\mu\text{g/L}$  levels [3]. As a consequence, it is usually necessary to use a preconcentration process, such as SPE, prior to their analysis, being this technique widely used for sample clean-up.

In recent years, the application of mesostructured materials as new sorbents has considerably increased for sample preparation. These materials present high surface area, well-defined pore size distribution, large pore volume and can be chemically modified with organo-functional groups to obtain functionalized silicas with specific binding sites on their surface, which is potentially useful in those processes where the specific and selective retention of different kinds of compounds is required [4, 5]. Moreover, the preparation for the first time in 1999 of the so-called periodic mesoporous organosilica (PMOs) offered a new family of hybrid mesoporous materials with very interesting surface and mechanical properties [6]. These materials are organic-inorganic hybrid materials that combine the properties of the organic functionality and the chemical stability of the inorganic silica as well as some other desirable characteristics like great surface area. Generally, PMOs are synthesized by the sol-gel method, using bridged organosilane precursors of the type  $(\text{R}'\text{O})_3\text{Si-R-Si}(\text{R}'\text{O})_3$ , as Si source and at the same time as organic moiety in which -R is the organic functional group, and a directing agent [7]. PMOs incorporate the organic functionalities directly into the silica framework, as molecular bridging ligands, in

contrast to other modified mesoporous silicas where the organic groups are pending from the walls. This aspect allows higher degrees of organic functionality and a more homogenous distribution of them through the whole framework. This improves the chemical and thermal properties of the materials and reduces the problems of channel blockage or diffusion of analytes, in comparison with other mesoporous materials functionalized with the post-synthesis method [8]. On the other hand, PMOs can be modified or tuned with different organic moieties (such as methylene, ethylene, ethenylene, phenylene) and other more complex functionalities like thiol, metal complexes, chiral groups, ionic entities or disulfide groups [9, 10]. These organic functionalizations allow the modification and optimization of their hydrophobic/hydrophilic behavior [11] or the ability to form metal complexes, among others [10]. All these properties stated above confer to these materials a wide variety of applications such as catalysis, drug delivery, sensing, adsorption, preparation of stationary phases for chromatography, separation, etc.

PMOs with amine-bridge ligands synthesized in this work present a high interest based on two aspects. First, in PMOs, the ligands are introduced not only in their surface, as happens with the post-synthesis modified materials, but also inside the whole framework of the materials. This fact provides them with bigger amount of active sites, without blocking the pores of the mesoporous material, as could happen with post-synthesis modified materials when bulky ligands are used. Secondly, the use of amine-bridged ligands allows to extract simultaneously a wide range of analytes since these ligands can act as mixed-mode sorbents, so they can interact simultaneously with ionic and neutral species by combining both effective reversed-phase and ion exchange interaction modes. This property can be achieved effectively using amine ligands that allow working with anion exchange or reversed-phase. Depending on the pH of the medium, the amine part

of the ligand will be neutral or positively charged, therefore, this fact can allow reversed-phase/strong anionic exchange mixed-mode retention mechanism, in this way better selectivity for analytes can be reached only modifying the pH of the medium. To the best of our knowledge the ligand employed in this work (styrylmethyl)bis(triethoxysilylpropyl)ammonium chloride (STPA) has been used for the first time in this article to prepare PMOs although PMOs modified with amine bridge ligands have been synthesized and characterized before [12-15]. However, most of the amine ligands employed in PMOs preparation were less bulky and they have been mostly applied in catalyst or heavy metal recovery. In the case of the second ligand used in this work, bis(3-triethoxysilylpropyl)amine (TEPA), it has previously been employed to prepare PMOs used in adsorption studies [16-18] and enzyme immobilization [19, 20] although any application to phenoxy acid analysis was reported.

Different types of SPE sorbents (Table S1 in supplementary material) [21-40] have previously been used in the pre-concentration of some of the phenoxy acids studied in this work from water samples, some commercial such as Oasis HLB [21-25], C18 [26-29] and C18 assisted with CTAB [30,31], LiChrolut EN, LiChroprep RP-18 [32] and SAX Disc [33], and other non-commercial such as polystyrene-divinylbenzene polymer [34], graphitized carbon black (GCB) [35], alumina with SDS and TBA [36], graphene oxide [37], and and molecularly imprinted polymers (MIPs) [38-40] (see Table S1 in supplementary material). Most of the extraction procedures carried out with water samples were focused on fenoprop, mecoprop and dichlorprop, whereas 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA have not been analyzed in none of them.

Among the different analytical techniques enabling the separation of stereoisomers, CE has widely been employed with this aim due to its advantages,

such as simplicity, the use of small volume of reagents and samples, high efficiency and resolution, rapid analysis and a reasonable operating cost which presents a high interest from the economic and environmental viewpoints. The most employed separation mode in chiral CE is Electrokinetic Chromatography (EKC) in which a chiral selector is added to the buffer to allow the separation of enantiomers. A wide range of chiral selectors have been tested, such as cyclodextrins (CDs), proteins, surfactants, antibiotics, polysaccharides, etc, being CDs the most widely used [41,42].

In this article, a simple method of synthesis, with only one step, is described for the preparation of two new PMOs using styrylmethylbis(triethoxysilylpropyl) ammonium chloride (STPA) or bis(3-triethoxysilylpropyl)amine (TEPA) and tetraethylorthosilicate (TEOS) as silica sources. All the materials were thoroughly characterized and evaluated as SPE sorbents for the extraction of six phenoxy acid herbicides (fenoprop, mecoprop, dichlorprop, 2-(4-chlorophenoxy)propionic acid (4-CPPA), 2-(3-chlorophenoxy)propionic acid (3-CPPA), 2-phenoxypropionic acid (2-PPA)) from water samples, before their simultaneous enantiomeric separation and determination by CE with diode array detector (DAD). The effect of the different interactions between sorbents and analytes due to a reverse-phase/strong anionic exchange mixed-mode (PMO-STPA) or strong anionic exchange (PMO-TEPA) retention mechanism on the performance of the extraction was also investigated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Poly(ethylene glycol) (EO20PO70EO20, Pluronic 123), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 98 %, orthophosphoric acid 85 %, sodium hydroxide (NaOH), ammonium formate, formic acid, boric acid and TEOS 98 % were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). TEPA 95 % and STPA 40 % were obtained from ABCR GmbH (Karlsruhe, Germany). Methanol (MeOH), ethanol (EtOH) 99.5 %, hydrochloric acid solution 37 % and ammonia solution (NH<sub>3</sub>) 32 % were obtained from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain).

The employed water was Milli-Q quality (Millipore, Bedford, MA, USA).  $\alpha$ -Cyclodextrin ( $\alpha$ -CD), heptakis (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD) and TM- $\beta$ -CD were bought in Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA);  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) and HP- $\beta$ -CD in Fluka (Buchs, Switzerland); and (2-hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD) was obtained from Cyclolab (Budapest, Hungary).

### 2.2. Standard solutions and water samples

Standard compounds with high purity (> 98 %) were purchased: (R,S)-2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propanoic acid (fenoprop) 97 %, (R,S)-2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid (mecoprop), (R,S)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid (dichlorprop), 4-CPPA and 3-CPPA from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2-PPA from Chem Service (West Chester, USA). Stock standard solutions were prepared in MeOH (in a concentration of 1000 mg/L) and then diluted with Milli-Q water until desired concentration to obtain working solutions, and were stored at 4°C. All solutions were filtered through



0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon membrane filters before analysis. For SPE optimization purposes, an herbicide mixture of fenoprop at a racemic concentration of 5 mg/L, and 10 mg/L for the rest of phenoxy acid herbicides, was analyzed.

Water samples (WS) analyzed in this work were collected through different locations: WS1 was obtained from effluent treatment plant (Cádiz, Spain, pH 7.6), WS2 from an effluent treatment plant (Sevilla, Spain, pH 7.3), and WS3 from Henares river (Alcalá de Henares, Spain, pH 7.8). WS were stored (WS1 and WS3 for one month and WS2 for three months) in glass bottles at 4°C and filtered with 0.45  $\mu\text{m}$  nylon filters before being analyzed.

### *2.3. Synthesis of periodic mesoporous organosilicas*

For the synthesis of the PMO materials, chemicals were added in a molar ratio as follows: 1 (ligand): 0.05 Pluronic 123: 0.15 CTAB: 7.14  $\text{NH}_3$ : 56.4 EtOH: 1471.4  $\text{H}_2\text{O}$ : 10 TEOS (in the case of TEPA ligand) and :14 TEOS (in the case of STPA ligand). For the synthesis of the organosilica employing STPA as organic ligand and TEOS as silica sources (denoted PMO-STPA), 2.7 g of Pluronic 123 and 0.5 g of CTAB were dissolved in a solution formed by mixing 31 mL of  $\text{NH}_3$  2M, 229 mL  $\text{H}_2\text{O}$  and 28 mL EtOH. After 1 h of stirring in a round glassware flask of 500 mL, a mixture of 13.8 mL of STPA and 27 mL TEOS (with molar ratio 1:14) was added with droplet system. In the case of TEPA as organic ligand and TEOS as silica sources (denoted PMO-TEPA), 4.6 g of Pluronic 123 and 0.8 g of CTAB were dissolved in a solution formed by mixing 52 mL of 2 M ammonia solution, 384 mL  $\text{H}_2\text{O}$  and 48 mL EtOH. After 1 h of stirring in a round glassware flask of 500 mL, a mixture of 6.4 mL of TEPA and 31.8 mL of TEOS (with molar ratio 1:10) was added with a droplet system and stirring for 1 h. After the addition of the ligand, each solution was transferred into a teflon-lined steel Parr autoclave and

heated at 100°C for 16 h. The precipitate (white colour with TEPA and orange colour in the case of STPA) was filtered off, washed with Milli-Q water and EtOH, and dried at 60°C for 6 h.

#### 2.4. Characterization of periodic mesoporous organosilicas

N<sub>2</sub> gas adsorption-desorption isotherms were obtained using a Micromeritics ASAP 2020 analyzer (Norcross, Atlanta, GA, USA). Adsorption isotherms were measured at -196°C over the interval of relative pressures from 10<sup>-4</sup> to 0.993. Prior to each adsorption analysis the samples were outgassed at 90°C in vacuum during 10 h in the port of degasification of the instrument. Such temperature was chosen to avoid any degradation of the organic ligands and to remove adsorbed species, solvents and water. The specific surface areas were calculated using the BET (Brunauer, Emmett and Teller) model. The pore size distributions were calculated using the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) model on the desorption branch. Elemental analysis (% C, % N, % H) was performed with a LECO CHNS-932 analyzer (St. Joseph, MI, USA). Thermogravimetric analysis (TGA) was carried out using a Setsys 18 A (Setaram, Caluire, France) thermogravimetric analyzer with a 100 µL platinum crucible, in a synthetic air atmosphere with a temperature increasing from 25°C to 800°C at a speed of 10°C per min. <sup>13</sup>C CP/MAS NMR was recorded on a Bruker Avance III/HD Spectrometer (Rheinstetten, Germany) at 100.53 MHz as resonance frequency (2000 transients, spinning speed of 12 KHz, contact time 3 ms, pulse delay 5 s) and <sup>29</sup>Si MAS NMR spectra was recorded on a Bruker Avance III/HD 9.4T Spectrometer (Rheinstetten, Germany) at 79.49 MHz, as resonance frequency and <sup>1</sup>H resonance frequency of 400 MHz (1000 transients, spinning speed of 5 KHz, contact time 3 ms, pulse delay 60 s), using high power decoupling pulse program

with unplugging as sequence and a Varian sounding line arranged to a Bruker 7.5 mm T3 HX.

Scanning electron microscopy (SEM) was carried out on a XL20 ESEM Philips (Reston, VA, USA) with an energy-dispersive spectrometry system (EDS). Samples were treated with a sputtering method with the following parameters: sputter time 100 s, sputter current 30 mA, and film thickness 20 nm using sputter coater BAL-TEC SCD 005. SEM was used to study the morphology and size of the particles of the materials prepared in this work. Conventional transmission electron microscopy (TEM) was carried out on a TECNAI 20 Philips microscope (Hillsboro, OR, USA) operating at 200 KV, with a resolution of 0.27 nm and  $\pm 70^\circ$  of sample inclination, using a beryllium oxide sample holder. The samples were prepared by dispersing the powder products as slurry in acetone and subsequently deposited and dried on a honey carbon film on a Cu grid.

Finally, the infrared spectra were recorded on a Perkin Elmer Frontier FTIR spectrophotometer (Waltham, MA, USA) in the region of 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  by using spectra quality KBr powder, to determine the presence of functional groups in the mesoporous structure.

### *2.5. CE separation*

Electrophoretic experiments were carried out on a HP <sup>3D</sup>CE system from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a DAD controlled by a HP <sup>3D</sup>CE ChemStation software. Background electrolytes (BGE) tested in the CE-DAD experiments consisted of 50 mM formate buffer (pH 5.0), 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) containing individual CDs as chiral selectors or a dual system of CDs at different concentrations. pH measurements were carried out in a 744 pH-meter

from Metrohm (Herisau, Switzerland). Separations were performed in an uncoated fused-silica capillary of 50  $\mu\text{m}$  I.D. and a total length of 58.5 cm or 63.5 cm (50 or 55 cm effective length, respectively) acquired in Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Different separation voltages (15, 20, 25 and 30 kV) and working temperatures (15, 20 and 25°C) were tested. Injections were carried out by applying 50 mbar for 5 or 10 s. Detector parameters were as follows: a response time of 1.0 s and a wavelength of 194 nm (2-PPA and 4-CPPA), 200 nm (mecoprop, dichlorprop and 3-CPPA) and 210 nm (fenoprop) (bandwidth 5 nm). At the beginning of each working day the capillary was flushed with NaOH 0.1 M for 5 min, Milli-Q water for 5 min, buffer solution for 5 min and BGE for 10 min, and at the end of the day it was flushed with NaOH 0.1M and Milli-Q water, both of them for 5 min. In order to ensure the repeatability between injections, the capillary was flushed with Milli-Q water for 2 min, NaOH 0.1 M for 2 min, Milli-Q water for 2 min and BGE for 5 min.

## 2.6. SPE conditions

The extraction procedure was carried out in a 20-position extraction manifold purchased from Waters (Barcelona, Spain), at a flow rate of 1 mL/min approximately, connected to a vacuum pump at 16 InHg. SPE 6 mL cartridges (65 mm length, 11 mm diameter) were packed with 100 or 200 mg of each PMO synthesized (PMO-STPA or PMO-TEPA) and plugged with polyethylene frits at both ends along with a 0.45  $\mu\text{m}$  pore size nylon filter membrane inserted at the bottom of the mesoporous silica bed in order to avoid material loss during sample loading. The work methodology was carried out as follows: the conditioning process previous to sample loading was carried out with 5 mL MeOH and 5 mL Milli-Q water. Once the sample was loaded at a flow of 1 mL/min, air was passed

for 20 min through the cartridges in order to eliminate sample solution in contact with the sorbent by suction with pressure application. The elimination of the remaining sample solution prior to the elution step, avoids the presence of sample matrix components in the eluate. Elution was performed by passing 2 x 4 mL MeOH (with apparent pH values of 5.6 or 1.8 (acidified with HCl)), and picked up in a vial whose eluate was evaporated to dryness in a Eppendorf Concentrator plus (1400 rpm, 250 RCF, 30°C) coupled with a 6 cone-shaped tube rotor, purchased from Eppendorf Ibérica S.L.U. (Madrid, Spain), and re-dissolved in 500 µL of MeOH:Milli-Q water (10:90 v/v) for subsequent analysis by CE.

The optimization of the extraction procedure was carried out using three different solutions spiked with the six phenoxy acid herbicides, two of them prior to extraction and one of them after extraction process (simulated sample) in the desired concentration level to obtain a final extract of 500 µL of MeOH:Milli-Q water (10:90 v/v) with a racemic concentration of 5 mg/L for fenoprop and 10 mg/L for the rest of phenoxy acids for subsequent analysis by CE. Recovery values were calculated by comparison of the corrected peak areas for the phenoxy acid herbicides studied with those obtained for the simulated sample.

When water samples from river and effluents of treatment plants were analyzed, accuracy for the SPE-CE method was evaluated as the recovery values obtained for the six phenoxy acid herbicides at two different concentrations. With this aim, the corrected peak areas obtained for the herbicides when the water samples were spiked after SPE treatment were compared with the corrected peak areas obtained for these compounds when the samples were analyzed by the developed CE method. Concentration levels spiked in water samples for each enantiomer (µg/L) were the following: WS 1 (Low 3.3 and High 16.7 for 3-CPPA and 2-PPA or 20 for Fenoprop, Mecoprop, Dichlorprop and 4-CPPA); WS 2 and

WS 3 (Low 12.5 and High 62.5 for 3-CPPA and 2-PPA or 75 for Fenoprop, Mecoprop, Dichlorprop and 4-CPPA).

### *2.7. Evaluation of the analytical characteristics*

Linearity was determined by plotting the corrected peak area (defined as the peak area divided by the peak migration time) as a function of the enantiomer concentration for each compound. Thus, ten standard racemic solutions, with the following total concentration (mg/L) for both enantiomers of each compound, were injected by triplicate: fenoprop (4-80), mecoprop (6-100), dichlorprop (8-80), 4-CPPA (8-80), 3-CPPA (6-80) and 2-PPA (10-80).

Instrumental LODs and LOQs (iLODs and iLOQs) were calculated considering 3 and 10 times the S/N ratio, respectively. MDLs and MQLs were calculated considering 3 and 10 times the S/N ratio, respectively, estimated from the lowest concentration level of spiked wastewater samples (samples were spiked before SPE treatment) and applying the corresponding PF of the SPE process.

Instrumental repeatability for the CE method was determined from nine repeated injections of a standard solution in Milli-Q water at low (5 mg/L for each enantiomer of all compounds) and high (25 mg/L for each enantiomer of 3-CPPA and 2-PPA and 30 mg/L for each enantiomer of fenoprop, mecoprop, dichlorprop and 4-CPPA) concentration levels without employing the SPE procedure, that is, by directly injecting the different standard solutions in the CE system. Intermediate precision was determined also at the above-mentioned concentration levels for three consecutive days injecting each sample by triplicate

each day. In this case, RSD values were obtained from the mean and SD of the three means corresponding to each day.

Precision for the SPE-CE method was determined as the RSD values corresponding to the recoveries obtained when analyzing in duplicate the three real water samples (injected in triplicate) when they were spiked at two concentration levels.

### *2.8. Data treatment and calculations*

Microsoft Excel Professional Plus 2010 was employed for calculations of recoveries and statistical analysis. OriginPro 8 software was used to create the artwork. Van der Waals forces and Hückel charges calculations were carried out by means of Chem3D Pro 12.0 software.

## **3. Results and discussion**

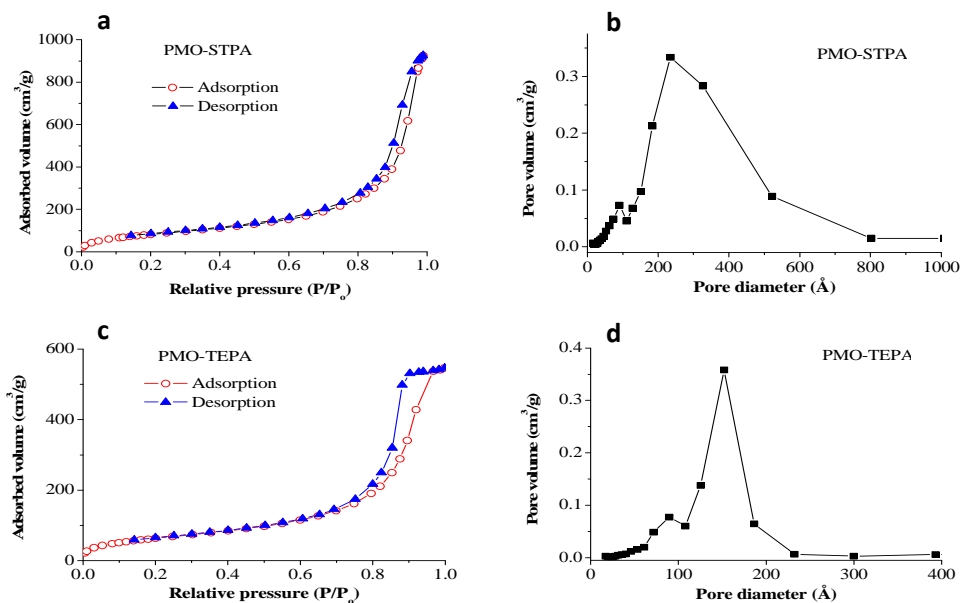
### *3.1. Synthesis and characterization of the periodic mesoporous organosilica materials*

PMO-STPA and PMO-TEPA materials have not been synthesized previously. Compared with common synthesis used for PMO type materials, the main variation presented in this work was the use of a basic medium instead of acid. In the acid medium, the synthesis employing STPA or TEPA as cationic amine-bridged ligands was completely unsuccessful to obtain PMOs. A possible explanation for these results can be the fact that these ligands (employed in the synthesis of PMOs for the first time in this work) are positively charged in strong acid media, due to the amino groups in their structures. Therefore, these positively charged ligands can suffer electrostatic repulsions with the ions of the

CTAB template not allowing the correct formation of the micelles, necessary to obtain a mesoporous structure.

N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms obtained for PMO-STPA and PMO-TEPA materials are shown in Figures 1a and 1c, respectively. For PMO-STPA material (Fig. 1a) the isotherm is a typical type IV isotherm, which corresponds with mesoporous materials, according to the IUPAC classification. The isotherm has a very prominent adsorption step at around 0.9 P/P<sub>0</sub>, this steep capillary condensation shows that the capillary condensation of nitrogen takes place in highly uniform mesopores [43]. Although the desorption branch of the material has no tailing before it reaches the adsorption branch, the isotherm does not show a plateau at high pressures. This fact could indicate the presence of some amorphous non-mesostructured domains in the material, and the pore size distribution of the material could have some non-uniformity. This is also in good agreement with the wide pore size distribution that the material shows (Fig. 1b) with most of the pores centered at 235 Å, which could be explained as a consequence of the big size of the STPA ligand (see Table 1).





**Fig. 1.** N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms and pore-size distribution of PMO-STPA (a and b) and PMO-TEPA materials (c and d).

**Table 1.-** Textural properties of the PMO materials synthesized in this work.

Material	S <sub>BET</sub> (m <sup>2</sup> /g) <sup>a</sup>	Pore volume (cm <sup>3</sup> /g) <sup>b</sup>	Pore size (Å) <sup>c</sup>	Elemental analysis (%)			
				C	N	H	mmol ligand/g <sup>d</sup>
PMO-STPA	316	1.30	235.0	18.4	1.3	2.9	0.93
PMO-TEPA	238	0.85	152.3	11.8	1.6	2.5	1.14

a: S stands for surface area, BET relates to Brunauer, Emmett and Teller method.

b: Total pore volume were measured at relative P/P<sub>0</sub> = 0.97.

c: Pore diameter estimated by using the BJH (Barrett, Joyner and Halenda) model applied on the desorption branch of the isotherm.

d: mmol of ligand per gram of PMO calculated with the % N obtained in elemental analysis.

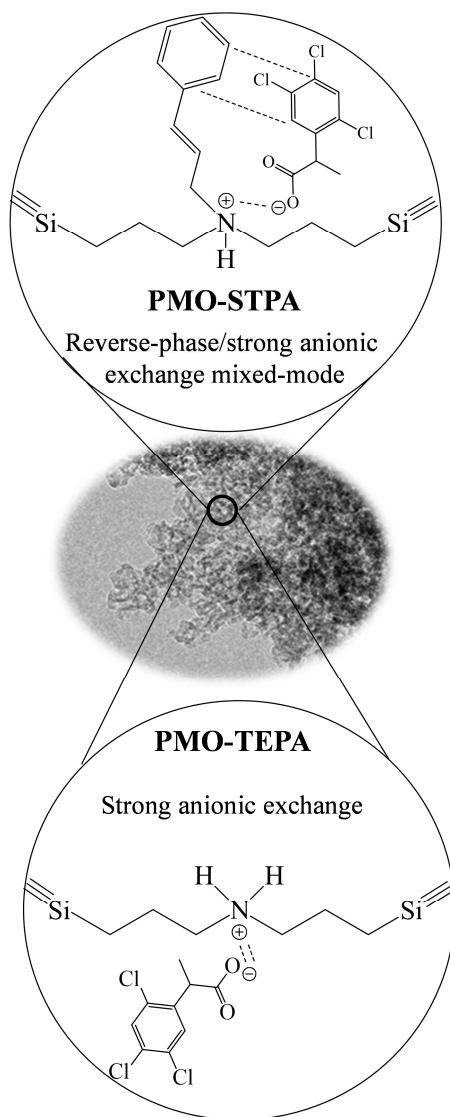
The isotherm also has a H1 type hysteresis loop with almost parallel branches confined to relative pressures between 0.85 and 0.95, this fact indicates the irreversibility of the adsorption-desorption behavior in primary mesopores [44]. All these features are characteristic of large channel mesostructures and pores with cylindrical shape. In the case of the PMO-TEPA material, the N<sub>2</sub> adsorption-desorption isotherms (Fig. 1c) also show a typical type IV isotherm, which corresponds with mesoporous materials. The isotherm has a very prominent adsorption step at around 0.8 P/P<sub>0</sub>, this steep capillary condensation and the final adsorption plateau show that the capillary condensation of nitrogen takes place in more uniform mesopores compared with the PMO-STPA material. This result is also confirmed by the narrower pore size distribution of the PMO-TEPA material (Fig. 1d) which most of the pores centered at 152 Å. In addition, the lower value of the pore size obtained with PMO-TEPA compared to PMO-STPA is in agreement with the smaller size of the TEPA ligand (Table 1). The isotherms also have a H1 type hysteresis loop with almost parallel branches confined to relative pressures between 0.8 and 0.95, these facts indicating the irreversibility of the adsorption-desorption behavior in primary mesopores and large channel mesostructures with pores with cylindrical shape in PMO-STPA material.

The SEM micrographs (Figs. S1 a and c in supplementary material) show that the morphology of these materials is not well defined, where small number of the particles are spherical, being most of them amorphous or prism-shaped. This fact can be explained taking into account the size and the shape of the STPA and TEPA ligands (Fig. 2) and the basic pH employed in the synthesis.

At this respect, there are several studies describing how the morphology of the particles are affected by some variables like the concentration of reactants,

pH of the media or the solvents employed in the synthesis [45, 46]. Mahendra et al. [45] showed that alkaline pH values affected the particle morphology and that the pH of the media can control the condensation reaction between the organic ligand bridges of organomesoporous materials to allow the formation of spherical regular particles or amorphous ones. It is also known that when a high surfactant/silica source ratio is used in the synthesis of the material, the particles grow bigger and without a tunable size from the first step and are excluded from the solution by a rapid process of condensation [45]. In this way, the use of bulky ligands like TEPA and STPA that act as silica sources decreases the amount of silica source in the surfactant/silica ratio, because of the lower amount of Si in the ligand (weight of ligand/weight of Si ratio, w/w) with respect to other usual silica sources like TEOS. This fact provokes that the surfactant/silica ratio would be higher than in other less bulky silica ligands. It was also suggested [46] that the anion charge in bulky organosilica sources like TEPA and STPA under basic conditions is lower than in the case of the more conventional and less bulky silica source TEOS, because in these bulky ligands (TEPA and STPA) the silyl groups are separated by the organic fragments of TEPA and STPA species. This difference in charge density affects the interaction with the surfactant. Also, the high ratio surfactant/silica source (w/w) employed in this work in the synthesis, 9.8 % and 12.8 % for STPA and TEPA, respectively, can avoid the formation of spherical micelles during the synthesis of the materials and affect the shape of the particles [47]. The dispersion in particle size in both materials is quite big, which in the case of PMO-STPA goes from 16 to 30  $\mu\text{m}$ , whereas the material PMO-TEPA shows bigger particles that go from 12 to 40  $\mu\text{m}$ . On the other hand, TEM images (Figs. S1 b and d in supplementary material) show that both materials have a porous structure with a wormhole-like arrangement of channels. These results are in agreement with previous works that reveal that high ratios of

surfactant (relative to the total content of surfactant and silica source) lead to a non-hexagonal pore arrangement [48, 49].

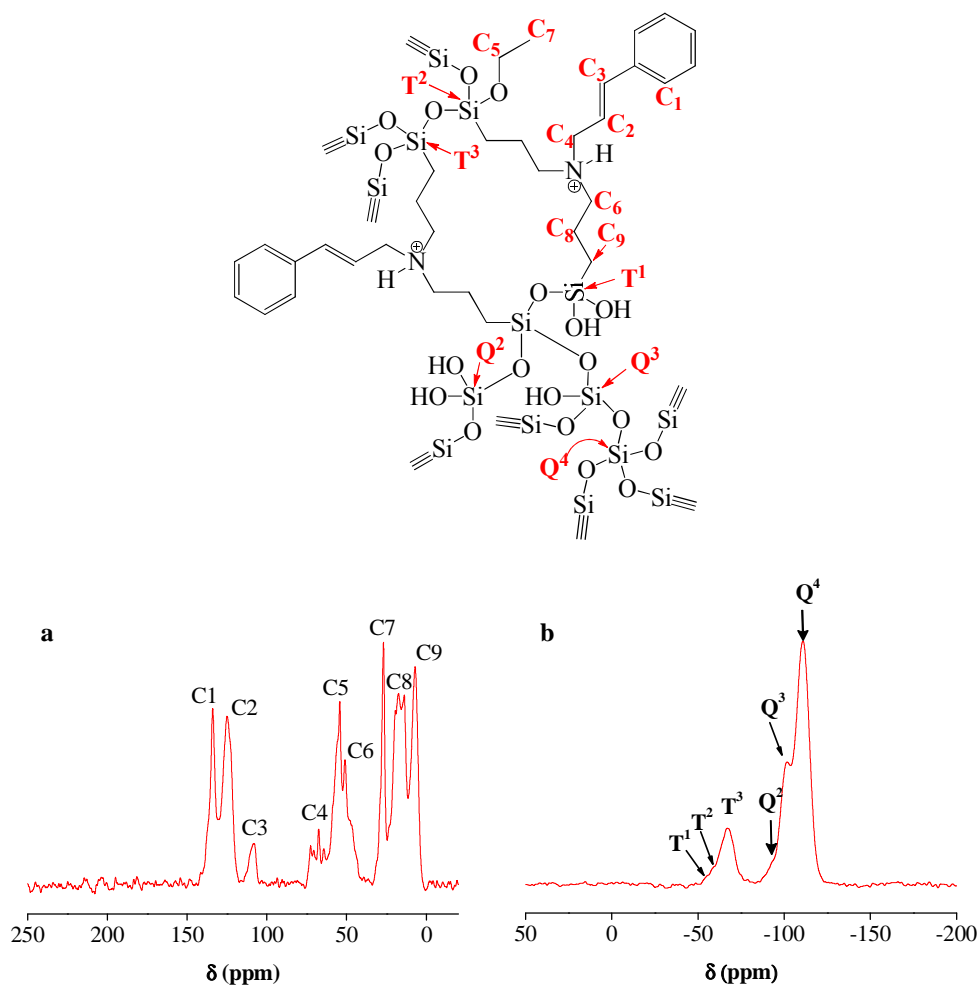


**Fig. 2.** Schematic representation for retention mechanism inside the pore of PMO-STPA and PMO-TEPA materials.

The FTIR spectra of the two materials synthesized (Fig. S2 in supplementary material) show a similar pattern for both, with most remarkable peaks in the fingerprint region. Stretching bands between 1645 and 1379  $\text{cm}^{-1}$ , as well as C-H bend bands at 1456  $\text{cm}^{-1}$  confirmed the presence of the aromatic moiety in the solid framework of PMO-STPA. At the same time, the N-H bend of amine moiety could be overlaid at 1625  $\text{cm}^{-1}$ , which is more intense in the case of PMO-TEPA. In addition, this region bending and rocking bands of C-H bonds of alkane moiety appear. These FTIR spectra showed that the organic ligand was correctly introduced in the PMO network. In order to quantify the amount of organic ligand incorporated into the silica framework, by means of elemental analysis, the % N was calculated. As shown in Table 1, PMO-STPA has a functionalization degree of 0.93 mmol ligand/g material whereas for PMO-TEPA it was 1.14 mmol ligand/g material, which means that ligands were successfully incorporated in the framework of each material. What is more, the lower amount of the ligand STPA, incorporated into the silica framework of PMO-STPA, compared with PMO-TEPA is due to the higher steric hindrance of the more voluminous STPA ligand. To corroborate the presence of the ligand in the framework and the thermal stability of the materials, TGA was carried out. Figure S3 (supplementary material) shows the TGA curves for these materials. It can be observed a loss in mass (8.25 % and 16 % for PMO-STPA and PMO-TEPA, respectively) that occurs between 300°C and 600°C (exothermic process) and that is due to cleavage / degradation of the ligand in the frame. The thermal stability of these samples is also in agreement with previous results given in the literature for other functionalized organo silicas [10].

Additional characterization of PMO-STPA material was also carried out by solid-state  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  NMR spectroscopy (Figs. 3a and 3b, respectively) that confirmed the presence of the STPA ligand in the material. The high ratio

between the Q/T sites in the  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR spectrum (Fig. 3b) shows that the silicate bonds are mainly present in the framework of the silica, which can be explained because of the low ligand/TEOS ratio used during the synthesis.



**Fig. 3.**  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR spectra (a) and  $^{29}\text{Si}$  MAS NMR spectra (b) of PMO-STPA material.

### *3.2. Simultaneous enantiomeric separation of a mixture of phenoxy acid herbicides by CE*

In order to develop a CE method enabling the simultaneous enantiomeric separation of six chiral phenoxy acid herbicides (fenoprop, mecoprop, dichlorprop, 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA) with an acceptable enantioselectivity and enantioresolution, and based on previous chiral separations reported in the literature for some of the herbicides studied [50-59], in which a neutral CD [50-53] or a dual system of CDs were usually employed [51, 54], an initial screening of neutral CDs was carried out ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, DM- $\beta$ -CD, TM- $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD and HP- $\gamma$ -CD). For this purpose, a 15 mM concentration of each neutral CD in a 50 mM formate buffer at pH 5.0, a separation voltage of 20 kV and a temperature of 25°C, were chosen. Among the CDs studied, the best chiral separation for the group of compounds analyzed was achieved with  $\beta$ -CD ( $R_s$  between 0.7 and 4.4, no chiral separation for dichlorprop, in 27.5 min), HP- $\beta$ -CD ( $R_s$  between 1.4 and 2.7, no chiral separation for fenoprop, in 27.4 min) and TM- $\beta$ -CD ( $R_s$  between 0.8 and 5.2, no chiral separation for 2-PPA, in 36.7 min), whereas no enantioseparation was obtained with the remaining CDs studied for the herbicides analyzed.

