



Anàlisi de biomarcadors neuropeptídics en fluids biològics per SPE-CE-MS

Sílvia Medina Casanellas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Universitat de Barcelona

FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de Doctorat:
Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

**Anàlisi de biomarcadors neuropeptídics en fluids biològics per
SPE-CE-MS**

Memòria presentada per
Sílvia Medina Casanellas
per a optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de
Dra. Victòria Sanz Nebot
Dr. Fernando J. Benavente Moreno
del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

La Dra. Victòria Sanz Nebot, professora titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i el Dr. Fernando J. Benavente Moreno, professor agregat del mateix Departament,

FAN CONSTAR

Que la present memòria titulada: **“Anàlisi de biomarcadors neuropeptídics en fluids biològics per SPE-CE-MS”**, ha estat realitzada sota la nostra direcció per la Sra. Sílvia Medina Casanellas i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades per la citada doctoranda.

I per a que així consti, expedim el present certificat.

Barcelona, Setembre 2013

Dra. Victòria Sanz Nebot

Dr. Fernando J. Benavente Moreno

“Tot està per fer i tot és possible”

“Everything is to be done and everything is possible”

Miquel Martí i Pol

Als meus

MOLTES GRÀCIES! Com no podia ser d'una altra manera, vull començar aquesta memòria donant les gràcies a totes aquelles persones que al llarg d'aquests anys m'han ajudat a superar aquest repte, perquè sense cadascun de vosaltres hauria estat impossible. Us ho agraeixo de tot cor!

En primer lloc voldria donar les gràcies als meus directors de tesi, la Dra. Victòria Sanz i el Dr. Fernando Benavente. Vicki, moltes gràcies per guiar-me en aquest camí, per animar-me a aprofitar totes les oportunitats que ens hem anat trobant i per aportar el teu punt de vista intentant mantenir la meva essència. A ti Fernando, millones de gracias por estar al pie del cañón cada día, incluso desde la distancia. Gracias por aportar un sinfin de ideas, por intentar mejorar nuestros trabajos siempre un poco más y por darme esos empujones tan necesarios para superar las malas rachas o para iniciar nuevos proyectos. Juntos formáis un gran equipo y hacéis posible que los nuevos químicos seamos mejores investigadores. Gracias por transmitirme vuestro entusiasmo por el mundo de la investigación.

También, querría agradecer al Dr. José Barbosa la confianza que depositó en mí al “*ficharme*” para formar parte de su grupo de investigación y más aún después de saber que compartimos los mismos colores futbolísticos.

Als companys i companyes del laboratori, gràcies per estar sempre disposats a donar-me un cop de mà per a superar els petits entrebancs diaris i així poder avançar en la nostra recerca. A la Pili i l'Estela, gràcies per compartir amb mi les vostres experiències científiques i personals i per aconsellar-me sempre que ho he necessitat. A les meves amigues, més que companyes, Raquel, Marta i Lorena moltíssimes gràcies per tots els bons moments que hem viscut i espero que, tot i que la vida ens porti per camins diferents, sapiguem retrobar-nos sovint. Raquel, gràcies per ser tan atenta, per ensenyar-me un punt de vista més positiu, pel teu afecte i pels teus ànims, especialment quan he estat lluny dels meus. Mai oblidaré la teva visita per terres holandeses, gràcies! Marta, gracias por acompañarme en este largo viaje. Has sido una gran compañera y amiga, siempre dispuesta a arrimar el hombro aunque eso supusiera hacer un esfuerzo extra, ¡sin olvidar que sin ti esto no hubiera sido ni la mitad de divertido! Lorena, ¡nuestra “*manitas*” del laboratorio! Gracias por tu ayuda, por nuestras sesiones de culebrones y por reírnos tanto de todo. ¡Ah, y por enseñarme a controlar esas persianas rebeldes! A nuestro chico tímido de BioA, Albert, gracias por darme tu opinión sobre mis “*debates científicos*”

y por ayudarme a solucionar las últimas locuras del *Word* para que todo estuviera a mi gusto. Laura y Elena, por animarme y ayudarme a desconectar, sobre todo con esas partidas de uno. Marcos, ¡qué bueno que viniste! Gracias por enseñarnos las excepciones más remotas del diccionario y ya sabes, ¡hasta pronto! Sandra, molta sort en el que et proposis! Y Sergio, tengo que reconocer que siendo un “*chulín*” me sorprendió tu predisposición a ayudarnos en cualquier momento. ¡Gracias por todas esas risas! También, quiero agradecer el compañerismo y el buen ambiente que han creado todas las personas que en algún momento han formado parte de este grupo de investigación: Míriam, Edyta, Ghiuli, Dilara, Rafa, Pedro, Rami, Leyre, Carles, Ana, Sara... Siempre guardaré buenos recuerdos de todos vosotros porque como dice un proverbio africano: “*las huellas de las personas que caminaron juntas nunca se borran*”. I will always keep good memories of all of you because as an African proverb says: “*the footsteps of people walking together will never fade*”. I vull estendre aquests agraiments a tots els companys del Departament de Química Analítica, professors, estudiants i personal de secretaria perquè fins i tot aquelles tasques que de vegades passen desapercebudes també han estat importants pel desenvolupament d'aquesta tesi doctoral. Gràcies!

Gràcies al grup de Quimiometria per la seva amabilitat, ja que m'han permès utilitzar l'espectrofotòmetre i la centrífuga que m'han facilitat el desenvolupament de part del treball experimental. També, vull donar les gràcies a Irene Fernández i Laura Ortiz del Laboratori d'Espectrometria de Masses de la Universitat de Barcelona per la seva ajuda en les anàlisis per MALDI-TOF-MS.

I would like to thank Prof. Gerhardus J. de Jong and Prof. Govert W. Somsen for giving me the opportunity of working in their laboratory and for their kindness and help during my stay in Utrecht. Thanks also to Javier for his valuable help, scientific advice and Dutch translations. I would also like to thank all the members of their research group: Yvonne, Miranda, Rob, Sergio, Bregje, Frits, Michiel, Johan, Sergio, Marta, Ilona, Elena, David and Amir for their hospitality and for making my stay enjoyable. I have good memories of coffee times, “*borrels*”, weather and football discussions and farewell dinner. “*Dank u wel!*”

Frank and Mees, I will never forget your warmth, friendliness and hospitality. I hope that someday we will be able to meet again. “*Bedankt voor alle!*” Y gracias a mis

compañeros de aventura: David, Cristina, Amir y Fernando. Muchísimas gracias por vuestra amistad y vuestro apoyo. ¡Formamos un grupo “*majísimo*”!

También quiero agradecer, y al mismo tiempo felicitar, a Bea Schulze por el diseño de la portada de esta memoria. Gracias porque sin conocerme personalmente no dudaste en prestarme tu ayuda desinteresada y además, acertaste con el estilo que me gusta.

A les meves amigues: Sílvia, Ester i Míriam, moltíssimes gràcies per estar sempre al meu costat, per la infinitat de bons moments que hem viscut i viurem i per ajudar-me a empetitir els no tan bons. Realment, em sento molt afortunada de tenir-vos com a amigues! Marta, mi amiga de batalla, gracias por contagiarme tu entusiasmo y optimismo. ¡Me has enseñado que una sonrisa es la mejor defensa! Miguel y Eli, gracias porque nuestras cenas siempre ayudan a dejar de lado los problemas por unos instantes. Tant de bo que junts veiem tots els nostres somnis fets realitat!

Gràcies Mercè, Quim, Joan i Anna per entendre la meva absència aquests últims mesos tan importants, pel vostre suport i sobretot per ajudar-me a *parar-li els peus* a l'Albert de tan en tan.

Per acabar, vull agrair molt especialment i dedicar aquesta tesi a la meva família. Als meus pares, mai us podré agrair tot el que heu fet i fareu per a mi. Gràcies per donar-me la oportunitat d'arribar fins aquí, per fer-me costat i per creure en mi més que jo mateixa. Al meu germà, Cristian, moltes gràcies per valorar-me tant i per saber fer-nos somriure els dies més difícils. També, vull tenir un record especial pels meus avis, perquè sé com gaudiríeu d'un dia com avui. I a tu, *vida*, milers de gràcies per arribar on jo no hi arribo, per donar-me forces quan me'n falten, per encoratjar-me i per fer dels meus somnis, els nostres i d'un *res*, un *tot*. Gràcies per continuar plorant i rient amb mi cada dia!

Abreviatures i acrònims

Abbreviations and acronyms

AAla-Met Ala-Met encefalina / *Ala-Met enkephalin*

Aminoàcids

Aminoàcid	Codi (3 lletres)	Codi (1 lletra)
Àcid aspàrtic / <i>Aspartic acid</i>	Asp	D
Àcid glutàmic / <i>Glutamic acid</i>	Glu	E
Alanina / <i>Alanine</i>	Ala	A
Arginina / <i>Arginine</i>	Arg	R
Asparagina / <i>Asparagine</i>	Asn	N
Cisteïna / <i>Cysteine</i>	Cys	C
Fenilalanina / <i>Phenylalanine</i>	Phe	F
Glicina / <i>Glycine</i>	Gly	G
Glutamina / <i>Glutamine</i>	Gln	Q
Histidina / <i>Histidine</i>	His	H
Isoleucina / <i>Isoleucine</i>	Ile	I
Leucina / <i>Leucine</i>	Leu	L
Lisina / <i>Lysine</i>	Lys	K
Metionina / <i>Methionine</i>	Met	M
Prolina / <i>Proline</i>	Pro	P
Serina / <i>Serine</i>	Ser	S
Tirosina / <i>Tyrosine</i>	Tyr	Y
Treonina / <i>Threonine</i>	Thr	T
Triptòfan / <i>Tryptophan</i>	Trp	W
Valina / <i>Valine</i>	Val	V

 A_{pic} Àrea del pic electroforètic / *Electrophoretic peak area***B**BGE Electròlit de separació / *Background electrolyte*BPE Electroferograma del pic base / *Base peak electropherogram***C**c Concentració / *Concentration*

C	Regió constant / <i>Constant region</i>
C _H	Regió constant de les cadenes pesades / <i>Heavy chain constant region</i>
C _L	Regió constant de les cadenes lleugeres / <i>Light chain constant region</i>
C ₁₈ -SPE-CE-IT-MS	Extracció en fase sòlida (C ₁₈) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de trampa d'ions / <i>On-line C₁₈ solid phase extraction capillary electrophoresis ion trap mass spectrometry</i>
C ₁₈ -SPE-CE-MS	Extracció en fase sòlida (C ₁₈) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses / <i>On-line C₁₈ solid phase capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	Extracció en fase sòlida (C ₁₈) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol / <i>On-line C₁₈ solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry</i>
C ₁₈ -SPE-tITP-CE-TOF-MS	Extracció en fase sòlida (C ₁₈) i isotacoforesi transitòria en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol / <i>On-line C₁₈ solid phase extraction transient isotachopheresis capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry</i>
CDG	Desordre de glicosilació congènit / <i>Congenital disorder of glycosylation</i>
CDI	Carbonildiimidazol / <i>Carbonyldiimidazole</i>
CDT	Glicoformes de la transferrina deficientment carbohidratades / <i>Carbohydrate deficient transferrin</i>
CE	Electroforesi capil·lar / <i>Capillary electrophoresis</i>
CEC	Electrocromatografia capil·lar / <i>Capillary electrochromatography</i>
CE-ESI-MS	Electroforesi capil·lar en línia amb l'espectrometria de

	masses amb ionització per electroesprai / <i>Capillary electrophoresis electrospray mass spectrometry</i>
CE-IT-MS	Electroforesi capil·lar acoblada en línia a l'espectrometria de masses amb analitzador de trampa d'ions / <i>Capillary electrophoresis ion trap mass spectrometry</i>
CE-MS	Electroforesi capil·lar acoblada en línia a l'espectrometria de masses / <i>Capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
CE-TOF-MS	Electroforesi capil·lar acoblada a l'espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol / <i>Capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry</i>
CE-UV	Electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada / <i>Capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry detection</i>
CZE	Electroforesi capil·lar de zona / <i>Capillary zone electrophoresis</i>
CGE	Electroforesi capil·lar en gel / <i>Capillary gel electrophoresis</i>
CIEF	Isoelectroenfocament capil·lar / <i>Capillary isoelectric focusing</i>
CSF	Líquid cerebroespinal / <i>Cerebrospinal fluid</i>

D

Da	Dalton / <i>Dalton</i>
Des	Des-Tyr-Leu encefalina / <i>Des-Tyr-Leu enkephalin</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
2-MEA	2-mercaptoetilamina / <i>2-mercaptoethylamine</i>
DS	Sulfat de dextrà / <i>Dextran sulfate</i>
DTT	Ditiotreitol / <i>Dithiothreitol</i>
DynA	Dinorfina A (1-7) / <i>Dynorphin A (1-7)</i>

E

EC	Detecció electroquímica / <i>Electrochemical detection</i>
EIA	Immunoassaig enzimàtic / <i>Enzyme immunoassay</i>
EIE	Electroferograma d'ions extrets / <i>Extracted ion electropherogram</i>

EKS	<i>Electrokinetic supercharging</i>
ELISA	<i>Assaig d'immunoabsorció enzimàtica / Enzyme linked immunosorbent assay</i>
End1	<i>Endomorfin 1 / Endomorphin 1</i>
End2	<i>Endomorfin 2 / Endomorphin 2</i>
EOF	<i>Flux electroosmòtic / Electroosmotic flow</i>
EPO	<i>Eritropoetina humana / Human erythropoietin</i>
ESI	<i>Ionització per electroesprai / Electrospray ionization</i>