With the aim to increase the  $R_s$  values obtained for the six herbicides, dual CDs systems were employed using different combinations of the three CDs ( $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD and TM- $\beta$ -CD) that originated enantioseparation when employed individually. Each CD was at a 15 mM concentration in the dual mixture and the same experimental conditions were employed. Among the three possible combinations, the best results were obtained for the HP- $\beta$ -CD/TM- $\beta$ -CD dual system which allowed the simultaneous separation of the enantiomers of five of the six herbicides studied (see Figure S4A in supplementary material).

Once selected the most suitable combination of CDs, the effect of their concentration was evaluated in the range from 10 to 20 mM (10, 15 and 20 mM). It could be observed that fenoprop, mecoprop, dichlorprop and 4-CPPA improved their Rs at low HP- $\beta$ -CD concentrations, whereas 3-CPPA and 2-PPA improved their Rs at high TM- $\beta$ -CD concentrations. A 10 mM HP- $\beta$ -CD/20 mM TM- $\beta$ -CD dual system enabled the simultaneous separation of all compounds with Rs values between 1.1 (fenoprop) and 3.0 in an analysis time less than 35.0 min.

In order to decrease the analysis time, a 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) was employed. Under these conditions an important decrease in the analysis time (to 11 min) was achieved with Rs values ranging from 0.6 to 1.7.

Finally, the effect of different instrumental parameters on the separation was also evaluated. First, an injection of 50 mbar in 5 s was tested, but a loss of sensitivity was observed without improving de Rs. Hence, the previous injection conditions (50 mbar x 10 s) were chosen. The influence of the temperature on the Rs was also investigated using values of 15, 20 and 25°C. The results obtained showed that a temperature of 15°C gave rise to an increase in Rs (between 0.9 (fenoprop) and 2.4) although an increase in the analysis time (16 min) was observed (see Fig S4B in supplementary material). Hence, a temperature of 15°C was chosen. With the aim of increasing the Rs obtained for fenoprop which were the lowest, HP- $\beta$ -CD concentration was decreased and 5 mM HP- $\beta$ -CD - 20 mM TM- $\beta$ -CD and 7 mM HP- $\beta$ -CD - 20 mM TM- $\beta$ -CD mixtures were tested showing that the optimum simultaneous enantiomeric separation (Rs between 1.1 (fenoprop) and 2.9) was obtained in 16 min at a 7 mM concentration HP- $\beta$ -CD (see Figure S4C in supplementary material). Finally, with the aim to short the analysis time, the applied voltage was increased to 25 and 30 kV. A value of 25 kV as applied voltage was selected (Figure S5 in supplementary material) since a



total loss in resolution for most compounds and high current values were observed at 30 kV. Under these conditions, an analysis time of 11 min was obtained with enantiomeric  $R_s$  values  $\geq 1.6$  for mecoprop ( $R_s$  2.7), dichlorprop ( $R_s$  2.0), 4-CPPA ( $R_s$  1.7) and 2-PPA ( $R_s$  1.6) and of 1.2 for fenoprop and 3-CPPA, although a co-elution was observed for the second-migrating enantiomer of mecoprop and the first-migrating enantiomer of dichlorprop. This co-elution could be avoided using different experimental conditions but the enantiomeric separation of fenoprop was lost. This is illustrated in Figure S4A (see supplementary material), where it can be observed as an example that this co-elution can be avoided but fenoprop enantiomers are not separated.

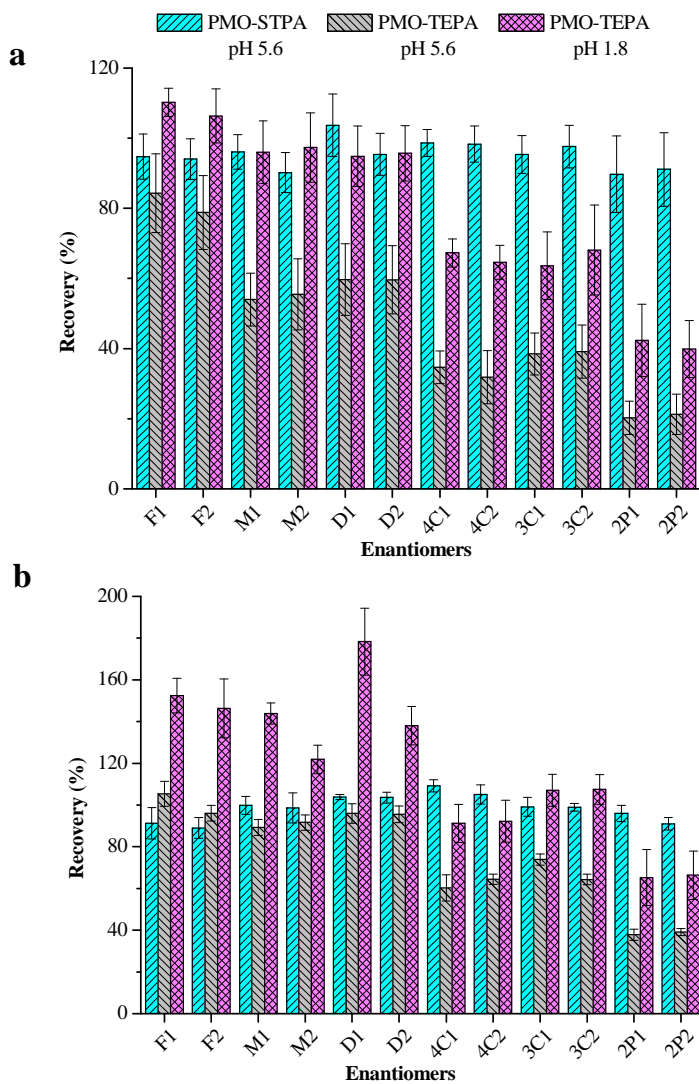
### *3.3. Evaluation of PMO materials for solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples*

The two PMOs synthesized in this work were evaluated as sorbents in SPE to study the extraction efficiency of six chiral phenoxy acid herbicides from water samples and to select the sorbent providing the highest recovery for these analytes. The PMO-STPA material shows a reverse-phase/strong anionic exchange mixed-mode retention mechanism due to this material possesses a styrylmethyl moiety that interacts by means of Van der Waals forces with the aromatic ring of the phenoxy acids at the same time that ionic interaction occurs between carboxyl and positively charged amine groups, whereas in the case of PMO-TEPA material only strong anionic exchange retention mechanism takes place (see Fig. 2). Related to textural properties previously discussed for both materials, it has not been found notable differences between them except for the greatest surface BET ( $S_{\text{BET}}$ ) and pore volume in PMO-STPA material with respect

to PMO-TEPA material, that could favor the interaction with phenoxy acid herbicides given the big substituent linked to the amine moiety in PMO-STPA.

First of all, different sorbent amounts (100 and 200 mg) and pH values of elution solvent (2 x 4 mL of MeOH at pH 5.6 or 1.8) were tested by passing 100 mL of Milli-Q water solution (pH = 6.3) spiked with the compounds (25 µg/L of fenoprop and 50 µg/L for the remaining herbicides) through the cartridge. As can be seen in Figure 4, at a pH of 5.6, using PMO-STPA material as sorbent, recovery values between 90.2 and 103.7 % were obtained with 100 mg (Fig. 4a) and recovery values between 89.0 and 109.2 % with 200 mg (Fig. 4b). However, with 100 mg of PMO-TEPA material sorbent (Fig. 4a) eluting with MeOH at pH 5.6, a poor recovery value between 20.3 and 59.7 % was obtained, except for fenoprop (recovery 84.3 %), whereas using 200 mg of sorbent (Fig. 4 b), with the same elution process, the recovery values were higher, between 89.2 and 105.3 % for mecoprop, dichlorprop and fenoprop, and between 37.8 and 73.9 % for 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA.

To increase the recovery values with PMO-TEPA as sorbent, it was decided to use MeOH acidified at pH 1.8 as elution solvent, in order to avoid the deprotonation of the carboxyl moiety in phenoxy acids, whose pKa values are between 2.8 and 4.3, and to break up the ionic interaction with positive amine moiety (see Fig. 2). These experiments were not carried out with PMO-STPA material as high recovery values were obtained at pH 5.6 with this sorbent. As it can be seen in Figure 4, with 100 mg of this sorbent, an increase in the recovery from 20.3-82.0 % to 39.9-110.2 % took place, whereas using 200 mg of this sorbent the increase in recovery percentages reached values from 37.8-105.3 % to 65.2-178.3 %, obtaining always the lowest recoveries for 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA.



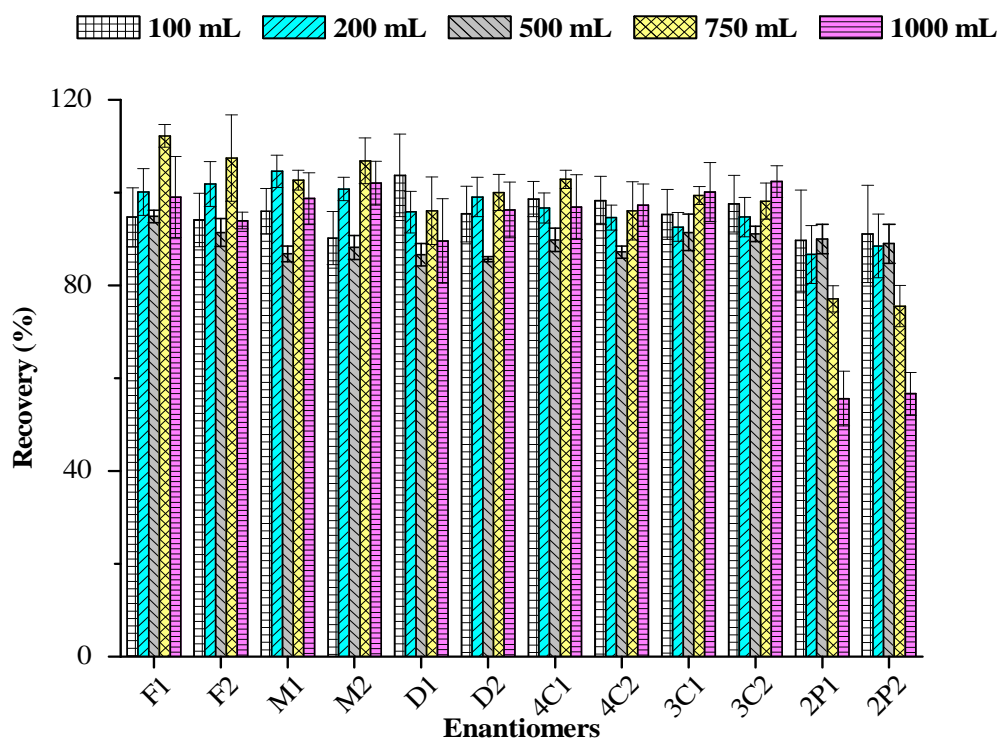
**Fig. 4.** Recovery percentages and error bars (as standard deviation, n = 6) obtained for each enantiomer of the six phenoxy acid herbicides using 100 mg (a) and 200 mg (b) of sorbent packing at two pH values of elution solvent (5.6 and 1.8) and 100 mL of Milli-Q water sample spiked in a concentration of 25 µg/L for fenoprop, and 50 mg/L for the other five phenoxy acid compounds. F: fenoprop, M: mecoprop, D: dichlorprop, 4C: 4-CPPA, 3C: 3-CPPA, 2P: 2-PPA. 1: First-migrating enantiomer, 2: Second-migrating enantiomer. Experimental conditions: BGE, 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM TM-β-CD and 7 mM HP-β-CD, capillary (50 µm I.D., total length of 58.5 cm (50 cm effective length)), injection: 50 mbar x 10 s, temperature: 15°C, separation voltage: 25 kV, UV detection at 194 nm (2-PPA and 4-CPPA), 200 nm (mecoprop, dichlorprop and 3-CPPA) and 210 nm (fenoprop) (bandwidth 5 nm).

There is evidence that the ionic interaction plays an important role in the recovery process although values higher than 100 % obtained for three compounds (fenoprop, mecoprop and dichlorprop) with 200 mg PMO-TEPA and eluting with MeOH at pH 1.8 could not be justified.

The differences observed in the recovery values comparing both sorbents could be explained as a function of the Van der Waals forces and Hückel charge values shown in Table S2 (supporting material). Both cationic amine ligands show a similar value of Hückel charge but STPA possesses a high value of Van der Waals forces. With regard to analytes, all of them show similar Van der Waals forces values, whereas a noticeable difference in the Hückel charge of oxygens in the carboxyl moiety was observed, whose values are lower for 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA (Table S2). This fact confirms that the PMO-STPA material involves a mixed-mode mechanism retention by Van der Waals forces and ionic exchange that favor the retention of 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA, whose values of Hückel charge are lower and show higher recovery values compared with PMO-TEPA sorbent that only shows anionic interaction with the negatively charged analytes. Hence, PMO-STPA was selected in order to achieve the higher efficiency in the extraction of the six chiral phenoxy acid herbicides in water samples.

Using PMO-STPA, the next step was to study the breakthrough volume, parameter that determines the maximum volume of sample that can be passed through the sorbent without considerable loss of recovery. This study was carried out with 100 mg of PMO-STPA and the volume of spiked sample was increased sequentially to 100, 200, 500, 750 and 1000 mL. The highest recoveries (see Fig. 5) were obtained up to 750 mL, considered the optimum volume, with values between 75.5 and 112.2 % and a PF of 1500, since with 1000 mL the enantiomeric recovery value obtained for 2-PPA decreased from 75.5 - 77.1 % to 55.5 - 56.6 %,

although the remaining compounds kept their recovery values between 89.6 and 102.4 %.



**Fig. 5.** Recovery percentages and error bars (as standard deviation,  $n = 6$ ) obtained for each enantiomer of the phenoxy acid herbicides taking into account the sample volume loaded in the cartridges ( $n = 6$ ) at 100, 200, 500, 750 and 1000 mL of spiked Milli-Q water solution with phenoxy acid herbicides at a concentration of 5 mg/L for fenoprop, and 10 mg/L for the other five phenoxy acid compounds using 100 mg of PMO-STPA as sorbent. F: fenoprop, M: mecoprop, D: dichlorprop, 4C: 4-CPPA, 3C: 3-CPPA, 2P: 2-PPA. 1: First-migrating enantiomer, 2: Second-migrating enantiomer.

Other experimental conditions as in Fig. 4.

These results show that PMO-STPA possesses a high capacity to concentrate the phenoxy acid herbicides studied in this work in diluted samples.

Comparing the results obtained in this work with those obtained previously when using other SPE cartridges (Table S1 in supplementary material), in general terms, recovery values obtained in all cases are higher than 80 %, except in two of them that used graphene oxide as sorbent [37] or a commercial Oasis HLB SPE cartridge [21], in which recovery values between 40 and 75 % were obtained. Basically, all these procedures are based on the Van der Waals, noncovalent or hydrophobic interactions in order to retain the analytes, although some of them [30,31] joined the effect of the sorbent with an ion-pairing agent, such as CTAB to achieve an increase of the recovery thanks to the exchange mixed-mode, similarly to the approach adopted in the present work using the mixed-mode retention mechanism of MPO-STPA which could provide an increase in recovery values.

Regarding PF values, previous works reported in the literature on the SPE extraction of wastewater samples with commercialized SPE cartridges (see Table S1, supplementary material), were generally focused on the analysis of only three of the six compounds analyzed in this work (fenoprop, dichlorprop, mecoprop). From the different commercial materials employed, only Oasis HLB was used for the extraction of the above-mentioned compounds from sewage and wastewater samples with PFs from 1000 to 2000 and from 200 to 500, respectively [23, 25]. The other commercial SPE materials were employed in the preconcentration of other water samples such as surface, river, ground, tap, pond and drinking waters ranging the PFs from 100 to 5000. In these cases, PFs higher than those obtained in this work (1500) were obtained only for Oasis HLB and C18. Thus, only Oasis HLB was employed for the preconcentration of wastewater samples with PFs

lower than those obtained in this work or for the preconcentration of sewage water with PFs similar to those obtained in this work (1500). Only in the case of other water samples, preconcentration factors higher than 1500 were obtained with Oasis HLB and C18.

#### *3.4. Analytical characteristics of the developed SPE-CE method and analysis of water samples*

Analytical characteristics of the developed SPE-CE method using PMO-STPA sorbent were evaluated in terms of linearity, precision, accuracy, instrumental limits of detection (iLOD) and quantitation (iLOQ), and method limits of detection (MDL) and quantitation (MQL) (see Table 2).

Linear range observed for each enantiomer is grouped in Table 2. Six standard racemic solutions within this range were injected during three different days. Linear equations were expressed according to a confidence range taking into account the mean value of the slope and its statistical error at 95 % (Table 2). Satisfactory results were obtained in terms of linearity with  $R^2$  values  $\geq 0.995$  in all cases. ANOVA confirmed through the  $p$ -values ( $p$ -value  $> 0.09$  in all cases for a 95 % confidence level) that the experimental data fit properly to linear models.

**Table 2.** Analytical characteristics of the developed CE method for the enantiomeric determination of phenoxy acid herbicides in water samples.

Analyte	Linearity		Precision							
			Instrumental repeatability				Intermediate precision			
			Linear range (mg/L)	Linear equation $bx + a$ $R^2$	$S_b$ $S_a$	$b \pm t S_b$	Ac // tm (RSD (%))		Ac // tm (RSD (%))	
Low concentration	High concentration	Low concentration					High concentration			
Fenoprop (E1)	2 - 30	0.48x-0.38 0.9950	0.11 0.46	0.48 ± 0.25	6.6 // 1.8	6.3 // 2.0	10.4 // 2.9	5.5 // 0.6	0.7	2.3
Fenoprop (E2)		0.42x-0.17 0.9957	0.07 0.38	0.42 ± 0.16	5.2 // 1.8	12.3 // 1.9	10.4 // 3.0	6.6 // 0.6	0.7	2.2
Mecoprop (E1)	3 - 30	0.62x-0.25 0.9966	0.13 0.33	0.62 ± 0.29	7.0 // 1.2	5.4 // 2.1	7.9 // 3.1	4.3 // 0.6	0.8	2.6
Mecoprop (E2)		0.68x-0.51 0.9953	0.17 0.47	0.68 ± 0.38	7.3 // 1.2	6.0 // 2.2	6.7 // 3.1	6.1 // 0.6	0.8	2.7
Dichlorprop (E1)	4 - 30	0.45x-0.23 0.9962	0.06 0.32	0.45 ± 0.14	10.1 // 1.2	9.2 // 2.1	10.6 // 3.1	2.8 // 0.6	1.0	3.3
Dichlorprop (E2)		0.51x-0.37 0.9961	0.11 0.16	0.51 ± 0.25	11.9 // 1.2	4.8 // 2.2	9.6 // 3.1	4.7 // 0.7	1.0	3.4
4-CPPA (E1)	4 - 30	0.66x-0.50 0.9965	0.13 0.48	0.66 ± 0.29	5.0 // 1.3	6.1 // 2.2	8.1 // 3.1	5.3 // 0.7	1.2	4.0
4-CPPA (E2)		0.65x-0.39 0.9962	0.12 0.45	0.65 ± 0.27	7.2 // 1.3	6.9 // 2.3	8.8 // 3.2	4.2 // 0.7	1.2	4.0
3-CPPA (E1)	3 - 25	0.69x-0.36 0.9987	0.12 0.34	0.69 ± 0.27	7.3 // 1.3	5.8 // 2.3	12.7 // 3.2	5.3 // 1.2	0.9	2.9
3-CPPA (E2)		0.60x-0.19 0.9977	0.08 0.26	0.60 ± 0.18	5.8 // 1.3	7.0 // 2.3	9.2 // 3.2	4.2 // 1.2	0.8	2.7
2-PPA (E1)	5 - 25	0.71x-0.75 0.9981	0.16 0.53	0.71 ± 0.36	11.3 // 1.6	7.2 // 2.7	8.7 // 3.6	4.8 // 1.4	1.5	5.0
2-PPA (E2)		0.68x-0.55 0.9974	0.13 0.51	0.68 ± 0.29	12.9 // 1.6	6.9 // 2.8	9.3 // 3.6	3.2 // 1.4	1.4	4.7

a: intercept; b: slope;  $S_a$ : intercept standard deviation;  $S_b$ : slope standard deviation; Confidence interval at 95 % as confidence level (n = 9); E1: first-migrating enantiomer; E2: second-migrating enantiomer; Ac: corrected area; tm: migration time; iLOD: instrumental limit of detection; iLOQ: instrumental limit of quantification; MDL: method limit of detection; MQL: method limit of quantification; Low concentration level for each enantiomer: 5 mg/L. High concentration level for each enantiomer: 25 mg/L in the case of 3-CPPA and 2-PPA or 30 mg/L in the case of Fenoprop, Mecoprop, Dichlorprop and 4-CPPA.



iLODs and iLOQs ranged from 0.7 to 1.5 mg/L and from 2.2 to 5.0 mg/L, respectively. MDLs and MQLs were determined as indicated in section 2.7 and taking into account a PF of 1500. Values for MDLs ranged from 0.1 to 0.9 µg/L for WS1, from 0.9 to 4.3 µg/L for WS2 and from 0.7 to 3.0 µg/L for WS3, and values for MQLs ranging from 0.4 to 3.1 µg/L for WS1, from 3.1 to 14.3 µg/L for WS2 and from 2.4 to 10.2 µg/L for WS3 were obtained (Table 3).

Precision of the method was evaluated in terms of instrumental repeatability and intermediate precision. RSD values (%) for instrumental repeatability were between 4.8 and 12.9 % for corrected peak areas (Ac) and between 1.2 and 2.8 % for migration time (tm) at both concentration levels assayed. Intermediate precision gave RSD values (%) in a range from 2.8 to 12.7 % for corrected peak area and 0.6 to 3.6 % for migration time.

Precision for the SPE-CE method evaluated as RSD (%) for recovery values determined as indicated in section 2.7, ranged from 0.6 to 4.0 % for WS1, from 1.9 to 7.4 % for WS2, and from 0.8 to 11.4 % for WS3.

Finally, accuracy was evaluated as recovery values obtained for three spiked WS from different locations at low and high concentration levels (Table 3). Since phenoxy acid herbicides were not detected in these samples, they were spiked at a concentration so that after preconcentration process, analytes were detected and quantified just beyond their LOD and LOQ, respectively. For WS 2 and 3, due to the plugging of the pores of the packed material produced by the presence of organic matter, only 200 mL of these spiked water sample (PF = 400) were passed through the cartridge, whereas 750 mL (PF = 1500) were passed with WS 1.

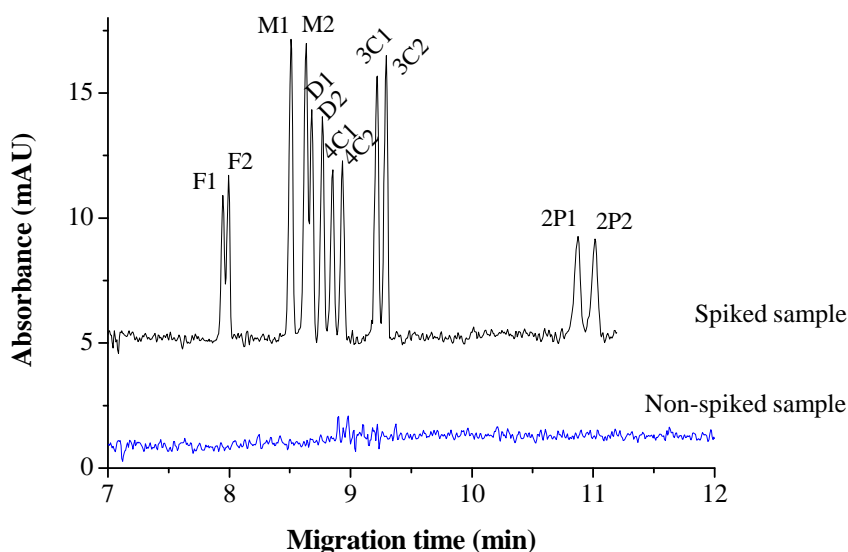
**Table 3.** Recovery values (%) and RSD (%) obtained for phenoxy acid herbicides using 100 mg PMO-STPA and 750 mL sample volume for WS1 and 200 mL for WS2 and WS3 (n=6) spiked at two different concentrations.

Analyte	Water sample 1				MDL/ MQL ( $\mu\text{g/L}$ )	Water sample 2				MDL/ MQL ( $\mu\text{g/L}$ )	Water sample 3				MDL/ MQL ( $\mu\text{g/L}$ )
	Recovery	RSD	Recovery	RSD		Recovery	RSD	Recovery	RSD		Recovery	RSD	Recovery	RSD	
	Low concentration		High concentration		Low concentration	High concentration	Low concentration	High concentration							
Fenoprop (E1)	100.5	2.9	97.3	1.3	0.2 / 0.5	96.5	3.9	99.8	4.3	1.0 / 3.4	88.5	6.2	100.5	2.3	0.8 / 2.6
Fenoprop (E2)	103.5	4.6	96.3	1.1	0.1 / 0.4	96.2	2.3	100.4	4.8	0.9 / 3.1	86.0	7.9	100.9	2.0	0.7 / 2.4
Mecoprop (E1)	105.0	1.8	100.6	1.8	0.3 / 0.9	91.9	2.7	99.7	4.6	1.0 / 3.4	98.6	8.5	101.6	0.8	1.4 / 4.5
Mecoprop (E2)	101.8	1.5	101.6	4.1	0.3 / 0.9	91.7	1.9	100.1	3.4	1.1 / 3.5	98.2	7.5	101.4	1.4	1.4 / 4.8
Dichlorprop (E1)	99.3	2.2	100.5	3.3	0.3 / 0.9	95.2	2.3	104.2	7.4	1.4 / 4.6	95.1	11.4	101.7	1.2	1.7 / 5.8
Dichlorprop (E2)	98.6	2.5	100.2	1.8	0.3 / 0.9	95.6	2.8	99.4	4.5	1.4 / 4.8	100.5	10.4	101.9	1.1	1.9 / 6.3
4-CPPA (E1)	101.7	3.1	103.3	1.5	0.3 / 1.2	102.2	2.5	100.6	5.4	1.9 / 6.2	93.3	9.1	103.5	1.5	1.5 / 4.9
4-CPPA (E2)	103.8	5.2	98.5	0.6	0.3 / 1.1	101.2	4.9	103.4	5.7	1.8 / 5.9	93.2	9.4	103.7	1.3	1.5 / 4.9
3-CPPA (E1)	102.2	4.0	102.8	1.9	0.5 / 1.7	96.9	2.4	101.4	4.0	2.0 / 6.7	92.6	9.5	102.4	1.4	2.7 / 9.0
3-CPPA (E2)	103.4	3.3	100.9	1.2	0.4 / 1.5	98.6	7.1	98.7	5.7	2.2 / 7.2	91.3	8.1	104.8	1.6	2.6 / 8.6
2-PPA (E1)	104.7	3.5	107.5	1.7	0.9 / 3.1	95.4	3.5	97.8	5.3	4.3 / 14.3	78.3	9.2	105.9	1.6	2.9 / 9.8
2-PPA (E2)	99.9	4.0	103.3	1.7	0.8 / 2.8	93.4	5.0	98.0	7.2	3.7 / 12.5	83.0	8.1	104.5	1.7	3.0 / 10.2

**Experimental conditions:** BGE: 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) / 7 mM HP- $\beta$ -CD-20 mM TM- $\beta$ -CD, injection: 50 mbar x 10 s, voltage: 25 kV, temperature: 15°C, capillary: 58.5 cm total length (50 cm effective length) x 50  $\mu\text{m}$  I.D. MDL: method limit of detection; MQL: method limit of quantification. Concentration levels spiked in water samples for each enantiomer ( $\mu\text{g/L}$ ): WS 1 (Low 3.3 and High 16.7 for 3-CPPA and 2-PPA or 20 for Fenoprop, Mecoprop, Dichlorprop and 4-CPPA); WS 2 and WS 3 (Low 12.5 and High 62.5 for 3-CPPA and 2-PPA or 75 for Fenoprop, Mecoprop, Dichlorprop and 4-CPPA). Water samples were collected from: WS1 from effluent treatment plant in Cádiz (Spain); WS2 from effluent treatment plant in Sevilla (Spain); WS3 from Henares river in Alcalá de Henares (Spain).

As observed in Table 3, accuracy was acceptable (without significant differences at both concentration levels) with values for WS 1 from 96.3 to 107.5 %, for WS 2 from 91.7 to 104.2 % and for WS 3 from 78.3 to 105.9 %.

**Figure 6** shows the electropherogram obtained for spiked and non-spiked WS 1 using 100 mg of PMO-STPA sorbent, 750 mL of sample volume and elution with 2 x 4 mL MeOH pH 5.6.



**Fig. 6.** Electropherograms obtained for the enantiomeric separation of the mixture of six phenoxy acid herbicides in spiked (top) and non-spiked (down) WS 1 using 100 mg of PMO-STPA sorbent and 750 mL of sample volume. Spiked concentrations of 3.3  $\mu\text{g/L}$  for the six phenoxy acids. Compounds: F: fenoprop ( $R_s = 1.1$ ), M: mecoprop ( $R_s = 2.7$ ), D: dichlorprop ( $R_s = 1.9$ ), 4C: 4-CPPA ( $R_s = 1.7$ ), 3C: 3-CPPA ( $R_s = 1.2$ ), 2P: 2-PPA ( $R_s = 1.6$ ). 1: First-migrating enantiomer, 2: Second-migrating enantiomer. UV detection at 200 nm. Other experimental conditions as in Fig. 4.

Comparing the results obtained in this work with those reported in the literature, high recovery values were obtained in addition to the simultaneous determination of 6 phenoxy acid herbicides as well as a high PF of 1500 with only 100 mg of a novel PMO-STPA material as sorbent, amount much lower than that usually employed in the extraction of these compounds by SPE.

With respect to other extraction techniques employed in the analysis of the compounds investigated in this work, only SPME was employed in the analysis of three of the six compounds investigated in this work (fenoprop, dichlorprop, mecoprop) in water samples (river, ground, sewage, environmental and wastewater) with recovery values lower [60] or similar [61-64] to those obtained with the materials presented in this article.

#### **4. Concluding remarks**

Two novel materials based on periodic mesoporous organosilica with cationic amine-bridged ligands, (styrylmethyl)bis(triethoxysilylpropyl)-ammonium chloride (STPA) and bis(3-triethoxysilylpropyl)amine (TEPA), were synthesized in this work using tetraethyl orthosilicate as additional silica source in basic medium, in order to obtain materials with reverse-phase/strong anionic exchange mixed-mode or strong anionic exchange retention mechanism, respectively. Although interesting characteristics with good recovery values for six phenoxy acid herbicides from several water samples were shown by PMO-TEPA material, PMO-STPA was found to be the best sorbent for the off-line solid-phase extraction of the compounds studied, which confirmed that a mixed-mode retention mechanism by Van der Waals forces and ionic exchange, that favor the retention of 4-CPPA, 3-CPPA and 2-PPA, was necessary for the extraction of these

selected compounds. Optimized conditions for SPE enabled a preconcentration factor of 1500 using 100 mg sorbent and 750 mL of water sample allowing high recovery values for the compounds studied and enabling method quantitation limits from 0.4 to 14.3  $\mu\text{g/L}$  using CE for the simultaneous enantiomeric separation of the six phenoxy acid herbicides in 11 min. The results presented in this article show the high potential of the PMO materials synthesized in this work as sorbents for off-line SPE previous to CE separation in the simultaneous chiral analysis of phenoxy acids in water samples.

## Acknowledgments

Authors thank the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) for research project CTQ2013-48740-P. J. Valimaña-Traverso also thanks this Ministry for his pre-doctoral contract (BES-2014-070532). The Research Support Center for Chemistry (University of Alcalá) is gratefully acknowledged for the availability of CE equipment for sample analysis.

## 5. References

- [1] W. Liu, M. Tang, Enantioselective activity and toxicity of chiral herbicides, in: M. N. Hasaneen (Ed.), *Herbicides - Mechanisms and Mode of Action*, InTech, Rijeka, 2011, pp. 63-80.
- [2] Z. Ujang, W. Husain, M. Seng, A. Rashid, The kinetic resolution of 2-(4-chlorophenoxy)propionic acid using *Candida rugosa* lipase, *Process Biochem.* 38 (2003) 1483-1488.

- [3] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, M. Behbahani, M. Salarian, A. Bagheri, S. Nojavan, Combination of graphene oxide-based solid phase extraction and electro membrane extraction for the preconcentration of chlorophenoxy acid herbicides in environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 227-235.
- [4] N. Casado, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Current development and applications of ordered mesoporous silicas and other sol-gel silica-based materials in food sample preparation for xenobiotics analysis, *TrAC* 88 (2017) 167-184.
- [5] J. Gañán, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction of 17 $\beta$ -estradiol from waters and its determination by HPLC-DAD, *J Hazard Mater.* 260 (2013) 609-617.
- [6] T. Asefa, M. MacLachlan, N. Coombs, G. Ozin, Periodic mesoporous organosilicas with organic groups inside the channel walls, *Nature* 402 (1999) 867-871.
- [7] D. Perez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Preparation and characterization of mesoporous silicas modified with chiral selectors as stationary phase for high-performance liquid chromatography, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 14-23.
- [8] H. Wu, C. Liao, Y. Pan, C. Yeh, H. Kao, Synthesis and characterization of cubic thiol-functionalized periodic mesoporous organosilicas as effective mercury ion adsorbents, *Microporous Mesoporous Mater.* 119 (2009) 109-116.
- [9] D. Esquivel, E. De Canck, C. Jimenez-Sanchidrian, F.J. Romero-Salguero, P. Van der Voort, Pyrrole PMOs incorporating new N-heterocyclic compounds on

an ethene-PMO through Diels-Alder reactions, *Mater. Chem. Phys.* 148 (2014) 403-410.