F

Fab'	<i>Fragment d'unió a l'antigen / Antigen binding fragment</i>
FASI	<i>Field-amplified sample injection</i>
FASS	<i>Field-amplified sample stacking</i>
Fc	<i>Fragment constant / Constant fragment</i>
FTICR	<i>Ressonància ciclòtrònica d'ions amb transformada de Fourier / Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer</i>
Fuc	<i>Fucosa / Fucose</i>
FWHM	<i>Relació entre la m/z del pic i l'amplada d'aquest a mitja alçada / Full-width/half-maximum</i>

G

Gal	<i>Galactosa / Galactose</i>
GalNAc	<i>N-acetilgalactosamina / N-acetylgalactosamine</i>
Glc	<i>Glucosa / Glucose</i>
GlcNAc	<i>N-acetilglucosamina / N-acetylglucosamine</i>
GnRH	<i>Hormona alliberadora de gonodotropina / Gonadotropin-releasing hormone</i>

H

H	<i>Cadena pesada de les immunoglobulines / Immunoglobulin heavy chain</i>
HSPS	<i>Nebulitzador d'alta sensibilitat amb punta porosa / High-sensitivity porous sprayer</i>

I

IA-SPE	Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat / <i>Immunoaffinity solid phase extraction</i>
IA-SPE-CE	Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar / <i>On-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis</i>
IA-SPE-CE-MS	Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses / <i>On-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
IA-SPE-CE-TOF-MS	Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol / <i>On-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry</i>
IA-SPE-CE-UV	Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada / <i>On-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry detection</i>
id	Diàmetre intern / <i>Inner diameter</i>
Ig	Immunoglobulina / <i>Immunoglobulin</i>
IgG	Immunoglobulina G / <i>Immunoglobulin G</i>
IMAC	Cromatografia d'afinitat a metall immobilitzat / <i>Immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IT	Analitzador de trampa d'ions / <i>Ion trap mass analyzer</i>
IT-MS	Espectrometria de masses amb analitzador de trampa d'ions / <i>Ion trap mass spectrometry</i>
ITP	Isotacoforesi / <i>Isotachopheresis</i>

L

L	Cadena lleugera / <i>Light chain</i>
LacNac	N-acetil-lactosamina / <i>N-acetyl-lactosamine</i>

LC	Cromatografia de líquids / <i>Liquid chromatography</i>
LE	Electròlit inicial / <i>Leading electrolyte</i>
LIF	Fluorescència induïda per làser / <i>Laser induced fluorescence</i>
LOD	Límit de detecció / <i>Limit of detection</i>
L _T	Longitud total / <i>Total length</i>
LVSS	<i>Large-volume sample stacking</i>

M

M	Massa molecular monoisotòpica / <i>Monoisotopic molecular mass</i>
MALDI	Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu / <i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MALDI-TOF-MS	Espectrometria de masses amb ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol / <i>Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
Man	Manosa / <i>Mannose</i>
Meap	Met-enkefalina-Arg-Phe / <i>Met-enkephalin-Arg-Phe</i>
MEKC	Cromatografia electrocinètica micel·lar / <i>Micellar electrokinetic chromatography</i>
Met	Met-enkefalina / <i>Met-enkephalin</i>
Met-NH ₂	Met-enkefalinamida / <i>Met-enkephalinamide</i>
μ-HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució micro o capil·lar / <i>Micro- or capillary-high performance liquid chromatography</i>
mPC-tITP-CE-MS	Combinació de la isotacoforesi transitòria amb la preconcentració mitjançant una membrana acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses / <i>On-line membrane preconcentration transient isotachopheresis capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
MS	Espectrometria de masses / <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem / <i>Tandem mass</i>

	<i>spectrometry</i>
MS ⁿ	Espectrometria de masses en tandem seqüencial / <i>Multistage (sequential) tandem mass spectrometry</i>
m/z	Relació massa càrrega elèctrica / <i>Mass-to-charge ratio</i>
MW	Pes molecular / <i>Molecular weight</i>

N

n	Nombre de replicats / <i>Number of replicates</i>
nano-ESI	Ionització per nanoelectrosprai / <i>Nanoelectrospray ionization</i>
NESP	Nova proteïna estimuladora de la eritropoesis / <i>Novel erythropoiesis stimulating protein</i>
nano-HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució nano / <i>Nano-high performance liquid chromatography</i>
NHS	N-hidroxisuccinimida / <i>N-Hydroxysuccinimide</i>

O

oa	Acceleració ortogonal / <i>Orthogonal acceleration</i>
od	Diàmetre extern / <i>Outer diameter</i>
OLS	Mètode de mínims quadrats ordinaris / <i>Ordinary least-squares regression</i>

P

PB	Polibrè / <i>Polybrene</i>
PTFE	Politetrafluoroetilè / <i>Polytetrafluoroethylene</i>

Q

q	Càrrega elèctrica / <i>Electric charge</i>
Q	Analitzador de quadrupol / <i>Quadrupole mass analyzer</i>

R

rEPO	Eritropoetina humana recombinant / <i>Recombinant human erythropoietin</i>
RIA	Radioimmunoassaig / <i>Radioimmunoassay</i>

RNA	Àcid ribonucleic / <i>Ribonucleic acid</i>
%RSD	Desviació estàndard relativa (%) / <i>Relative standard deviation (%)</i>

S

S/N	Relació senyal soroll / <i>Signal-to noise ratio</i>
SA	Àcid sinapínic (àcid trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinàmic) / <i>Sinapinic acid (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid)</i>
s	Desviació estàndard / <i>Standard deviation</i>
SDS	Dodecil sulfat sòdic / <i>Sodium dodecil sulphate</i>
SiA	Àcid siàlic / <i>Sialic acid</i>
SMIL	Capes successives múltiples de polímer iònic / <i>Successive multiple ionic polymer layers</i>
SPE	Extracció en fase sòlida / <i>Solid phase extraction</i>
SPE-CE	Extracció en fase sòlida acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar / <i>On-line solid phase extraction coupled capillary electrophoresis</i>
SPE-CE-MS	Extracció en fase sòlida acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses / <i>On-line solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
SPE-CE-UV	Extracció en fase sòlida acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada / <i>On-line solid phase extraction capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry detection</i>
SPE-tITP-CE-MS	Extracció en fase sòlida i isotacoforesi transitòria en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses / <i>On-line solid phase extraction transient isotachophoresis capillary electrophoresis mass spectrometry</i>
SPE-tITP-CE-TOF-MS	Extracció en fase sòlida i isotacoforesi transitòria en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol /

SSMCC *On-line solid phase extraction transient isotachopheresis capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry*
1-carboxilat de sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexà / *Sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate*

T

TE *Electròlit terminal / Terminating electrolyte*
Tf *Transferrina humana / Human transferrin*
tITP *Isotacoforesi transitòria / Transient isotachopheresis*
tITP-CE-TOF-MS *Isotacoforesi transitòria acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol / On-line transient isotachopheresis capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry*
tITP-CE-UV *Isotacoforesi transitòria acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada / On-line transient isotachopheresis capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry detection*
 t_m *Temps de migració / Migration time*
TNBS *Àcid 2,4,6-trinitrobenzensulfònic / 2,4,6-trinitrobenzensulfonic acid*
TOF *Analitzador de temps de vol / Time-of-flight mass analyzer*
TOF-MS *Espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol / Time-of-flight mass spectrometry*

U

Ub *Ubiquitina bovina / Bovine ubiquitin*
UV *Espectrofotometria ultraviolada / Ultraviolet spectrophotometry*
UV-Vis *Ultraviolat-Vis / Ultraviolet-Vis*

V

V	Regió variable / <i>Variable región</i>
V _H	Regió variable de les cadenes pesades / <i>Heavy chain variable region</i>
V _L	Regió variable de les cadenes lleugeres / <i>Light chain variable region</i>

Z

z	Càrrega elèctrica / <i>Electric charge</i>
---	--

Índex

Index

RESUM	1
<i>Abstract*</i>	9
OBJECTIUS	13
<i>Aims*</i>	17
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ	19
1.1. Genòmica. Proteòmica i peptidòmica	21
1.1.1. Biomarcadors peptídics i proteics	22
1.2. Pèptids i proteïnes	24
1.2.1. Els neuropèptids. Els pèptids opiacis	25
Els pèptids opiacis	25
1.2.2. Les glicoproteïnes. La transferrina humana	30
La transferrina humana	31
1.3. Anàlisi de pèptids i proteïnes per electroforesi capil·lar	35
1.3.1. Fonament de la separació	36
1.3.2. Adsorció. Els recobriments	37
1.3.3. Límits de detecció en electroforesi capil·lar	38
1.3.4. Detecció per espectrometria de masses	40
1.3.4.1. Tècniques d'ionització	41
Electrosprai (ESI)	41
Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI)	45
1.3.4.2. Analitzadors	47
1.4. Tècniques de preconcentració en línia	51
1.4.1. Preconcentració cromatogràfica en línia	52

1.4.1.1. Configuració dels preconcentradors	53
1.4.1.2. SPE-CE amb fases estacionàries convencionals	58
1.4.1.3. SPE-CE amb fases estacionàries d'immunoafinitat (IA-SPE-CE)	59
Consideracions generals dels anticossos	59
Mètodes de preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat	
Immobilització d'anticòs o de fragments d'anticòs	62
Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat (IA-SPE)	66
1.4.2. Preconcentració electroforètica en línia	68
1.4.2.1. Sample stacking	69
1.4.2.2. Isotacoforesi (ITP)	69
1.4.2.3. Junció dinàmica de pH	70
1.4.2.4. Sweeping	71
1.4.3. Combinació de mètodes de preconcentració	71
1.5. Tendències actuals i futures	73
CAPÍTOL 2. ANÀLISI DE PÈPTIDS OPIACIS PER SPE-CE AMB FASES ESTACIONÀRIES CROMATOGRÀFIQUES CONVENCIONALS	75
Article 2.1. Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE	79
Article 2.2. Transient isotachopheresis in on-line solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry for peptide analysis in human plasma	91
Article 2.3. Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid	101
Article 2.4. Lowering the limits of detection of opioid peptides at the picomolar level by fritless solid-phase extraction coupled on-line to sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry	115

CAPÍTOL 3. ANÀLISI DE PÈPTIDS OPIACIS I PROTEÏNES PER SPE-CE AMB FASES ESTACIONÀRIES D'IMMUNOAFINITAT **127**

Article 3.1. Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by online immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry 131

Article 3.2. On-line immunoaffinity SPE-CE-MS for the analysis of large biomolecules using transferrin as a model compound 141

Article 3.3. Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent with Fab' antibody fragments for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry 155

CAPÍTOL 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ **165**

4.1. Anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE amb fases estacionàries cromatogràfiques convencionals **167**

4.1.1. Construcció del preconcentrador 167

4.1.2. Selecció de fases estacionàries per SPE-CE-IT-MS. Tractament de mostres de plasma humà 171

4.1.3. Anàlisi dels pèptids opiacis per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS 177

4.1.4. Anàlisi dels pèptids opiacis per C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS 183

4.1.5. Anàlisi de pèptids opiacis per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb un preconcentrador sense *frits* 189

4.1.5.1. C₁₈-SPE-CE-UV 189

4.1.5.2. C₁₈-SPE-CE-TOF-MS 192

4.1.6. Anàlisi dels pèptids opiacis per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb una interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar 197

4.2. Anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE amb fases estacionàries d'immunoafinitat **204**

4.2.1. Preconcentració amb fases estacionàries amb anticòs intacte	204
4.2.1.1. Preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte	204
4.2.1.2. Anàlisi de pèptids opiacis per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte	208
4.2.1.3. Anàlisi de transferrina humana per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte	215
4.2.2. Preconcentració amb fases estacionàries amb fragments d'anticòs	223
4.2.2.1. Preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb fragments d'anticòs	223
4.2.2.2. Anàlisi de pèptids opiacis per IA-SPE-CE-TOF-MS amb fragments d'anticòs	228
<u>CAPÍTOL 5. CONCLUSIONS</u>	237
<i>CHAPTER 5. CONCLUSIONS*</i>	243
<u>CAPÍTOL 6. REFERÈNCIES</u>	247
<i>CHAPTER 6. REFERENCES*</i>	247

* Chapters and sections denoted in italics are fully or partially written in English.

Resum

Abstract

En l'era de la post-genòmica, la determinació de biomarcadors peptídics en fluids biològics i teixits resulta crucial pel diagnòstic, la monitorització i el pronòstic de nombrosos desordres. Els pèptids opiacis són un important grup de neuropèptids que estan estretament relacionats amb l'analgèsia i la modulació del dolor. Els seus nivells endògens en fluids biològics estan associats a tumors de la glàndula pituïtària, a diversos desordres neurològics com el Parkinson i a síndromes de dolor crònic com la fibromiàlgia. Actualment, les principals dificultats en l'anàlisi de pèptids opiacis són les concentracions extremadament baixes a les que es troben en matrius complexes, generalment $1000\text{-}1\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, i la limitada disponibilitat de mostra.