[10] M. Imamoglu, D. Perez-Quintanilla, I. Sierra, Bifunctional periodic mesoporous organosilicas with sulfide bridges as effective sorbents for Hg(II) extraction from environmental and drinking waters, *Microporous Mesoporous Mater.* 229 (2016) 90-97.

[11] C. Sanchez, F. Jeremias, S. Ernst, S.K. Henninger, Synthesis, functionalization and evaluation of ethylene-bridged PMOs as adsorbents for sorption dehumidification and cooling systems, *Microporous Mesoporous Mater.* 244 (2017) 151-157.

[12] F.X. Zhu, D.D. Yang, F. Zhang, H.X. Li, Amine-bridged periodic mesoporous organosilica nanospheres as an active and reusable solid base-catalyst for water-medium and solvent-free organic reactions, *J. Mol. Catal. A-Chem.* 363-364 (2012) 387-397.

[13] M.S. Moorthy, P.K. Tapaswi, S.S. Park, A. Mathew, H.J. Cho, C.S. Ha, Ion-imprinted mesoporous silica hybrids for selective recognition of target metal ions, *Microporous Mesoporous Mat.* 180 (2013) 162-171.

[14] X.A. Zhang, W.J. Wu, Y.H. Man, T. Tian, X.Z. Tian, J.F. Wang, Preparation and photochromism of Kegging-type molybdphosphoric acid/silica mesoporous composite thin films, *Sci. China Ser. B-Chem* 50 (2007) 318-326.

[15] F.X. Zhu, P.S. Zhao, X.J. Sun, L.T. An, Y. Deng, J.M. Wu, Direct synthesis and application of bridged diamino-functionalized periodic mesoporous organosilicas with high nitrogen contents, *J. of Solid-State Chem.* 255 (2017) 70-75.

- [16] J.H. Shin, S.S. Park, C.S. Ha, Adsorption behaviour of nicotine on periodic mesoporous organosilicas, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 84 (2011) 579-584.
- [17] T. Asefa, A.N. Otuonye, G. Wang, E.A. Blair, R. Vathyam, K. Denton, Controlling adsorption and release of drugs and small molecules by organic functionalization of mesoporous materials, *Adsorption* 15 (2009) 287-299.
- [18] J.H. Shin, S.S. Park, N. Selvaraj, Adsorption of amino acids on periodic mesoporous organosilicas, *J. Porous Mat.* 19 (2012) 29-35.
- [19] V. Gascón, I. Díaz, R.M. Blanco, C. Márquez-Álvarez, Hybrid periodic mesoporous organosilica designed to improve the properties of immobilized enzymes, *RSC Adv.* 4 (2014) 34356.
- [20] M. Park, S.S. Park, M. Selvaraj, D.Y. Zhao, C.S. Ha, Hydrophobic mesoporous materials for immobilization of enzymes, *Microporous Mesoporous Mater.* 124 (2009)
- [21] E. Terzopoulou, D. Voutsas, G. Kaklamanos, A multi-residue method for determination of 70 organic micropollutants in surface waters by solid-phase extraction followed by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 1095-1112.
- [22] V. Fauvelle, N. Mazzella, S. Morin, S. Moreira, B. Delest, H. Bidzinski, Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for acidic herbicides and metabolites analysis in fresh water, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (2015) 3988-3996.
- [23] I. Rodríguez Pereiro, R. González Irimia, E. Rubí Cano, R. Cela Torrijos, Optimisation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for the



determination of phenoxy acid herbicides in water samples as silyl derivatives, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 249-256.

[24] M. Peruzzi, G. Bartolucci, F. Cioni, Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/mL level in water by solid-phase extraction with poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography-diode-array detection, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 169-175.

[25] R. Rodil, J.B. Quintana, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Multi-residue analytical method for the determination of emerging pollutants in water by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2958-2969.

[26] C. Xu, D.W. Armstrong, High-performance liquid chromatography with paired ion electrospray ionization (PIESI) tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of acidic pesticides in water, *Anal. Chim. Acta* 792 (2013) 1-9.

[27] B. Jin, F. Xiao, B. Chen, P. Chen, L. Xie, Simultaneous determination of 42 organic chemicals in bottled water by combining C18 extraction disk with GC-MS and LC/MS/MS technique, *J. Water Health* 8 (2010) 116-125.

[28] W. Qin, S.F.Y. Li, Determination of chlorophenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis with integrated potential gradient detection, *Electrophoresis* 24 (2003) 2174-2179.

[29] Y.S. Fung, J.L.L. Mak, Determination of pesticides in drinking water by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Electrophoresis* 22 (2001) 2260-2269.

- [30] Y. Xu, W. Qin, Y.H. Lau, S.F.Y. Li, Combination of cationic surfactant-assisted solid-phase extraction with field-amplified sample stacking for highly sensitive analysis of chlorinated acid herbicides by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis* 26 (2005) 3507-3517.
- [31] N. Li, H.K. Lee, Sample preparation based on dynamic ion-exchange solid-phase extraction for GC/MS analysis of acidic herbicides in environmental water, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3077-3084.
- [32] K. Vandecasteele, I. Gaus, W. Debreuck, K. Walraevens, Identification and quantification of 77 pesticides in groundwater using solid phase coupled to liquid-liquid microextraction and reversed-phase liquid chromatography, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3093-3101.
- [33] J.A. Field, K. Monohan, Chlorinated acid herbicides in water by strong anion-exchange disk extraction and in-vial elution and derivatization, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 85-90.
- [34] L.Z. Yu, M.J.M. Wells, Establishing the feasibility of coupled solid-phase extraction-solid-phase derivatization for acidic herbicides, *J. Chromatogr. A* 1143 (2007) 16-25.
- [35] X.J. Yang, Z. Du, A. Lin, Q. Yuan, P. Wan, C. Wong, Simultaneous determination of neutral, basic and acidic pesticides in aquatic environmental matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Methods* 5 (2013) 2083-2092.
- [36] N. Luque, S. Rubio, Extraction and stability of pesticides multiresidues from natural water on a mixed-mode admicellar sorbent, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 74-83.

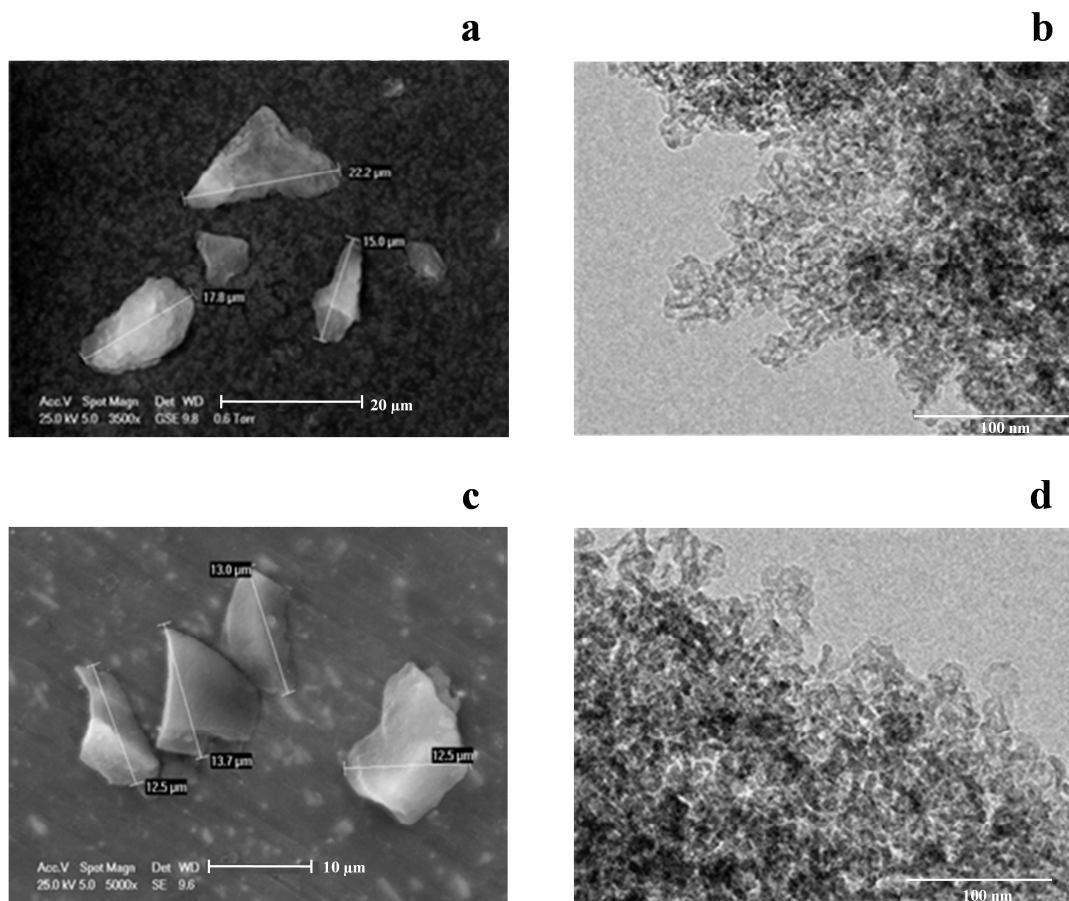
- [37] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, M. Behbahani, M. Salarian, A. Bagheri, S. Nojavan, Combination of graphene oxide-based solid phase extraction and electro membrane extraction for the preconcentration of chlorophenoxy acid herbicides in environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 227-235.
- [38] E. Herrero-Hernández, R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, Behavior of phenols and phenoxyacids on a bisphenol-A imprinted polymer. Application for selective solid-phase extraction from water and urine samples, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 3322-3339.
- [39] C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the clean-up of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 35-44.
- [40] C. Baggiani, C. Giovannoli, Molecular imprinted solid-phase extraction for cleanup of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples, in: J.L. Martínez Vidal, A.G. Frenich (Eds.), *Pesticide protocols. Method in biotechnology*, Vol 19, Humana Press, New York, USA, 2006, pp. 421-433.
- [41] J.M. Saz, M.L. Marina, Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 79-94.
- [42] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Eds., *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [43] Y. Ji, L. Black, R. Koester, M. Janek, Hydrophobic coagulation and aggregation of hematite particles with sodium dodecylsulfate, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 298 (2007) 235-244.

- [44] M. Kruk, M. Jaroniec, A. Sayari, Relations between pore structure parameters and their implications for characterization of MCM-41 using gas adsorption and X-ray diffraction, *Chem. Mater.* 11 (1999) 492-500.
- [45] M.P. Kapoor, S. Inagaki, Synthesis of phenylene bridged mesoporous silsesquioxanes with spherical morphology in ammonia solution, *Chem. Lett.* 33 (2004) 88-89.
- [46] S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, O. Terasaki, Novel mesoporous materials with a uniform distribution of organic groups and inorganic oxide in their frameworks, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9611-9614.
- [47] J.L. Blin, A. Léonard, B.L. Su, Well-ordered spherical mesoporous materials CMI-1 synthesized via an assembly of decaoxyethylene cetyl ether and TMOS, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3542-3553.
- [48] S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, Templating of mesoporous molecular sieves by non-ionic polyethylene oxide surfactants, *Science* 269 (1995) 1242-1244.
- [49] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024-6036.
- [50] Y. Martin-Biosca, C. Garcia-Ruiz, M. Marina, Enantiomeric separation of chiral phenoxy acid herbicides by electrokinetic chromatography. Application to the determination of analyte-selector apparent binding constants for enantiomers, *Electrophoresis* 22 (2001) 3216-3225.

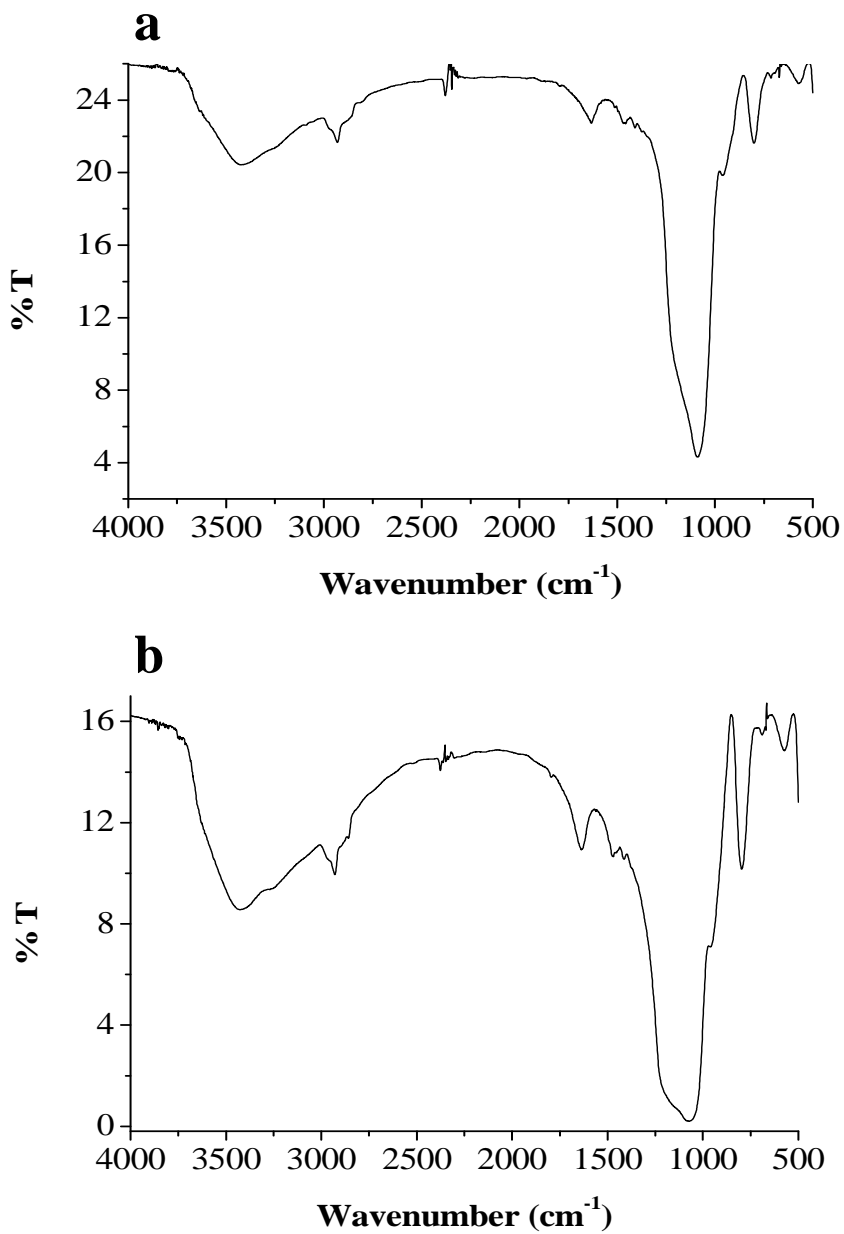
- [51] M. Miura, Y. Terashita, K. Funazo, M. Tanaka, Separation of phenoxy acid herbicides and their enantiomers in the presence of selectively methylated cyclodextrin derivatives by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 359-367.
- [52] K. Otsuka, C.J. Smith, J. Grainger, J.R. Barr, D.G. Patterson, N. Tanaka, S. Terabe, Stereoselective separation and detection of phenoxy acid herbicide enantiomers by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 75-81.
- [53] O. Zerbinati, F. Trotta, C. Giovannoli, Optimization of the cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis separation of the enantiomers of phenoxyacid herbicides, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 423-430.
- [54] S. Tsunoi, H. Harino, M. Miura, M. Eguchi, M. Tanaka, Separation of phenoxy acid herbicides by capillary electrophoresis using a mixture of hexakis(2,3-di-O-methyl)- and sulfopropylether- $\alpha$ -cyclodextrins, *Anal. Sci.* 16 (2000) 991-993.
- [55] A.K. Malik, J.S. Aulakh, A. Fekete, P. Schmitt-Kopplin, Separation of the phenoxy acid herbicides and their enantiomers by capillary zone electrophoresis in presence of highly sulphated cyclodextrins, *J. Chin. Chem. Soc.* 56 (2009) 1163-1167.
- [56] J.L. Haynes III, S.A. Shamsi, F. O'Keefe, R. Darcey, I.M. Warner, Cationic  $\beta$ -cyclodextrin derivative for chiral separations, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 261-271.
- [57] F. O'Keefe, S.A. Shamsi, R. Darcy, P. Schwinte, I.M. Warner, A persubstituted cationic  $\beta$ -cyclodextrin for chiral separations, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4773-4782.

- [58] Y. Xiao, T.T. Ong, T.T.Y. Tan, S.C. Ng, Synthesis and application of a novel single-isomer mono-6-deoxy-6-(3R,4R-dihydroxypyrrolidine)- $\beta$ -CD chloride as a chiral selector in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 994-999.
- [59] C. Desiderio, C.M. Polcaro, P. Padiglioni, S. Fanali, Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 503-513.
- [60] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, Automated on-line in-tube solid-phase microextraction followed by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of chlorinated phenoxy acid herbicides in environmental waters, *Analyst* 126 (2001) 602-608
- [61] M.R. Lee, R.J. Lee, Y.W. Lin, C.M. Chen, B.H. Hwang, Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for determining acidic herbicides in water, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1963-1968.
- [62] A. Prieto, R. Rodil, J.B. Quintana, R. Cela, M. Moder, I. Rodriguez, Evaluation of polyethersulfone performance for the microextraction of polar chlorinated herbicides from environmental water samples, *Talanta* 122 (2014) 264-271.
- [63] M.T. Jafari, M. Saraji, S. Yousefi, Negative electrospray ionization ion mobility spectrometry combined with microextraction in packed syringe for direct analysis of phenoxyacid herbicides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 41-47.
- [64] I. Rodriguez, E. Rubi, R. Gonzalez, J.B. Quintana, R. Cela, On-fibre silylation following solid-phase microextraction for the determination of acidic herbicides in water samples by gas chromatography, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 259-266.

**Supplementary material**

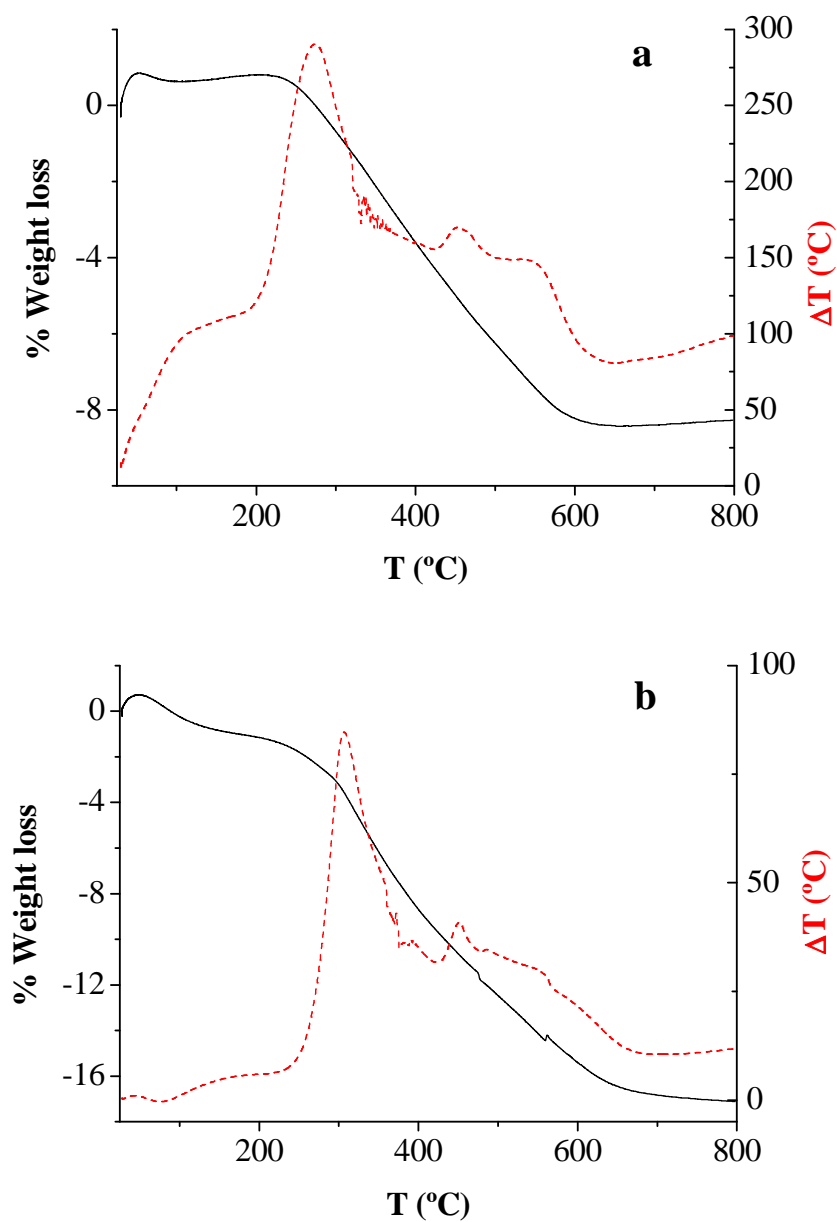


**Figure S1.** SEM micrographs (a, c) and TEM pictures (b, d) for PMO-STPA and PMO-TEPA materials, respectively.

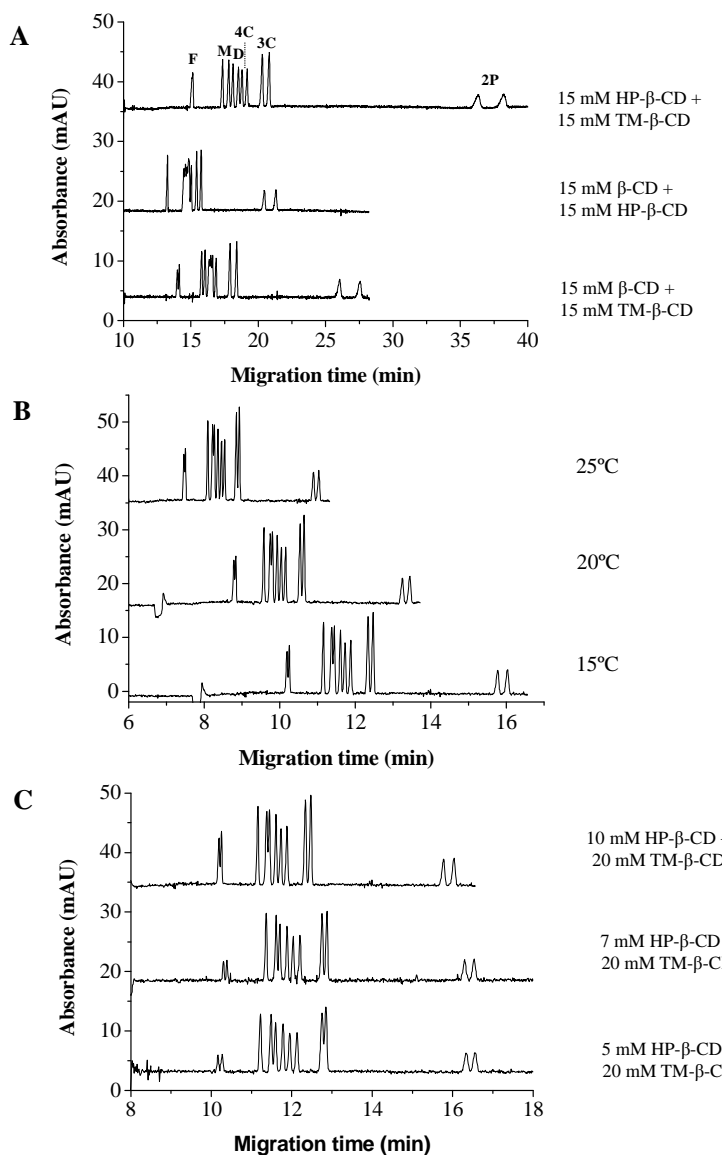


**Figure S2.** FTIR spectra of PMO-STPA (a) and PMO-TEPA (b) materials.

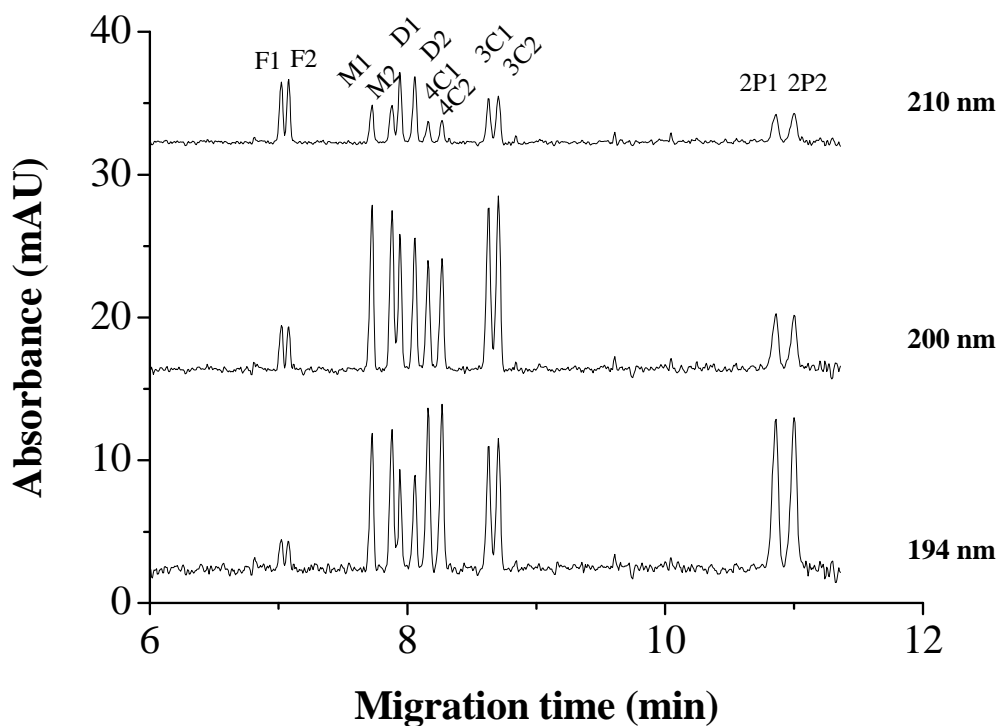




**Figure S3.** Thermogravimetric analysis of PMO-STPA (a) and PMO-TEPA (b) materials.



**Figure S4.** Electropherograms corresponding to the enantiomeric separation of six phenoxy acid herbicides by CE: (A) using different dual CD-systems (50 mM ammonium formate, pH 5.0, temperature: 25°C); (B) using different separation temperatures with 10 mM HP- $\beta$ -CD/20 mM TM- $\beta$ -CD (50 mM phosphate buffer, pH 7.0); and (C) using different HP- $\beta$ -CD concentrations in the dual CD-system (50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 15°C). Other conditions: injection: 50 mbar x 10 s, voltage: 20 kV, capillary: 58.5 cm total length (50 cm effective length) x 50  $\mu$ m I.D.



**Figure S5.** Representative electropherograms for the simultaneous enantiomeric separation of the six phenoxy acid herbicides at each wavelength used to monitor the analytes.

**Table S1.** Use of other commercial and non-commercial materials for SPE extraction of the phenoxyacid herbicides studied from water samples.

Analyte	Sorbent (Amount)	Recovery (%)	PF	MDL/MQL ( $\mu\text{g/L}$ ) (*)	Sample	Ref.
Mecoprop Dichlorprop	Oasis HLB (200 mg)	42-65 55-75	2000	-	Surface waters	[21]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	Oasis HLB (150 mg)	90 100 85	3177	-	Drinking water	[22]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	Oasis HLB (60 mg)	94-98 82-103 83-98	1000- 2000	-	River and sewage water	[23]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	Oasis HLB (500 mg)	86 86 84	5000	N/A	River water	[24]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	Oasis HLB (200 mg)	91-131 97-117 91-120	200-500	-	Tap, Surface and wastewater	[25]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	C18 (N/A)	93	133	-	Surface and ground water	[26]
Fenoprop Dichlorprop Mecoprop	C18 (N/A)	83-107 84-92 83-101	1000	-	Drinking water	[27]
Mecoprop Dichlorprop	C18 (500 mg)	96-103 93-96	4000	1700 / - 1500 / -	Tap water	[28]
Mecoprop Dichlorprop	C18 (500 mg)	89 96	1000	0.078 / - 0.056 / -	Drinking water	[29]
Dichlorprop Fenoprop	C18 assisted with CTAB (500 mg)	100 97	100	0.071 / - 0.114 / -	Pond water	[30]
Fenoprop Mecoprop Dichlorprop	C18 and CTAB (500 mg)	85-105 90-102 94-101	N/A	N/A	Tap water	[31]

(Continued)

Analyte	Sorbent (Amount)	Recovery (%)	PF	MDL/MQL (µg/L) (*)	Sample	Ref.
Mecoprop	LiChrolut EN/LiChrorep RP-18	79-87	N/A	0.024 / -	Groundwater	[32]
Dichlorprop		55-79		0.027 / -		
Fenoprop	SAX disk	98-107	N/A	-	Surface water	[33]
Fenoprop	Polystyrene-divinylbenzene (N/A)	81	100	N/A	Water samples	[34]
Dichlorprop		143				
Dichlorprop	GCB (300 mg)	83-103	10	-	River water	[35]
Mecoprop		80-107				
Mecoprop	Alumina cartridge with SDS and	97-102	N/A	0.003 / 0.008	River and	[36]
Dichlorprop	Graphene oxide-based SPE - electro membrane extraction	40	1950-2000	0.3-0.5 / -	River and sea water	[37]
Mecoprop		40				
Fenoprop	MISPE	91	5	0.040 / -	River water	[38]
Fenoprop	MIP (500 mg)	81-93	500	N/A	River water	[39]
Mecoprop		89				
Dichlorprop		89-114				
Mecoprop	MIP (200 mg)	88	2	N/A	Deionized water	[40]
Dichlorprop		95				
Fenoprop		96				
Fenoprop	PMO	86-104	400-1500	0.1-1.0 / 0.4-3.4	River and wastewater	This work
Mecoprop		92-105		0.3-1.4 / 0.9-4.8		
Dichlorprop		95-104		0.3-1.9 / 0.9-6.3		
4-CPPA		93-104		0.3-1.9 / 1.1-6.2		
3-CPPA		91-105		0.4-2.7 / 1.5-9.0		
2-PPA		78-108		0.8-4.3 / 2.8-14.3		

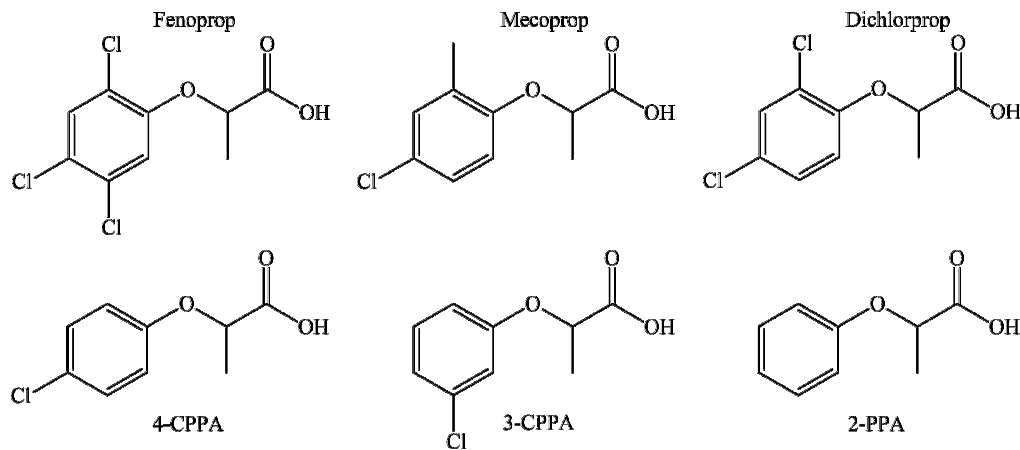
(\*) MDL and MQL values were specified only for methodologies employing UV detection. N/A: Not available; PF: Preconcentration factor, GCB: Graphitized carbon black, SDS: Sodium dodecyl sulphate, TBA: Tetrabutylammonium.

**Table S2.** Values of Van der Waals forces and Hückel charge of ligands (STPA and TEPA) and phenoxyacid herbicides studied.

	Cationic amine-bridge ligand		Phenoxyacid herbicides					
	STPA	TEPA	Fenoprop	Mecoprop	Dichlorprop	4-CPPA	3-CPPA	2-PPA
<b>Van der Waals forces (Kcal/mol)</b>	29.6	19.2	12.0	10.8	11.4	9.9	10.0	9.5
<b>Hückel charge</b>	+0.7006 <sup>a</sup>	+0.6464 <sup>a</sup>	-0.7694 <sup>b</sup>	-0.6698 <sup>b</sup>	-0.6490 <sup>b</sup>	-0.4599 <sup>b</sup>	-0.4332 <sup>b</sup>	-0.4523 <sup>b</sup>

a: Hückel nitrogen charge for amine moiety.

b: Hückel oxygen charge for carboxyl moiety (Mean value of charge of two oxygens).





## CAPÍTULO VI

**ESTABILIDAD ENANTIOMÉRICA Y TOXICIDAD  
DE DULOXETINA, ECONAZOL Y SUS MEZCLAS  
POR CROMATOGRAFÍA ELECTROKINÉTICA**





## **VI. 1 Introducción**

La presencia de contaminantes en matrices medioambientales supone una amenaza potencial para organismos no diana [6] ya que éstos pueden sufrir alteraciones metabólicas y hormonales [6, 261]. Mientras que existen innumerables estudios para evaluar la presencia de xenobióticos en matrices medioambientales, la evaluación del impacto de estos compuestos sobre organismos no diana es menos frecuente, especialmente cuando se tiene en cuenta la relación enantiomérica de los compuestos que son quirales.

Dos ejemplos de organismos no diana son la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna* [262]. El primero de ellos se ha utilizado escasamente en estudios de toxicidad y supone una alternativa muy interesante a la utilización de organismos de nivel inferior como las algas que han sido los más utilizados en estos tipos de estudios [263]. En lo que respecta a *Daphnia magna*, su tiempo de vida está condicionado por la presencia de alimentos como algas, bacterias y detritos, así como de contaminantes [264], por lo que resulta ser un organismo usado como indicador de la calidad del agua, sobre todo gracias a su fisiología transparente [265] que permite observar cambios en ésta cuando el organismo es expuesto a condiciones tóxicas [266]. Estos organismos poseen la capacidad de degradar compuestos quirales mediante procesos enzimáticos estereoespecíficos que hacen variar su fracción enantiomérica [267]. Todo lo mencionado avala el interés de estudiar el impacto de tóxicos sobre estos organismos no diana.