L'electroforesi capil·lar (CE) és una tècnica de separació d'alta resolució que permet analitzar petites quantitats de mostra, però que presenta una limitada sensibilitat en unitats de concentració per a la majoria dels anàlits. L'extracció en fase sòlida acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar (SPE-CE) és una poderosa eina per a millorar la sensibilitat de la CE. La configuració més típica per SPE-CE consisteix en inserir a prop de l'entrada del capil·lar de separació un microcartutx d'extracció o preconcentrador, que conté una fase estacionària empaquetada adequada per a retenir selectivament els anàlits d'interès. D'aquesta manera, és possible introduir elevats volums de mostra i eluir els anàlits retinguts en un volum molt inferior d'una solució adequada, aconseguint una purificació de la mostra i un augment de la concentració amb una mínima manipulació. Abans de l'anàlisi de mostres complexes (p.e. fluids biològics), generalment és necessari realitzar un tractament simple de la mostra per a prevenir la saturació del preconcentrador. A més, els anàlits es poden identificar de forma fiable mesurant les seves masses moleculars mitjançant espectrometria de masses. El punt de partida d'aquesta tesi doctoral és una metodologia d'extracció en fase sòlida (C_{18}) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de trampa d'ions (C_{18} -SPE-CE-IT-MS) per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres biològiques, que no presenta suficient sensibilitat per a detectar els pèptids opiacis als nivells de concentració als que es troben en mostres reals. En aquest treball, s'han proposat nombroses estratègies per a superar aquest inconvenient.

Primer, s'han avaluat diverses fases estacionàries comercials per a l'anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE emprant un preconcentrador amb estructures poroses (*frits*). La fase estacionària C_{18} és la que ha proporcionat millors resultats per a l'anàlisi de mostres de plasma humà. S'ha previngut la saturació del preconcentrador mitjançant un tractament previ de la mostra que consta de dues etapes, una precipitació amb acetonitril seguida d'una filtració per centrifugació. Com que l'etapa de filtració és crítica per tal d'obtenir recuperacions dels anàlits òptims i eliminar la matriu de la mostra, s'han provat filtres de diversos talls moleculars i diverses condicions de filtració. Tot i que les millors recuperacions dels pèptids s'han obtingut amb els filtres de tall molecular de 10 kDa (pes molecular, MW), els límits de detecció (LOD) assolits per C_{18} -SPE-CE-IT-MS són similars als obtinguts per a mostres de plasma desproteïnitades i filtrades a través dels filtres de tall molecular de 3 kDa (MW) (Dinorfina A (1-7) (DynA), $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, Endomorfina 1 (End1) i Met-enkefalina (Met), $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$). L'ús d'un espectròmetre de masses amb analitzador de temps de vol (TOF-MS) ha permès disminuir els LOD. S'ha avaluat l'anàlisi de pèptids opiacis per extracció en fase sòlida (C_{18}) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (C_{18} -SPE-CE-TOF-MS) i s'ha aconseguit millorar els LOD al voltant de 10 vegades per a la majoria dels pèptids opiacis estudiats en mostres de plasma humà (DynA i End1, $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ i Met, $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Per tal de disminuir els LOD en l'anàlisi de pèptids, s'ha estudiat la combinació de la SPE-CE amb la isotacoforesi transitòria (tITP), que és una tècnica de preconcentració electroforètica. La tITP és una variant de la isotacoforesi (ITP) que es pot implementar transitòriament abans de la separació electroforètica en un capil·lar de separació. En tITP, es crea un *sandvitx* de la mostra entre dos petits volums d'una solució d'electròlit inicial i una solució d'electròlit terminal (LE i TE), les quals contenen ions amb mobilitats electroforètiques superiors i inferiors a les dels anàlits, respectivament. Després de l'aplicació del voltatge de separació, els anàlits migren a la mateixa velocitat i són preconcentrats en bandes estretes en ordre decreixent de mobilitats electroforètiques. S'han optimitzat i avaluat metodologies d'isotacoforesi transitòria acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada i per espectrometria de masses amb analitzador de temps de vol (tITP-CE-UV i tITP-CE-TOF-MS, respectivament) i d'extracció en fase sòlida (C_{18}) i isotacoforesi transitòria en línia amb l'electroforesi capil·lar amb

detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS) per a l'anàlisi de pèptids opiàcis. Les solucions escollides (LE, TE, eluent i electròlit de separació (BGE)) han de complir els requeriments de la SPE i la tITP en línia així com la volatilitat requerida per a la detecció en línia per MS. En condicions òptimes, els LOD de l'End1 i la Met en mescules de patrons i mostres de plasma són aproximadament 10 vegades millors que els obtinguts per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS (en mescules de patrons $0.01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament i en mostres de plasma $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $1\text{-}0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament). No obstant, no s'han millorat per a la DynA i s'ha observat una baixa resolució en la separació que dificulta la identificació dels pèptids opiàcis en mostres de plasma.

També, s'ha comparat el comportament de preconcentradors amb i sense *frits* per a l'anàlisi de pèptids opiàcis per C_{18} -SPE-CE-UV i C_{18} -SPE-CE-TOF-MS. Els LOD per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS són 10 vegades millors emprant els preconcentradors amb *frits* que sense (0.1 i $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ pels pèptids estudiats en mescules de patrons, respectivament). En mostres de líquid cerebrospinal (CSF), els pèptids opiàcis es detecten a $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS amb el preconcentrador sense *frits* demostrant la seva aplicabilitat a mostres biològiques.

Una altra estratègia per augmentar la sensibilitat són les interfases d'ionització per nanoelectroesprai (nano-ESI) perquè no requereixen d'un líquid auxiliar per establir el contacte elèctric a la sortida del capil·lar de separació i conseqüentment, els anàlits separats no es dilueixen. En aquest treball, s'ha explorat un prototip recentment desenvolupat d'una interfase nano-ESI sense líquid auxiliar basada en una punta porosa per a l'anàlisi de pèptids opiàcis per CE-TOF-MS. L'ús d'aquesta interfase ha permès disminuir 50 i 100 vegades els LOD obtinguts mitjançant una interfase CE-MS convencional amb líquid auxiliar depenent del diàmetre intern (id) del capil·lar ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. 500 i $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ emprant capil·lars de 30 i $50 \mu\text{m}$ id, respectivament). La sensibilitat de la interfase sense líquid auxiliar s'ha millorat encara més per SPE-CE. S'ha dissenyat un innovador preconcentrador sense *frits* compatible amb les dimensions específiques del capil·lar de separació requerit per a la interfase sense líquid auxiliar i s'ha establert una metodologia de C_{18} -SPE-CE-TOF-MS per a l'anàlisi de pèptids opiàcis. En les millors condicions, els

pèptids s'han detectat a concentracions 5000 vegades més diluïdes que sense preconcentració ($2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Una altra alternativa per millorar la detecció de pèptids opiacis a baixa concentració en mostres biològiques és utilitzar fases estacionàries amb una selectivitat més elevada que el C_{18} , com les fases estacionàries d'immunoafinitat (IA) gràcies a les interaccions específiques antígen-anticòs.

S'han explorat dos procediments per a la preparació de fases estacionàries d'IA per extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (IA-SPE-CE-TOF-MS): la immobilització d'anticossos intactes oxidats (immunoglobulina G (IgG)) a través dels carbohidrats a partícules de sílice activades amb grups hidrazida i la immobilització de fragments d'IgG (fragment d'unió a l'antigen (Fab')) a partícules de sílice activades amb grups succinimidil. En ambdós casos, es realitza una immobilització covalent específica per afavorir una orientació apropiada dels llocs actius de la IgG policlonal o del seu fragment. S'han estudiat les principals característiques de la fase estacionària d'IA amb IgG, com la quantitat de grups hidrazida i d'anticossos immobilitzats a les partícules de sílice amb grups diol oxidats. En el cas de la fase estacionària amb Fab', la fragmentació de l'anticòs s'ha avaluat per espectrometria de masses amb ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS). Seguint els procediments establerts, s'ha preparat una fase estacionària amb IgG i una altra amb Fab', ambdues contra l'End1 i l'Endomorfina 2 (End2). S'han optimitzat i avaluat metodologies d'IA-SPE-CE-TOF-MS per a l'anàlisi de mesclades de patrons d'End1 i d'End2. El LOD de l'End1 és 2 vegades millor emprant la fase estacionària amb Fab' que amb IgG (0.5 i $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament), mentre que l'End2 es detecta a la mateixa concentració en els dos casos ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). En mostres de plasma humà, els LOD de l'End1 i l'End2 són, respectivament, 100 i 20 vegades millor amb la fase estacionària amb Fab' (1 i $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per l'End1 i l'End2, respectivament) que amb IgG ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per ambdós pèptids). La millora de la sensibilitat en l'anàlisi de mostres de plasma amb la fase estacionària amb Fab' probablement és deguda a la baixa selectivitat de la fase estacionària amb IgG intacta.

Finalment, s'ha explorat l'aplicabilitat d'una fase estacionària d'immunoafinitat amb IgG intacta per a l'anàlisi de biomolècules d'elevat pes molecular per IA-SPE-CE-TOF-MS emprant la transferrina com a model. En IA-SPE i detecció per MS en línia, es requereix un recobriment altament estable per evitar l'adsorció de la proteïna. S'ha establert una metodologia CE-UV innovadora emprant capil·lars recoberts amb un derivat aniònic de la poliacrilamida (*UltraTrolTM Dynamic Pre-Coat HN*). Després, s'ha adaptat a IA-SPE-CE-UV i IA-SPE-CE-TOF-MS. Mentre que per CE-UV s'han detectat les glicofomes més abundants de la transferrina, per CE-TOF-MS i IA-SPE-CE-TOF-MS s'ha observat una pèrdua en la resolució de la separació. A més, com que la fase estacionària d'immunoafinitat mostra reactivitat creuada contra certs components de la matriu, especialment contra l'albumina, la detecció de la transferrina en mostres de sèrum és difícil. Ha estat necessari dessalar prèviament les mostres de sèrum mitjançant una filtració per centrifugació per detectar la transferrina per IA-SPE-CE-TOF-MS.

In the post-genomic era the determination of peptide biomarkers in biological fluids and tissues has become crucial for the diagnosis, monitoring and prognosis of numerous disorders. Opioid peptides are an important group of neuropeptides that are closely related to analgesia and pain modulation. Their endogenous levels in biological fluids have been linked to pituitary tumours, several neurological disorders such as Parkinson's disease and chronic pain syndromes such as fibromyalgia. Nowadays, the leading difficulties in the analysis of opioid peptides are the extremely low concentrations in complex matrices, generally $1000\text{-}1\text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the limited availability of sample.

Capillary electrophoresis (CE) is a high-performance separation technique that allows analyzing small amounts of sample, but it presents poor concentration sensitivity for most analytes. On-line solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE) is a powerful approach to improve CE sensitivity. The most typical configuration for SPE-CE includes a microcartridge placed near the inlet of the separation capillary, which contains an appropriate packed sorbent to retain the target analytes selectively. In this way, it is possible to introduce large volumes of sample and the retained analytes are eluted in a smaller volume of an appropriate solution, which results in sample clean-up and concentration enhancement with minimum sample handling. Before the analysis of complex samples (e.g. biological fluids), a simple sample pre-treatment is usually necessary to prevent the saturation of the on-line SPE microcartridge. Moreover, analytes can be reliably identified measuring their molecular masses by mass spectrometry. The starting point of this thesis is the current on-line C_{18} solid-phase extraction capillary electrophoresis ion trap mass spectrometry (C_{18} -SPE-CE-IT-MS) methodology for the analysis of opioid peptides in biological samples that does not allow enough sensitivity to detect the opioid peptides at the concentration levels found in real samples. In this work, numerous strategies have been proposed to overcome this issue.

First, several commercial sorbents have been compared for the analysis of opioid peptides by SPE-CE using a microcartridge with frits and the C_{18} sorbent has provided the best results for the analysis of human plasma samples. The saturation of the on-line SPE microcartridge is prevented by a double-step sample clean-up pretreatment that consists of precipitation with acetonitrile and centrifugal filtration.

As the filtration step is critical to obtain optimum analyte recoveries and sample matrix clean-up, different centrifugal filters and filtration conditions have been tested. Despite the best peptide recoveries have been obtained with 10 kDa molecular weight (MW) cut-off filters, limits of detection (LODs) achieved by C₁₈-SPE-CE-IT-MS are similar to those obtained from deproteinized plasma samples filtered through 3 kDa MW cut-off filters (Dynorphin A (1-7) (DynA), 10 ng·mL⁻¹ and Endomorphin 1 (End1) and Met-enkephalin (Met), 1 ng·mL⁻¹). The use of time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) detection allows a further decrease on the LODs. The analysis of opioid peptides has been evaluated by on-line C₁₈ solid-phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (C₁₈-SPE-CE-TOF-MS). LODs have been improved around 10-fold for most of the studied opioid peptides in human plasma samples (DynA and End1, 1 ng·mL⁻¹ and Met, 0.5 ng·mL⁻¹).

In order to decrease LODs in peptide analysis, the combination of SPE-CE with transient isotachopheresis (tITP), which is an electrophoretic preconcentration technique, has been studied. tITP is a variant of isotachopheresis (ITP) that can be transiently implemented before the electrophoretic separation in a single capillary column. In tITP the sample zone is sandwiched between two small volumes of leading and terminating electrolytes (LE and TE), which contain ions with faster and slower electrophoretic mobilities than that of the analytes, respectively. After applying the separation voltage, the analytes migrate with the same velocity and are preconcentrated in discrete narrow bands in order of decreasing electrophoretic mobilities. On-line transient isotachopheresis capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry and time-of-flight mass spectrometry (tITP-CE-UV and tITP-CE-TOF-MS, respectively) and on-line C₁₈ solid phase extraction transient isotachopheresis capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS) methodologies have been optimized and evaluated for the analysis of opioid peptides. The selected solutions (e.g. LE, TE, eluent and separation background electrolyte (BGE)) have to fulfill the requirements of on-line SPE and tITP as well as meet the volatility required for on-line MS detection. Under optimum conditions, LODs in standard solutions and plasma samples for End1 and Met are approximately 10-fold better than those obtained in C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (i.e. in standard solutions 0.01 ng·mL⁻¹ and 0.1 ng·mL⁻¹, respectively and in plasma samples 0.1 ng·mL⁻¹ and 1-0.5 ng·mL⁻¹, respectively). However, no improvements

are obtained for DynA and low separation resolution is observed, which hinder the identification of the opioid peptides in plasma samples.