Duloxetina y econazol son dos fármacos considerados contaminantes emergentes y que se pueden encontrar en el medio acuático. Duloxetina es un fármaco perteneciente a la familia de los recaptadores de serotonina y

norepinefrina y se usa para el tratamiento de la depresión y la ansiedad [268]. Su actividad terapéutica reside principalmente en el enantiómero S [269] por lo que se comercializa como fármaco enantioméricamente puro. Econazol es un antifúngico derivado del imidazol usado para el tratamiento de infecciones micóticas [270]. A pesar de que su actividad terapéutica se debe principalmente al enantiómero R, se ha comercializado como racemato [271]. La evaluación de la estabilidad y toxicidad de estos fármacos para organismos no diana presenta un gran interés debido a su presencia en el medio acuático y a la escasez de datos para estos compuestos en relación a los dos parámetros mencionados. Únicamente en el caso de econazol, se han descrito sus características (bioacumulación y baja biodegradabilidad) [272, 273].

Diversas agencias internacionales promueven estudios de ecotoxicidad, biodisponibilidad y bioacumulación de contaminantes emergentes. Sin embargo, en muchos casos, se ignora la estereoquímica de dichos compuestos lo que puede restar validez a los resultados obtenidos dadas las distintas características que pueden presentar los estereoisómeros de tóxicos quirales. Además, los cálculos de los parámetros de toxicidad habitualmente se llevan a cabo utilizando las concentraciones iniciales de los tóxicos en las muestras en estudio sin tener en cuenta las concentraciones reales a las que se encuentran expuestos los organismos no diana base de dichos estudios. En consecuencia, los valores de los parámetros de toxicidad pueden presentar diferencias significativas en relación a los obtenidos sin tener en cuenta estas variaciones en las concentraciones [191]. Por otra parte, el efecto combinado de varios tóxicos sobre organismos no diana presenta una gran relevancia debido a las interacciones que pueden existir entre dichos compuestos alterando su impacto sobre el medioambiente.

Por todo ello, en este trabajo de investigación se abordó el estudio de estabilidad enantiomérica y determinación de la toxicidad de duloxetina, econazol y sus mezclas sobre los dos organismos no diana mencionados anteriormente (la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna*) considerando la estereoquímica de ambos tóxicos y determinando las concentraciones enantioméricas reales de ambos compuestos mediante Cromatografía Electrocinética. Este trabajo constituye la primera contribución científica que evalúa el impacto de los dos fármacos estudiados y sus mezclas sobre una planta acuática y de las mezclas de dichos compuestos sobre el microcrustáceo *Daphnia magna*.

## VI.2 Objetivos

El objetivo de este capítulo ha sido evaluar la estabilidad de los enantiómeros de duloxetina, econazol y sus mezclas en condiciones abióticas y bióticas, en este último caso en presencia de dos organismos no diana, la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna*, así como determinar la toxicidad de estos fármacos y sus mezclas sobre dichos organismos, determinando las concentraciones enantioméricas de dichos fármacos mediante CD-EKC.

Con este fin, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Optimizar una metodología electroforética por CD-EKC que permita la separación enantiomérica simultánea rápida de duloxetina y econazol.

2. Evaluar los perfiles de estabilidad de los dos fármacos estudiados y sus mezclas, en condiciones abióticas y bióticas (en presencia de la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna*).
3. Determinar la toxicidad de duloxetina, econazol y sus mezclas, sobre los organismos no diana *Spirodela polyrhiza* y *Daphnia magna*.

### **VI.3 Resultados y discusión**

#### **VI.3.1. Optimización de una metodología analítica por EKC para la separación enantiomérica simultánea de duloxetina y econazol**

Con el fin de optimizar una metodología analítica que permitiera la separación enantiomérica rápida de duloxetina y econazol por EKC, se partió del método desarrollado en el capítulo IV de esta Tesis Doctoral y que había demostrado su potencial para la separación simultánea de los enantiómeros de siete fármacos, entre los que se encontraban duxetina y econazol. Para ello, se partió de las condiciones empleadas en el capítulo IV (25 mM tampón fosfato pH 3.0, una concentración de S- $\beta$ -CD de 2 % (p/v), una temperatura de 20°C y un voltaje de -20 kV) y se procedió a optimizar variables como la concentración de CD y de tampón fosfato, la temperatura y el voltaje de separación, con la finalidad de conseguir el objetivo planteado en este trabajo en el menor tiempo posible y con las mayores resoluciones enantioméricas.

En primer lugar, se ensayaron diferentes concentraciones del selector quiral (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 % (p/v)) manteniendo constantes el resto de condiciones experimentales. En base a los resultados obtenidos, se seleccionó una concentración óptima de CD del 1.5 % (p/v) ya que permitía obtener la mayor

resolución enantiomérica para econazol sin reducir apreciablemente la de duloxetine y dando lugar a la vez a una reducción del tiempo de análisis a 9 min. A continuación, se optimizó la concentración de tampón fosfato a pH 3.0 (25, 50 y 75 mM), observándose que al aumentar ésta mejoraba la resolución enantiomérica para duloxetine pero disminuía la de econazol y aumentaba el tiempo de análisis por lo que se decidió mantener una concentración de tampón de 25 mM. El estudio del efecto de la temperatura se llevó a cabo para valores entre 15 y 30 °C (15, 20, 25 y 30°C) eligiéndose 30 °C como temperatura óptima ya que a este valor se observó un aumento en la resolución enantiomérica para ambos fármacos (debido al incremento de la eficacia de pico) y una reducción del tiempo de análisis a 7.5 min. Finalmente, se optimizó el voltaje de separación (-20, -25 y -30 kV), seleccionándose un valor de -20 kV ya que, si bien se reducía el tiempo de análisis, como era de esperar para mayores valores del voltaje, se observaba también una pérdida de resolución enantiomérica y la rápida electrolisis del tampón. En las condiciones optimizadas, la separación simultánea de los dos fármacos se llevó a cabo en un tiempo de análisis de 7.5 min, con una resolución enantiomérica de 7.9 para duloxetine y de 6.5 para econazol.

Una vez optimizado el método, se procedió a evaluar sus características analíticas en términos de linealidad, estudio de la existencia de interferencias de matriz, precisión, exactitud, LODs y LOQs cuando se analizaron los medios de cultivo (correspondientes a la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y al microcrustáceo *Daphnia magna*) en las condiciones abióticas y bióticas empleadas en este trabajo. Los resultados demostraron que el método era adecuado para llevar a cabo la determinación de los enantiómeros de los dos fármacos en dichas muestras estando los LODs para los enantiómeros de duloxetine comprendidos entre 0.2 y 0.4 mg/L y entre 0.7 y 1.1 mg/L para los enantiómeros de econazol, mientras que los LOQs para los enantiómeros de duloxetine estaban

comprendidos entre 0.8 y 1.3 mg/L y entre 2.2 y 3.6 mg/L para los enantiómeros de econazol. La ausencia de interferencias de matriz permitió aplicar la metodología desarrollada a la cuantificación de los enantiómeros de ambos fármacos mediante calibración por el método del patrón externo.

### **VI.3.2. Estudios de estabilidad enantiomérica en condiciones abióticas y bióticas para duloxetina, econazol y sus mezclas**

Con el objetivo de estudiar la estabilidad de los enantiómeros de duloxetina, econazol y sus mezclas en los medios de cultivo utilizados para la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y para el microcrustáceo *Daphnia magna*, se incubaron, tanto de manera individual como en mezclas, disoluciones de cada fármaco a diferentes concentraciones durante 72 h, determinando la concentración inicial y final de cada enantiómero por la metodología quiral EKC optimizada.

En el caso de la planta acuática *Spirodela polyrhiza*, se observó que tanto el racemato de duloxetina como sus enantiómeros veían disminuida su concentración en porcentajes de hasta un 79 % en condiciones abióticas cuando duloxetina se encontraba de forma individual. En estas mismas condiciones, econazol (racemato y enantiómeros) ve reducida su concentración en porcentajes de hasta un 65%. En condiciones bióticas y en disoluciones individuales, duloxetina es aún menos estable (reduciendo sus concentraciones hasta un 87 %) mientras que econazol se comporta de modo similar a como lo hace en condiciones abióticas. En mezclas binarias, la reducción de las concentraciones del racemato y los enantiómeros de duloxetina fue mayor en condiciones bióticas (hasta un 83 %) que abióticas (hasta un 71 %) y las concentraciones de econazol no fueron detectables ni en condiciones abióticas ni bióticas.

El estudio de la estabilidad en medios de cultivo de *Daphnia magna* puso de manifiesto que econazol reduce su concentración tras la incubación con dichos medios de cultivo hasta valores no detectables, tanto cuando se adiciona de forma individual a dichos medios como cuando está presente como mezcla binaria con duloxetine demostrando que no es estable. La variación de la concentración de duloxetine fue insignificante tanto en condiciones abióticas como bióticas en disoluciones individuales de este fármaco, así como en mezclas en condiciones abióticas. Sin embargo, en las mezclas con econazol en condiciones bióticas, duloxetine vio reducida su concentración en porcentajes entre 46 y 77 % dependiendo de las concentraciones iniciales ensayadas de este fármaco.

### **VI.3.3. Determinación de la toxicidad de duloxetine, econazol y sus mezclas para la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y el microcrustáceo *Daphnia magna***

La determinación de la toxicidad de duloxetine, econazol y sus mezclas sobre *Spirodela polyrhiza* y *Daphnia magna* se llevó a cabo cuantificando las concentraciones reales de los enantiómeros de ambos fármacos mediante el método EKC optimizado con este fin. Los valores de EC50 para los dos fármacos y para sus mezclas sobre *Spirodela polyrhiza* (a 72 h de incubación) resultaron ser inferiores a 1, lo cual indicó que pueden ser calificados como compuestos muy tóxicos de acuerdo con la normativa europea EC1272/2008 [274]. Los menores valores de EC50 correspondieron a econazol, lo cual corrobora su mayor toxicidad para este organismo (EC50 = 0.435 mg/L) en comparación con duloxetine (EC50=0.813 mg/L) y la mezcla binaria (EC50=0.690 mg/L). El cálculo de los índices de combinación (CI) para la mezcla permitió estudiar el efecto combinado de ambos fármacos cuando se encuentran en una mezcla, así como el tipo de interacción que tiene lugar. En este caso, se observó un efecto antagonista



ligero entre EC50 y EC90 y moderado por encima de EC90, y efecto aditivo en la zona próxima a los valores de EC50.

Del mismo modo, se realizaron estudios de toxicidad sobre *Daphnia magna* tras tiempos de exposición de 24, 48 y 72 h. Como en el caso anterior, los fármacos y sus mezclas mostraron una alta toxicidad para este organismo con valores de EC50 a 72 h de 0.08 mg/L para duloxetina, 0.11 mg/L para econazol y 0.07 mg/L para la mezcla, valores significativamente inferiores a los obtenidos para *Spirodela polyrhiza* y que además permiten observar que para *Daphnia magna* el econazol muestra menor toxicidad que la duloxetina o la mezcla, al contrario de lo que sucede para *Spirodela polyrhiza*. En relación al efecto combinado de los fármacos, en este caso, se observó una fuerte sinergia a un tiempo de exposición de 48 h y a cualquier nivel de efecto, lo que demostró la alta toxicidad de esta mezcla de fármacos para *Daphnia magna*.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral basado en la planta acuática *Spirodela polyrhiza* constituye la primera contribución científica al estudio de la ecotoxicidad de duloxetina, econazol y sus mezclas sobre una planta acuática. En efecto, los únicos datos descritos para estos fármacos corresponden a dos organismos acuáticos fotosintéticos (la microalga verde *Raphidocelis subcapitata* y la microalga verde marina *Skeletonema marinoi*) y a disoluciones individuales de cada uno de ellos [275, 276]. En el caso de *Daphnia magna*, en este trabajo se aportan por primera vez los datos de toxicidad de mezclas de duloxetina y econazol para este microcrustáceo, así como datos de toxicidad de los dos fármacos y sus mezclas a distintos tiempos de exposición. Por ello, únicamente se pudo comparar los valores de EC50 obtenidos en este trabajo para cada uno de los fármacos estudiados de forma individual (EC50=0.12 mg/L para duloxetina y EC50=0.24 mg/L para econazol) con los obtenidos previamente por otros autores

a 48 h de incubación ( $EC_{50}=3.35$  mg/L para duloxetine y  $EC_{50}=0.4$  mg/L para econazol) [262]. Las diferencias observadas entre los valores de  $EC_{50}$  para duloxetine se justifican por el empleo de concentraciones reales de los fármacos determinadas por EKC en este trabajo mientras que en el mencionado artículo [262] se utilizaron concentraciones iniciales. De hecho, el empleo de concentraciones iniciales para econazol en esta Tesis Doctoral (al no ser detectable en el medio) justifica la menor diferencia entre los valores de  $EC_{50}$  obtenidos en el presente trabajo y el artículo referenciado [262].

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos en la determinación de la toxicidad de los fármacos estudiados y sus mezclas para *Spirodela polyrhiza*, se llevaron a cabo ensayos en los que se investigó el efecto de los tóxicos en la eficacia fotosintética. Para ello, se midió la emisión de fluorescencia de clorofila directamente sobre diferentes partes de la planta (brotes, hojas y raíces). Se observó que los porcentajes de inhibición eran diferentes en función de la zona de la planta estudiada, disminuyendo en el orden siguiente: raíces>hojas>brotes, independientemente de los tóxicos. El econazol fue el tóxico que proporcionó la mayor inhibición de la fluorescencia seguido de la mezcla y de la duloxetine, resultados que están en concordancia con los valores de  $EC_{50}$  obtenidos. De la misma forma, se evaluó el estrés oxidativo provocado por estos tóxicos sobre *Daphnia magna* empleando un marcador bioquímico para obtener imágenes basadas en medidas de fluorescencia. Se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia a medida que aumentaba el tiempo de exposición, siendo más elevada para duloxetine y para la mezcla binaria tras 48 h corroborando la mayor toxicidad de duloxetine y de la mezcla para este organismo en relación a econazol.

Los resultados obtenidos en este capítulo de la presente Tesis Doctoral han dado lugar a la redacción de dos artículos científicos:

**Artículo 4**

*“Stability and toxicity studies for duloxetine and econazole on Spirodela polyrhiza using chiral capillary electrophoresis”.*

J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M. A. García, M.L. Marina.

**Journal of Hazardous Materials:** *En primera revisión.*

**Artículo 5**

*“Enantiomer stability and combined toxicity of duloxetine and econazole on Daphnia magna using real concentrations determined by capillary electrophoresis”.*

J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M. A. García, M.L. Marina.

**Journal of Science of the Total Environment:** *En primera revisión.*

#### Artículo 4

**“Stability and toxicity studies for duloxetine and econazole on *Spirodela polyrhiza* using chiral capillary electrophoresis”**

J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M.A. García, M.L. Marina.

J. Hazard. Mater. *En primera revisión*



## **Abstract**

Stability and toxicity studies for duloxetine and econazole were achieved using single solutions of each drug and their mixtures. Stability of drugs racemates and enantiomers was investigated under abiotic and biotic conditions. Toxicity was evaluated for the first time in this work on *Spirodela polyrhiza*. EC50 values were calculated for each drug and for binary mixtures. Real concentrations of the compounds determined by Capillary Electrophoresis were employed in the calculations and not nominal concentrations. The use of a 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) with 1.5% S- $\beta$ -CD as chiral selector at a temperature of 30°C and a separation voltage of -20 kV enabled the simultaneous enantiomeric separation of duloxetine (Rs 7.9) and econazole (Rs 6.5) in 7.5 min. Decay percentages under abiotic conditions were higher for duloxetine (80%) than for econazole (60%) while in presence of *Spirodela polyrhiza* they increased for duloxetine but not for econazole. Econazole showed the highest decay percentages under abiotic or biotic conditions (100%) in the presence of binary mixtures. EC50 values for duloxetine and econazole enabled to include both compounds within the group of very toxic compounds although econazole toxicity was higher than that of duloxetine and that of the binary mixture of both compounds.

**Keywords:** Aquatic plants; chiral capillary electrophoresis; duloxetine; econazole; mixture toxicity and stability.

## **Highlights**

- Duloxetine and econazole enantiomers were simultaneously separated by CE in 7.5 min

- Real concentrations determined by CE were used in stability and toxicity studies
- Stability of single drugs and their mixtures under abiotic and biotic conditions
- Single drugs and their mixture resulted very toxic for aquatic plant
- Toxicological interaction of drugs was studied in the whole range of effect levels

## **1. Introduction**

Tons of pharmaceuticals are produced worldwide to be consumed by humans and animals, so they are ubiquitous in the environment. They are designed to have particular physiological modes of action, and often resist inactivation before exerting their therapeutic effect, but these same characteristics are responsible for their bioaccumulation and toxic effects in aquatic and terrestrial ecosystems. Thus, they represent a potential threat [1], not only for humans and animals, but also towards non-target organisms [2], being recognized as emerging pollutants and considered a priority for the main organizations aimed to the protection of the public and environmental health [1, 2].

More than 60% of the drugs currently used are chiral compounds [3]. The enantiomers of a chiral drug can present different pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicity and degradation rates [2, 4] and frequently exhibit enantioselectivity in their environmental impact and their ultimate fate and toxicity. Some studies suggest that there is an enantioselective adsorption of chiral drugs in soils, sludges and sediments that is also affected by pH, temperature, ionic strength and the presence of co-solutes [2].

Regulatory agencies recognize pharmaceuticals as emerging pollutants of environmental concern. However, they ignore their stereochemistry originating ecotoxicity, bioavailability and accumulation studies incorrectly carried out since a correct assessment of the environmental risk due to the presence of chiral drugs requires stability and toxicity studies considering drug enantiomers. Moreover, the toxicity parameters are generally estimated using nominal or initial test concentrations of the contaminants, without taking into account the actual concentrations in the exposure tests. As a result, EC50 values can be greater than those corresponding to the actual degradation in the environment, both under biotic and abiotic conditions [5]. In any case, more attention should be paid to non-target organisms.

In order to achieve the individual determination of the enantiomers of a chiral drug, chiral separation techniques are mostly employed. Among them, Capillary Electrophoresis (CE) has shown to have a big potential for enantiomeric separations due to its high efficiency and its flexibility derived from the use of chiral selectors in the mobile phase [6]. Moreover, the small amount of reagents and samples needed to carry out a separation by CE confers to this technique a high interest from an environmental point of view being considered a clean analytical technique.

Duloxetine (N-methyl-3-(naphthalen-1-yloxy)-3-(thiophen-2-yl)propan-1-amine) is a selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor that is primarily used to treat depression and anxiety, although it is also prescribed to treat diabetic peripheral neuropathy, fibromyalgia and chronic musculoskeletal pain [7]. It is a chiral compound with an asymmetric carbon and although both enantiomers are active, it has been shown that the S-enantiomer has a higher activity than the R-enantiomer [7], so it is marketed as a pure enantiomer.



Econazole (1-[2-[(4-chlorophenyl)methoxy]-2-(2,4-dichlorophenyl) ethyl]imidazole) is an antifungal drug for topical use, derived from imidazole, which is used for the treatment of cutaneous mycoses as candidiasis and different kinds of ringworm [8]. It is a chiral compound with an asymmetric carbon that is commercialized as a racemate although, for conazole type fungicides, the R-enantiomer shows a higher activity than the S-isomer [9].

Evaluation of drugs stability is important and common practice in industrial pharmaceutical formulation. Previous studies were focused on the identification of degradation products of drugs under abiotic stress conditions such of hydrolysis, oxidation, photolysis and thermal degradation. Regarding duloxetine, it is highly sensitive to acid alkaline and neutral hydrolysis acid and also to photodegradation (UV and visible spectra) but not to thermal treatment and oxidation [10, 11]. In the case of econazole, a study reported its stability against neutral, acidic and alkaline hydrolysis, oxidation and thermal degradation [12]. Regarding ecotoxicity of both drugs, Minguez et al. [13] evaluated acute effect of individual compounds on different organisms paying special attention to photosynthetic microalgae for which both compounds can be considered highly toxic. The EC<sub>50</sub> values for the freshwater algae *Raphidocelis subcapitata* were 0.37 mg/L for duloxetine and 1.37 mg/L for econazole. Minguez et al. [14] predicted toxicity in multicomponent mixtures of antidepressants (including duloxetine) by applying the Concentration Addition (CA) model using the data of individual compounds, to describe combined toxicity with accuracy in most cases evaluated. The only article dealing with the study of ecotoxicity using an aquatic plant was achieved in *Lemna minor* for the azole compound climbazole [15].

This work was aimed to achieve stability and toxicity studies for duloxetine and econazole in individual solutions and binary mixtures under the

conditions used in the ecotoxicity test. Stability of drugs racemates and enantiomers was investigated under abiotic and biotic conditions and toxicity was evaluated for the first time on the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. Real concentrations were determined by an optimized chiral CE method. Toxicological profiles of individual drugs and interactions in their mixtures were studied by Combination Index (CI)-isobologram equation as in our previous works [16, 17].

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

Ortophosphoric acid 85%, sodium hydroxide (NaOH), sulfated- $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (HCl) 37% and methanol (MeOH) were from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q System from Millipore (Bedford, MA, USA). Standard compounds with high purity (99%) were purchased: (R,S)-duloxetine HCl from IS Chemical Technology (Shanghai, China) and (R,S)-econazole nitrate from Sigma-Aldrich.

### *2.2. Biological material and pre-culture conditions*

*Spirodela polyrhiza* duckweed as "dormant vegetative buds" (called turions) and concentrated solution for nutritive medium were obtained from the MicroBio Tests Inc. (Belgium). The growth conditions were based on International Standard ISO 20079 (ISO DIS 2005) for *Lemna* toxicity tests with a few modifications. Duckweeds were grown in a freshwater inorganic medium (Steinberg).

Turions were germinated for 3 days in a petri dish containing 5ml of (Steinberg) growth medium using a growth chamber (IBERCEX, Spain) with a continuous illumination at 6000 lux, under static conditions, and temperature was kept at 25 °C.

### *2.3. Toxicity tests*

After germination, freshly and healthy duckweed was used to perform inhibition tests according to a modified form of the ISO 20079. Exposure experiments were conducted in transparent 24 well plate containing 2 mL of culture media supplemented with either no added toxicants (Control) and predefined concentration of toxicants. One germinated duckweed was placed per well. The experiments for duloxetine and econazole were performed in the range 0.1–20 mg L<sup>-1</sup>. The mixtures of duloxetine+econazole were assayed using concentrations selected on the basis of the EC50 values of the individual components at 72h of exposure. All exposure experiments were conducted in the same growth chamber under the same light and temperature conditions cited for the preculture. Each set of experiments was replicated two times. For experimental purposes, plants were harvested 24, 48 and 72 h after the start of the treatment. Both growth rate and confocal images were recorded for each exposure condition.

#### 2.3.1. Inhibition of fronds area / growth rates

Plant growth, expressed as frond area, was monitored 24, 48 and 72 h after inoculation by measuring the size of the first fronds of the plants. For each exposure, images were taken with a digital camera. Total fronds area of each

plant were measured before and after the experiment by adopting the OECD 221 guideline (OECD, 2002). The images were subsequently analysed using the software Image J (National Institutes of Health, USA). Growth rate (GR) was calculated for each well by using formula  $GR = \text{Area}_{tf} - \text{Area}_{ti}$  where  $\text{Area}_{ti}$  represents frond area at the beginning of the experiment (ti) and  $\text{Area}_{tf}$  represents frond number 24, 48 and 72 h after the start of the exposure (tf). To evaluate the effect of toxicants on growth, percent inhibition of growth rate (%GR) was calculated as the difference between the mean growth rate/ fronds area in blank samples and mean growth rate/ fronds area in presence of target compounds.

### 2.3.2. Inhibition of chlorophyll fluorescence (CF)

In order to investigate the effect/stress of toxicants on plant physiology or photosynthesis efficiency, we used chlorophyll fluorescence (CF) quantification by confocal imaging [18, 19]. For experimental purposes, control and harvested plants after 72h exposure were used. A laser scanning confocal microscope (Leica TCS SP5, Germany). Chlorophyll auto-fluorescence was detected in the red channel ( $\lambda_{exc}=488\text{nm}$ ;  $\lambda_{em}=595\text{-}700\text{nm}$ ). Data were collected by a computer attached to the instrument, stored on the hard drive, processed with a Leica TCS Image Browser. Finally, the intensity of chlorophyll fluorescence was quantified by processing images of the plant components with ImageJ professional software.

### 2.3.3. Stability of exposure concentration

The stability of pollutants under the test conditions were tested. Briefly, toxicant concentrations were incubated during 72 hours in the same conditions used in biotic toxicity tests. The abiotic runs were performed in the absence of

plants in order to evaluate the sorption of target pollutants. From abiotic runs, it was evaluated also the effect of light and hydrolysis of compounds into aqueous reaction media by exposure under continuous light. The sorption capacity of the plant was calculated from the difference between the concentrations measured in assays of plant and abiotic runs performed in the absence of plant. Sorption and other physico-chemical phenomena were estimated by measuring the concentration of each contaminant in the liquid fraction at the beginning (0 h) and at the end of the exposure time (72 h). Each assay condition was replicated three times.

#### *2.4. Equations for the evaluation of toxicity parameters*

Toxicity parameters were calculated for individual pollutants and their binary combination, using the median-effect/combination index (CI)-isobologram equation, proposed in [20], which is based on the median-effect principle:

$$\frac{f_a}{1 - f_a} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m$$

D is a concentration of toxicant that affects a population fraction  $f_a$ .  $D_m$  is the median effective concentration (EC50). The parameter  $m$  accounts for the sigmoidicity of the dose-effect curve. The combined effect was assessed by using combined doses over a wide range of effect levels. The combination index (CI) values were obtained according to the combination index equation, valid form-chemical combination at  $x$ -percentage inhibition [21]:

$$(CI)_x^n = \sum_j^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_j^n \frac{(D_x)_{1-n} - \{[D]_j / \sum_j^n [D]\}}{(D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \}^{1/m_j}}$$

Where  $(CI)_x^n$  is the combination index for  $n$  chemicals at a certain  $x$  inhibition,  $\{[D]_j / \sum_j^n [D]\}$  is the ratio of a given ( $j$ ) chemical inducing a  $x$  inhibition in combination and  $((D_m)_j \{ (f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j] \})^{1/m_j}$  is the dose of each compound alone producing the same effect. CI indicates additivity ( $CI = 1$ ), synergism ( $CI < 1$ ) or antagonism ( $CI > 1$ ). The calculations were performed using CompuSyn software [22].

### *2.5. Analytical methods*

Buffer solutions were prepared by dissolving the appropriate volume of phosphoric acid in Milli-Q water and adjusting to pH 3.0 with 1M NaOH. Milli-Q water was used to complete the volume necessary to reach the desired buffer concentration. The appropriate amount of S- $\beta$ -CD was dissolved in the buffer solution to obtain the BGE.

Stock standard solutions of duloxetine and econazole were prepared by dissolving each standard in MeOH at a concentration of 1000 mg/L and then diluting with Milli-Q water until obtaining the desired concentration. All solutions were stored at 4 °C until use and filtered through a 0.45  $\mu$ m pore size nylon filter from Scharlau Chemie and degassed in an ultrasonic bath from Penta Manufacturing Company (Livingston, NJ, USA) before analysis.

Electrophoretic experiments were carried out on a HP<sup>3D</sup>CE instrument from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD). The detection wavelengths were 200 nm for econazole and 220 nm for duloxetine with a bandwidth of 5 nm, and response time of 1.0 s when the quantitation of these compounds was achieved. An intermediate wavelength of 210 nm was also employed to record electrophoregrams for binary mixtures of

both drugs. The HP3DCE ChemStation (Agilent Technologies) was used to control the CE system. Uncoated fused-silica capillaries of 50  $\mu\text{m}$  I.D. (375  $\mu\text{m}$  O.D.) with a total length of 58.5 cm (50 cm effective length) were from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

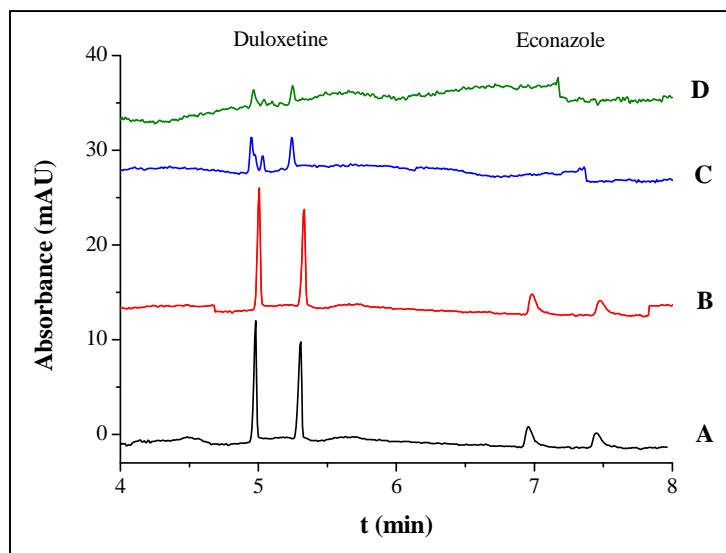
New capillaries were rinsed (applying 1 bar) with MeOH for 5 min, 1 M NaOH for 25 min, Milli-Q water for 5 min followed by 5 min with 1M HCl. Each capillary was conditioned each working day with buffer solution for 20 min and 10 min with the BGE, and at the end of the day, it was flushed with NaOH 0.1 M and Milli-Q water, both of them for 5 min. In order to ensure the repeatability between injections, the capillary was flushed with 0.1 M HCl for 2 min, Milli-Q water for 1 min and BGE for 5 min.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Optimization of an analytical methodology for the simultaneous separation of duloxetine and econazole enantiomers by CE*

In a previous work of our research team, the simultaneous enantiomeric separation of six drugs (including duloxetine and econazole) was achieved by CE using S- $\beta$ -CD as chiral selector under the following experimental conditions: 25 mM phosphate buffer (pH 3.0), 2% (w/v) S- $\beta$ -CD, 20°C and -20kV (reverse polarity) [23]. With the aim of improving the simultaneous enantiomeric separation of duloxetine and econazole in binary mixtures of these two drugs in terms of resolution and analysis time, the influence of the concentration of S- $\beta$ -CD (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0% (w/v)) and phosphate buffer (pH 3.0) (25, 50 and 75 mM), the temperature (15, 20, 25, and 30°C) and the separation voltage (-20, -25 and -30 kV) was investigated. Values of 1.5% S- $\beta$ -CD, a 25 mM phosphate buffer (pH 3.0),

30°C and -20 kV were chosen as optimized conditions under which the simultaneous enantiomeric separation of duloxetine ( $R_s$  7.9) and econazole ( $R_s$  6.5) was carried out in 7.5 min (**Figure 1A**). Analytical characteristics of the developed methodology were evaluated in terms of linearity, precision, accuracy, LODs and LOQs and results obtained are grouped in **Table 1**. Adequate performance was verified for the analytical method with adequate values of instrumental (RSD $\leq$ 1.9% for migration times and RSD $\leq$ 4.6% for corrected peak areas) and intermediate (RSD $\leq$ 2.9% for migration times and RSD $\leq$ 3.9% for corrected peak areas) precision, absence of matrix interferences, recovery values better than 99% and LODs of 0.2 and 0.3 mg/L for duloxetine and 0.7 and 0.8 mg/L for econazole enantiomers, respectively.



**Figure 1.** Electropherograms corresponding to the analysis of a mixture of duloxetine and econazole racemates in presence of light at racemic concentrations of 20 mg/L of each drug in: A) a standard solution; B) culture medium at zero time; C) culture medium at 72 h incubation (abiotic conditions); D) culture medium in presence of plant at 72 h incubation. Experimental conditions: 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) with a 1.5% S- $\beta$ -CD at a temperature of 30°C and a separation voltage of -20 kV; detection at  $\lambda = 210$  nm; effective capillary length 50 cm, internal diameter 50  $\mu$ m, hydrodynamic injection 50 mbar x 10 s.



**Table 1.** Analytical characteristics of the developed CE method for the determination of duloxetine and econazole enantiomers.