The performance of frit and fritless microcartridges has been compared for the analysis of opioid peptides by C_{18} -SPE-CE-UV and C_{18} -SPE-CE-TOF-MS. LODs by C_{18} -SPE-CE-TOF-MS are 10-fold better using microcartridges with frits than without frits (0.1 and 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for the studied peptides in standard mixtures, respectively). In cerebrospinal fluid (CSF) samples, the opioid peptides are detected at 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ by C_{18} -SPE-CE-TOF-MS using fritless microcartridges demonstrating the applicability to biological samples.

Sheathless nanoelectrospray (nano-ESI) interfaces are another approach to be explored in CE-MS to increase sensitivity because a sheath liquid is not required to establish the electrical contact at the outlet end of the separation capillary and then, the separated analytes are not diluted. A recently developed sheathless nano-ESI interface based on a porous tip has been evaluated for the analysis of opioid peptides by CE-TOF-MS. The use of this interface has allowed to decrease 50- and 10-fold the LODs obtained by a conventional sheathflow CE-MS interface depending on the capillary inner diameter (id) (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. 500 and 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ using capillaries of 30 and 50 μm id, respectively). The sensitivity of the sheathless interface has been further improved by SPE-CE. A novel fritless microcartridge has been designed to be compatible with the specific dimensions of the separation capillary required for the sheathless interface and a C_{18} -SPE-CE-TOF-MS methodology has been established and evaluated for the analysis of opioid peptides. Under optimum conditions, peptides have been detected at 5000-fold lower concentrations in standard mixtures than without SPE (2 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Another alternative to improve the detection of low-abundance opioid peptides in biological samples is using sorbents with a higher selectivity than the C_{18} sorbent, such as immunoaffinity (IA) sorbents due to the antigen-antibody specific interactions.

Two different procedures for the preparation of IA sorbents for on-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (IA-SPE-CE-TOF-MS) have been explored: the immobilization of oxidized intact

antibodies (Immunoglobulin G (IgG)) through their carbohydrate moieties to derivatized hydrazide silica particles and the immobilization of IgG fragments (antigen binding fragment (Fab')) to derivatized succinimidyl silica particles. In both cases, it is performed a covalent site-specific attachment to achieve an appropriate orientation of the active binding sites of the original polyclonal IgG. The main features of the IA sorbent with intact IgG have been studied, such as the amount of hydrazide groups and antibodies attached onto oxidized diol silica particles. In the case of the Fab' sorbent, the antibody fragmentation has been evaluated by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Following the established procedures, an IgG sorbent and a Fab' sorbent both against End1 and Endomorphin 2 (End2) have been prepared. IA-SPE-CE-TOF-MS methodologies have been optimized and evaluated for the analysis of standards solutions of End1 and End2. LOD of End1 is 2-fold lower using the Fab' sorbent than with the IgG sorbent (0.5 and $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively), while End2 is detected at the same concentration in both cases ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). In human plasma samples, LODs of End1 and End2 are, respectively, 100 and 20-fold better with the Fab' sorbent (1 and $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for End1 and End2, respectively) than using the IgG sorbent ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for both peptides). The sensitivity enhancement in the analysis of plasma samples with the Fab' sorbent is probably due to the lower selectivity of the intact IgG sorbent.

Finally, the suitability of an IA sorbent with an intact IgG has also been explored for the analysis of large biomolecules by IA-SPE-CE-TOF-MS using transferrin as a model. A highly stable coated capillary to avoid protein adsorption is required with IA-SPE and MS detection. A novel CE-UV methodology using capillaries coated with an anionic derivative of polyacrylamide (*UltraTrolTM Dynamic Pre-Coat HN*) has been established. Later, it has been adapted to IA-SPE-CE-UV and IA-SPE-CE-TOF-MS. While the most abundant transferrin glycoforms are detected by CE-UV, a loss of separation resolution is observed by CE-TOF-MS and IA-SPE-CE-TOF-MS. Furthermore, as the IA sorbent shows some cross-reactivity against matrix compounds, especially albumin, detection of transferrin in serum samples is difficult. An off-line sample de-salting by centrifugal filtration of serum samples has been necessary to detect transferrin in serum samples by IA-SPE-CE-TOF-MS.

Objectius

Aims

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és el desenvolupament de metodologies per a l'anàlisi de biomarcadors peptídics en fluids biològics per extracció en fase sòlida acoblada en línia a l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses (SPE-CE-MS). Principalment, s'han estudiat pèptids opiacis en mostres de plasma, alguns dels quals s'utilitzen actualment com a biomarcadors de malalties relacionades amb el dolor crònic i d'altres s'investiguen com a possibles biomarcadors de diverses patologies. En treballs previs del nostre grup de recerca, es va establir una metodologia per a l'anàlisi de pèptids opiacis per extracció en fase sòlida (C₁₈) acoblada en línia a l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de trampa d'ions (C₁₈-SPE-CE-IT-MS). No obstant, aquesta metodologia no permet assolir els nivells de concentració dels pèptids opiacis en mostres de plasma. En aquest treball s'han explorat diverses alternatives per disminuir els límits de detecció (LOD).

Per tal d'assolir l'objectiu principal s'ha seguit el següent pla de treball:

- Optimització d'un mètode de tractament de mostres de plasma humà.
- Investigació de diverses fases estacionàries cromatogràfiques convencionals per a l'anàlisi de pèptids opiacis per extracció en fase sòlida acoblada en línia a l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrofotometria ultraviolada (SPE-CE-UV).
- Desenvolupament, optimització i validació de metodologies d'extracció en fase sòlida (C₁₈) acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (C₁₈-SPE-CE-TOF-MS) per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de plasma humà.
- Combinació de l'extracció en fase sòlida (C₁₈) i la isotacoforesi transitòria acoblades en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS) per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de plasma humà.

- Avaluació de les configuracions dels microcartutxos o preconcentradors amb i sense *frits* per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS. Aplicació a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de líquid cerebrospinal humà (CSF).
- Avaluació de les interfases d'acoblament en línia de l'electroforesi capil·lar amb l'espectrometria de masses (CE-MS) amb i sense líquid auxiliar per a l'anàlisi de pèptids opiacis per CE-TOF-MS i C₁₈-SPE-CE-TOF-MS.
- Preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat, emprant anticossos intactes i fragments Fab' d'anticossos contra els pèptids opiacis d'interès. Preparació d'una fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte contra la transferrina humana per avaluar l'aplicabilitat a l'anàlisi de biomolècules d'elevat pes molecular.
- Desenvolupament, optimització i validació de metodologies d'extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses i analitzador de temps de vol (IA-SPE-CE-TOF-MS) per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de plasma humà.
- Desenvolupament d'una metodologia d'IA-SPE-CE-TOF-MS per a la detecció de transferrina en mostres de sèrum humà.

The aim of this doctoral thesis is the development of methodologies for the analysis of peptide biomarkers in biological fluids by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry (SPE-CE-MS). The analysis of opioid peptides in plasma samples is the main topic. Some of these peptides are currently used as biomarkers of diseases related to chronic pain, while others are being investigated as possible biomarkers of several pathologies. An on-line C_{18} solid-phase extraction capillary electrophoresis ion trap mass spectrometry (C_{18} -SPE-CE-IT-MS) methodology for the analysis of opioid peptides was previously established in our research group. However, that methodology does not allow to achieve the levels of concentration of opioid peptides in plasma samples. In this work, several alternatives have been explored to decrease the limits of detection (LODs).

In order to achieve the main objective, the work plan has been the following:

- Optimization of a human plasma sample treatment.
- Investigation of several conventional chromatographic sorbents for the analysis of opioid peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis with ultraviolet spectrophotometry detection (SPE-CE-UV).
- Development, optimization and validation of methodologies of on-line C_{18} solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (C_{18} -SPE-CE-TOF-MS) for the analysis of opioid peptides in human plasma samples.
- Evaluation of on-line C_{18} solid-phase extraction transient isotachopheresis capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS) for the analysis of opioid peptides in human plasma samples.
- Assessment of frit and fritless microcartridges or preconcentrators for C_{18} -SPE-CE-TOF-MS. Application to the analysis of opioid peptides in human cerebrospinal fluid samples (CSF).

- Assessment of the sheathflow and sheathless capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) interfaces for the analysis of opioid peptides by CE-TOF-MS and C₁₈-SPE-CE-TOF-MS.
- Preparation of immunoaffinity (IA) sorbents using intact antibodies and Fab' fragments against the opioid peptides of interest. Preparation of an IA sorbent with an intact antibody against transferrin to evaluate the applicability for the analysis of large biomolecules.
- Development, optimization and validation of on-line immunoaffinity solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (IA-SPE-CE-TOF-MS) methodologies for the analysis of opioid peptides in human plasma samples.
- Development of an IA-SPE-CE-TOF-MS methodology for the analysis of transferrin in serum samples.

Capítol 1. Introducció

1.1. Genòmica. Proteòmica i peptidòmica

Les ciències òmiques són un conjunt de disciplines que estudien l'origen, l'evolució i el funcionament dels éssers vius. Inicialment, va sorgir la genòmica per a la determinació de la posició dels gens en la seqüència de l'àcid desoxiribonucleic (DNA) i ràpidament es va expandir a l'estudi de l'expressió i funció dels gens, l'àcid ribonucleic (RNA) i els pèptids i les proteïnes donant lloc a altres disciplines, com la transcriptòmica i la proteòmica. Totes elles es basen en la integració d'una gran quantitat de dades, les quals es gestionen i s'analitzen mitjançant eines computacionals que desenvolupa la bioinformàtica per a facilitar la interpretació de la informació. Els seus resultats aporten grans avenços en el coneixement dels sistemes biològics, així com en el desenvolupament d'aplicacions mèdiques i biotecnològiques [1, 2].

L'èxit més reconegut en el camp de la genòmica és el projecte del genoma humà [3]. La seqüenciació completa del genoma humà ha afavorit el desviament de l'atenció cap a la proteòmica [4-7], que inclou la peptidòmica [8-11], i la metabolòmica [12-16]. Aquestes tres disciplines estudien el proteoma (proteïnes), el peptidoma (pèptids) i el metaboloma (metabòlits), respectivament. Alguns dels metabòlits o compostos de baix pes molecular que participen en les reaccions metabòliques i que són necessaris per al manteniment, creixement i desenvolupament de les funcions cel·lulars són també compostos peptídics [15, 16].

L'objectiu de la peptidòmica i la proteòmica és la identificació i caracterització estructural dels pèptids i les proteïnes presents en un determinat fluid biològic, cèl·lula, teixit o organisme i l'estudi de les seves funcions o interaccions [8-10]. La informació resultant és fonamental per explicar el funcionament dels organismes, però el repte no és senzill, perquè a diferència del gens, les proteïnes i els pèptids canvien contínuament i interaccionen amb altres molècules mitjançant una xarxa bioquímica molt complexa. A més, l'expressió proteica ve condicionada, entre d'altres factors, per la resposta cel·lular a les condicions ambientals i a la salut. El gran nombre de pèptids i proteïnes expressats en un organisme, la seva complexitat, les seves interaccions i els seus nivells de concentració, de vegades extremadament baixos, exigeixen el desenvolupament continu de noves

metodologies analítiques. Bona part de les aplicacions d'aquestes metodologies analítiques estan enfocades al descobriment de biomarcadors.

1.1.1. Biomarcadors peptídics i proteics

L'institut nacional de la salut dels Estats Units (*National Institute of Health, NIH, Bethesda, Maryland, USA*) defineix biomarcador com una característica que es pot mesurar objectivament i avaluar com a indicador d'un procés biològic normal, d'un procés patològic o com a resposta farmacològica a una intervenció terapèutica [17-19]. Els biomarcadors es poden classificar de diverses maneres considerant les seves propietats, les seves aplicacions i els desordres amb els quals estan relacionats. La classificació més comuna diferencia entre els biomarcadors de diagnòstic, de pronòstic i els predictius [5, 20].

La proteòmica i metabolòmica clíniques són les disciplines que s'encarreguen de la identificació, caracterització, determinació i validació de biomarcadors específics que resulten útils en el diagnòstic, seguiment, pronòstic i prevenció de nombrosos desordres de l'organisme [17]. Generalment, els biomarcadors es mesuren en fluids biològics perquè la seva composició és més homogènia i és un bon indicador de l'estat fisiològic o patològic de l'organisme i d'altra banda, l'obtenció d'aquestes mostres és més accessible i menys invasiva que la dels teixits. Els fluids biològics més habituals són el sèrum, el plasma i l'orina, i menys freqüentment, el líquid cerebrospinal (CSF), la saliva i les llàgrimes [4, 5, 18]. La complexitat dels fluids biològics juntament amb la baixa concentració dels compostos d'interès respecte altres compostos de la matriu biològica fan que la identificació i determinació de biomarcadors en mostres biològiques sigui una tasca difícil [6, 18, 19, 21].

Avui en dia, l'anàlisi de proteïnes i pèptids en fluids biològics proporciona informació clínica fonamental pel diagnòstic i seguiment de certes patologies. Per exemple, s'apliquen tests per determinar la troponina alliberada a la sang després d'un infart de miocardi, la proteïna C-reactiva incrementada en desordres coronaris o la tiroglobulina relacionada amb la metàstasi del càncer de tiroides [19, 22, 23]. En la majoria dels diagnòstics clínics rutinaris, els biomarcadors peptídics es quantifiquen mitjançant tècniques immunològiques, com l'assaig d'immunoabsorció enzimàtica

(ELISA) i el radioimmunoassaig (RIA), que tot i l'excel·lent especificitat i sensibilitat, no permeten una quantificació acurada i són susceptibles a generar falsos positius [24]. D'aquí la importància de l'establiment de noves metodologies analítiques per a la purificació, preconcentració, separació i caracterització de biomarcadors peptídics als nivells de concentració que es troben en fluids biològics, que permetin la confirmació de la seva identitat per espectrometria de masses [8, 11].