	Duloxetine				Econazole			
	Enantiomer 1		Enantiomer 2		Enantiomer 1		Enantiomer 2	
<b>Precisión (RSD)</b>								
Concentration (mg/L)	1	3	1	30	3	10	3	10
<b>Instrumental repeatability (n=9)</b>								
t <sub>m</sub> , RSD (%)	1.7	1	1.8	1.9	1.9	0.8	2.0	0.9
A <sub>c</sub> , RSD (%)	4.4	3	4.6	3.6	3.5	4.0	3.6	2.8
<b>Intermediate precision (n=9)</b>								
t <sub>m</sub> , RSD (%)	1.6	1	1.2	2.1	2.1	2.0	2.9	1.3
A <sub>c</sub> , RSD (%)	2.4	2	2.3	3.5	2.9	2.8	3.9	2.4
<b>External standard calibration method (n=7)</b>								
Range (mg/L)	1-30				3-10			
Linear equation (bx ± a)	0.368x - 0.160		0.367x - 0.177		0.397x - 0.559		0.377x - 0.516	
Standard errors	S <sub>a</sub> =0.086, S <sub>b</sub> =0.005		S <sub>a</sub> =0.081, S <sub>b</sub> =0.004		S <sub>a</sub> =0.044, S <sub>b</sub> =0.006		S <sub>a</sub> =0.050, S <sub>b</sub> =0.007	
Correlation coefficient	0.9989		0.9991		0.9987		0.9986	
a ± t × S <sub>a</sub>	-0.160±0.221		-0.177±0.208		-0.559±0.113		-0.516±0.128	
b ± t × S <sub>b</sub>	0.386±0.013		0.367±0.010		0.397±0.015		0.377±0.018	
<b>Standard additions calibration method (n=6)</b>								
Range (mg/L)	1-30				3-10			
Linear equation (bx ± a)	0.382x - 0.340		0.382x - 0.377		0.390x - 0.767		0.378x - 0.858	
Standard errors	S <sub>a</sub> =0.195, S <sub>b</sub> =0.016		S <sub>a</sub> =0.146, S <sub>b</sub> =0.012		S <sub>a</sub> =0.086, S <sub>b</sub> =0.007		S <sub>a</sub> =0.098, S <sub>b</sub> =0.006	
Correlation coefficient	0.9974		0.9986		0.9975		0.9979	
a ± t × S <sub>a</sub>	-0.340±0.620		-0.377±0.464		-0.767 ± 0.133		-0.858 ± 0.114	
b ± t × S <sub>b</sub>	0.382±0.051		0.382±0.038		0.390 ± 0.019		0.378 ± 0.017	
LOD (mg/L)	0.2		0.3		0.7		0.8	
LOQ (mg/L)	0.8		1.0		2.2		2.6	
<b>Accuracy</b>								
Study of matrix interferences	0.6509		0.2959		0.4596		0.8917	
Concentration (mg/L)	2	30	2	30	4	10	4	10
Recovery (%)	99 ± 3	100	100 ± 3	102 ± 4	102 ± 3	100 ±	99 ± 2	104 ± 6

a: intercept; b: slope; S<sub>a</sub>: intercept standard deviation; S<sub>b</sub>: slope standard deviation; Confidence interval at 95% as confidence level (n = 9); Enantiomer1: first-migrating enantiomer; Enantiomer2: second-migrating enantiomer; A<sub>c</sub>: corrected area; t<sub>m</sub>: migration time; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

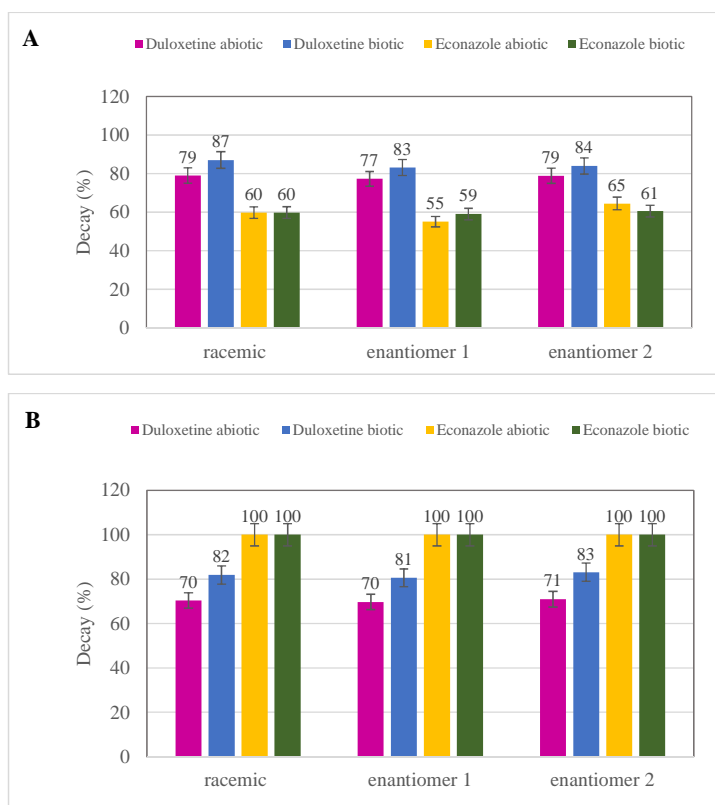
### *3.2 Stability study for duloxetine, econazole and their mixtures under biotic and abiotic conditions.*

In order to study the stability of duloxetine and econazole, individual solutions for each drug were incubated for three days with the plant culture medium (see experimental). Initial and final concentrations (after three days) were determined by CE. Results obtained for the decay percentages for each drug are shown in **Figure 2**. It can be observed in **Figure 2A** that under abiotic conditions, decay percentages close to 80 and 60 % were observed for duloxetine and econazole racemates, respectively. Similar decay percentages were observed for duloxetine enantiomers whereas for econazole enantiomers a slightly different behaviour was observed for both enantiomers (55 % for enantiomer 1 and 65 % for enantiomer 2). These results agree with those previously reported by other authors for duloxetine [10, 11] and azole fungicides (econazole not included) [24] under abiotic conditions in the presence of light.

In presence of the plant, decay percentages for duloxetine racemate increased (less significant increases were observed for duloxetine enantiomers) while this was not the case for econazole for which a similar behaviour was observed under biotic conditions with respect to that observed in absence of the plant, being this true for econazole racemate and enantiomers. When mixtures of duloxetine and econazole were employed, results obtained revealed that under these conditions econazole showed the highest decay percentages regardless the abiotic or biotic conditions (100%) for the racemate as well as the enantiomers (**Figure 2B**). Decay percentages for duloxetine increased under the presence of the plant and this was true for the racemate and the enantiomers. Electropherograms shown in **Figures 1C and 1D** illustrate the decrease of peak areas corresponding to duloxetine and econazole under abiotic and biotic conditions, respectively,

with respect to the electropherogram obtained in the culture medium before incubation (**Figure 1B**).

A comparison between **Figures 2A and 2B** shows that decay percentages for duloxetine decreased when they were determined using mixtures with econazole with respect to the use of solutions of the single drug. However, for econazole the contrary was observed since an important increase in the decay percentages were observed in any case.



**Figure 2.** Percentages of decay for the racemates and the enantiomers of duloxetine and econazole under abiotic and biotic conditions. Results obtained for A) solutions containing a single drug. B) Solutions with both drugs. Each percentage is the average of three results. Error bars correspond to a 95% confidence interval.

Since these results were observed under abiotic and biotic conditions, they suggested a possible effect derived from the coexistence of both drugs in the solution showing the relevance of carrying out this kind of studies in multicomponent samples.

3.3. *Evaluation of the toxicity of the enantiomers of duloxetine and econazole and their mixtures.*

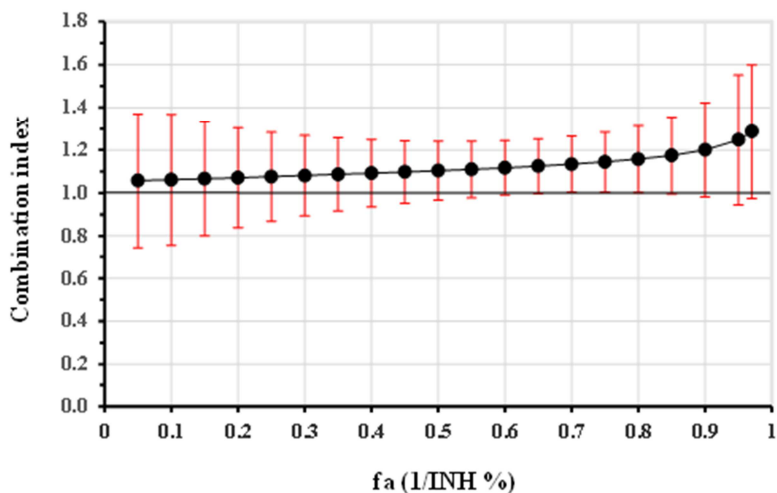
The toxicity of duloxetine, econazole and their mixtures was evaluated for the first time in this work on *Spirodela polyrhiza*. Moreover, real concentrations of the compounds (as the sum of the concentrations of the two enantiomers determined by CE for each compound) were employed in the calculations and not initial concentrations. Results obtained are shown in **Table 2**.

**Table 2.** Dose-effect relationship parameters of individual compounds and binary mixtures on *Spirodela polyrhiza* ecotoxicity tests.

<i>Individual compounds</i>	<i>EC<sub>20</sub> (mg/L)</i>	<i>EC<sub>50</sub> (mg/L)</i>	<i>EC<sub>95</sub> (mg/L)</i>	
Duloxetine	0.434±0.05	0.813±0.06	3.084±0.04	
Econazole	0.177±0.03	0.435±0.04	2.934±0.05	
<i>Binary mixture</i>	<i>EC<sub>20</sub> (mg/L)</i>	<i>EC<sub>50</sub> (mg/L)</i>	<i>EC<sub>95</sub> (mg/L)</i>	<i>CI</i>
Duloxetine/Econazole	1.071±0.05	0.690±0.06	1.248±0.04	1.104±0.08

EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub> and EC<sub>95</sub>, are the doses (in mg/L) that foliar growth by 20%, 50% and 95%, respectively. These values are expressed with their confidence intervals at 95 %. CI < 1, CI = 1, and CI > 1 indicate synergism, additive effect and antagonism, respectively. All these parameters are indicated with 95% confidence interval. CI value included in this table corresponds to a level of 50 % inhibition.

It can be observed that EC50 values for duloxetine and econazole were lower than 1 which according to the European Regulation (EC 1272/2008) enabled to include both compounds within the group of very toxic compounds. However, econazole toxicity was higher than that of duloxetine and also higher than the binary mixture of both compounds which is also corroborated by the EC20 value for econazole that is as low as 0.177 mg/L. Although legal regulations do not include the mixtures of compounds, it is worthy to highlight that EC50 was also lower than 1 for the binary mixture of duloxetine and econazole indicating their danger character. The combination index was also calculated for the binary mixture. Results are grouped in **Figure 3** which shows that the mixture exhibits antagonism which can be slight (from EC50 to EC90) or moderate above EC90. In the zone up to EC50 values a nearly additive effect could be observed.

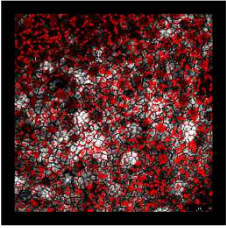
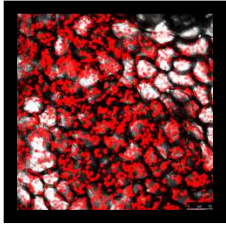
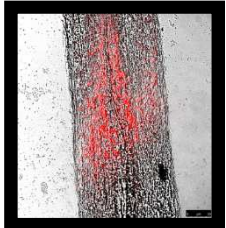
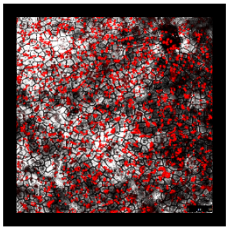
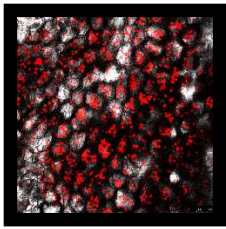
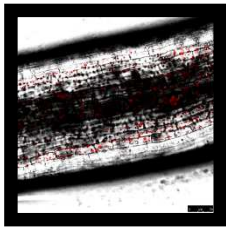
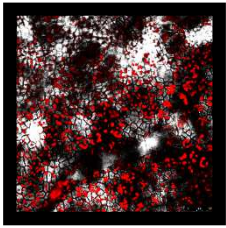
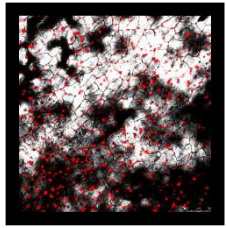
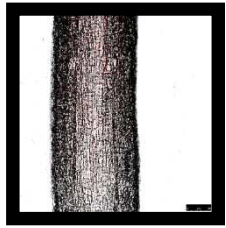
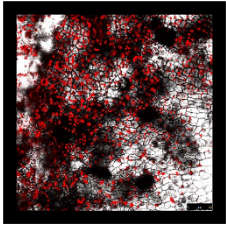
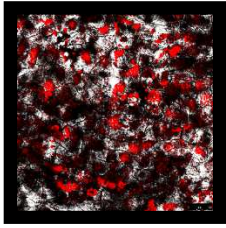
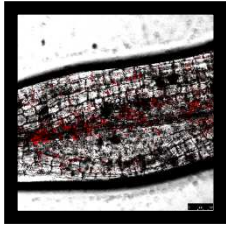


**Figure 3.** Combination index calculated for different effect levels in binary mixtures of duloxetine and econazole. Error bars correspond to a 95% confidence interval.

These results were corroborated when the chlorophyll fluorescence emission was measured for buds (at 24 h incubation), leaves and roots at different concentrations of duloxetine and econazole in single solutions of each drug and mixtures of both. **Table 3** groups the inhibition percentages of the fluorescence emission for EC50 values. Significantly different values for inhibition percentages were obtained for buds, leaves and roots being these percentages the highest for roots followed by leaves and by buds, for which the lowest inhibition percentages were observed regardless the toxic considered. Regarding the effect of each drug or the mixture, the highest inhibition percentages were observed for econazole and this was in agreement with the lowest EC50 value obtained for this compound as mentioned before. Moreover, the mixture caused inhibition percentages generally higher than duloxetine alone. **Figure 4** illustrates the confocal images for these three samples at EC50 values for the drugs and the binary mixture compared with the control. In addition to the effect of fluorescence inhibition, it could also be observed a change in the aspect of the vegetal cells that loss their hexagonal appearance in the case of buds and leaves (see **Figure 4**).

**Table 3.** Inhibition percentages of chlorophyll fluorescence emission by confocal images of the plant for EC50 values of individual and binary mixture solutions. Each percentage is expressed with its confidence interval at 95%.

<b>Compounds</b>	<b>Buds</b>	<b>Leaves</b>	<b>Roots</b>
<i>Duloxetine</i>	12±0.9	61±1.1	65±1.3
<i>Econazole</i>	18±1.6	70±0.6	78±0.9
<i>Duloxetine/Econazole binary mixture</i>	13 ±1.2	65±0.8	70±1.2

Drug concentrations	Bud	Leaves	Roots
0 Control assay			
EC50 Duloxetine			
EC50 Econazole			
EC50 mixture Duloxetine + Econazole			

**Figure 4.** Confocal images illustrating the inhibition of the chlorophyll natural fluorescence emission of *Spirodela polyrhiza* incubated with the drugs and their binary mixture at EC50 values.

The results obtained in this work are the first described for duloxetine, econazole and their mixtures using an aquatic plant. No previous results were reported for comparison. In fact, as far as we know, only EC50 values for these drugs in individual solutions were previously reported for two aquatic photosynthetic organisms (the fresh water green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* (recently renamed as *Raphidocelis subcapitata*), the marine green microalgae *Skeletonema marinoi*) [13, 14, 25]. As expected, different EC50 values were obtained for these two algae (0.37 and 1.9 for duloxetine and 1.37 and 0.04 for econazole, respectively) being these differences justified by the use in our work of real (and not nominal) concentrations, the different experimental conditions, and the distinct organisms employed in these studies.

#### **4. Conclusions**

Stability and toxicity studies were achieved for duloxetine and econazole using single solutions of each drug and their mixtures and the real concentration of these compounds determined by a Capillary Electrophoresis method optimized in this work. This method was based on the use of a 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) with 1.5% S- $\beta$ -CD as chiral selector at a temperature of 30°C and a separation voltage of -20 kV and enabled the simultaneous separation of duloxetine and econazole enantiomers in 7.5 min with enantiomeric resolutions for each drug of 7.9 and 6.5, respectively. Stability evaluation for drugs racemates and enantiomers under abiotic and biotic conditions enabled to observe different decay percentages for both drugs in individual solutions as well as in binary mixtures being the highest decay percentage values obtained in the presence of the plant and for the binary mixture. Toxicity for both drugs was evaluated for the first time in this work on *Spirodela polyrhiza*. EC50 values calculated for each



drug and for their binary mixtures enabled to include both compounds within the group of very toxic compounds although econazole toxicity was higher than that of duloxetine and that of the binary mixture of both compounds. The study of combined effect of drugs also revealed slight to moderate antagonism above the EC50 value and additivity below EC50, showing a different profile which must be taken into account in risk assessment for aquatic environments.

### **Acknowledgements**

M.L.M., M.A.G, J.V.T. thank the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) for projects CTQ2013-48740-P and CTQ2016-76368-P. J.V.T. thanks the same Ministry for his predoctoral contract (BES-2014-070532). G.A. and K.B. thank financial support from the Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid (Spain), Research Network S2013/MAE-2716, and ICTS "NANBIOSIS", Confocal Microscopy Service: Ciber in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BNN) at the Alcalá University (CAI Medicine Biology). G.A. thanks the University of Alcalá for her pre-doctoral contract.

### **References**

- [1] L.H.M.L.M. Santos, A.N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro, Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* 175 (2010) 45-95.
- [2] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, J. Gan, Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes, *Water Res.* 124 (2017) 527-542.

- [3] X. Wang, Y. Sun, K. Sun, Y. Ding, R. Yuan, Separation and pharmacology of chiral compounds in traditional chinese medicine, *Anal. Lett.* 50 (2017) 33-49.
- [4] B. Kasprzyk-Hordern, D.R. Baker, Enantiomeric profiling of chiral drugs in wastewater and receiving water, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 1681-1691.
- [5] M.A. García, N. Menéndez-López, K. Boltés, M. Castro-Puyana, M.L. Marina, A capillary micellar electrokinetic chromatography method for the stereoselective quantitation of bioallethrin in biotic and abiotic samples, *J. Chromatogr. A* 1510 (2017) 108-116.
- [6] M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, Eds., *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [7] E. Sánchez-López, C. Montealegre, M.L. Marina, A.L. Crego, Development of chiral methodologies by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometry detection for duloxetine analysis in pharmaceutical formulations, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 356-362.
- [8] ECONAZOL EN VADEMECUM, Instituto Químico Biológico (IQB). <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/e002.htm>, 2010 (last access November 17, 2018).
- [9] V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina, Chiral separation of agricultural fungicides, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6561-6582.
- [10] P. A. Datar, R. U. Waghmare, Development and validation of an analytical method for the stability of duloxetine hydrochloride, *J. Taibah Univ. Sci.* 8 (2014) 357-363.

- [11] R. Chandha, A. Bali, G. Bansal, Characterization of stress degradation products of duloxetine hydrochloride employing LC-UV/PDA and LC-MS/TOF studies, *J. Pharmaceut. & Biomed. Anal.* 121 (2016) 39-55.
- [12] M. M. Baker, T. S. Belal, M. S. Mahrous, H. M. Ahmed, H. G. Daabees, A validated stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of econazole nitrate, tramcinolone acetonide, benzoic acid and butylated hydroxyanisole in cream dosage form, *Anal. Methods* 8 (2016) 2185-2200.
- [13] L. Minguez, J. Pedelucq, E. Farcy, C. Ballandonne, H. Budzinski, M. P. Halm-Lemeille, Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23 (2016) 4992-5001.
- [14] L. Minguez, R. Bureau, M. P. Halm-Lemeille, Joint effects of nine antidepressants on *Raphidocelis subcapitata* and *Skeletonema marinoi*: A matter of amine functional groups, *Aquatic Toxicol.* 196 (2018) 117-123.
- [15] E. Richter, A. Wick, T. A. Ternes, A. Coors, Ecotoxicity of climbazole, a fungicide contained in antidandruff shampoo, *Environ. Toxicol. & Chem.* 32 (2013) 2816-2825.
- [16] G. Amariei, K. Boltes, R. Rosal, P. Leton, Toxicological interactions of ibuprofen and triclosan on biological activity of activated sludge, *Journal Hazard. Mater.* 334 (2017) 193-200.
- [17] V. González-Naranjo, K. Boltes, Toxicity of ibuprofen and perfluorooctanoic acid for risk assessment of mixtures in aquatic and terrestrial environments, *Int. J. Environ. Sci. & Tech.* 11 (2013) 1743-1750.

- [18] Y.C. Tseng, S.W. Chu, High spatio-temporal-resolution detection of chlorophyll fluorescence dynamics from a single chloroplast with confocal imaging fluorometer, *Plant methods*, 13 (2017) 43.
- [19] D. Liu, Z. Chen, Analysis Effects of Lead on Chlorophyll Fluorescence of Wheat Leaves with Confocal Software. IEEE, Proceedings of the Intelligent Systems and Applications, 2009. International Workshop. ISA 2009. Pp. 1-3.
- [20] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27-55.
- [21] T.C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Reviews*, 58 (2006) 621-681.
- [22] T.C. Chou, N. Martin, *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> and LD<sub>50</sub> Values*, ComboSyn, Paramus, NJ, 2005.
- [23] J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcero, D. Pérez-Quintanilla, M.A. García, I. Sierra, M.L. Marina, Periodic mesoporous organosilica materials as sorbents for solid-phase extraction of drugs prior to simultaneous enantiomeric separation by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1566 (2018) 135-145.
- [24] Z. F. Chen, G. G. Ying, Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review, *Environment Internat.* 84 (2015) 142-153.

[25] J. Villain, L. Mínguez, M. P. Halm-Lemeille, G. Durrieu, R. Bureau, Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae, mode of action, biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models, *Ecotoxicol. & Environm. Safety* 124 (2016) 337-343.

## Artículo 5

**“Enantiomer stability and combined toxicity of duloxetine and econazole on *Daphnia magna* using real concentrations determined by capillary electrophoresis”**

J. Valimaña-Traverso, G. Amariei, K. Boltes, M.A. García, M.L. Marina.

J. Sci. Total Environ. *En primera revisión*



## **Abstract**

Enantiomer stability was investigated in this work for the first time for duloxetine and econazole in individual solutions and their mixtures under the standardized ecotoxicity test experimental conditions for *Daphnia magna* and abiotic conditions. Real (and not nominal) enantiomer concentrations were employed for calculations since their determination was achieved by Capillary Electrophoresis. Relevant differences were found in stability profiles for both drugs in any case. Toxicity was evaluated for the first time in this work for mixtures of duloxetine and econazole on *Daphnia magna*. Dose-effect parameters were calculated at different exposure times (24, 48, and 72 h) showing a significant inhibition of daphnids mobility when increasing the incubation time. Combination index values enabled to obtain the type and level of interaction of drugs with the organism. A strong synergism was observed at 48 h exposure time and any effect level, which demonstrated the high toxicity of the drug mixture compared with the individual drug solutions. These results were corroborated when evaluating the oxidative stress using fluorescence images.

**Keywords:** *Daphnia magna*, duloxetine, econazole, enantiomer stability, mixture toxicity.

## **Highlights**

- Stability of each drug or mixture was evaluated under abiotic and biotic conditions.
- Toxicity of both drugs and their mixtures for *Daphnia magna* was established.



- Real concentrations of drug enantiomers were determined by chiral CE.
- Strong synergism observed for drug mixture at 48 h exposure and any effect level.

## **1. Introduction**

The wide use of pharmaceuticals for human and animal disease treatment has originated their presence in the environment and their consideration as emerging pollutants. A lot of work has been carried out to evaluate the presence of these pollutants in water or soil samples. However, although the increasing pollution has mainly impact on ground and surface waters or soils, biota is also affected without having paid considerable attention to the risk that these emerging pollutants could suppose for the metabolism and hormonal balance of non-target organisms (Weber et al., 2016; Sanganyado et al., 2017) even when they are at as low concentrations as  $\mu\text{g/L}$  and  $\text{ng/L}$  (Sanderson et al., 2003).

An example of a non-target organism is *Daphnia magna*, a freshwater organism belonging to the microcrustacean family (Minguez et al., 2016) that can be found in lakes, rivers and rocky pools. Its lifespan depends on the environmental conditions, such as temperature, food availability (since this organism is fed with algae, bacteria and detritus), and the presence of pollutants (Animal Diversity Web, 2014). *Daphnia magna* is an indicator organism for water quality and it is employed in test of water toxicity. It is noteworthy to stand out that this organism can degrade chiral compounds by means of estereospecific enzymatic processes with a variation in their enantiomeric ratio (Stanley et al., 2006). In addition, *Daphnia magna* possesses transparent physiology (Paul et al.,

1997) that allows to carry out non-invasive assays in order to investigate changes in the organism during the toxic process (Colmorgen and Paul, 1995).

Duloxetine (N-methyl-3-(naphthalen-1-yloxy)-3-(thiophen-2-yl)propan-1-amine) belongs to the family of selective serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors that affect neurotransmitters in order to restore the balance in brain and treat depression and anxiety disorder (MedicineNet, 1996). It is a chiral compound that possesses two active enantiomers although with different activity, being higher the activity of the S-enantiomer (Wong et al., 1993), reason that has originated its commercialization as pure enantiomer. Econazole (1-[2-[(4-chlorophenyl)methoxy]-2-(2,4-dichlorophenyl) ethyl] imidazole) is a chiral drug belonging to imidazole family, with antimicrobial activity, that is widely employed as antifungal in the treatment of mycosis infections (Heel et al., 1978). It is also used in different kinds of ringworm (Instituto Químico Biológico, 2004), being commercialized as racemate although the antifungal activity has been reported only for the R-enantiomer (Furuta and Doi, 1994). Stability studies were carried out for pharmaceutical production for duloxetine and econazole. Duloxetine is degraded under acid, alkaline and neutral hydrolysis (Chadha et al., 2016) and under UV photodegradation (Datar and Waghmare, 2014) and it remains stable under thermal and oxidative stress conditions (Chadha et al., 2016). Econazole demonstrated full stability under several stress conditions when neutral, acidic and alkaline hydrolysis were employed at high temperatures (90°C) as well as with thermal degradation, showing instability only under oxidation conditions (Baker et al., 2016). Moreover, in the context of environmental studies, it has been shown that econazole bioaccumulates and has a low biodegradability (Lindberg et al., 2010; Jean et al., 2012).

Enantiomers of chiral compounds possess identical physical and chemical properties in a symmetrical environment. However, when they are present in a chiral biological environment, they can exhibit different enantiospecific biological activity with differences between the enantiomers that can reach 500-fold in some cases such as  $\beta$ -blockers (Ma et al., 2014). The different pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicity and degradation rates (Sanganyado et al., 2017), confer a high interest to the investigation of the stability and toxicity for the individual enantiomers of chiral drugs under abiotic and biotic conditions. However, this study requires to have analytical tools able to determine the individual concentrations of these enantiomers. In this context, Capillary Electrophoresis (CE) is considered one of the most powerful techniques to achieve the separation of enantiomers. With this aim, a chiral selector has to be added to the separation media in the most frequently employed chiral separation mode, which is Electrokinetic Chromatography.

Although Minguez et al. (Minguez et al., 2016) studied the ecotoxicity of duloxetine and econazole on *Daphnia magna*, this study was performed using nominal and not real concentrations of each drug for the determination of the EC50 values in solutions containing only one of both drugs and not their mixtures.

In this work, real concentrations of duloxetine and econazole were determined by CE in culture medium for *Daphnia magna* under abiotic and biotic conditions in order to make possible the individual evaluation of the toxicity of these drugs in single drug solutions and their mixtures. In addition, the individual estimation of the stability of drug enantiomers was also carried out in single drug solutions and their mixtures and under abiotic and biotic conditions.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

High purity standards (>99%) of (R,S)-duloxetine HCl and of (R,S)-econazole nitrate were from IS Chemical Technology (Shanghai, China) and from Sigma-Aldrich, respectively. Sulfated- $\beta$ -CD (S- $\beta$ -CD), sodium hydroxide (NaOH), and orthophosphoric acid 85% were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Hydrochloric acid (HCl) 37% and methanol (MeOH) were from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA,  $\geq 97\%$ ) was acquired from Sigma Aldrich. Water used to prepare solutions was purified through a Milli-Q System from Millipore (Bedford, MA, USA).

### *2.2. Enantiomeric determination of duloxetine and econazole by CE*

A HP<sup>3D</sup>CE instrument from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) with a diode array detector (DAD) was employed. The electrophoretic system was controlled by HP<sup>3D</sup>CE ChemStation software and included the data collection and analysis. Separations were performed in an uncoated fused-silica capillaries of 50  $\mu\text{m}$  I.D. (375  $\mu\text{m}$  O.D.) with a total length of 58.5 cm (50 cm effective length) purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The detection wavelengths were 200 nm for econazole and 220 nm for duloxetine with a bandwidth of 5 nm, and response time of 1.0 s when the quantitation of these compounds was achieved. An intermediate wavelength of 210 nm was also employed to record electropherograms for binary mixtures of both drugs.

The preparation of stock standard solutions of duloxetine and econazole was carried out by dissolving each compound in MeOH at a 1000 mg/L concentration and diluting with Milli-Q water to obtain the desired concentration. All solutions were stored at 4 °C until use, and filtered (through a 0.45 µm pore size nylon filter from Scharlau Chemie) and degassed (in an ultrasonic bath from Penta Manufacturing Company (Livingston, NJ, USA)), before use.

In order to prepare buffer solutions, the appropriate volume of phosphoric acid was dissolved in Milli-Q water and the pH was adjusted at pH 3.0 with 1M NaOH. Milli-Q water was added to complete the volume necessary to reach the desired buffer concentration. The appropriate amount of S-β-CD was dissolved in the buffer solution to obtain the background electrolyte (BGE).

When new capillaries were employed, a special procedure was followed which involved rinsing with MeOH for 5 min, 1 M NaOH for 25 min, Milli-Q water for 5 min followed by 5 min with 1M HCl (at 1 bar pressure). At the beginning of each working day, the capillary was conditioned with buffer solution for 20 min and 10 min with the BGE. At the end of the day, it was flushed with NaOH 0.1 M and Milli-Q water, both of them for 5 min. Between injections, the capillary was flushed with 0.1 M HCl for 2 min, Milli-Q water for 1 min and BGE for 5 min.

The separation and determination of duloxetine and econazole enantiomers were achieved using a 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) containing 1.5% S-β-CD at a temperature of 30°C and reverse polarity at -20 kV. Hydrodynamic injection of standard solutions and samples was carried out at 50 mbar for 10 s. Seven standard solutions for duloxetine racemate (2, 12, 20, 30, 40,

50, 60 mg/L) and six for econazole racemate (6, 8, 12, 15, 18, 20 mg/L) were employed for quantitation of both compounds using the external calibration method. Calibration by the standard addition method was achieved by adding similar concentrations employed for external calibration to culture medium samples for *Daphnia magna*. Comparison of slope values for both calibration methods was performed using Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics Centurion, 2013) which was also employed for other statistical data analysis.

### 2.3. Biological material and pre-culture conditions

*Daphnia magna* eggs and concentrated solution for nutritive medium were obtained from the MicroBio Tests Inc. (Belgium).

Eggs were incubated in the nutritive medium at a temperature of  $20\pm 1$  °C with a continuous illumination at 6000 lux inside a growth chamber acquired from IBERCEX, S.L. (Spain), with the aim of achieving the hatching.

The stability of duloxetine and econazole was evaluated under abiotic and biotic conditions using toxicant concentrations ranging from 3 to 30 mg/L. The abiotic runs were carried out in the absence of daphnids, in order to evaluate the possible hydrolysis of compounds into aqueous reaction media and the effect of the variation of any physico-chemical parameter. Concentration of each contaminant in the liquid fraction was determined at the beginning (0 h) and along the exposure time (24, 48 and 72 h). Each assay condition was replicated three times.

#### 2.4. Toxicity tests

Once the eggs hatching was carried out, toxicity bioassays with neonates of 24 h of lifetime were developed in accordance with the international standard OECD 202 Guideline (OECD, 2004). The experiments were conducted in plates containing 5 neonates and 10 mL of culture media supplemented with either no added toxicants (Control) and predefined concentration of toxicants, per quadruplicate, being all sets of experiments conducted under darkness. Both pollutants were first assayed in the range 0.1-20 mg/L and mixtures were tested based on the EC50 values of the individual components at 24 h of exposure. Acute toxicity was expressed by the EC50 value, being this the concentration provoking the immobilization of 50% of organisms during the exposure time (24, 48 and 72 h), using the control experiment as the reference with 0% of inhibition.

#### 2.5. Evaluation of oxidative stress

The toxicity of the target compounds was also evaluated in terms of Reactive Oxygen Species (ROS) amount produced in *D. magna* by H<sub>2</sub>DCFDA assay (Galdiero et al., 2017). In brief, after exposure to toxicants at the EC50 concentration, as previously described in section 2.4, 10 daphnids were taken and incubated with 1 mL of 10 mM H<sub>2</sub>DCFDA for 2 h at 20°C in the dark. ROS level was monitored by fluorescence (excitation wavelength of 350 nm and emission wavelength of 600 nm) using a Confocal Microscope Leica TCS SP5 (Germany).

## 2.6. Equations for the evaluation of toxicity parameters

The median-effect/combination index (CI)-isobologram equation, was used the calculation of toxicity parameters. This equation proposed by Chou and Talalay (Chou and Talalay, 1984) is derived from mass-action law:

$$\frac{f_a}{1 - f_a} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m$$

D is a concentration of drug that provokes damage on a population fraction  $f_a$ .  $D_m$  is the median effective concentration (EC50) and the parameter m accounts for the shape of the same dose-effect curve.

EC50 and m values are used for calculating the CI values; CI <1, =1, and >1 indicate synergism (S), additive effect (Add), and antagonism (A), respectively. EC10, EC50 and EC95, are the doses required to inhibit 10, 50 and 95%, respectively. Computer software CompuSyn (Chou and Martin, 2005) was used for automated calculation and simulation.

To the evaluation of the combined effect of duloxetine and econazole, it was tested mixtures of pollutants in 1:1 fixed constant ratio based on the EC50 values of single drugs for 24h of exposition time, over a wide range of effect levels. Calculation of the CI values was done according to the combination index equation (Chou, 2006):

$$(CI)_x^n = \sum_j^n \frac{(D)_j}{(D_x)_j} = \sum_{j=1}^n \frac{(D_x)_{1-n} \left\{ \frac{D_j}{\sum_1^n [D]} \right\}}{(D_m)_j \left\{ \frac{(f_{ax})_j}{[1 - (f_{ax})_j]} \right\}^{1/m_j}}$$



Where  $(CI)_x^n$  is the combination index for n chemicals at a certain x% inhibition (e.g., mobility of daphnids),  $(D_x)_{1-n}$  is the sum of the concentrations of n toxicants exerting x % of inhibition in combination  $\{[D]_j / \sum_1^n [D]\}$  is the ratio of a given (j) drug inducing a x% inhibition in combination and  $(D_m)_j \{(f_{ax})_j / [1 - (f_{ax})_j]\}^{1/m_j}$  is the dose of each compound alone producing the same effect. CI indicates additivity (CI = 1), synergism (CI < 1) or antagonism (CI > 1). The calculations were performed using CompuSyn software (Chou and Martin, 2005).

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Analytical characteristics of the CE method employed for the simultaneous determination of duloxetine and econazole enantiomers*

In a previous work of our research team (Valimaña-Traverso et al., 2019) a CE method was optimized enabling the simultaneous enantiomeric separation of duloxetine and econazole in 7.5 min with enantiomeric resolutions of 7.9 and 6.5, respectively. The experimental conditions employed are detailed in Materials and Methods (see section 2.2). In order to assure the adequate performance of this method to analyse duloxetine and econazole enantiomers in the culture medium samples employed in this work under abiotic and biotic conditions, the analytical characteristics of this method were evaluated. As linearity was assessed in our previous work using standard solutions (linear range from 1.8 to 60 mg/L for duloxetine and from 4.8 to 20 mg/L for econazole), in this work, precision, accuracy, LOD and LOQ, and the existence of matrix interferences were evaluated using the culture medium of *Daphnia magna* under abiotic and biotic conditions. To assess method variability related to the incubation process with duloxetine

and econazole mixtures in the culture medium of *Daphnia magna*, precision was expressed as repeatability and intermediate precision at two concentration levels.

As shown in **Table 1**, repeatability (expressed as RSD values) was better than 1.3 % for migration times and lower than 2.5 % for corrected peak areas, both for duloxetine and econazole enantiomers. RSD values obtained for intermediate precision were lower than 1.6 % for migration times and 2.8 % for corrected peak areas for drug enantiomers. The study of matrix interferences was carried out by comparison of the slopes obtained by the external and the standard addition calibration methods. No statistically significant differences existed ( $p \text{ value} > 0.05$ ) between these slope values showing the absence of matrix interferences and the possibility of using the external calibration method for the quantitation of duloxetine and econazole enantiomers (see **Table 1**). Finally, average recovery values at two concentrations levels ranged from 98 to 102 % for duloxetine and from 98 to 104 % for econazole assuring method accuracy, and LOD and LOQ values were close to 0.4 and 1.3 mg/L for duloxetine enantiomers and close to 1.1 and 3.6 mg/L for econazole enantiomers, respectively.

**Table 1.** Precision, study on the existence of matrix interferences, LOD, LOQ, and accuracy of the CE method, evaluated using the culture medium of *Daphnia magna* under abiotic and biotic conditions.

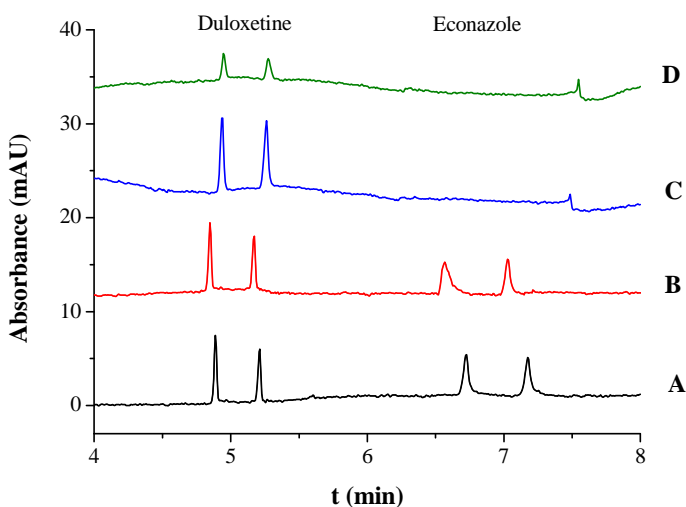
	Duloxetine				Econazole			
	Enantiomer 1		Enantiomer 2		Enantiomer 1		Enantiomer 2	
<b>Precision<sup>1</sup></b>								
Concentration (mg/L)	2	30	2	30	4	10	4	10
<b>Repeatability (n=6)<sup>2</sup></b>								
t <sub>m</sub> , RSD (%)	0.3	1.0	0.8	1.3	1.0	1.1	1.1	1.3
A <sub>c</sub> , RSD (%)	1.0	2.5	1.2	2.5	2.0	2.3	2.4	2.2
<b>Intermediate precision (n=9)<sup>3</sup></b>								
t <sub>m</sub> , RSD (%)	0.4	1.2	0.9	1.5	1.3	1.4	1.3	1.6
A <sub>c</sub> , RSD (%)	1.1	2.8	1.4	2.7	2.1	2.6	2.8	2.4
<b>Standard additions calibration method (n=6)</b>								
Range (mg/L)	1-30				3-10			
Equation (bx ± a)	0.361x - 0.202		0.370x - 0.270		0.396x - 0.878		0.372x - 0.784	
Standard errors	S <sub>a</sub> =0.154, S <sub>b</sub> =0.012		S <sub>a</sub> =0.194, S <sub>b</sub> =0.016		S <sub>a</sub> =0.048, S <sub>b</sub> =0.007		S <sub>a</sub> =0.044, S <sub>b</sub> =0.006	
Correlation coefficient (r)	0.9982		0.9972		0.9976		0.9977	
a ± t × S <sub>a</sub>	-0.202±0.490		-0.270±0.617		-0.878 ± 0.133		-0.784 ± 0.122	
b ± t × S <sub>b</sub>	0.361±0.038		0.370±0.051		0.396 ± 0.019		0.372 ± 0.017	
<b>LOD (mg/L)</b>	0.3		0.4		1.0		1.1	
<b>LOQ (mg/L)</b>	1.0		1.3		3.3		3.6	
<b>Accuracy</b>								
<b>Study of matrix interferences p-value of t test</b>	0.5528		0.8285		0.8765		0.5925	
Concentration (mg/L)	2	30	2	30	4	10	4	10
<b>Recovery (%)</b>	98 ± 3	101 ± 4	100 ± 1	102 ± 5	102 ± 5	98 ± 4	101 ± 3	104 ± 6

<sup>1</sup> Precision: This variability included the incubation process with duloxetine and econazole mixtures in culture medium of *Daphnia magna* organisms. <sup>2</sup> Six consecutive injections of the culture medium of *Daphnia magna* with a mixture of duloxetine and econazole racemates. <sup>3</sup> Three replicates of the culture medium of *Daphnia magna* with a mixture of duloxetine and econazole racemates were injected in triplicate.

a: intercept; b: slope; S<sub>a</sub>: intercept standard deviation; S<sub>b</sub>: slope standard deviation; Confidence interval at 95% as confidence level (n = 9); Enantiomer1: first-migrating enantiomer; Enantiomer2: second-migrating enantiomer; A<sub>c</sub>: corrected peak area; t<sub>m</sub>: migration time; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

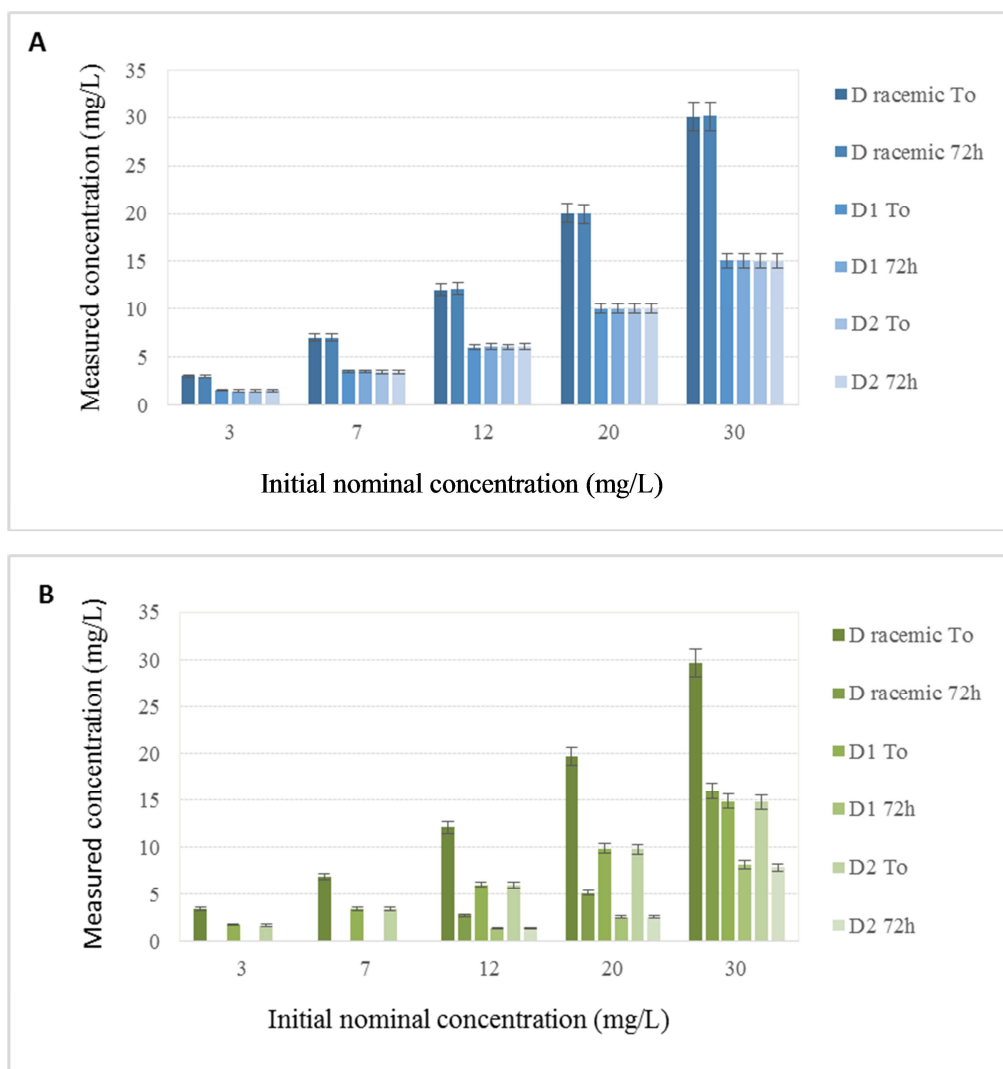
### 3.2 Stability of duloxetine and econazole enantiomers and their mixtures

The stability of duloxetine and econazole enantiomers was evaluated in individual solutions of each drug under abiotic and biotic conditions. It was observed that the variations of duloxetine concentrations were negligible in any case while econazole was not stable disappearing after incubation with the culture medium and in the presence of daphnis (results not shown). Similar results were obtained for econazole when mixtures of duloxetine and econazole enantiomers were incubated under abiotic and biotic conditions (**Figures 1C and 1D**).



**Figure 1.** Electropherograms corresponding to the analysis of a mixture of duloxetine and econazole racemates at racemic concentrations of 20 mg/L of each drug in: A) an aqueous standard solution; B) culture medium at zero time; C) culture medium at 72 h incubation (abiotic conditions); D) culture medium in presence of *Daphnia magna* at 72 h incubation. Experimental conditions: 25 mM phosphate buffer (pH 3.0) with a 1.5% S- $\beta$ -CD at a temperature of 30°C and a separation voltage of -20 kV; detection at  $\lambda = 210$  nm; effective capillary length 50 cm, internal diameter 50  $\mu$ m, hydrodynamic injection 50 mbar x 10 s.

However, stability profiles for racemic duloxetine and each of its enantiomers were different in mixtures of both drugs after 72 h incubation under abiotic (**Figure 2A**) and biotic conditions (**Figure 2B**) and different racemate initial nominal concentrations. It was observed that in absence of *Daphnia magna*, the concentration of each duloxetine enantiomer is stable with variations lower than 0.4% of the initial nominal concentration (see **Figure 2A**). Nevertheless, in the presence of *Daphnia magna*, a concentration decay was observed for racemic duloxetine as well as for the individual enantiomers (**Figure 2B**). Decay percentages for duloxetine enantiomers ranged from 46 to 77 % depending on the initial nominal concentrations assayed. In fact, for the lowest initial nominal concentrations (3 and 7 mg/L racemate), duloxetine concentrations after incubation could not be determined because they were lower than the LOQ of the analytical method.



**Figure 2.** Stability profiles for racemic duloxetine and its enantiomers after 72 h incubation under abiotic (A) and biotic conditions (B) in mixtures of duloxetine and econazole at different initial nominal concentrations of both racemic drugs. Each percentage is the average of three results. Error bars correspond to a 95% confidence interval.

### 3.3. Toxicity of duloxetine and econazole mixtures.

The toxicity of mixtures of duloxetine and econazole on *Daphnia magna* was determined for the first time in this work, and compared with the toxicity evaluated for single drug solutions. **Table 2** groups the values of the toxicity parameters for the mixtures and the single solution of each drug, in both cases for 24, 48 and 72 h of exposure time. Real concentrations determined by CE were employed for calculations for both drugs although in the case of econazole only initial concentrations could be used since this drug disappeared after incubation. It can be observed that EC50 values measured for single drug solutions decreased with the incubation time for both compounds. In fact, EC50 values were a 73% lower for duloxetine and a 36 % for econazole at 48 h incubation time referred to the typical reference time for *Daphnia magna* mobility test (24 h incubation time). Decreases of 82 % and 85 % were observed for duloxetine and econazole, respectively, when an incubation time of 72 h is considered.

These results show the high toxicity of duloxetine and econazole according to the European Regulation EC 1272/2008 (EC, 2008), although duloxetine toxicity was higher than that of econazole. EC50 values obtained in this work could be compared with those determined previously by other authors but only for 48 h incubation time (Minguez et al., 2016). In the case of duloxetine, an EC50 value of 3.35 mg/L was previously reported (Minguez et al., 2016) which was considerably higher than that obtained in this work (0.12 mg/L). However, differences for EC50 values were lower in the case of econazole (0.4 and 0.24 mg/L in (Minguez et al., 2016) and in this work, respectively). The highest differences in the EC50 values for duloxetine with respect to the previous work (Minguez et al., 2016) could be explained by the use of real concentrations

determined in this work by CE while nominal concentrations were used for calculations in the previous work. In fact, these differences in EC50 values decreased for econazole for which initial concentrations were used in this work as this drug disappeared as explained above.

**Table 2.** Dose-effect relationship parameters and mean combination index (CI) values of duloxetine (D), econazole (E) and their mixtures for toxicity tests.

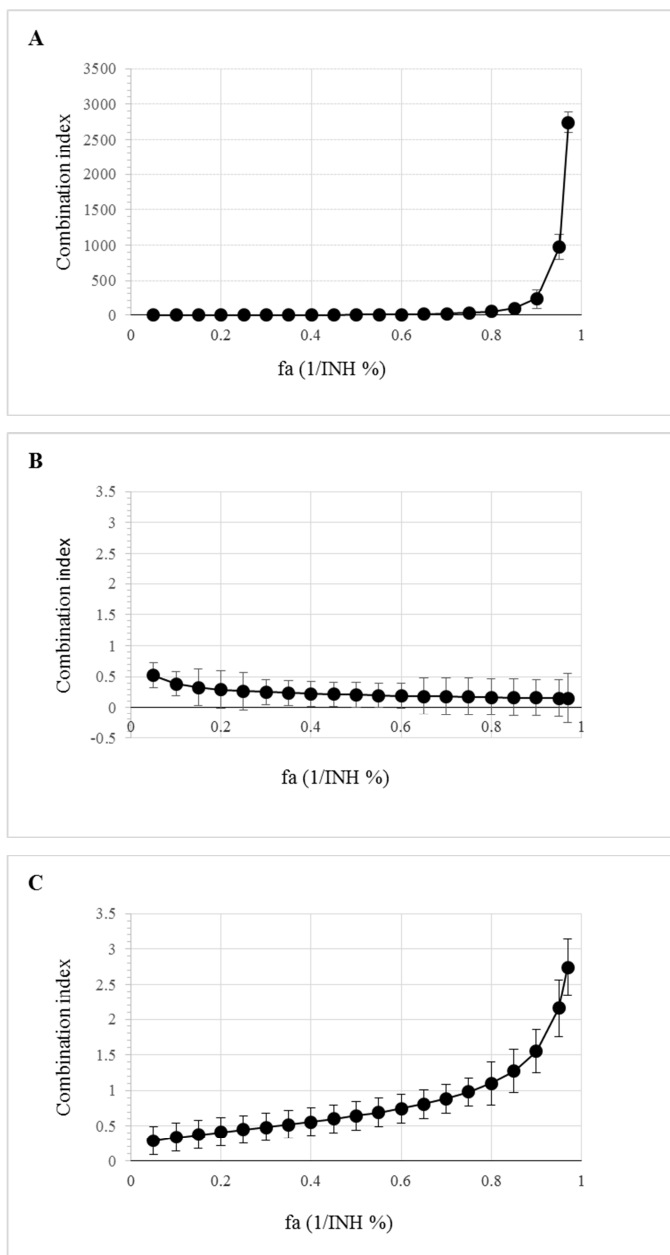
SINGLE TOXICANT						
Exposure time (h)	Duloxetine Dose-effect parameters			Econazole Dose-effect parameters		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)	m	r	EC <sub>50</sub> (mg/L)	m	r
24	0.45±0.01	1.0±0.1	0.98	0.73±0.02	3±1	0.90
48	0.12±0.01	0.8±0.2	0.89	0.24±0.01	1.6±0.3	0.93
72	0.08±0.01	0.9±0.2	0.96	0.11±0.01	1.7±0.4	0.96
BINARY COMBINATION DULOXETINE AND ECONAZOLE						
Exposure time (h)	Dose-effect parameters			CI values		
	EC <sub>50</sub> (mg/L)	m	r	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>95</sub>
24	2.52±0.02	0.43±0.02	0.98	<b>0.09±0.01</b>	3.86±0.05	977±1
48	0.04±0.01	1.6±0.8	0.90	<b>0.39±0.02</b>	<b>0.21±0.01</b>	<b>0.15±0.02</b>
72	0.07±0.01	1.8±0.6	0.91	1.07±0.01	<b>0.67±0.02</b>	<b>0.50±0.03</b>

Regarding the mixtures of duloxetine and econazole, EC50 values decreased when increasing the incubation time, as previously observed for the single solution of each drug, with EC50 values up to 98 % lower than that obtained for 24 h (see **Table 2**). **Table 2** also shows the higher toxicity of the



mixtures at 48 h incubation time compared with the single drug solutions. Regarding the combination index, **Figure 3** shows that this parameter is lower than 1 at any effect level for 48 h incubation time (Fig. 3B) contrary to that observed for 24 (Fig. 3A) and 72 h (Fig. 3C) showing the synergism existing between both drugs at 48 h incubation time. At short exposure times (Fig. 3A), the interaction profile is different from that obtained at 48 h with synergism effect only until 0.3 effect level. Similarly, Fig. 3C shows that synergism occurs up to 0.75 effect level with antagonism appearing when increasing this variable.

These results showing the different interaction profiles for the drug studied in this work with *Daphnia magna* agree with those previously obtained by our research team for the same compounds and the aquatic plant *Spirodela polyrhiza* (Valimaña-Traverso et al., 2019) and also for other organisms (green alga, cyanobacteria (González-Pleiter et al., 2013), and biological activated sludge (Amariei et al., 2017), and other drug mixtures such as a combination of five antibiotics (amoxicillin, erythromycin, levofloxacin, norfloxacin and tetracycline) (González-Pleiter et al., 2013), and a binary mixture containing an antimicrobial (triclosan) and a non-steroidal antiinflammatory drug (ibuprofen)) (Amariei et al., 2017) using in all these cases the combination index model. Moreover, using a different model (Concentration Addition (CA)), deviations observed from predictions, suggested a synergistic effect for duloxetine in mixtures with other eight antidepressants when two different green algae were studied (Minguez et al., 2018).



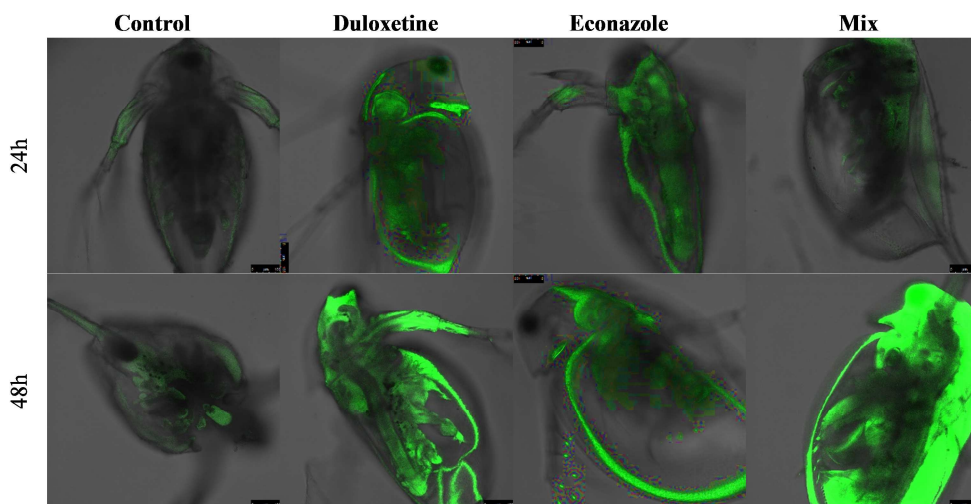
**Figure 3.** Combination index calculated for different effect levels in binary mixtures of duloxetine and econazole at different exposition times: A) 24 h., B) 48 h., C) 72 h. Error bars correspond to a 95% confidence interval.

Traditional CA and Independent Action (IA) models, predict the toxicity of a mixture based on the effect of individual components, and consider deviations from additivity (antagonism and synergy) toxicologically irrelevant and corresponding to unusual situations (Backhaus, et al., 2003; European Commission, 2011). However, the results obtained in this work, together with those reported in our previous works (González-Pleiter et al., 2013, Amariei et al., 2017) show that deviations from additivity exist and can be strong in many systems.

Toxicity of duloxetine, econazole and their mixtures was also investigated by evaluating the oxidative stress on *Daphnia magna* using a biochemical marker and fluorescence images as described in section 2.5. The results obtained are shown in **Figure 4**. A light stress (background fluorescence) was observed in control assays at 24 and 48 h of incubation without toxicants probably due to changes in aqueous media when H<sub>2</sub>DCFDA was added and to the handling of the crustaceans for confocal microscopy observation. No increase on the fluorescence was detected at 24 h incubation time for the mixture supporting the above-mentioned comments on the antagonistic effect of this mixture at EC<sub>50</sub> concentration value contrary to what it was observed at 48 h exposure time (see **Table 2**).

However, as shown in Fig. 4, a considerable increase of fluorescence was observed with the exposure time also corroborating the above-mentioned results on the toxicity of these compounds as illustrated in **Table 2**. In fact, the highest increase in fluorescence took place for duloxetine at 48 h exposure time and for the mixture of both drugs at the same exposure time. Moreover, a widespread distribution of fluorescence occurred within the daphnids body, regardless of the compounds tested and the exposure time, contrasting this distribution with that

reported when *Daphnia magna* was exposed to metallic nanoparticles (Galdiero et al., 2017). In this case, the increase in fluorescence was limited to the gastrointestinal tract and broad egg chamber of daphnis. Other authors reported previously oxidative stress for *Daphnia magna* induced by pharmaceuticals (Gómez-Oliván et al., 2014a; Gómez-Oliván et al., 2014b) although duloxetine and econazole were not investigated in any case.



**Figure 4.** Fluorescence images of *Daphnia magna* after 24 h and 48 h of exposure to duloxetine, econazole and their mixtures at their specific EC50 values.

The results obtained in this work are the first described for mixtures of duloxetine and econazole using the microcrustacean *Daphnia magna*. No previous results were reported for comparison.

#### **4. Conclusions**

The stability of duloxetine and econazole enantiomers in individual solutions and their mixtures under the ecotoxicity test conditions for *Daphnia magna* was evaluated for the first time in this work. Results showed that the variations of duloxetine concentrations were negligible in any case in single solutions while the stability profiles for racemic duloxetine and each of its enantiomers were different in mixtures of both drugs after 72 h incubation. Decay percentages for duloxetine enantiomers ranged from 46 to 77 % depending on the initial nominal concentrations. However, econazole was not stable disappearing after incubation and this was true for single solutions and mixtures of both drugs. The toxicity of the mixtures of duloxetine and econazole was determined on *Daphnia magna* for the first time in this work and compared with the toxicity of single solutions. Mixtures at 48 h incubation time showed a high toxicity and synergism at any effect level which should be taken into account when evaluating environmental risk in aquatic ecosystems. A good correlation was observed between toxicity parameters calculated by the ecotoxicity test and the interaction profiles, and the fluorescence images obtained for *Daphnia magna* using a reactive oxygen species biochemical marker. Real drug concentrations were determined by CE in this work which could justify the big differences observed for EC50 values obtained for duloxetine with respect to the only EC50 value reported for this drug in the bibliography in a single solution.

#### **Acknowledgements**

M.L.M., M.A.G, J.V.T. thank the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain) for projects CTQ2013-48740-P and CTQ2016-76368-P.

J.V.T. thanks the same Ministry for his predoctoral contract (BES-2014-070532). G.A. and K.B. thank financial support from the Dirección General de Universidades e Investigación de la Comunidad de Madrid (Spain), Research Network S2013/MAE-2716 and ICTS "NANBIOSIS", Confocal Microscopy Service: Ciber in Bioengineering, Biomaterials & Nanomedicine (CIBER-BNN) at the Alcalá University (CAI Medicine Biology). G.A. thanks the University of Alcalá for her pre-doctoral contract.

## References

- Animal Diversity Web (ADW), 2014. *Daphnia magna*. [http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/) (accessed 23 January 2019).
- Amariei, G., Boltes, K., Rosal, R., Letón, P., 2017. Toxicological interactions of ibuprofen and trisoclan on biological activity of activated sludge, *J. Hazard. Mater.* 334, 193-200.
- Backhaus, T., Altenburger, R., Arrhenius, Å., Blanck, H., Faust, M., Finizio, A., Gramatica, P., Grote, M., Junghans, M., Meyer, W., Pavan, M., Porsbring, T., Scholze, M., Todeschini, R., Vighi, M., Walter H., Horst Grimme, L., 2003, The BEAM-project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment, *Continental Shelf Research*, 23, 1757-1769.
- Baker, M.M., Belal, T.S., Mahrous, M.S., Ahmed, H.M., Daabees, H.G., 2016. Validated stability-indicating HPLC-DAD method for simultaneous determination of econazole nitrate, triamcinolone acetonide, benzoic acid and butylated hydroxyanisole in cream dosage form, *Anal. Methods* 8, 2185-2200.

Chadha, R., Bali, A., Bansal, G., 2016. Characterization of stress degradation products of duloxetine hydrochloride employing LC-UV/PDA and LC-MS/TOF studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 121, 39-55.

Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27-55.

Chou, T.C., Martin, N., 2005. *CompuSyn for Drug Combinations: PC Software and User's Guide: A Computer Program for Quantitation of Synergism and Antagonism in Drug Combinations, and the Determination of IC50 and ED50 and LD50 Values*, ComboSyn, Paramus, (NJ).

Chou, T.C., 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Reviews*, 58, 621-681.

Colmorgen, M., Paul, R.J., 1995. Imaging of physiological functions in transparent animals (*Agonous cataphractus*, *Daphnia magna*, *Pholcus phalangioides*) by video microscopy and digital image processing, *Comp. Biochem. Physiol.* 111, 583-595.

Datar, P.A., Waghmare, R.U., 2014. Development and validation of an analytical method for the stability of duloxetine hydrochloride, *J. Taibah Univ. Sci.* 8, 357-363.

European Commission, 2011, Toxicity and assessment of chemical mixtures. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/environmental\\_risks/docs/sc/her\\_o\\_155.pdf](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/environmental_risks/docs/sc/her_o_155.pdf) (accessed 23 January 2019).

European Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of

substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 199/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006, OJL 2008, 353, 1-1355.

Furuta, R., Doi, T., 1994. Chiral separation of diniconazole, uniconazole and structurally related compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 15, 1322-1325.

Galdiero, E., Falanga, A., Siciliano, A., Maselli, V., Guida, M., Carotenuto, R., Tussellino, M., Lombardi, L., Benvenuto, G., Galdiero, S., 2017. *Daphnia magna* and *Xenopus laevis* as in vivo models to probe toxicity and uptake of quantum dots functionalized with gH625, *Int. J. Nanomed.* 12, 2717-2731.

Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2014a. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*, *Drug Chem. Toxicol.* 37, 391-399.

Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., SanJuan-Reyes, N., 2014b. DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 164, 21-26.

González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., Marco, E., Fernández-Piñas, F., 2013. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment, *Water Res.* 47, 2050-2064.

Heel, R.C., Brodgen, R.N., Speight, T.M., Avery, G.S., 1978. Econazole: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy, *Drugs* 16, 177-201.



Instituto Químico Biológico (IQB), 2004. Econazol en vademécum. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/e002.htm> (accessed 23 January 2019).

Jean, J., Perrodin, Y., Pivot, C., Trepo, D., Perraud, M., Droguet, J., Tissot-Guerraz, F., Locher, F., 2012. Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents, *J. Environ. Manage.* 103, 113-121.

Lindberg, R.H., Fick, J., Tysklind, M., 2010. Screening of antimycotics in Swedish sewage treatment plants – Waters and sludge, *Water Res.* 44, 649-657.

Ma, Y., Zhang, H., Chen, H., Chen, X., 2014. Recent developments in chiral analysis of  $\beta$ -blocker drugs by capillary electromigration techniques, *Electrophoresis* 0, 1-10.

MedicineNet. Duloxetine.  
<https://www.medicinenet.com/duloxetine/article.htm> 1996. (accessed 23 January 2019)

Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., Halm-Lemeille, M.P., 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23, 4992-5001.

Minguez, L., Bureau, R., Halm-Lemeille, M.P., 2018. Joint effects of nine antidepressants on *Raphydocolis subcapitata* and *Skeletonema marinoi*: A matter of amine functional groups, *Aquatic Toxicol.* 196, 117-123.

OECD, 2004. Test Guideline 202. *Daphnia* sp, acute immobilisation test and reproduction test.

Paul, R.J., Colmorgen, M., Hüller, S., Tyroller, F., Zinkler, D., 1997. Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods, *J. Comp. Physiol. B* 167, 399-408.

Sanderson, H., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Brain, R.J., Solomon, K.R., 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening, *Toxicol. Lett.* 144, 383-395.

Sanganyado, E., Lu, Z., Fu, Q., Schlenk, D., Gan, J., 2017. Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes, *Water. Res.* 124, 527-542.

Stanley, J.K., Ramirez, A.J., Mottaleb, M., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2006. Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*, *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1780-1786.

Statgraphics Centurion, X.V.I., 2013. *Statgraphics centurion XVI software version 16.1.18*. StatPoint Technologies Inc. Warrenton, Virginia, USA.

Valimaña-Traverso, J., Amariei, G., Boltes, K., García, M.A., Marina, M.L., 2019. Stability and toxicity studies for duloxetine and econazole on *Spirodela polyrhiza* using chiral capillary electrophoresis, *J. Hazard. Mater.*, *submitted*.

Weber, F.A., aus der Beer, T., Bergmann, A., Carius, A., Grüttner, G., Hickmann, S., Ebert, I., Hein, A., Küster, A., Rose, J., Koch-Jugl, J., Stolzenberg, H.C. *Fármacos en el medio ambiente - la perspectiva global. Incidencia, efectos y acción cooperativa potencial bajo el SAICM*, 2016. Available from: [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/farmacos\\_en\\_el\\_medio\\_ambiente.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/farmacos_en_el_medio_ambiente.pdf) (accessed 23 January 2019).

Wong, D.T., Bymaster, F.P., Mayle, D.A., Reid, L.R., Krushinski, J.H., Robertson, D.W., 1993. LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake, *Neuropsychopharmacology* 8, 23-33.

## **CAPÍTULO VII**

### **CONCLUSIONES**



Del conjunto de resultados presentados en esta memoria, es posible extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se han separado por primera vez en el formato de la CE, los enantiómeros del fármaco antiurémico colchicina en el modo EKC utilizando CDs como selectores quirales y detección UV. De los trece derivados de CD aniónicos ensayados, únicamente CE- $\beta$ -CD, CE- $\gamma$ -CD, Succ- $\gamma$ -CD y S- $\gamma$ -CD mostraron tener poder de discriminación quiral frente a colchicina siendo Succ- $\gamma$ -CD la que dio lugar a una mayor resolución enantiomérica. El orden de migración de los enantiómeros de colchicina no era el mismo para las cuatro CDs que dieron lugar a separación quiral, siendo el enantiómero S (principio activo) el primero en migrar en el caso de CE- $\beta$ -CD, CE- $\gamma$ -CD y Succ- $\gamma$ -CD mientras que con S- $\gamma$ -CD el primer enantiómero en migrar fue la R-colchicina (impureza enantiomérica). El orden de migración obtenido para los enantiómeros de colchicina con Succ- $\gamma$ -CD no pudo justificarse a partir de las constantes aparentes de los complejos de cada enantiómero con Succ- $\gamma$ -CD calculadas por RMN, permitiendo concluir que además de la estabilidad de dichos complejos, la movilidad electroforética de los mismos contribuye de forma relevante a su migración.

2. La optimización de las condiciones de separación enantiomérica para colchicina por CD-EKC con Succ- $\gamma$ -CD permitió obtener una resolución enantiomérica de 5.6 en 12 min, condiciones que dieron lugar al desarrollo con éxito en nuestro grupo de investigación de una metodología analítica para la determinación enantiomérica de colchicina en formulaciones farmacéuticas, metodología a la que no afectó negativamente el hecho de que el enantiómero S fuera el primero en migrar. Dado que la única separación enantiomérica que se había descrito para colchicina se había llevado a cabo por TLC en 3.5 h, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación suponen un claro avance en el conocimiento.

3. Se ha llevado a cabo la separación enantiomérica simultánea de una mezcla de siete fármacos de uso común (duloxetina, terbutalina, econazol, propranolol, verapamil, tartrato de metoprolol y betaxolol), por primera vez en el formato de la CE utilizando EKC con CDs como selectores quirales. De las ocho CDs ensayadas (cuatro neutras y cuatro anónicas), únicamente S- $\beta$ -CD permitió separar simultáneamente los 14 enantiómeros de los fármacos estudiados en 16 min y con resoluciones enantioméricas para todos ellos comprendidas entre 2.4 y 8.5. Las características analíticas del método desarrollado fueron adecuadas en términos de linealidad, precisión y exactitud con LODs y LOQs en el orden de los mg/L.