1.2. Pèptids i proteïnes

Els pèptids i les proteïnes estan formats per la unió covalent de diversos aminoàcids mitjançant enllaç peptídic, és a dir, un enllaç amida entre els grups α -carboxil i α -amino de dos aminoàcids. Els pèptids contenen un nombre menor d'aminoàcids i són més petits (<10000-12000 Da), mentre que les proteïnes poden estar formades per la unió de diversos polipèptids (pèptids amb 10-100 aminoàcids) i a vegades, grups prostètics (components no aminoacídics). Després de la síntesi de la seqüència peptídica que constitueix l'estructura primària, les proteïnes poden experimentar modificacions post-transduccionals com fosforilacions, acetilacions i glicosilacions. L'estructura secundària dels polipèptids i les proteïnes es forma en plegar-se els diferents segments de la cadena peptídica per originar estructures regulars com les hèlix α i les làmines β . En el cas de les proteïnes, aquestes estructures es poden plegar de nou i compactar-se donant lloc a l'estructura terciària, que confereix la forma tridimensional. L'organització pot arribar a un últim nivell, l'estructura quaternària, que s'origina per la interacció entre les diferents subunitats que formen una proteïna. Els nivells estructurals superiors d'una proteïna s'estabilitzen mitjançant ponts disulfur entre els residus de cisteïna, ponts d'hidrogen, interaccions electrostàtiques, forces de Van der Waals o interaccions hidrofíliques [25].

Els pèptids i les proteïnes són responsables d'un gran nombre de funcions, moltes de les quals encara es desconeixen. Els pèptids poden actuar com a hormones, neurotransmissors, immunomoduladors, coenzims, substrats i inhibidors d'enzims, lligands receptors, ionòfors, toxines i antibiòtics. D'altra banda, les proteïnes són molècules extremadament complexes que poden desenvolupar funcions molt variades, entre les quals destaquen la funció estructural, immunològica, enzimàtica, homeostàtica, protectora i la transducció de senyals [25]. A més, molts fàrmacs deriven de pèptids i proteïnes endògenes [11, 26]. A més de la determinació de les seves concentracions, la caracterització de l'estructura peptídica pot proporcionar informació molt valuosa, especialment en el camp de la biomedicina. Les proteïnes es caracteritzen mitjançant l'anàlisi de la molècula intacta (anàlisi descendent, *top-down*), o bé mitjançant seqüenciació (anàlisi ascendent, *bottom-up*), que implica la digestió enzimàtica de la proteïna intacta i l'anàlisi dels fragments generats.

Aquests pèptids més petits sovint són més fàcils de caracteritzar i analitzar. No obstant, es pot perdre informació estructural de la biomolècula completa [4, 7, 11, 27-29].

1.2.1. Els neuropèptids. Els pèptids opiacis

Els neuropèptids constitueixen la família més nombrosa de missatgers del sistema nerviós central i actuen com a neuromoduladors o neurotransmissors. Estan involucrats en la regulació d'emocions, la percepció del dolor, la formació de tumors, la demència senil i patologies molt diverses [25, 30, 31].

Es poden classificar en cinc grans categories: hormones hipotalàmiques (factors alliberadors), pèptids hipofisiaris, pèptids gastrointestinals, pèptids opiacis i una última categoria que conté els pèptids que no es poden classificar en alguna de les anteriors [30]. Aquesta classificació no és definitiva, donat el nombre i la diversitat de pèptids existents, a més de tots aquells que resten per descobrir.

Els pèptids opiacis

Els pèptids opiacis endògens es classifiquen en quatre famílies: encefalines, endorfines, dinorfines i endomorfines [31-33]. Les primeres famílies en ser identificades van ser les encefalines, les endorfines i les dinorfines, les quals presenten una certa similitud estructural. Els pèptids pertanyents a aquestes famílies tenen la mateixa seqüència d'aminoàcids a l'extrem N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe-). Les endomorfines es van aïllar posteriorment, i consten d'una seqüència d'aminoàcids N-terminal diferent a l'anterior (H-Tyr-Pro-Phe/Trp-). A la figura 1.1 i a la taula 1.1 es troben les estructures, les seqüències i algunes característiques dels pèptids opiacis estudiats en aquesta tesi doctoral: Dinorfina A (1-7) (DynA), Met-encefalinamida (Met-NH₂), Met-encefalina-Arg-Phe (Meap), Endomorfina 1 (End1), Endomorfina 2 (End2), Des-Tyr-Leu encefalina (Des), Met-encefalina (Met) i Ala-Met encefalina (Ala-Met).

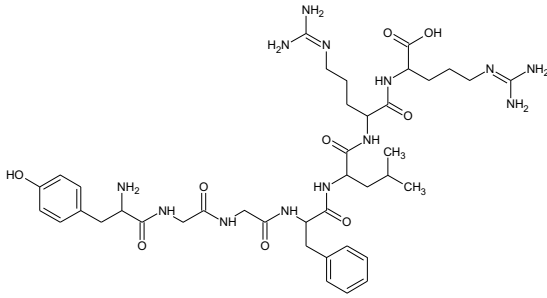
Els pèptids opiacis deuen el seu nom a que actuen produint efectes similars als analgèsics derivats de l'opi, com la morfina, però sense generar addicció. Es

localitzen a l'encèfal, sobretot a la glàndula pituïtària, a la medul·la adrenal i a les neurones peptidèrgiques. Es sintetitzen com a part d'un precursor hormonal més complex, que es fragmenta per alliberar els pèptids opiacis i d'altres hormones amb funcions completament diferents.

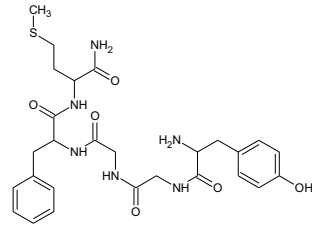
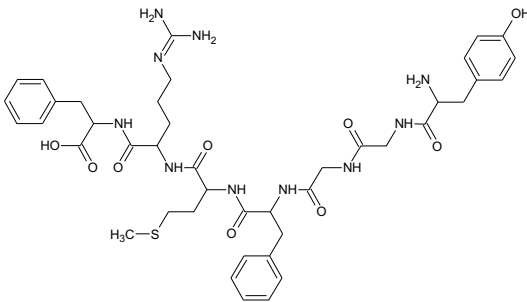
L'efecte dels pèptids opiacis sobre el sistema nerviós central es produeix quan aquests s'uneixen a molècules específiques anomenades receptors, els quals reconeixen selectivament l'estructura peptídica. Bàsicament, es diferencien els receptors opiacis μ , κ i δ . Els receptors μ són responsables de l'analgèsia del cervell i intervenen en la depressió respiratòria, en l'eufòria i en la inhibició gastrointestinal. Els receptors κ estan relacionats amb la sedació, la disfòria i l'anorèxia, i els receptors δ són responsables de l'analgèsia de la medul·la espinal. En general, els receptors δ mostren més afinitat per les encefalines, els receptors μ per les endorfines i els receptors κ per les dinorfines, tot i que un pèptid opiaci pot interaccionar amb més d'un receptor. Aquesta interacció inicia una sèrie de processos bioquímics que culminen en els efectes indicats [33-35].

Els pèptids opiacis endògens juguen un paper crític en la modulació de funcions sensorials, emocionals i cognitives. Per exemple, es creu que tenen el poder d'alleujar el dolor, proporcionar sensacions d'eufòria, gaudir del gust dels aliments o fins i tot poden afectar en certs comportaments com el consum d'alcohol [33-37]. La determinació de pèptids opiacis en mostres biològiques resulta especialment important en el diagnòstic i en el tractament de patologies com els tumors pituïtaris, els desordres neurològics i el dolor crònic. A mode d'exemple, el pèptid Met-enkefalina-Arg-Phe (Meap) està sent estudiat com a possible biomarcador en la fibromiàlgia, ja que s'ha trobat a concentracions superiors en malalts respecte a persones sanes [38, 39]. Les endomorfines estan implicades en processos inflamatoris com l'artritis reumatoide i l'osteoartritis [40] i en la diabetis [41]. Els nivells de β -endorfina, Met-enkefalina (Met) i Leu-enkefalina han estat relacionats amb tumors pituïtaris [42, 43].

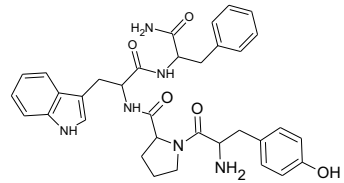
L'anàlisi de pèptids opiacis en mostres biològiques és problemàtica perquè es troben a concentracions subnanomolars en matrius complexes ($<0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, depenent del neuropèptid i de la mostra considerada (plasma, CSF, etc.) i perquè la quantitat d'aquestes mostres sovint és limitada.



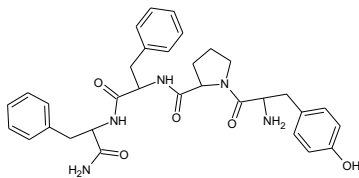
Dinorfina A (1-7) (Dyn A)

Met-enkefalina (Met-NH₂)

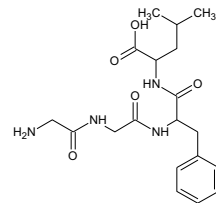
Met-enkefalina-Arg-Phe (Meap)



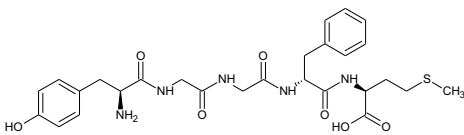
Endomorfin1 (End1)



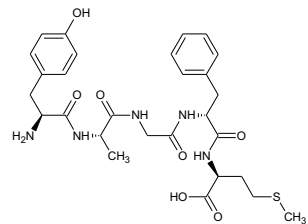
Endomorfin2 (End2)



Des-Tyr-Leu enkefalina (Des)



Met-enkefalina (Met)



Ala-Met enkefalina (Ala-Met)

Figura 1.1. Estructura dels pèptids opiacis estudiats.

Taula 1.1. Característiques dels pèptids opiàcics estudiats rellevants per aquesta tesi doctoral.

Pèptids opiàcics	DynA	Met-NH ₂	Meap	End1
Seqüència	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH ₂	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	Tyr-Pro-Tyr-Phe-NH ₂
M (Da)	867.4715	572.2417	876.3952	610.2904
[M+zH] ^{z+} m/z	[M+H] ⁺ =868.4788 [M+2H] ²⁺ =434.7430	[M+H] ⁺ =573.2490	[M+H] ⁺ =877.4025 [M+2H] ²⁺ =439.2049	[M+H] ⁺ =611.2976
Grups ionitzables àcids i bàsics (pK) ^a	1 fenol (Tyr-) (9.67) 1 àcid carboxílic (-Arg) (2.17)	1 fenol (Tyr-) (10.02)	1 fenol (Tyr-) 1 àcid carboxílic (-Phe)	1 fenol (Tyr-) (9.68)
	1 amino (Tyr-) (6.20) 2 guanidines (-Arg-Arg) (12.5, 12.5)	1 amino (Tyr-) (6.67)	1 amino (Tyr-) 1 guanidina (-Arg)	1 amino (Tyr-) (6.90)
Pèptids opiàcics	End2	Des	Met	Ala-Met
Seqüència	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	Gly-Gly-Phe-Leu	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	Tyr-Ala-Gly-Phe-Met
M (Da)	571.2795	392.2060	573.2257	587.2414
[M+zH] ^{z+} m/z	[M+H] ⁺ =572.2867	[M+H] ⁺ =393.2132	[M+H] ⁺ =574.2330	[M+H] ⁺ =588.2486
Grups ionitzables àcids i bàsics (pK) ^a	1 fenol (Tyr-)	1 àcid carboxílic (-Leu) (3.46)	1 fenol (Tyr-) (10.47) 1 àcid carboxílic (-Met) (3.19)	1 fenol (Tyr-) (10.36) 1 àcid carboxílic (-Met) (3.16)
	1 amino (Tyr-)	1 amino (Gly-) (7.96)	1 amino (Tyr-) (7.37)	1 amino (Tyr-) (7.50)

^a Valors de pK determinats per CE [44]. No disponibles per alguns dels pèptids opiàcics estudiats.

Tradicionalment, després d'un tractament de mostra adequat (dilució, ultrafiltració, precipitació de la fracció proteica, extracció en fase sòlida (SPE), etc.), els pèptids opiacis s'analitzen mitjançant immunoassaigs enzimàtics (EIA) o RIA que són tècniques que proporcionen una selectivitat i sensibilitat suficients [31, 38]. Especialment s'utilitza el RIA, malgrat els inconvenients que presenta, com la reactivitat creuada, la falta de confirmació de la identitat de les substàncies detectades, el no proporcionar informació quantitativa, l'ús de materials radioactius i el cost econòmic. Alternativament, s'han descrit metodologies basades en la cromatografia de líquids (LC), l'electroforesi capil·lar (CE) i l'espectrometria de masses (MS) [18, 31, 45-49]. Entre les metodologies de LC i CE, les més destacades utilitzen detectors electroquímics (EC), de fluorescència (LIF) o el propi RIA per aconseguir els millors límits de detecció (LOD). L'espectrometria de masses no proporciona aquests LOD, però sí la informació estructural necessària per a la identificació dels anàlits. En CE-MS, la incorporació d'una etapa de preconcentració i purificació en línia, com l'extracció en fase sòlida (SPE) emprant fases estacionàries cromatogràfiques convencionals o tècniques electroforètiques com la isotacoforesi transitòria (tITP), ha permès millorar els LOD [8, 49-56]. Fins els treballs d'aquesta tesi doctoral no s'havia descrit cap mètode per a la determinació de pèptids per extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses (IA-SPE-CE-MS) (veure capítols 3 i 4.2), a excepció de l'anàlisi de l'hormona alliberadora de gonodotropina (GnRH) en sèrum i orina [57] i de l'anàlisi de biomarcadors peptídics de l'eritropoesis humana recombinant (rEPO) i la nova proteïna estimuladora de la eritropoesis (NESP) [58], però sí que s'havien obtingut bons resultats en l'anàlisi de neuropèptids i proteïnes petites emprant aquesta tècnica però amb detecció LIF [47, 59-62].