4. De las tres organosílices mesoporosas periódicas sintetizadas utilizando ligandos neutros, dos de ellas nuevas y basadas en el empleo del ligando 1,4-bis(trimetoxisililetil)benceno (TMSB) (para una de ellas se utilizó una fuente adicional de sílice, tetraetilortosilicato), y la tercera, escasamente utilizada con anterioridad, basada en el empleo del 1,4-bis(trietoxisilil)benceno (TESB) como ligando, los materiales PMO-TESB y PMO-TMSB-1 dieron lugar a los mejores resultados en la extracción y preconcentración de los enantiómeros de los siete fármacos estudiados en este trabajo con recuperaciones comprendidas entre 80 y 100 % para todos los enantiómeros excepto los de terbutalina con el material PMO-TESB y los de duloxetina en el caso del material PMO-TMSB-1. Los peores resultados obtenidos para el material PMO-TMSB-2 se atribuyeron a su pobre distribución de poros y falta de homogeneidad en los mismos. Además, de los tres materiales, PMO-TESB proporcionó los mejores resultados cuando se estudió el máximo volumen de disolución de muestra que podía pasarse a través del sorbente sin perder de forma apreciable la recuperación de los analitos, siendo 200 mL el volumen óptimo cuando se utilizó 100 mg de sorbente (factor de preconcentración de 400). Sin embargo, es posible concluir también que la nueva

organosílice mesoporosa PMO-TMSB-1 sintetizada y caracterizada en este trabajo ha demostrado poseer un elevado potencial para la preconcentración de los fármacos estudiados con la excepción de duloxetina.

5. Se ha desarrollado un método analítico que ha permitido la determinación enantiomérica simultánea de doce enantiómeros de seis de los fármacos estudiados (exceptuando terbutalina) en aguas de depuradora enriquecidas previa preconcentración por SPE utilizando PMO-TESB como sorbente. La evaluación de las características analíticas del método permitió demostrar que eran adecuadas en términos de linealidad, precisión y exactitud (con valores de recuperación de los fármacos de muestras de agua de depuradora entre 73.9 y 102.9 % excepto para econazol cuyos valores de recuperación fueron del 58.5 al 72.4 %) y límites de cuantificación del método SPE-CE-UV del orden de los  $\mu\text{g/L}$ , concentraciones a las que algunos de los fármacos estudiados se encontraban en aguas residuales según se había descrito en trabajos previos. Los resultados obtenidos han demostrado que la organosílice mesoporosa PMO-TESB sintetizada y caracterizada en este trabajo constituye una alternativa adecuada a otros sorbentes utilizados previamente para la preconcentración de los fármacos estudiados (excepto terbutalina) en muestras de agua por SPE. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera aplicación de CE a la determinación enantiomérica de estos fármacos en aguas ya que no existía ningún antecedente en la bibliografía como muestra la Tabla I.2 del capítulo I, excepto en el caso de propranolol y metoprolol cuya determinación en aguas por CE había sido descrita en un único trabajo realizado por nuestro grupo de investigación.

6. Se ha llevado a cabo la separación enantiomérica simultánea de los doce enantiómeros correspondientes a seis herbicidas fenoxiácidos (fenoprop, mecoprop, dicloroprop, 4-CPPA, 3-CPPA y 2-PPA), por primera vez en el formato



de la CE utilizando el modo EKC con CDs como selectores quirales y detección UV. De las seis CDs neutras ensayadas, tres de ellas ofrecieron los mejores resultados de separación quiral ( $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD y TM- $\beta$ -CD) si bien ninguna de ellas permitió separar los enantiómeros de todos los compuestos estudiados. El empleo de un sistema dual de CDs formado por una mezcla de HP- $\beta$ -CD+TM- $\beta$ -CD en las condiciones optimizadas de concentración de los selectores quirales, pH y temperatura, dio lugar a la separación enantiomérica simultánea de los seis herbicidas en 16 min (resoluciones enantioméricas entre 1.1 y 2.9) pudiendo reducirse el tiempo a 11 min al incrementar el voltaje de separación de 20 a 25 kV (resoluciones enantioméricas entre 1.2 y 2.7) aunque en este caso se observó una co-elución entre el enantiómero del mecoprop que eluye en segundo lugar y el enantiómero del diclorprop que eluye en primer lugar. Las características analíticas del método fueron adecuadas en términos de linealidad, precisión y exactitud, con valores de LODs y LOQs instrumentales a niveles de mg/L.

7. Se han sintetizado dos nuevas organosílices mesoporosas periódicas, basadas en ligandos catiónicos, cuya síntesis no había sido descrita con anterioridad. Los ligandos utilizados han sido cloruro de (estirilmetil)bis(trietoxisililpropil)amonio (STPA) y bis(3-trietoxisililpropil)amina (TEPA) que han dado lugar a la obtención de materiales que permiten trabajar en el modo mixto fase reversa/intercambio aniónico fuerte (PMO-STPA) o intercambio aniónico fuerte (PMO-TEPA), respectivamente. En ambos casos, se utilizó TEOS como fuente de sílice. La organosílice mesoporosa PMO-STPA permitió obtener los mejores resultados para la extracción y preconcentración de los herbicidas fenoxiácidos estudiados con recuperaciones elevadas para todos ellos cuando se empleaban 100 mg de sorbente y se hacía pasar un volumen de la disolución estándar de los analitos de 750 mL (factor de preconcentración de 1500).

8. Se ha desarrollado un método analítico para la determinación enantiomérica simultánea de los seis herbicidas fenoxiácidos estudiados en este trabajo previa extracción y preconcentración de aguas de río y de depuradora por SPE utilizando como sorbente la organosílice mesoporosa periódica PMO-STPA sintetizada y caracterizada en este trabajo. Las características analíticas del método fueron adecuadas en términos de linealidad, precisión y exactitud (con porcentajes de recuperación para los compuestos estudiados en aguas de río y de depuradora entre 78.3 y 107.5 %) siendo los valores de LODs y LOQs del método SPE-CE-UV del orden de los  $\mu\text{g/L}$ . Estos resultados permiten concluir que la retención de los herbicidas fenoxiácidos mediante un mecanismo mixto de fase inversa e intercambio aniónico en el material PMO-STPA resulta ventajosa siendo este material una alternativa interesante en términos de recuperación y factor de preconcentración a otros materiales utilizados previamente para la extracción de los compuestos estudiados por SPE. Estos resultados constituyen la primera aplicación de CE a la determinación enantiomérica de los fenoxiácidos estudiados en aguas, ya que no existían antecedentes bibliográficos como se observa en la Tabla I.3 del capítulo I de esta memoria, excepto en el caso de fenoprop y dicloroprop cuya determinación enantiomérica en aguas por CE se había descrito en un trabajo previo.

9. Se ha optimizado la separación enantiomérica simultánea de duloxetina y econazol por CD-EKC dando lugar a resoluciones enantioméricas de 7.9 para duloxetina y de 6.5 para econazol en 7.5 min utilizando la  $S\text{-}\beta\text{-CD}$  en medio tampón fosfato a pH 3.0. Se han evaluado las características analíticas del método desarrollado en términos de linealidad, precisión y exactitud aplicándolo a la determinación enantiomérica de los dos fármacos en medios de cultivo en condiciones abióticas y bióticas correspondientes a la planta acuática *Spirodela polyrhiza* y al microcrustáceo de agua dulce *Daphnia magna*.

10. La evaluación de la estabilidad de duloxetina, econazol y sus mezclas en condiciones abióticas y bióticas puso de manifiesto que para los medios de cultivo correspondientes a la planta acuática *Spirodela polyrhiza*, la disminución de la concentración del racemato y de los enantiómeros de duloxetina fue menor en mezclas binarias con econazol que en disoluciones individuales de duloxetina, y que, por el contrario, la concentración de econazol disminuyó hasta hacerse no detectable en mezclas binarias con duloxetina mientras que dicha reducción fue menor en disoluciones individuales de econazol con respecto a las mezclas binarias y a las disoluciones individuales de duloxetina, todo ello tanto en condiciones abióticas como bióticas.

11. En el caso del organismo *Daphnia Magna*, los estudios de estabilidad de los fármacos investigados y sus mezclas revelaron que las concentraciones de racemato y de los enantiómeros de duloxetina no sufrieron variaciones significativas en mezclas binarias con econazol en condiciones abióticas y el mismo comportamiento se observó en disoluciones individuales de duloxetina tanto en condiciones abióticas como bióticas. Sin embargo, para mezclas de duloxetina y econazol en condiciones bióticas, las concentraciones del racemato y de los enantiómeros de duloxetina disminuyen apreciablemente (entre un 46 y un 77 % dependiendo de la concentración inicial). En el caso del econazol, este fármaco desaparece tras la incubación con los medios de cultivo en condiciones abióticas y bióticas, tanto cuando se adiciona de forma individual a dichos medios como cuando está presente como mezcla binaria con duloxetina demostrando que no es estable.

12. La determinación de la toxicidad de duloxetina, econazol y sus mezclas se llevó a cabo, por primera vez, para el organismo *Spirodela polyrhiza*. Los valores de EC50 obtenidos demostraron la elevada toxicidad de ambos fármacos y sus

mezclas para este organismo no diana siendo la toxicidad de econazol mayor que la de la duloxetina y que la de la mezcla de ambos. Asimismo, la toxicidad de las mezclas de duloxetina y econazol se determinó por primera vez en este trabajo para *Daphnia magna* y los valores de EC50 pusieron de manifiesto la elevada toxicidad de dichas mezclas para este organismo, si bien en este caso la duloxetina de forma individual presentaba una toxicidad similar a la mezcla y superior al econazol. Además, el estudio del efecto combinado de ambos fármacos sobre los dos organismos reveló la existencia de un antagonismo de ligero a moderado por encima de los valores de EC50 y un efecto aditivo por debajo de los mismos en el caso de *Spirodela polyrhiza*, mientras que para *Daphnia magna* se constató la existencia de sinergismo a cualquier valor de EC. Los resultados obtenidos demuestran el elevado potencial de EKC para determinar valores de toxicidad de contaminantes a partir de las concentraciones reales de los mismos y no de las concentraciones iniciales que son las que habitualmente se emplean en este tipo de estudios.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral han dado lugar a un conjunto de metodologías analíticas avanzadas que han permitido la determinación enantiomérica de fármacos y agroquímicos en el formato de la CE y la propuesta de nuevas organosílices mesoporosas periódicas con características ventajosas para su utilización como sorbentes para la extracción y preconcentración de fármacos y herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas por SPE. Todo ello incidiendo en el empleo de técnicas analíticas de bajo coste económico y medioambiental y en la introducción de innovaciones en la etapa de preparación de muestra.



## **CAPÍTULO VIII**

## **BIBLIOGRAFÍA**



- [1] G.H. Wagnière, Introduction, in G.H. Wagnière (Ed.), *On chirality and the universal asymmetry: Reflections on image and mirror image*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich (Switzerland), 2008.
- [2] G.H. Wagnière, Image and mirror image in molecules, in: G.H. Wagnière (Ed.), *On chirality and the universal asymmetry: Reflections on image and mirror image*, Verlag Helvetica Chimica Acta, Zürich (Switzerland), 2008.
- [3] W.H. Brooks, W.C. Guida, K.G. Daniel, The significance of chirality in drug design and development, *Curr. Top. Med. Chem.* 11 (2011) 760-770.
- [4] A.J. Hutt, S.C. Tan, Drug chirality and its clinical significance, *Drugs* 52 (1996) 1-12.
- [5] Chirality at nitrogen, phosphorus, and sulfur. [https://chem.libretexts.org/Courses/Athabasca\\_University/Chemistry\\_350%3A\\_Organic\\_Chemistry\\_I/Chapter\\_5%3A\\_Stereochemistry\\_at\\_Tetrahedral\\_Centres/5.10\\_Chirality\\_at\\_Nitrogen%2C\\_Phosphorus%2C\\_and\\_Sulfur](https://chem.libretexts.org/Courses/Athabasca_University/Chemistry_350%3A_Organic_Chemistry_I/Chapter_5%3A_Stereochemistry_at_Tetrahedral_Centres/5.10_Chirality_at_Nitrogen%2C_Phosphorus%2C_and_Sulfur) (acceso el 09 de Febrero de 2019).
- [6] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, J. Gan, Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes, *Water Res.* 124 (2017) 527-542.
- [7] A. Berthod, Chiral recognition mechanisms in enantiomers separations: A general view, in A. Berthod (Ed.), *Chiral recognition in separation methods*, Springer, Berlin (Germany), 2010.
- [8] S.J. Mohan, E.C. Mohan, M.R. Yamsani, Chirality and its importance in pharmaceutical field-an overview, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.* 1 (2009) 309-316.



- [9] S. Harrad (Ed.), *Persistent organic pollutants*, Blackwell Publishing Ltd, New Jersey (USA), 2010.
- [10] T.P. Prabhu, Shinesudev, M. Kurian, P. Manjusha, P.S. Minnu, M. Hisham, S. Shrikumar, *Pharmaceutical review and its importance of chiral chromatography*, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 6 (2016) 476-484.
- [11] X.F. Wang, Y.K. Sun, K. Sun, Y.Z. Ding, R.J. Yuan, *Review: Separation and pharmacology of chiral compounds in traditional chinese medicine*, *Anal. Lett.* 50 (2017) 33-49.
- [12] E. García-Martín, C. Martínez, B. Tabarés, J. Frías, J.A. Agúndez, *Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 76 (2004) 119-127.
- [13] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, *Chiral drugs: An overview*, *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 85-100.
- [14] J. McConathy, M.J. Owens, *Stereochemistry in drug action*, *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 5 (2003) 70-73.
- [15] H.Y. Aboul-Enein, I. Ali, *Introduction*, in: H.Y. Aboul-Enein, I. Ali (Eds.), *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies*, CRC Press, Florida (USA), 2003.
- [16] M. Rösner, H.G. Capraro, A.E. Jacobson, L. Atwell, A. Brossi, *Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, and (+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines*, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 257-261.

- [17] M. Del Bubba, L. Checchini, L. Lepri, Thin-layer chromatography enantioseparations on chiral stationary phases: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 533-554.
- [18] E.J. Ariëns, Racemic therapeutics – ethical and regulatory aspects, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 41 (1991) 89-83.
- [19] A. Bertaso, G. Musile, R. Gottardo, C. Seri, F. Tagliaro, Chiral analysis of methorphan in opiate-overdose related deaths by using capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B* 1000 (2015) 130-135.
- [20] K.M. Rentsch, The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 1-9.
- [21] P. Lees, R.P. Hunter, P.T. Reeves, P.L. Toutain, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of stereoisomeric drugs with particular reference to bioequivalence determination, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 35 (2012) 17-30.
- [22] S. Erb, Single-enantiomer drugs poised for further market growth, *Pharm. Technol.* 30 (2006) 14-18.
- [23] P. Drabina, V. Feixová, M. Sedlák, New synthetic strategy for preparation of the anticoagulant drug rivaroxaban via an asymmetric Henry reaction, *Tetrahedron Lett.* 60 (2019) 99-101.
- [24] ICH Harmonized tripartite guideline: Q3B(R2) Impurities in new products.. Published in the Federal Register 68 (2003) 64628-64629.

- [25] S. Samakashvili, C. Ibáñez, C. Simó, F.J. Gil-Bea, B. Winblad, A. Cedazo-Mínguez, A. Cifuentes, Analysis of chiral amino acids in cerebrospinal fluid samples linked to different stages of Alzheimer disease, *Electrophoresis* 32 (2011) 2757-2764.
- [26] T. Takayama, T. Mochizuki, K. Todoroki, J.Z. Min, H. Mizuno, K. Inoue, H. Akatsu, I. Noge, T. Toyooka, A novel approach for LC-MS/MS-based chiral metabolomics fingerprinting and chiral metabolomics extraction using a pair of enantiomers of chiral derivatization reagents, *Anal. Chim. Acta* 898 (2015) 73-84.
- [27] T. Kimura, K. Hamase, Y. Miyoshi, R. Yamamoto, K. Yasuda, M. Mita, H. Rakugi, T. Hayashi, Y. Isaka, Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1-7.
- [28] N. Galazis, M. Galazi, W. Atiomo, D-Chiro-inositol and its significance in polycystic ovary syndrome. A systematic review, *Gynecol. Endocrinol.* 27 (2011) 256-262.
- [29] EU. Commission regulation (EC) No 953/2009 of 13 October 2009 on substances that may be added for specific nutritional purposes in foods for particular nutritional uses, *Off J L* 269 (2009) 9-19.
- [30] N. Fujii, T. Saito, Homochirality and life, in: K. Maruoka, B. Johnson (Eds.), *The chemical record*, vol. IV, issue 5, WILEY-VCH, Weinheim (Germany), 2004.
- [31] G. Genchi, An overview on D-amino acids, *Amino Acids* 49 (2017) 1521-1533.
- [32] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Söll, Natural expansion of the genetic code, *Nat. Chem. Biol.* 3 (2007) 29-35.

- [33] W. Jiang, B.S. Fang, Construction and evaluation of a novel bifunctional phenylalanine-formate dehydrogenase fusion protein for bioenzyme system with cofactor regeneration, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43 (2016) 577-584.
- [34] U. Schäfer, J. Kiefl, W. Zhu, M. Kempf, M. Eggers, M. Backes, T. Geissler, R. Wittlake, K.V. Reichelt, J.P. Ley, G. Krammer, Authenticity control of food flavorings – merits and limitations of chiral analysis, in: K.H. Engel, G. Takeoka (Eds.), *Importance of chirality to flavour compounds*, vol. 1212, American Chemical Society, Washington (USA), 2015.
- [35] W. Liu, M. Tang, Enantioselective activity and toxicity of chiral herbicides, in: M.N. Hasaneen (Ed.), *Herbicides – Mechanisms and mode of action*, InTech, Rijeka (Croatia), 2011.
- [36] P. Jeschke, Current status of chirality in agrochemicals, *Pest. Manag. Sci.* 74 (2018) 2389-2404.
- [37] K. Saito, M. Yato, T. Ito, Y. Iwasaki, R. Ito, Y. Matsuki, H. Nakazawa, Verification of the need for optical purity measurement of chiral pesticide standards as agricultural reference materials, *Accred. Qual. Assur.* 13 (2008) 373-379.
- [38] A. Williams, Opportunities for chiral agrochemicals, *Pest. Sci.* 46 (1996) 3-9.
- [39] V. Schurig, Chiral separations using gas chromatography, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 647-661.
- [40] X.X. Sun, L.Z. Sun, H.Y. Aboul-Enein, Chiral derivatization reagents for drug enantioseparation by high-performance liquid chromatography based upon pre-column derivatization and formation of diastereomers: Enantioselectivity and related structure, *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 116-132.

- [41] S.Görög, M. Gazdag, Enantiomeric derivatization for biomedical chromatography, *J. Chromatogr. B* 659 (1994) 51-84.
- [42] Y. Okamoto, T. Ikai, Chiral HPLC for efficient resolution of enantiomers, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 2593-2608.
- [43] I. Ali, S.D. Alam, Z.A. Al-Othman, J.A. Farooqi, Recent advances in SPE-chiral-HPLC methods for enantiomeric separation of chiral drugs in biological samples, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 645-654.
- [44] C. García-Ruiz, M.L. Marina, Chiral analysis by capillary electrophoresis, in: M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- [45] E.M. Martin Del Valle, Cyclodextrins and their uses: A review, *Process Biochem.* 39 (2004) 1033-1046.
- [46] J. Zhou, H. Ritter, Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems, *Polym. Chem.* 1 (2010) 1552-1559.
- [47] Y. Nie, X. Liu, X. Yang, Z. Zhao, Review: Recent application of chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for enantiomeric pharmaceutical and biomedical determinations, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 753-763.
- [48] J. Zheng, S.A. Shamsi, Chiral analysis in capillary electrochromatography (CEC) and CEC coupled to mass spectrometry, in: G. Subramanian (Ed.), *Chiral separation techniques: A practical approach*, G., 3<sup>rd</sup> Edition, WILEY-VCH, Weinheim (Germany), 2007.

- [49] G.K.E. Scriba, Enantiomer separation by capillary electrophoresis, in: G. Subramanian (Ed.), *Chiral separation techniques: A practical approach*, G., 3<sup>rd</sup> Edition, WILEY-VCH, Weinheim (Germany), 2007.
- [50] R. Kuhn, Enantiomeric separations in capillary zona electrophoresis using a chiral crown ether, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 367-373.
- [51] G. Gübitz, M.G. Schmid, Recent advances in chiral separation principles in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Electrophoresis* 23 (2004) 3981-3996.
- [52] C. Morrison, Chromatographic separations and analysis: Chiral gas chromatography, in: E.M. Carreira, H. Yamamoto (Eds.), *Comprehensive Chirality*, vol. VIII, Elsevier, Amsterdam, 2012.
- [53] I. Sierra, M.L. Marina, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, M. Silva, Approaches for enantioselective resolution of pharmaceuticals by miniaturized separation techniques with new chiral phases based on nanoparticles and monoliths, *Electrophoresis* 37 (2016) 2538-2553.
- [54] Z. Chen, Capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of amino acids as dansyl derivatives, *J. Chromatogr. Lib.* 70 (2005) 309-338.
- [55] M.J. Trujillo-Rodríguez, H. Nan, M. Varona, M.N. Emaus, I.D. Souza, J.L. Anderson, *Anal. Chem.* 91 (2019) 505-531.
- [56] V.Y. Gus'kov, V.N. Maistrenko, New chiral stationary phases: Preparation, properties and applications in gas chromatography, *J. Anal. Chem.* 73 (2018) 937-945.

- [57] D. Wu, P. Cai, X. Zhao, Y. Kong, Y. Pan, Recent progress of task-specific ionic liquids in chiral resolution and extraction of biological samples and metal ions, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 373-384.
- [58] X. Sun, J. Xu, X. Zhao, Y. Zhai, J. Xing, Study of chiral ionic liquid as stationary phases for GC, *Chromatographia* 73 (2013) 1013-1019.
- [59] L. Zhao, P. Ai, A.H. Duan, L.M. Yuan, Single-walled carbon nanotubes for improved enantioseparations on a chiral ionic liquid stationary phase in GC, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 143-147.
- [60] M. Zhang, A.K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara, H. Qiu, Versatile ligands for high-performance liquid chromatography: An overview of ionic liquid-functionalized stationary phases, *Anal. Chim. Acta* 887 (2015) 1-16.
- [61] A. Hussain, M.F. AlAjmi, I. Hussain, I. Ali, Future of ionic liquids for chiral separations in high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Crit. Rev. Anal. Chem.* (2018) In press.
- [62] C.P. Kapnissi-Christodoulou, I.J. Stavrou, M.C. Mavroudi, Chiral ionic liquids in chromatographic and electrophoretic separations, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 2-10.
- [63] S.M. Xie, L.M. Yuan, Recent progress of chiral stationary phases for separation of enantiomers in gas chromatography, *J. Sep. Sci.* 40 (2016) 124-137.
- [64] B. Chankvetadze, Contemporary theory of enantioseparations in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1567 (2018) 2-25.

- [65] M.P. Vaccher, E. Lipka, J.P. Bonte, C. Foulon, J.F. Goossens, C. Vaccher, Enantiomeric analysis of baclofen analogs by capillary zone electrophoresis, using highly sulfated cyclodextrins: Inclusion ionization constant pKa determination, *Electrophoresis* 26 (2005) 2974-2983.
- [66] E. Lipka, A. Selouane, D. Postel, C. Len, M.P. Vaccher, J.P. Bonte, C. Vaccher, Enantioseparation of four *cis* and *trans* diastereomers of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidide analogs, by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 161-167.
- [67] G.K.E. Scriba, Recent advances in enantioseparations of peptides by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 24 (2003) 4063-4077.
- [68] H. Krajian, N. Mofaddel, D. Villemin, P.L. Desbène, A new example of reversal of the order of migration of enantiomers, as a function of cyclodextrin concentration and pH, by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis: Enantioseparation of 6,6'-dibromo-1,1'-binaphthyl-2,2'-diol, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2193-2201.
- [69] C.E. Lin, W.S. Liao, H.T. Cheng, C.M. Kuo, Y.C. Liu, Enantioseparation of phenothiazines in cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis using sulfated cyclodextrins as chiral selectors, *Electrophoresis* 26 (2005) 3869-3877.
- [70] M. Castro-Puyana, A.L. Crego, M.L. Marina, C. García-Ruíz, Enantioselective separation ofazole compounds by EKC. Reversal of migration order of enantiomers with CD concentration, *Electrophoresis* 28 (2007) 2667-2674.
- [71] O. Núñez, Fundamentals of electrophoretic analysis, in: M.M. Barbooti (Ed.), *Environmental applications of instrumental chemical analysis*, 1<sup>st</sup> Edition, Apple Academic Press, Florida (USA), 2015.



- [72] K. Swinney, D.J. Bornhop, Detection in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 1239-1250.
- [73] A. Tycova, F. Foret, Trends in CE-MS and applications, in: J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino, A.M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science*, vol. II, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2015.
- [74] E. Sánchez-López, M. Castro-Puyana, M.L. Marina, A.L. Crego, Chiral separations by capillary electrophoresis, in: J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino, A.M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Science*, 1<sup>st</sup> Edition, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2015.
- [75] I. Milsik, Coupling of CE-MS for protein and peptide analysis, *J. Sep. Sci.* 42 (2019) 385-397.
- [76] M. Swartz, HPLC detectors: A brief review, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 33 (2010) 1130-1150.
- [77] K.D. Ward, T.J. Ward, Recent progress in chiral stationary phase development and current chiral applications, *LC-GC Eur.* 32 (2014) 20-23.
- [78] Z.A. Al-Othman, A. Al-Warthan, I. Ali, Advances in enantiomeric resolution on monolithic chiral stationary phases in liquid chromatography and electrochromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 1033-1057.
- [79] D.S. Tonchar, M.A. Bombaywala, A.V. Chandewar, A review on supercritical fluid chromatography, *Int. J. Res. Pharm. Technol.* 2 (2017) 51-55.
- [80] E. Lemasson, S. Bertin, C. West, Use and practice of achiral and chiral supercritical fluid chromatography in pharmaceutical analysis and purification, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 212-233.

- [81] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski (Eds.), *Electromigration Techniques*, Springer, Berlin (Germany), 2013.
- [82] G. de Jong, *Detection in capillary electrophoresis – An introduction*, in: G. de Jong (Ed.), *Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS): Principles and applications*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2016.
- [83] G.K.E. Scriba, *Differentiation of enantiomers by capillary electrophoresis*, in: V. Schurig (Ed.), *Differentiation of enantiomers I*, Springer, Berlin (Germany), 2013.
- [84] U. Pyell (Ed.), in: *Electrokinetic chromatography: Theory, instrumentation and applications*, John Wiley & Sons, Chichester (UK), 2006.
- [85] S. Terabe, *Electrokinetic chromatography: An interface between electrophoresis and chromatography*, *Trends Anal. Chem.* 8 (1989) 129-134.
- [86] H. Lu, G. Chen, *Recent advances of enantioseparations in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*, *Anal. Methods* 3 (2011) 488-508.
- [87] Cyclolab, [www.cyclolab.hu](http://www.cyclolab.hu) (acceso el 10 de Enero de 2019).
- [88] Sigma, [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) (acceso el 10 de Enero de 2019).
- [89] P. Saokham, C. Muankaew, P. Jansook, T. Loftsson, *Solubility of cyclodextrins and drug/cyclodextrin complexes*, *Molecules* 23 (2018) E1161.
- [90] M.A. García, M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel, *Separation modes in capillary electrophoresis*, in: M.L. Marina, A. Ríos, M. Valcárcel (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. XLV, Elsevier, Amsterdam, 2005.

- [91] S.A.A. Rizvi, S.A. Shamsi, Chiral analysis using polymeric surfactants in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and MEKC coupled to mass spectrometry, in: G. Subramanian (Ed.), *Chiral separation techniques: A practical approach*, G., 3<sup>rd</sup> Edition, WILEY-VCH, Weinheim (Germany), 2007.
- [92] K. Zhang, R. Gao, *Capillary electrochromatography*, in: J.L. Anderson, A. Berthod, V. Pino, A.M. Stalcup (Eds.), *Analytical Separation Sciences*, 1<sup>st</sup> Edition, WILEY-VCH, Weinheim (Germany), 2015.
- [93] D. Wistuba, J. Kang, V. Schurig, Chiral separation by capillary electrochromatography using cyclodextrin phases, in: G. Gübitz, M.G. Schmid (Eds.), *Chiral separations: Methods and protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
- [94] P. Spégel, J. Nilsson, S. Nilsson, Chiral separations by capillary electrochromatography using molecularly imprinted polymers, in: G. Gübitz, M.G. Schmid (Eds.), *Chiral separations: Methods and protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
- [95] C. Borst, F. Belal, U. Holzgrabe, Possibilities and limitations of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Pharmazie* 68 (2013) 526-530.
- [96] M.L. Riekkola, M. Jussila, S.P. Porras, I.E. Walkó, Non-aqueous capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 155-170.
- [97] A. Wuetrich, J.P. Quirino, A decade of microchip electrophoresis for clinical diagnostics - A review of 2008-2017, *Anal. Chim. Acta* 1045 (2019) 42-66.
- [98] D. Belder, M. Ludwig, Microchip electrophoresis for chiral separations, *Electrophoresis* 24 (2003) 2422-2430.

- [99] Q. Zhu, G.K.E. Scriba, Advances in the use of cyclodextrins as chiral selectors in capillary electrokinetic chromatography: Fundamentals and applications, *Chromatographia* 73 (2016) 1403-1435.
- [100] F. Shang, E. Guihen, J.D. Glennon, Recent advances in miniaturisation - The role of microchip electrophoresis in clinical analysis, *Electrophoresis* 33 (2012) 105-116.
- [101] S. Orlandini, B. Pasquini, M. del Bubba, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Quality by design in the chiral separation strategy for the determination of enantiomeric impurities: Development of a capillary electrophoresis method based on dual cyclodextrin systems for the analysis of levosulpiride, *J. Chromatogr. A* 1380 (2015) 177-185.
- [102] S. Krait, M. Heuermann, G.K.E. Scriba, Development of a capillary electrophoresis method for the determination of the chiral purity of dextromethorphan by a dual selector system using quality by design methodology, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 1405-1413.
- [103] W.A. Wan Ibrahim, S.M. Abd Wahib, D. Hermawan, M.M. Sanagi, H.Y. Aboul-Enein, Separation of selected imidazole enantiomers using dual cyclodextrin system in micellar electrokinetic chromatography, *Chirality* 25 (2013) 328-335.
- [104] D. Hermawan, W.A. Wan Ibrahim, M.M. Sanagi, H.Y. Aboul-Enein, Chiral separation of econazole using micellar electrokinetic chromatography with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1244-1249.

- [105] S. Orlandini, B. Pasquini, C. Caprini, M. Del Bubba, M. Dousa, S. Pinzauti, S. Furlanetto, Enantioseparation and impurity determination of ambrisentan using cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography: Visualizing the design space within quality by design framework, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 363-371.
- [106] X. Li, Y. Du, Z. Feng, X. Sun, Z. Huang, A novel enantioseparation approach based on liposome electrokinetic capillary chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 145 (2017) 186-194.
- [107] H. Cheng, Q. Zhang, Y. Tu, Separation of fat-soluble isoquinoline enantiomers using  $\beta$ -cyclodextrin-modified micellar capillary electrokinetic chromatography, *Curr. Pharm. Anal.* 8 (2012) 37-43.
- [108] H. Cheng, B. He, Q. Zhang, Y. Tu, Chiral separation of sertraline with microemulsion electrokinetic chromatography on a polymer/ $\beta$ -cyclodextrin assembling molecular film modified capillary, *Anal. Sci.* 26 (2010) 1087-1092.
- [109] C. Borst, U. Holzgrabe, Comparison of chiral electrophoretic separation methods for phenethylamines and application of impurity analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1201-1209.
- [110] S. Wongwan, G.K.E. Scriba, Impurity profiling of dexamphetamine sulfate by cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 31 (2010) 3006-3011.
- [111] A. Mohammadi, S. Nojavan, M. Rouini, A.R. Fakhari, Stability evaluation of tramadol enantiomers using a chiral stability-indicating capillary electrophoresis method and its application to pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1613-1620.

- [112] Simultaneous chiral separation of tramadol and methadone in tablets, human urine, and plasma by capillary electrophoresis using maltodextrin as the chiral selector, *Chirality* 30 (2018) 1161-1168.
- [113] J. Yu, Z. Jiang, T. Sun, F. Ji, S. Xu, L. Wei, X. Guo, Enantiomeric separation of meptazinol and its three intermediate enantiomers by capillary electrophoresis: Quantitative analysis of meptazinol in pharmaceutical formulations, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 135-141.
- [114] H. Ye, L. Yu, X. Xu, C. Zheng, W. Lin, X. Liu, G. Chen, Affinity capillary electrophoresis coupling with partial filling technique and field-amplified sample injection for enantioseparation and determination of DL-tetrahydropalmatine, *Electrophoresis* 31 (2010) 2049-2054.
- [115] N. Porpiglia, G. Musile, F. Bortolotti, E.F. De Palo, F. Tagliaro, Chiral separation and determination of ketamine and norketamine in hair by capillary electrophoresis, *Forensic. Sic. Int.* 266 (2016) 304-310.
- [116] Y. Li, Y. Yu, P. Zhu, G. Duan, Y. Li, F. Song, Chiral separation of bupivacaine hydrochloride by capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection and its application to rabbit serum and pharmaceutical injection, *Pharmazie* 67 (2012) 25-30.
- [117] 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.

- [118] K.M. Al Azzam, B. Saad, R. Adnan, H.Y. Aboul-Enein, Enantioselective analysis of ofloxacin and ornidazole in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using single chiral selector and computational calculation of their inclusion complexes, *Anal. Chim. Acta* 674 (2010) 249-255.
- [119] Y. Cui, X. Ma, M. Zhao, Z. Jiang, S. Xu, X. Guo, Combined use of ionic liquid and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin for the enantioseparation of ten drugs by capillary electrophoresis, *Chirality* 25 (2013) 409-414.
- [120] X. Deng, Y. Yuan, E. Adams, A. Van Schepdael, Development and validation of a sensitive enantiomeric separation method for new single enantiomer drug levornidazole by CD-capillary electrophoresis, *Talanta* 106 (2013) 186-191.
- [121] X. Wang, J. Hou, M. Jann, Y.Y. Hon, S.A. Shamsi, Development of a chiral micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous analysis of warfarin and hydroxywarfarin metabolites: Application to the analysis of patients serum samples, *J. Chromatogr. A* 1271 (2013) 207-216.
- [122] J. Abolhasani, H. R. Jafariyan, M.M. Khataei, R.H. Khanmiri, E. Ghorbani-Kalhor, A. Hassanpour, Hollow fiber supported liquid phase microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for determination of citalopram enantiomers in urine samples, *Anal. Method* 7 (2015) 2012-2019.
- [123] Y. Liu, M. Jann, C. Vandenberg, C.B. Eap, S.A. Shamsi, Development of an enantioselective assay for simultaneous separation of venlafaxine and *O*-desmethylvenlafaxine by micellar electrokinetic chromatography-tandem mass spectrometry: Application to the analysis of drug-drug interaction, *J. Chromatogr. A* 1420 (2015) 119-128.

- [124] E. Sánchez-López, C. Montealegre, M.L. Marina, A.L. Crego, Development of chiral methodologies by capillary electrophoresis with ultraviolet and mass spectrometry detection for duloxetine analysis in pharmaceutical formulations, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 356-362.
- [125] L. Asensi-Bernardi, Y. Martín-Biosca, E. Fornet-Herrero, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernández, Determination of fluoxetine enantiomers in pharmaceutical formulations by electrokinetic chromatography-counter current technique, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 377-381.
- [126] A.R. Fakhari, H. Tabani, S. Nojavan, H. Abedi, Electromembrane extraction combined with cyclodextrin-modified capillary electrophoresis for the quantification of trimipramine enantiomers, *Electrophoresis* 33 (2012) 506-515.
- [127] M. Castro-Puyana, I. Lammers, J. Buijs, C. Gooijer, F. Ariese, Sensitized phosphorescence as detection method for the enantioseparation of bupropion by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 31 (2010) 3928-3936.
- [128] L. Kanizsová, M. Ansorge, I. Zusková, P. Dubský, Using single-isomer octa(6-O-sulfo)- $\gamma$ -cyclodextrin for fast capillary zone electrophoretic enantioseparation of pindolol: Determination of complexation constants, software-assisted optimization, and method validation, *J. Chromatogr. A* 1568 (2018) 214-221.
- [129] S. Hamidi, S. Soltani, A. Jouyban, A dispersive liquid-liquid microextraction and chiral separation of carvedilol in human plasma using capillary electrophoresis, *Bioanalysis* 7 (2015) 1107-1117.



- [130] H. Tabani, A.R. Fakhari, A. Shahsavani, H.G. Alibabaou, Electrically assisted liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for quantification of propranolol enantiomers in human body fluids, *Chirality* 26 (2014) 260-267.
- [131] G. Hancu, A. Carje, I. Iuga, I. Fulop, Z.I. Szabo, Cyclodextrine screening for the chiral separation of carvedilol by capillary electrophoresis, *Iran. J. Pharm. Res.* 14 (2015) 425-433.
- [132] L. Fang, Y. Du, X. Hu, L. Luo, X. Guo, X. Guo, J. Yu, Carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis: Enantioseparation of 16 basic chiral drugs and its chiral recognition mechanism associated with drugs' structural features, *Biomed. Chromatogr.* 31 (2017) e3991.
- [133] S.M. El-Gizawy, O.H. Abdelmageed, S.M. Derayea, M.A. Omar, A.M. Abdel-Megied, Chiral separation of perindopril erbumine enantiomers using high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis, *Anal. Methods* 6 (2014) 825-830.
- [134] L.P. Lourenço, F.A. Aguiar, A.R. Moraes de Oliveira, C. Masetto de Gaitani, Quantitative determination of lercanidipine enantiomers in comercial formulations by capillary electrophoresis, *J. Anal. Methods Chem.* 2015 (2015) 1-9.
- [135] G. Hancu, M. Budau, L.K. Kántor, A. Cârje, Cyclodextrine screening for the chiral separation of amlodipine enantiomers by capillary electrophoresis, *Adv. Pharm. Bull.* 5 (2015) 35-40.

- [136] S. Nojavan, S. Pourmoslemi, H. Behdad, A.R. Fakhari, A. Mohammadi, Application of maltodextrin as chiral selector in capillary electrophoresis for quantification of amlodipine enantiomers in commercial tablets, *Chirality* 26 (2014) 394-399.
- [137] F.A. Aguiar, C.M. de Gaitani, K.B. Borges, Capillary electrophoresis method for the determination of isradipine enantiomers: Stability studies and pharmaceutical formulation analysis, *Electrophoresis* 32 (2011) 2673-2682.
- [138] G. Hancu, M. Budau, L.A. Papp, A. Rusu, E. Mircia, Chiral separation of cetirizine enantiomers by cyclodextrin mediated capillary electrophoresis, *Indonesian J. Pharm.* 25 (2014) 223-229.
- [139] X. Deng, B. de Cock, R. Vervoort, D. Pamperin, E. Adams, A. Van Schepdael, Development of a validated capillary electrophoresis method for enantiomeric purity control and quality control of levocetirizine in a pharmaceutical formulation, *Chirality* 24 (2012) 276-282.
- [140] K. Phattiyaphaibun, W. Som-Aum, M. Srisa-ard, J. Threeprom, Chiral separation of pheniramine by capillary electrophoresis partial-filling technique using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selector, *J. Anal. Chem.* 65 (2010) 803-808.
- [141] J. Zhang, Y. Du, Q. Zhang, Y. Lei, Evaluation of vancomycin-based synergistic system with amino acid ester chiral ionic liquids as additives for enantioseparation of non-steroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis, *Talanta* 119 (2014) 193-201.

- [142] L. Song, Z. Guo, Y. Chen, Separation and determination of chiral composition in penicillamine tablets by capillary electrophoresis in a broad pH range, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2056-2063.
- [143] Z.I. Szabó, R. Gál, L. Szocs, R. Ludmercszki, D.L. Muntean, B. Noszál, G. Tóth, Validated capillary electrophoretic method for the enantiomeric quality control of *R*-praziquantel, *Electrophoresis* 38 (2017) 1886-1894.
- [144] P.L. Yu, Y.Y. Tu, M.M. Hsieh, Combination of poly(diallyldimethylammonium chloride) and hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin for high-speed enantioseparation of phenothiazines by capillary electrophoresis, *Talanta* 13 (2015) 330-334.
- [145] W.B. Tseng, M.M. Hsieh, T.C. Chiu, P.L. Yu, S.H. Chen, Enantioseparation of phenothiazines through capillary electrophoresis with solid phase extraction and polymer based stacking, *J. Food Drug Anal.* 26 (2018) 1171-1179.
- [146] J. Zhou, H. Yao, H. Shao, Y. Li, Z. Zhang, Enantioseparation of  $\beta$ -agonists with carboxymethyl- $\beta$ -cyclodextrin by CE, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 35 (2012) 50-58.
- [147] L. Zuo, Y. Zhao, F. Ji, M. Zhao, Z. Jiang, T. Sun, X. Guo, Determination of the enantiomeric and diastereomeric impurities of *RS*-glycopyrrolate by capillary electrophoresis using sulfated- $\beta$ -cyclodextrin as chiral selectors, *Electrophoresis* 35 (2014) 3339-3344.
- [148] Y. Liu, H. Yu, H. Zhang, L. Yu, W. Xu, Use of various  $\beta$ -cyclodextrin derivatives as chiral selectors for the enantiomeric separation of higenamine by capillary electrophoresis, *Microchem. J.* 134 (2017) 289-294.

- [149] X. Cui, C. Liang, F. Gong, R. Wang, C. Ni, Y. Wu, G. Chen, Y. Zhang, Simultaneous chiral analysis of amphetamine-type stimulants and ephedrine by capillary electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Chirality* 30 (2018) 1079-1087.
- [150] T. Baciú, F. Borull, M. Calull, C. Aguilar, Enantioselective determination of cathinone derivatives in human hair by capillary electrophoresis combined in-line with solid-phase extraction, *Electrophoresis* 37 (2016) 2352-2362.
- [151] L. Meng, B. Wang, F. Luo, G. Shen, Z. Wang, M. Guo, Application of dispersive liquid-liquid microextraction and CE with UV detection for the chiral separation and determination of the multiple illicit drugs on forensic samples, *Forensic Sci. Int.* 209 (2011) 42-47.
- [152] G. Merola, H. Fu, F. Tagliaro, T. Macchia, B.R. McCord, Chiral separation of 12 cathinone analogs by cyclodextrin-assisted capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection, *Electrophoresis* 35 (2014) 3231-3241.
- [153] R. Theurillat, W. Thormann, Monitoring of *threo*-methylphenidate enantiomers in oral fluid by capillary electrophoresis with head-column field-amplified sample injection, *Electrophoresis* 35 (2014) 986-992.
- [154] S. Hamidi, M. Khoubnasabjafari, K. Ansarin, V. Jouyban-Gharamaleki, A. Jouyban, Chiral separation of methadone in exhaled breath condensate using capillary electrophoresis, *Anal. Methods* 9 (2017) 2342-2350.
- [155] B. Wang, J. He, S.A. Shamsi, A high-throughput multivariate optimization for the simultaneous enantioseparation and detection of barbiturates in micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry (MEKC-MS), *J. Chromatogr. Sci.* 48 (2010) 572-583.

- [156] M.A. Tonon, P.S. Bonato, Capillary electrophoretic enantioselective determination of zopiclone and its impurities, *Electrophoresis* 33 (2012) 1606-1612.
- [157] A.B. Martínez-Girón, M.L. Marina, A.L. Crego, Chiral separation of a basic drug with two chiral centers by electrokinetic chromatography for its pharmaceutical development, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 427-435.
- [158] O. Wahl, U. Holzgrabe, Evaluation of enantiomeric purity of magnesium-L-aspartate dehydrate, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 102 (2015) 100-109.
- [159] D.A. Tsioupi, I.N. Nicolau, L. Moore, C.P. Kapnissi-Christodoulou, Chiral separation of Huperzine A using CE - Method validation and application in pharmaceutical formulations, *Electrophoresis* 33 (2012) 516-522.
- [160] M. Castro-Puyana, I. Lammers, J. Buijs, C. Gooijer, F. Ariese, Quenched phosphorescence as alternative detection mode in the chiral separation of methotrexate by electrokinetic chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2913-2919.
- [161] I. Fejos, Z. Urbancsok, W. Zhou, T. Sohajda, W. Hu, L. Szenté, S. Béni, Separation of aligliptin enantiomers in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis: A validated method, *Electrophoresis* 35 (2014) 2885-2891.
- [162] C. Li, Y. Jiang, Analysis of repaglinide enantiomers in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis using 2,6-di-O-metil- $\beta$ -cyclodextrin as a chiral selector, *J. Chromatogr. Sci.* 50 (2012) 739-743.

- [163] A. Kazsoki, I. Fejos, T. Sohajda, W. Zhou, W. Hu, L. Szente, S. Béni, Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers, *Electrophoresis* 37 (2016) 1318-1325.
- [164] G. Hancu, L.A. Papp, A. Rusu, Chiral separation of the enantiomers of omeprazole and pantoprazole by capillary electrophoresis, *Chromatographia* 78 (2015) 279-284.
- [165] P. Estevez, S. Flor, O. Boscolo, V. Tripodi, S. Lucangioli, Development and validation of a capillary electrophoresis method for determination of enantiomeric purity and related substances of esomeprazole in raw material and pellets, *Electrophoresis* 35 (2014) 804-810.
- [166] J. Guan, F. Yan, S. Shi, S. Wang, Optimization and validation of a new CE method for the determination of pantoprazole enantiomers, *Electrophoresis* 33 (2012) 1631-1636.
- [167] S.S. Bawazeer, A.M. Abdel-Megied, L.I. Bebawy, Enantiospecific HPLC and CE methods for separation and determination of *S*-darifenacin in pharmaceutical formulations, *Chromatographia* 79 (2016) 1533-1542.
- [168] B. Pasquini, S. Orlandini, M. Villar-Navarro, C. Caprini, M. Del Bubba, M. Dousa, A. Giuffrida, R. Gotti, S. Furlanetto, Chiral capillary zone electrophoresis in enantioseparation and analysis of cinacalcet impurities: Use of quality by design principles in method development, *J. Chromatogr. A* 1568 (2018) 205-213.
- [169] P. Ginterová, J. Znaleziona, R. Knob, M. Dousa, J. Petr, J. Sevcik, Enantiomeric purity control of *R*-cinacalcet in pharmaceutical product by capillary electrophoresis, *Chem. Pap.* 70 (2016) 1024-1030.

- [170] M. Khan, K.V.S.R.K. Reddy, P.K. Dubey, B.M. Rao, Development and validation of a capillary electrophoresis method for determining zolmitriptan enantiomers, *Anal. Chem. Indian J.* 10 (2011) 676-682.
- [171] Y.J. Lee, S. Choi, J. Lee, N.T. Nguyen, K. Lee, J.S. Kang, W. Mar, K.H. Kim, Chiral discrimination of sibutramine enantiomers by capillary electrophoresis and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Arch. Pharm. Res.* 35 (2012) 671-681.
- [172] X. Deng, X. Hai, R. Vervoort, D. Pamperin, E. Adams, A. Van Schepdael, Development and validation of a chiral capillary electrophoresis method for assay and enantiomeric purity control of pramipexole, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3070-3076.
- [173] A.F. Prokhorova, V.A. Larin, A.N. Mikhalyuk, S.M. Staroverov, E.N. Shapovalova, O.A. Shpigun, Enantioseparation of organic acids of pharmaceutical interest using ermomycin as a chiral selector, *Electrophoresis* 32 (2011) 2663-2668.
- [174] B.L. Chu, B.Y. Guo, Z. Peng, Z. Wang, G. Guo, J.M. Lin, Studies on degradation of imazalil enantiomers in soil using capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 923-929.
- [175] A.W. Garrison, P. Schmitt, D. Martens, A. Kettrup, Enantiomeric selectivity in the environmental degradation of dichlorprop as determined by high-performance capillary electrophoresis, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2449-2455.
- [176] C. Klein, R.J. Schneider, M.T. Meyer, D.S. Aga, Enantiomeric separation of metolachlor and its metabolites using LC-MS and CZE, *Chemosphere* 62 (2006) 1591-1599.

- [177] A. Messina, M. Sinibaldi, CEC enantioseparations on chiral monolithic columns: A study of the stereoselective degradation of (*R/S*)-dichlorprop [2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid] in soil, *Electrophoresis* 28 (2007) 2613-2618.
- [178] D.L. Lewis, A.W. Garrison, K.E. Wommack, A. Whittemore, P. Steudler, J. Melillo, Influence of environmental changes on degradation of chiral pollutants in soils, *Nature* 401 (1999) 898-901.
- [179] J.L. Jarman, W.J. Jones, L.A. Howell, A.W. Garrison, Application of capillary electrophoresis to study the enantioselective transformation of five chiral pesticides in aerobic soil slurries, *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005) 6175-6182.
- [180] Y.S. Wu, H.K. Lee, S.F.Y. Li, Simultaneous chiral separation of triadimefon and triadimenol by sulphated- $\beta$ -cyclodextrin-mediated capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 21 (2000) 1611-1619.
- [181] L. Huang, J. Lin, L. Xu, G. Chen, Nonaqueous and aqueous-organic media for the enantiomeric separations of neutral organophosphorus pesticides by CE, *Electrophoresis* 28 (2007) 2758-2764.
- [182] V. Pérez-Fernández, E. Domínguez-Vega, B. Chankvetadze, A.L. Crego, M.A. García, M.L. Marina, Evaluation of new cellulosa-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1234 (2012) 22-31.
- [183] M. Silva, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, M.L. Marina, I. Sierra, Preconcentration of  $\beta$ -blockers using functionalized ordered mesoporous silica as sorbent for SPE and their determination in waters by chiral CE, *Electrophoresis* 38 (2017) 1905-1912.



- [184] J. Petr, P. Ginterová, J. Znaleziona, R. Knob, M. Lostakova, V. Maier, J. Sevcik, Separation of ketoprofen enantiomers at nanomolar concentration levels by micellar electrokinetic chromatography with on-line electrokinetic preconcentration, *Cent. Eur. J. Chem.* 11 (2013) 335-340.
- [185] A.W. Garrison, J.K. Avants, R.D. Miller, Loss of propiconazole and its four stereoisomers from the water phase of two soil-water slurries as measured by capillary electrophoresis, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8 (2011) 3453-3467.
- [186] V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina, Chiral separation of metalaxyl and benalaxyl fungicides by electrokinetic chromatography and determination of enantiomeric impurities, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4877-4885.
- [187] T. Asami, H. Imura, Absolute determination method for trace quantities of enantiomer of glufosinate by  $\gamma$ -cyclodextrin modified capillary zone electrophoresis combined with solid-phase extraction and on-capillary concentration, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1489-1493.
- [188] C. Desiderio, C.M. Polcaro, P. Padiglioni, S. Fanali, Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 503-513.
- [189] Y.Z. Hsieh, H.Y. Huang, Analysis of chlorophenoxy acid herbicides by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 745 (1996) 217-223.
- [190] V. Pérez-Fernández, M.A. García, M.L. Marina, Enantiomeric separation of *cis*-bifenthrin by CD-MEKC: Quantitative analysis in a commercial insecticide formulation, *Electrophoresis* 31 (2010) 1533-1539.

- [191] M.A. García, N. Menéndez-López, K. Boltes, M.L. Marina, A capillary micellar electrokinetic chromatography method for the stereoselective quantitation of bioallethrin in biotic and abiotic samples, *J. Chromatogr. A* 1510 (2017) 108-116.
- [192] C. García-Ruíz, G. Álvarez-Llamas, A. Puerta, E. Blanco, A. Sanz-Medel, M.L. Marina, Enantiomeric separation of organophosphorus pesticides by capillary electrophoresis. Application to the determination of malathion in water samples after preconcentration by off-line solid-phase extraction, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 77-83.
- [193] M. Lecoeur-Lorin, R. Delépée, P. Morin, Simultaneous enantioselective determination of fenamiphos and its two metabolites in soil sample by CE, *Electrophoresis* 30 (2009) 2931-2939.
- [194] A.W. Garrison, P. Schmitt-Kopplin, J.K. Avants, Analysis of the enantiomers of chiral pesticides and other pollutants in environmental samples by capillary electrophoresis, *Methods Mol. Biol.* 384 (2008) 157-170.
- [195] D. Shea, K.V. Penmetsa, R.B. Leidy, Enantiomeric and isomeric separation of pesticides by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1550-1561.
- [196] H. Sanderson, D.J. Johnson, C.J. Wilson, R.A. Brain, K.R. Solomon, Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening, *Toxicol. Lett.* 144 (2003) 383-395.

- [197] K. Sing, D. Everett, R. Haul, L. Moscou, R. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity, *Pure Appl. Chem.* 57 (1985) 603-619.
- [198] P.N.E. Diagboya, E.D. Dikio, Silica-based mesoporous materials; emerging designer adsorbents for aqueous pollutants removal and water treatment, *Microporous Mesoporous Mater.* 266 (2018) 252-267.
- [199] I. Sierra, D. Pérez-Quintanilla, Heavy metal complexation on hybrid mesoporous silicas: An approach to analytical applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3792-3807.
- [200] C.T. Kresge, W.J. Roth, The discovery of mesoporous molecular sieves from the twenty year perspective, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 3663-3670.
- [201] L. Zhao, H. Qin, R. Wu, H. Zou, Recent advances of mesoporous materials in sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 193-204.
- [202] C.T. Kresge, M.E. Leonowicz, W.J. Roth, J.C. Vartuli, J.S. Beck, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism, *Nature* 359 (1992) 710-712.
- [203] F. Di Renzo, H. Cambon, R. Dutartre, A 20-year-old synthesis of micelle templated mesoporous silica, *Microporous Mater.* 10 (1997) 283-286.
- [204] D.A. Loy, K.J. Shea, Bridged polysilsesquioxanes. Highly porous organic-inorganic materials, *Chem. Rev.* 95 (1995) 1431-1442.

- [205] V.K. Tomer, S. Devi, R. Malik, S. Duhan, Mesoporous materials and their nanocomposites, in: P.M. Visakh, M.J. Martínez Morlanes (Eds.), *Nanomaterials and nanocomposites: Zero- to three- dimensional materials and their composites*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), 2016.
- [206] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, Silica-based mesoporous organic-inorganic hybrid materials, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 3216-3251.
- [207] S. Kumar, M.M. Malik, R. Purohit, Synthesis methods of mesoporous silica materials, *Mater. Today* 4 (2017) 350-357.
- [208] G. Cerveau, R.J.P. Corriu, C. Fischmeister-Lepeytre, Influence of kinetic parameters on the textural and chemical properties of silsesquioxane materials obtained by sol-gel process, *J. Mater. Chem.* 9 (1999) 1149-1154.
- [209] D.J. Macquarrie, Direct preparation of organically modified MCM-type materials. Preparation and characterisation of aminopropyl-MCM and 2-cyanoethyl-MCM, *Chem. Commun.* 0 (1996) 1961-1962.
- [210] T. Asefa, M. Kruk, M.J. MacLachlan, N. Coombs, H. Grondy, M. Jaroniec, G.A. Ozin, Novel bifunctional periodic mesoporous organosilicas, BPMOs: Synthesis, characterization, properties and in-situ selective hydroboration-alcoholysis reactions of functional groups, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 8520-8530.
- [211] A. Stein, B.J. Melde, R.C. Schroden, Hybrid inorganic-organic mesoporous silicates-nanoscopic reactors coming of age, *Adv. Mater.* 12 (2000) 1403-1419.
- [212] A. Sayari, S. Hamoudi, Periodic mesoporous silica-based organic-inorganic nanocomposite materials, *Chem. Mater.* 13 (2001) 3151-3168.

- [213] S.S. Park, M.S. Moorthy, C.S. Ha, Periodic mesoporous organosilica (PMO) for catalytic applications, *Korean J. Chem. Eng.* 31 (2014) 1707-1719.
- [214] I. Sierra, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante, J. Gañán, Novel supports in chiral stationary phase development for liquid chromatography. Preparation, characterization and application of ordered mesoporous silica particles, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 27-40.
- [215] A. Walcarius, Impact of mesoporous silica-based materials on electrochemistry and feedback from electrochemical science to the characterization of these ordered materials, *C. R. Chim.* 8 (2005) 693-712.
- [216] A. Mehdi, C. Reye, R. Corriu, From molecular chemistry to hybrid nanomaterials. Design and functionalization, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 563-574.
- [217] F. Hoffmann, M. Fröba, Vitalising porous inorganic silica networks with organic functions-PMOs and related hybrid materials, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 608-620.
- [218] J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, Chemistry of zirconia and its use in chromatography, *J. Chromatogr. A* 657 (1993) 229-282.
- [219] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, Mesoporous materials for drug delivery, *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 (2007) 7548-7558.
- [220] H. Yu, Q.Z. Zhai, Mesoporous SBA-15 molecular sieve as a carrier for controlled release of nimodipine, *Microporous Mesoporous Mater.* 123 (2009) 298-305.

- [221] D. Halamová, M. Badanicová, V. Zelenák, T. Gondová, U. Vainio, Naproxen drug delivery using periodic mesoporous silica SBA-15, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6489-6494.
- [222] N. Mizoshita, T. Tani, S. Inagaki, Syntheses, properties and applications of periodic mesoporous organosilicas prepared from bridged organosilane precursors, *Chem. Soc. Rev.* 40 (2011) 789-800.
- [223] S.L. Suib, A review of recent developments of mesoporous materials, *Chem. Rec.* 17 (2017) 1169-1183.
- [224] S.K. Das, M.K. Bhunia, A. Bhaumik, Highly ordered Ti-SBA-15: Efficient H<sub>2</sub> adsorbent and photocatalyst for eco-toxic dye degradation, *J. Solid State Chem.* 183 (2010) 1326-1333.
- [225] A. Taguchi, F. Schüth, Ordered mesoporous materials in catalysis, *Microporous Mesoporous Mater.* 77 (2005) 1-45.
- [226] V.F. Cheong, P.Y. Moh, Recent advancement in metal-organic framework: Synthesis, activation, functionalisation, and bulk production, *Mater. Sci. Technol.* 34 (2018) 1025-1045.
- [227] P. Kumar, V.V. Guliants, Periodic mesoporous organic-inorganic hybrid materials: Applications in membrane separations and adsorption, *Microporous Mesoporous Mater.* 132 (2010) 1-14.
- [228] A. Carpio, D. Esquivel, L. Arce, F.J. Romero-Salguero, P. Van der Voort, C. Jiménez-Sanchidrián, M. Valcárcel, Evaluation of phenylene-bridged periodic mesoporous organosilica as a stationary phase for solid phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1370 (2014) 25-32.

- [229] N. Casado, S. Morante-Zarcelero, D. Pérez-Quintanilla, I. Sierra, Evaluation of mesostructured silicas with wormhole-like framework functionalized with hydrophobic groups as alternative sorbents for extraction of drug residues from food samples, *Mater. Lett.* 220 (2018) 165-168.
- [230] B.J. Johnson, I.A. Leska, B.J. Melde, R.L. Siefert, A.P. Malanoski, M.H. Moore, J.R. Taft, J.R. Deschamps, Extraction of perchlorate using porous organosilicate materials, *Materials* 6 (2013) 1403-1419.
- [231] J.E. Lofgreen, I.L. Moudrakovski, G.A. Ozin, Molecularly imprinted mesoporous organosilica, *ACS Nano* 5 (2011) 2277-2287.
- [232] B.J. Johnson, B.J. Melde, P.T. Charles, M.A. Dinderman, A.P. Malanoski, I.A. Leska, S.B. Qadri, Macroporous silica for concentration of nitroenergetic targets, *Talanta* 81 (2010) 1454-1460.
- [233] L.Y. Xia, Y.C. Hu, M.Z. Rong, Y.J. Liang, Preparation of bifunctionalized phenylene-bridged periodic mesoporous organosilica for solid-phase microextraction, *RSC Adv.* 4 (2014) 168-174.
- [234] M.M. Abolghasemi, B. Karimi, V. Yousefi, Periodic mesoporous organosilica with ionic liquid framework as a novel fiber coating for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 280-286.
- [235] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27-55.

- [236] T.C. Chou, Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Reviews* 58 (2006) 621-681.
- [237] I. Manfred Rosner, H-G. Capraro, A.E. Jacobson, L. Atwell, A. Brossi, Biological effects of modified colchicines. Improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, an(+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines, *J. Med. Chem.* 24 (1981) 257-261.
- [238] T. Graening, H.G. Schmalz, Total syntheses of colchicine in comparison: A journey through 50 years of synthetic organic chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 3230-3256.
- [239] S. Verma, J.W. Eikelboom, S.M. Nidorf, M. Al-Omran, N. Gupta, H. Teoh, O.J. Friedrich, Colchicine in cardiac disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *BMC Cardiovasc. Disord.* 15 (2015) 1-15.
- [240] M. Ebadi, *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, 2<sup>nd</sup> Edition, CRC Press-Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, 2007.
- [241] R. Bhushan, I. Ali, Resolution of racemic mixtures of hyoscyamine and colchicine on impregnated silica-gel layers, *Chromatographia* 35 (1993) 679-680.
- [242] K. Lomsadze, A. B. Martínez-Girón, M. Castro-Puyana, L. Chankvetadze, A. L. Crego, A. Salgado, M. L. Marina, B. Chankvetadze, About the role of enantioselective selector-selectand interactions and the mobilities of diastereomeric associates in enantiomer separations using capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 30 (2009) 2803-2811.



- [243] X. Wang, Y. Sun, K. Sun, Y. Ding, R. Yuan, Separation and pharmacology of chiral compounds in traditional chinese medicine, *Anal. Lett.* 50 (2017) 33-49.
- [244] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerda, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 641-654.
- [245] A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerda, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part II). *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 655-667.
- [246] D. Esquivel, E. De Canck, C. Jiménez-Sanchidrián, F.J. Romero-Salguero, P. Van der Voort, Pyrrole PMOs incorporating new N-heterocyclic compounds on an ethene-PMO through Diels-Alder reactions, *Mater. Chem. Phys.* 148 (2014) 403-410.
- [247] M. Imamoglu, D. Pérez-Quintanilla, I. Sierra, Bifunctional periodic mesoporous organosilicas with sulfide bridges as effective sorbents for Hg(II) extraction from environmental and drinking waters, *Microporous Mesoporous Mater.* 229 (2016) 90-97.
- [248] C. Sanchez, F. Jeremias, S. Ernst, S.K. Henninger, Synthesis, functionalization and evaluation of ethylene-bridged PMOs as adsorbents for sorption dehumidification and cooling systems, *Microporous Mesoporous Mater.* 244 (2017) 151-157.
- [249] M.A. Wahab, J.N. Beltramini, Recent advances in hybrid periodic mesostructured organosilica materials: Opportunities from fundamental to biomedical applications, *Rsc Adv.* 5 (2015) 79129-79151.

- [250] M. Gao, S. Han, Y. Hu, L. Zhang, Enhanced fluorescence in tetraylnitrilomethylidyne-hexaphenyl derivative-functionalized periodic mesoporous organosilicas for sensitive detection of copper(II), *J. Phys. Chem. C* 120 (2016) 9299-9307.
- [251] Y. Wei, X. Li, R. Zhang, Y. Liu, W. Wang, Y. Ling, A.M. El-Toni, D. Zhao, Periodic mesoporous organosilica nanocubes with ultrahigh surface areas for efficient CO<sub>2</sub> adsorption, *Sci. Rep.* 6 (2016) 20769.
- [252] D. Esquivel, C. Jiménez-Sanchidrian, F.J. Romero-Salguero, Thermal behaviour, sulfonation and catalytic activity of phenylene-bridged periodic mesoporous organosilicas, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 724-733.
- [253] N. Casado, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Current development and applications of ordered mesoporous silicas and other sol-gel silica-based materials in food simple preparation for xenobiotics analysis, *TrAC* 88 (2017) 167-184.
- [254] J. Gañán, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcelero, I. Sierra, Comparison of different mesoporous silicas for off-line solid phase extraction 17 $\beta$ -estradiol from waters and its determination by HPLC-DAD, *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 609-617.
- [255] V. Gascón, I. Díaz, R.M. Blanco, C. Márquez-Álvarez, Hybrid periodic mesoporous organosilica designed to improve the properties of immobilized enzymes, *RSC Adv*, 4 (2014) 34356.
- [256] J.M. Saz, M.L. Marina, Recent advances on the use of cyclodextrins in the chiral analysis of drugs by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1467 (2016) 79-94.

- [257] M.P. Kapoor, S. Inagaki, Synthesis of phenylene bridged mesoporous silsesquioxanes with spherical morphology in ammonia solution, *Chem. Lett.* 33 (2004) 88-89.
- [258] S. Inagaki, S. Guan, Y. Fukushima, T. Ohsuna, O. Terasaki, Novel mesoporous materials with a uniform distribution of organic groups and inorganic oxide in their frameworks, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9611-9614.
- [259] S.A. Bagshaw, E. Prouzet, T.J. Pinnavaia, Templating of mesoporous molecular sieves by non-ionic polyethylene oxide surfactants, *Science* 269 (1995) 1242-1244.
- [260] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 6024-6036.
- [261] Fármacos en el medio ambiente - La perspectiva global. Incidencia, efectos y acción cooperativa potencial bajo el SAICM.  
[https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/farmacos\\_en\\_el\\_medio\\_ambiente.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/378/publikationen/farmacos_en_el_medio_ambiente.pdf) (acceso el 23 de Enero de 2019).
- [262] L. Minguez, J. Pedelucq, E. Farcy, C. Ballandonne, H. Budzinski, M.P. Halm-Lemeille, Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (2016) 4992-5001.

- [263] R. Baudo, M. Foudoulakis, G. Arapis, K. Perdaen, W. Lanneau, A.C.M. Paxinou, S. Kouvdou, G. Persoone, History and sensitivity comparison of the *Spirodela polyrhiza* microbiotest and *Lemna* toxicity tests, *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 416 (2015) 23.
- [264] *Daphnia magna*. [http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia\\_magna/](http://animaldiversity.org/accounts/Daphnia_magna/) (acceso el 23 de Enero de 2019).
- [265] R.J. Paul, M. Colmorgen, S. Hüller, F. Tyroller, D. Zinkler, Circulation and respiratory control in millimetre-sized animals (*Daphnia magna*, *Folsomia candida*) studied by optical methods, *J. Comp. Physiol. B* 167 (1997) 399-408.
- [266] M. Colmorgen, R.J. Paul, Imaging of physiological functions in transparent animals (*Agonus cataphractus*, *Daphnia magna*, *Pholcus phalangioides*) by video microscopy and digital image processing, *Comp. Biochem. Physiol.* 111 (1995) 583-595.
- [267] J.K. Stanley, A.J. Ramirez, M. Mottaleb, C.K. Chambliss, B.W. Brooks, Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 1780-1786.
- [268] Duloxetine. <https://www.medicinenet.com/duloxetine/article.htm> 1996. (acceso el 23 de Enero de 2019).
- [269] D.T. Wong, F.P. Bymaster, D.A. Mayle, L.R. Reid, J.H. Krushinski, D.W. Robertson, LY248686, a new inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake, *Neuropsychopharmacology* 8 (1993) 23-33.

[270] R.C. Heel, R.N. Brodgen, T.M. Speight, G.S. Avery, Econazole: A review of its antifungal activity and therapeutic efficacy, *Drugs* 16 (1978) 177-201.

[271] R. Furuta, T. Doi, Chiral separation of diniconazole, uniconazole and structurally related compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *Electrophoresis* 15 (1994) 1322-1325.

[272] R.H. Lindberg, J. Fick, M. Tysklind, Screening of antimycotics in Swedish sewage treatment plants - Waters and sludge, *Water Res.* 44 (2010) 649-657.

[273] J. Jean, Y. Perrodin, C. Pivot, D. Trepo, M. Perraud, J. Droguet, F. Tissot-Guerraz, F. Locher, Identification and prioritization of bioaccumulable pharmaceutical substances discharged in hospital effluents, *J. Environ. Manage.* 103 (2012) 113-121.

[274] Directive 1272/2008 of European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EC and 1999/45/EC, and amending regulation (EC) No 1907/2006, 353 (2008) 1-1355.

[275] L. Mínguez, R. Bureau, M. P. Halm-Lemeille, Joint effects of nine antidepressants on *Raphydocolis subcapitata* and *Skeletonema marinoi*: A matter of amine functional groups, *Aquatic Toxicol.* 196 (2018) 117-123.

[276] J. Villain, L. Mínguez, M. P. Halm-Lemeille, G. Durrieu, R. Bureau, Acute toxicities of pharmaceuticals toward green algae, mode of action, biopharmaceutical drug disposition classification system and quantile regression models, *Ecotoxicol. Environm. Saf.* 124 (2016) 337-343.