1.2.2. Les glicoproteïnes. La transferrina humana

Les glicoproteïnes són proteïnes que contenen carbohidrats units mitjançant un enllaç covalent a determinats grups aminoacídics de les cadenes polipeptídiques [25, 63, 64]. Són els productes proteics més comuns i versàtils derivats de les modificacions post-transduccionals en tots els éssers vius [65]. Es sintetitzen principalment al reticle endoplasmàtic i a l'aparell de Golgi de les cèl·lules i es troben en el seu interior, en les membranes cel·lulars, en les matrius extracel·lulars i en els teixits conjuntius. S'han identificat milers de glicoproteïnes que poden actuar com anticossos, antigens, enzims, hormones, receptors, citoquines, proteïnes estructurals, agents protectors i proteïnes transportadores, i aquest nombre encara continua creixent.

El contingut de carbohidrats en les glicoproteïnes pot variar des de l'1%, com en certs col·làgens, fins el 99%, com en el glicogen. Típicament, les cadenes de carbohidrats poden ser des de simples disacàrids fins a estructures polimèriques complexes amb nombrosos monosacàrids, típicament anomenats glicans [63, 64]. Entre els monosacàrids més comuns es troben la glucosa (Glc), la manosa (Man), la galactosa (Gal), la fucosa (Fuc), la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la N-acetilgalactosamina (GalNAc) i l'àcid siàlic (SiA) [66]. Els glicans units a la cadena polipeptídica afecten a les propietats fisicoquímiques de les proteïnes alterant la càrrega, la solubilitat, la viscositat, el plegament, l'estabilitat i la susceptibilitat a les proteases, i per tant, modulen la seva activitat biològica [64, 67, 68].

Les glicoproteïnes es poden classificar en O-glicoproteïnes, N-glicoproteïnes i glicoproteïnes d'àncora (GPI, glicosilfosfatidilinositol) en funció de la naturalesa de l'enllaç glicosídic que es forma entre la cadena polipeptídica i els glicans (enllaç O-glicosídic, N-glicosídic i GPI, respectivament) [65, 69]. Els enllaços O- i N-glicosídics, que s'estableixen entre un monosacàrid i un grup hidroxil o amida d'un aminoàcid de la cadena peptídica, són els més comuns. Hi ha glicoproteïnes que presenten enllaços N- i O-glicosídics simultàniament.

Els oligosacàrids de les O-glicoproteïnes són molt heterogenis. D'altra banda, els N-glicans sempre presenten el mateix nucli central, però difereixen en l'estructura

de les seves antenes, formades per unitats de lactosamina (LacNac, disacàrid amb GlcNAc i Gal) en el cas dels N-glicans de tipus complex, que són els més estudiats. Aquests N-glicans presenten d'1 a 5 antenes, que generalment contenen residus terminals de SiA. També, és habitual trobar residus de Fuc units al nucli central.

Una característica destacada i de gran importància en les glicoproteïnes és l'elevada heterogeneïtat dels glicans [70]. Aquesta microheterogeneïtat és deguda a la gran varietat de glicans que es poden enllaçar a un mateix punt de glicosilació. A més, en una cadena polipeptídica poden existir varis punts de glicosilació que poden estar ocupats en diferent grau. Les diferents espècies d'una mateixa glicoproteïna que posseeixen la mateixa cadena polipeptídica però que difereixen en el conjunt dels seus glicans s'anomenen glicofomes. A les glicofomes que presenten el mateix tipus de glicans i que es diferencien en el nombre de SiA se les denomina sialofomes. El contingut i composició de les glicofomes i sialofomes d'una glicoproteïna acostuma a ser relativament constant entre individus d'una mateixa espècie. No obstant, poden modificar-se davant de situacions fisiològiques o com a conseqüència d'una malaltia, com succeeix en el cas de la transferrina humana (Tf) [68].

La transferrina humana

La transferrina és una glicoproteïna d'aproximadament 80 kDa que s'encarrega principalment del transport de ferro a través del plasma sanguini [71, 72]. Està formada per una cadena polipeptídica de 679 aminoàcids que presenta una fosforilació en la tirosina 517, dinou ponts disulfur i dues regions d'unió d'alta afinitat pel ferro (III) en les posicions 82, 114, 207 i 264 en la primera regió i 411, 445, 536 i 604 en la segona regió. El 5.8% del seu pes correspon a tres glicans addicionats durant els processos post-transduccionals. Es tracta d'un O-glicà amb una hexosa unida a la serina 32 i dos N-glicans de tipus complex units a les asparagines 413 i 611. Els N-glicans són els responsables de les diverses glicofomes que presenta aquesta glicoproteïna. A la figura 1.2 es mostra la seva seqüència d'aminoàcids de la transferrina amb els punts d'O- i N-glicosilació marcats en vermell i blau, respectivament.

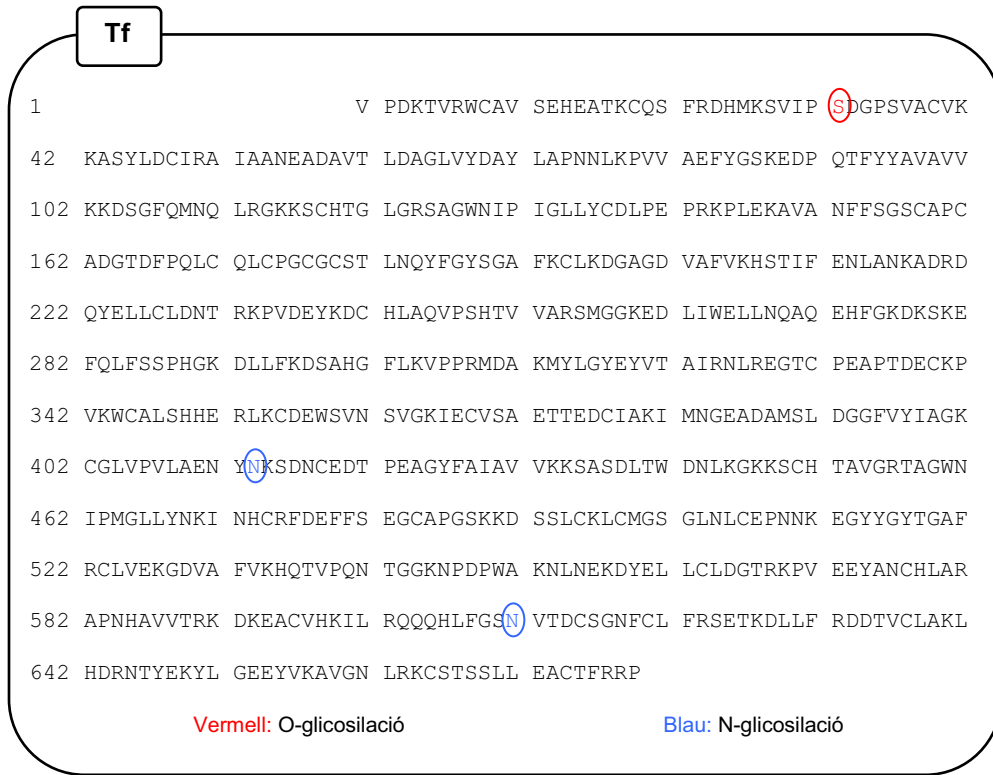


Figura 1.2. Seqüència d'aminoàcids de la transferrina humana (Tf) i punts de glicosilació.

Com a conseqüència de la microheterogeneïtat associada als N-glicans de tipus complex, la transferrina existeix com una mescla de glicofomes que difereixen en la composició, estructura i càrrega dels glicans (figura 1.3). La glicofoma majoritària és la tetraantenaria (S4), que presenta dos N-glicans biantenaris amb SiA terminals. En un individu sa, també existeixen altres glicofomes menys abundants: la trisialofoma (S3) amb dos biantenes i tres SiA, i la pentasialofoma (S5) i la hexasialofoma (S6) amb cinc i sis antenes amb un SiA cadascuna d'elles. Les glicofomes S2, S1 i S0 o glicofomes deficientment carbohidratades (CDT) són gairebé inexistents en un individu sa [73-77]. Malgrat que la majoria d'autors proposen les estructures que es mostren a la figura 1.3, existeix encara certa controvèrsia sobre la composició exacta de monosacàrids de les glicofomes CDT. Les CDT han estat proposades com biomarcadors pel diagnòstic clínic de diversos desordres, entre ells l'alcoholisme crònic i el desordre de glicosilació congènit (CDG) [73-80]. L'alcoholisme crònic suposa un risc greu per a la salut que sovint condueix a una mort prematura com a conseqüència d'afeccions com la cirrosi

hepàtica, hemorràgies internes, intoxicació alcohòlica, hepatocarcinoma, accidents o suïcidi. D'altra banda, els individus amb CDG poden presentar malformacions en alguns dels seus òrgans, disfuncions en el sistema nerviós, retard del creixement i hepatopaties en la infància [81]. Per tant, es requereixen metodologies analítiques que permetin separar i caracteritzar les diferents glicofomes de la Tf, tan per diagnosticar de manera ràpida, segura i fiable les CDT com per detectar un consum d'alcohol excessiu i monitoritzar el procés de rehabilitació d'un alcohòlic.

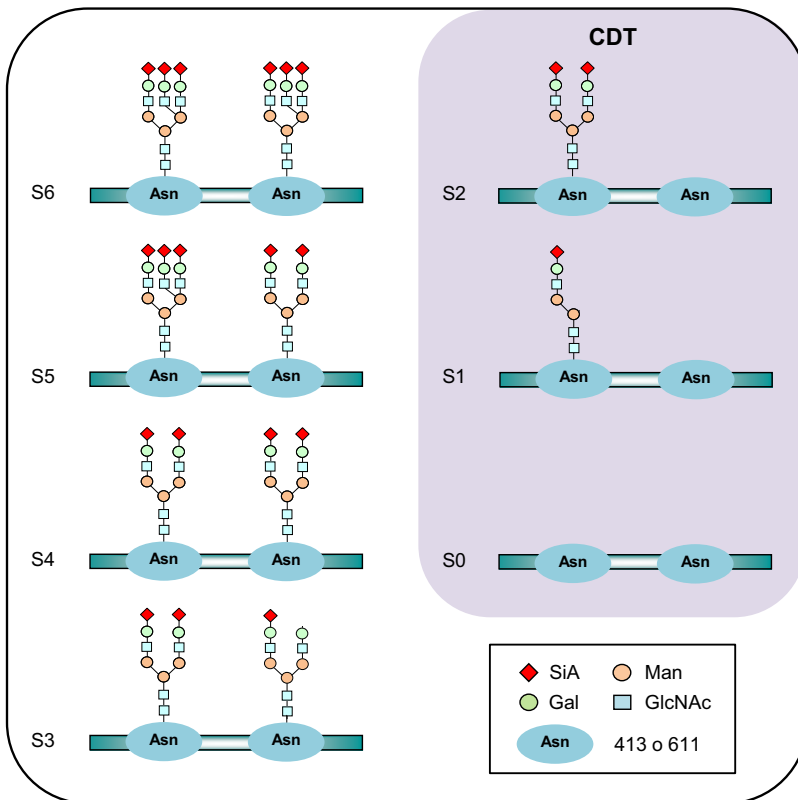


Figura 1.3. Estructura de les glicofomes presents a la transferrina humana (Tf).

En els últims anys, les tècniques emprades per a l'anàlisi de la transferrina han estat la CE i la LC d'intercanvi aniónic, que generalment permeten separar les diferents glicofomes en funció de la càrrega negativa proporcionada pel diferent contingut en SiA [65, 73, 77, 79, 80, 82-88]. En CE destaca l'ús de capil·lars recoberts amb recobriments dinàmics i detecció per UV a 200 nm. L'inconvenient més important d'aquests mètodes és la baixa selectivitat del detector, ja que

existeixen biomolècules amb punts isoelèctrics similars que poden interferir en la mesura del senyal a la longitud d'ona de treball [79]. Actualment i segons el grup de treball per a l'estandardització de la CDT de la Federació Internacional de Química Clínica i Laboratori Clínic (IFCC), la tècnica de separació recomanada per a la mesura de les CDT en mostres de sèrum sanguini és la LC d'intercanvi aniònic [76, 79, 89]. Aquest mètode és més selectiu i sensible que el mètode de CE-UV, ja que la detecció es realitza a la longitud d'ona del complex Tf-ferro (λ 460-470 nm) on el risc d'interferència analítica és molt baix [79, 80, 87].

Totes les metodologies analítiques que s'estan aplicant en els laboratoris d'anàlisi clínic per a la mesura de les glicofomes CDT utilitzen la detecció UV i consegüentment, no permeten la identificació inequívoca de les glicofomes de la transferrina [90]. Alternativament, l'espectròmetre de masses permet obtenir informació estructural a partir de la massa molecular de les biomolècules analitzades o dels seus fragments per tal de caracteritzar-les i identificar-les de manera fiable. L'anàlisi de les glicofomes de la transferrina per MS es pot enfocar a partir de la glicoproteïna intacta [90], o bé a partir dels glicans i/o pèptids obtinguts després d'una digestió enzimàtica (anàlisi ascendent, *bottom-up*) [91, 92]. Com ja s'ha esmentat anteriorment, aquesta última estratègia d'anàlisi està suscitant gran interès per la dificultat de detectar la glicoproteïna intacta amb sensibilitat suficient per MS com a conseqüència de la seva elevada massa molecular i de l'efecte negatiu dels carbohidrats en la ionització [65, 76, 82, 93-96].

Una altra de les dificultats en l'anàlisi de la transferrina resideix en la separació d'aquesta de la resta de proteïnes presents en el sèrum sanguini. Generalment, abans de l'anàlisi per LC o CE, es realitza un tractament previ de la mostra que inclou la saturació de la transferrina amb Fe mitjançant una solució d'àcid nitriltriacètic-Fe o una solució de FeCl_3 i NaHCO_3 , seguida d'una precipitació de les lipoproteïnes amb una solució de sulfat de dextrans i CaCl_2 [89, 97]. Les metodologies de purificació i preconcentració basades en immunoafinitat podrien ser una excel·lent alternativa donada la seva elevada selectivitat [83]. Fins l'actualitat no s'ha descrit cap mètode per a la determinació de proteïna intacta per IA-SPE-CE-MS (veure capítols 3 i 4.2), però sí que s'han analitzat digestos de les glicoproteïnes rEPO i NESP [58]. En el cas de proteïna intacta, existeixen pocs precedents, com per exemple l'anàlisi d'EPO mitjançant IA-SPE-CE-UV [98].

1.3. Anàlisi de pèptids i proteïnes per electroforesi capil·lar

La CE, juntament amb altres tècniques de separació d'alta resolució miniaturitzades (μ -HPLC, nano-HPLC i els sistemes basats en microxips), juga un paper molt important en camps d'investigació com la peptidòmica i la proteòmica, on en molts casos la quantitat de mostra disponible és molt petita [5, 99, 100]. Els principals avantatges que ofereix són el baix consum de reactius i de mostra (1-50 nL), l'elevada selectivitat, resolució i eficàcia en temps d'anàlisi curts, la instrumentació senzilla i l'automatització completa. A més, es pot acoblar en línia amb la detecció per MS (CE-MS) [12, 14, 21, 28, 101].

La CE també destaca per presentar una gran versatilitat, ja que admet diversos modes d'operació, permetent separar anàlits de naturalesa molt diversa. Els cinc modes més emprats són l'electroforesi capil·lar de zona (CZE), l'electroforesi capil·lar en gel (CGE), l'isoelectroenfocament capil·lar (CIEF), la cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) i l'electrocromatografia capil·lar (CEC) [2, 8, 102]. De totes les modalitats, la CZE és la més emprada per la seva simplicitat operacional i versatilitat, ja que la seva selectivitat es pot modificar canviant la polaritat elèctrica, el recobriment del capil·lar o la composició o el pH de l'electròlit de separació (BGE). És per aquest motiu que el terme CE està àmpliament estès i acceptat per referir-se a la CZE. Com que en aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat exclusivament la CZE, d'ara endavant es farà servir aquesta nomenclatura (CE).

Una de les aplicacions més exitoses de la CE és la seva participació en el projecte del genoma humà [3, 103]. En l'actual era post-genòmica, la CE és una de les millors alternatives per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes, especialment les que presenten modificacions post-transduccionals com les glicoproteïnes, que afecten a la càrrega elèctrica de les diferents glicofomes [2, 4, 6, 7, 11, 14-16, 27-29, 104]. La CE es considera una tècnica amb un mecanisme de separació complementari al de la LC, però a diferència dels modes de LC més utilitzats, com ara la cromatografia en fase inversa que utilitza fases mòbils hidroorgàniques àcides, la composició del BGE pot compatibilitzar-se amb la conservació de l'estructura nativa dels pèptids i les proteïnes [12, 21, 29, 80, 105].

1.3.1. Fonament de la separació

La CE és una tècnica de separació basada en la diferent velocitat de migració dels anàlits segon la seva relació càrrega/radi a l'aplicar un camp elèctric dins d'un capil·lar de diàmetre intern (id) petit (25-75 μm) ple d'un medi conductor, que és el BGE.

Quan una solució que conté espècies carregades es sotmet a l'efecte d'un camp elèctric, aquestes es començaran a moure i la mobilitat de cadascuna dependrà de la seva càrrega i mida. La mida dels ions està relacionada amb la seva massa molecular, la seva estructura tridimensional i el seu grau de solvatació. Fent balanç entre les forces d'electromobilitat i fricció, la mobilitat electroforètica (m_e , μ_e), que és constant per a cada ió determinat, pot expressar-se com: $\mu_e = q/6\pi\eta r$, on q és la càrrega de l'ió, η és la viscositat del BGE i r és el radi de l'ió solvatat. Si tenim una mescla de diferents substàncies, a l'aplicar un camp elèctric, les diferents μ_e faran que els anions migrin cap al pol positiu (ànode) i els cations cap al pol negatiu (càtode). A més, els ions més petits i més carregats migraran a major velocitat que els de mida més gran i càrrega menor (figura 1.4) [102].

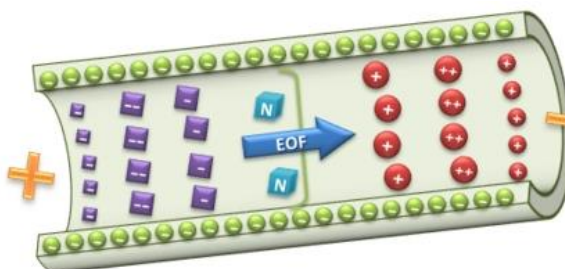


Figura 1.4. Representació de la migració electroforètica de diferents molècules en un capil·lar de sílice fosa.

Un fenomen important en les separacions per CE és el transport electroosmòtic dels ions, produït per la presència del flux electroosmòtic (EOF) [106, 107]. Quan s'utilitzen capil·lars de sílice fosa, la superfície de la paret interna es troba carregada negativament per l'existència de grups silanols que es troben dissociats a pH superiors a 2. Aquests silanols ionitzats atreuen els contraions catiónics del BGE i es forma una doble capa de cations que origina una diferència de potencial

coneguda com a potencial zeta. Quan s'aplica un voltatge a través del capil·lar de separació, els cations de la doble capa es mouen cap al càtode, arrossegant el BGE que omple el capil·lar. Aquest EOF catòdic provoca el moviment de totes les espècies, ja siguin positives, negatives o neutres cap al càtode, on està situat el detector (polaritat normal), i té un efecte molt important en la separació dels anàlits, ja que el seu perfil pla minimitza els efectes de dispersió. La mobilitat efectiva dels anàlits ve donada, doncs per la seva m_e i l'EOF, que depenen principalment de les característiques del BGE.

El principal paràmetre a tenir en compte en la optimització d'una separació per CE és la naturalesa i composició (concentració i pH) del BGE. Altres factors importants que afecten a la separació i que en alguns casos estan interrelacionats són: la quantitat de mostra a injectar, la mida del capil·lar (longitud i diàmetre), la calor per efecte Joule, la temperatura de treball i el voltatge emprat en la separació. El control d'aquests factors és imprescindible per a poder aconseguir separacions ràpides, reproduïbles i d'alta resolució [102].

1.3.2. Adsorció. Els recobriments

Els anàlits poden interaccionar amb els grups silanols ionitzats de les parets dels capil·lars de sílice fosa donant lloc a fenòmens d'adsorció [18, 108]. Aquests fenòmens són especialment importants en proteïnes, mentre que en pèptids petits i poc carregats són gairebé negligibles. L'adsorció dels anàlits pot provocar una pèrdua de la eficàcia en la separació, eixamplament i asimetria dels pics, i poca reproductibilitat en els temps de migració i en les àrees dels pics electroforètics, fins i tot pot arribar a impedir la detecció.

Existeixen diverses estratègies per a prevenir o minimitzar l'adsorció dels anàlits, com augmentar la força iònica del BGE, treballar a pH extrems, formar parells iònics entre els anàlits i el BGE o establir protocols de rentat entre anàlisis per a regenerar eficientment la superfície interna dels capil·lars de separació. No obstant, el procediment més efectiu és el recobriment de la superfície interna dels capil·lars de sílice fosa. Els recobriments també es poden utilitzar per alterar i mantenir constant l'EOF, de manera que permeten millorar la reproductibilitat en els temps de

migració dels anàlits, la resolució i l'eficiència de les separacions, i influir en la rapidesa de les anàlisis [109-112]. Els recobriments bàsicament es poden classificar en dinàmics i permanents [18, 108, 110, 113-118]. Els **recobriments dinàmics** acostumen a ser additius en el BGE que interaccionen de forma reversible amb la paret del capil·lar mitjançant un mecanisme d'adsorció. La interacció que es produeix és feble i per aquest motiu és necessari regenerar constantment el recobriment addicionant-lo al BGE. Els additius més utilitzats s'engloben en amines, polímers neutres o carregats i surfactants neutres o zwitterònics. Aquests compostos són en general poc volàtils i poden suprimir la ionització dels anàlits, augmentar el senyal de fons i disminuir la sensibilitat, motiu pel qual, en CE-MS, s'utilitzen principalment els **recobriments permanents** [27, 29, 113]. Aquests recobriments es caracteritzen per modificar de forma irreversible les parets del capil·lar, en una etapa prèvia a la separació, i no s'addicionen en el BGE. Aquesta modificació irreversible pot ser tan a través d'un enllaç covalent entre els grups silanols i l'agent derivatitzant, com per l'adsorció d'un polímer neutre o iònic mitjançant interaccions hidrofòbiques i/o electrostàtiques. Generalment, els recobriments covalents presenten una major estabilitat, però els recobriments generats per adsorció són menys laboriosos de preparar i a més, modifiquen la paret interna del capil·lar de manera més uniforme i reproducible.

Diversos autors han descrit metodologies amb recobriments permanents per adsorció per a separar glicoproteïnes, entre elles la transferrina, però sovint l'estabilitat d'aquests capil·lars és limitada i es poden produir desprendiments del recobriment. Això pot no ser crític per a la separació durant un nombre d'anàlisis elevat, però en el cas d'utilitzar un espectròmetre de masses com a detector, pot provocar la disminució de la sensibilitat i de l'estabilitat del senyal a causa de la contaminació de l'espectròmetre de masses [27, 29, 90, 96, 98, 113].

1.3.3. Límits de detecció en electroforesi capil·lar

Un dels inconvenients de la CE és la dificultat de detectar concentracions d'anàlit molt baixes. La causa principal és la injecció de volums de mostra molt petits (2-50 nL) per les dimensions del capil·lar de separació i en el cas de la detecció UV, pel reduït camí òptic [102].

Al llarg dels anys, s'han proposat diverses estratègies amb la finalitat de solucionar aquest inconvenient, des d'augmentar el camí òptic del capil·lar de separació mitjançant cel·les bombolla o cel·les en forma de Z [102], emprar altres detectors més sensibles que la detecció UV, LIF o MS [11, 62, 119], fins a combinar tècniques de purificació i/o preconcentració amb la CE [49-51, 120-129]. Algunes d'aquestes tècniques de preconcentració s'apliquen abans de l'anàlisi per CE de forma independent (*off-line*), com la precipitació, la ultracentrifugació, la microdiàlisi i les extraccions amb solvents, i d'altres es combinen en línia amb la CE (*on-line* o *in-line*), entre elles les tècniques d'enfocament i les tècniques cromatogràfiques de SPE clàssiques [49, 128]. Les tècniques de preconcentració en línia permeten automatitzar les anàlisis i evitar una manipulació excessiva de volums petits de mostra. En aquesta tesi doctoral ens hem centrat en aquesta última estratègia, concretament emprant la SPE i la tITP (veure capítol 2 i 4.1).

Un dels paràmetres de qualitat que generalment s'indica per tal d'avaluar si una metodologia analítica és adient per complir l'objectiu de l'anàlisi i al mateix temps poder-la comparar amb altres metodologies, és el LOD, que correspon a la mínima concentració d'anàlit que pot ser detectada de forma fiable. No obstant, no existeix un consens científic sobre quina és la millor manera per a mesurar aquesta concentració [130]. Principalment, es diferencia entre els LOD estimats matemàticament i els determinats experimentalment. Els primers LOD s'haurien de confirmar posteriorment de forma experimental.

Existeixen diversos mètodes per estimar el LOD matemàticament, els quals depenen de l'anàlisi d'espècimens en el blanc i de l'examen de la relació entre el senyal i el soroll (S/N). En un dels mètodes més habituals, el LOD s'expressa com la concentració de l'anàlit corresponent al senyal del blanc més tres vegades la desviació estàndard del blanc ($LOD = y_{\text{blanc}} + 3s_{\text{blanc}}$), on aquests valors es calculen mitjançant l'anàlisi de diversos replicats d'un blanc de mostra [131, 132]. També, es pot estimar el LOD a partir de la S/N d'una zona propera al pic de l'anàlit en l'electroferograma. En aquest cas, el LOD serà aquella concentració d'anàlit que proporcionï una senyal igual a un cert valor de S/N, i generalment s'accepta una S/N superior a 3 [132].

Una altra alternativa per estimar matemàticament el LOD consisteix en les regressions lineals basades en repeticions d'anàlisis a diferents nivells de concentració. Els paràmetres de les regressions lineals es poden estimar mitjançant diversos models, entre els quals destaca el mètode de mínims quadrats ordinaris (OLS) [132-134]. El LOD serà el quocient entre tres vegades la desviació estàndard dels residuals ($s_{y/x}$) i el pendent de la recta de calibratge (b) ($LOD=3s_{y/x}/b$).

Els LOD també es poden determinar de forma experimental mitjançant la comparació de la resposta analítica del blanc amb la de les mostres que contenen una concentració coneguda i molt petita d'anàlit. D'aquesta manera es pot concloure quina concentració d'anàlit és necessària per a diferenciar la seva presència de la seva absència. En els mètodes cromatogràfics i electroforètics, per assegurar que el LOD determinat sigui significatiu i diferenciable d'un blanc, s'estableix una relació S/N mínima [131]. En aquesta tesi doctoral, tots els LOD s'han obtingut experimentalment analitzant mostres amb concentracions d'anàlit molt baixes. En tots els casos, la mínima concentració detectada presenta una S/N superior a 3.

1.3.4. Detecció per espectrometria de masses

L'evolució en camps de recerca com la peptidòmica i la proteòmica està lligada al desenvolupament de metodologies analítiques cada vegada més selectives i sensibles. En aquest context, l'espectrometria de masses (MS) s'ha convertit en una eina fonamental per a la identificació i caracterització de pèptids i proteïnes [135, 136]. El potencial de la detecció per MS augmenta quan s'acobla en línia amb una tècnica de separació d'alta resolució com són la LC i la CE. Ambdues tècniques acoblades permeten separar els anàlits en pics cromatogràfics o electroforètics abans d'obtenir informació estructural. La separació en la primera dimensió pot prevenir la supressió de la ionització provocada per l'elució o migració dels anàlits amb altres components de la mostra que estiguin més concentrats o que s'ionitzin millor [2, 4, 7, 8, 14-16, 21, 27-29].

Els espectròmetres de masses són instruments sofisticats que generalment consten per una banda d'un sistema d'introducció de mostra, que per exemple pot ser una

bomba d'infusió, un cromatògraf de líquids o una electroforesi capil·lar, i per altra banda d'una font d'ionització, un analitzador i un detector.

1.3.4.1. Tècniques d'ionització

Les tècniques d'ionització més emprades en MS per a l'anàlisi de pèptids i proteïnes són la ionització per electroesprai (ESI) i la ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI) [6, 29, 137, 138]. Aquestes tècniques són capaces d'ionitzar de manera relativament suau i efectiva molècules polars de baix i d'elevat pes molecular, des de pèptids fins a proteïnes intactes senzilles o complexes (anticossos, glicoproteïnes, etc.). La seva contribució a la Química Analítica moderna es va reconèixer l'any 2002, quan es va atorgar el Premi Nobel de Química a John B. Fenn i Koichi Tanaka, descobridors d'ambdues tècniques d'ionització (ESI i MALDI, respectivament) [139-141].

Electroesprai (ESI)

L'ESI és la tècnica d'ionització per excel·lència per a l'acoblament en línia de la CE amb MS [7, 8, 15, 27-29, 107]. Es tracta d'una tècnica d'ionització a pressió atmosfèrica en la que la ionització dels anàlits es produeix mitjançant l'aplicació d'una diferència de potencial elevada (2-6 kV) entre l'extrem de l'elèctrode o agulla per on flueix la mostra líquida (normalment cabals compresos entre 1 i 100 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) i el contraelèctrode situat a l'entrada de l'espectròmetre de masses. Aquesta diferència de potencial genera un esprai de microgotes carregades a la sortida de l'elèctrode formant l'anomenat con de Taylor. La formació de l'esprai sovint s'assisteix amb un gas nebulitzador (N_2). A mesura que el dissolvent s'evapora per acció de la temperatura d'un gas d'assecat (N_2), es produeix la repulsió de les càrregues dins de les gotes fins ocasionar la completa desintegració d'aquestes i la formació d'ions en fase gas, els quals són transferits al sistema de buit de l'espectròmetre de masses (figura 1.5) [107, 137, 139, 142]. Com que es generen ions moleculars multicarregats, es poden analitzar molècules d'elevat pes molecular emprant analitzadors amb intervals d'escombratge de relacions massa/càrrega (m/z) relativament petits (inferiors a 3200 Da/e).

En les interfases d'ESI, és molt important ajustar correctament els paràmetres operacionals per arribar a l'equilibri adequat entre el subministrament de suficient energia d'activació, que assegurï una bona sensibilitat, i la preservació de la molècula intacta i dels grups més làbils, així com les conformacions i les interaccions no covalents en les proteïnes més complexes [104]. D'altra banda, l'eficàcia de la ionització en mode positiu o negatiu depèn de les propietats de la molècula, del pH i de la composició de la solució on es troba dissolta. L'ús d'aquest tipus d'ionització, sovint limita els components dels BGE i les solucions emprades, que han de ser volàtils [7, 28].

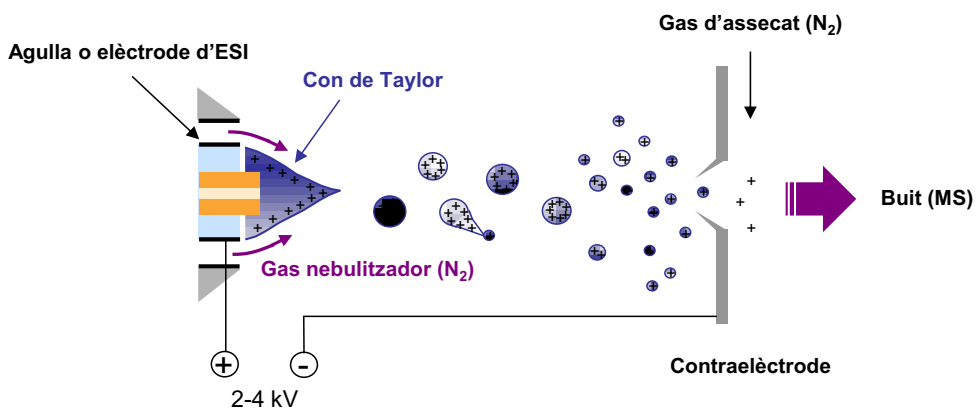


Figura 1.5. Formació de l'esprai en ESI positiu.

Existeixen diversos tipus d'interfases per a l'electroforesi capil·lar acoblada en línia amb l'espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (CE-ESI-MS o simplement CE-MS). Bàsicament, es poden diferenciar entre les interfases amb líquid auxiliar (*sheathflow*) i les interfases sense líquid auxiliar (*sheathless*) (figura 1.6) [107]. La principal diferència entre elles és la manera en la que es tanca el circuit elèctric de la separació electroforètica.

La **interfase de CE-MS amb líquid auxiliar** desenvolupada per Smith et al és la més emprada [143]. En aquesta interfase s'utilitza un líquid auxiliar coaxial (*coaxial sheath-liquid*) per augmentar el cabal proporcionat per la CE i al mateix temps, tancar la connexió elèctrica a la sortida del capil·lar de separació electroforètica amb el BGE (figura 1.6 a) [2, 8]. Generalment, la ionització s'assisteix amb N_2 com a gas nebulitzador. La composició del líquid auxiliar és un dels paràmetres que més

afecten a l'eficàcia de la ionització i s'ha d'optimitzar per a cada aplicació concreta. Quan s'opera en mode positiu és habitual emprar dissolucions hidroorgàniques amb concentracions moderades d'àcids orgànics volàtils (0.05-0.5% (v/v) d'àcid acètic o d'àcid fòrmic) [7]. També és recomanable optimitzar la temperatura del gas d'assecat i el cabal i la pressió del gas nebulitzador, que poden afectar al temps de migració dels pics electroforètics. Aquesta interfase destaca per la reproductibilitat dels resultats, la robustesa, la fàcil implementació i la versatilitat. No obstant, els anàlits es dilueixen a la sortida del capil·lar de separació i, com que la composició del líquid auxiliar és diferent a la del BGE pot afectar negativament a la separació electroforètica provocant eixamplament dels pics electroforètics i variabilitat en els temps de migració.

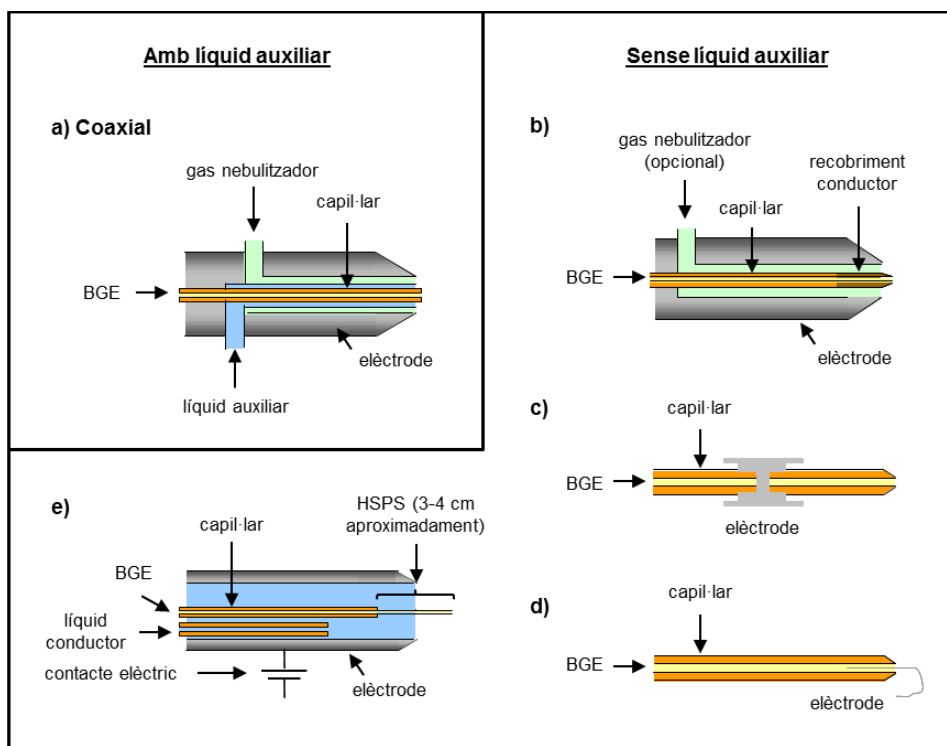
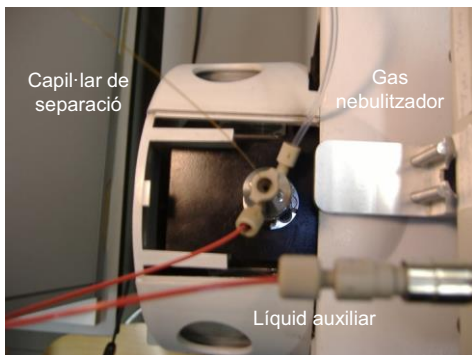


Figura 1.6. Representació esquemàtica de diverses interfases d'ESI per a CE-MS.

La interfase de CE-MS amb líquid auxiliar es troba disponible comercialment (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya*) (figura 1.7), però no està exempta de nous reptes per a millorar l'anàlisi de biomolècules. Les condicions necessàries per a una ionització i desolvatació òptimes (dissolvents orgànics, àcids volàtils,

potencials d'ionització i temperatures relativament elevades) poden ser negatives per a l'estabilitat d'algunes biomolècules especialment làbils.

Vista superior (interfase tancada)



Vista frontal (interfase oberta)

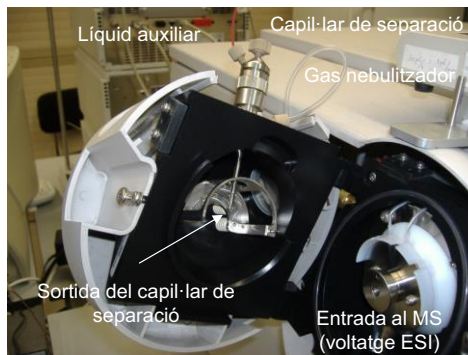


Figura 1.7. Interfase ESI amb líquid auxiliar (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya*).

Una bona alternativa per a superar aquests inconvenients són les fonts d'ionització per nanoelectrosprai (nano-ESI), en les que s'ha reduït el diàmetre intern de l'elèctrode, el cabal de treball i la quantitat de mostra necessàries. Aquestes característiques fan que la ionització esdevingui molt eficaç i suau, especialment apropiada per a l'obtenció d'ions moleculars en fase gas de molècules làbils. A més, s'augmenta la sensibilitat, la tolerància a les sals i s'elimina la necessitat de fer servir dissolvents i àcids orgànics, així com temperatures massa elevades. També s'ha observat que es minimitza la supressió iònica i els efectes de matriu que dificulten l'ESI convencional. Per aquests motius, l'ús de les interfases de nano-ESI s'està estenent per a determinats anàlisis en mostres diluïdes i estudis de metal·loproteïnes, glicoproteïnes, oligòmers i complexos proteïcs especialment làbils emprant solucions tampó aquoses neutres [140, 142].

Les **interfases de CE-MS sense líquid auxiliar** són fonts de nano-ESI en les que el contacte elèctric s'estableix directament amb el BGE just abans o després de que abandoni el capil·lar de separació (figura 1.6 b-e) [7, 8, 104, 137, 144-146]. El seu principal avantatge és que no dilueixen l'anàliti i per tant, a priori haurien d'ofrir una major sensibilitat. S'han descrit diversos dissenys d'interfases sense líquid auxiliar, la majoria emprant un capil·lar de separació amb la superfície de l'extrem de sortida recobert amb un material conductor (figura 1.6 b) o inserint un microelèctrode a la

sortida del capil·lar (figura 1.6 c-d). Desafortunadament, el temps de vida d'aquests recobriments és limitat i es deterioren per l'aplicació d'alts voltatges, i els microelèctrodes sovint causen la formació de bombolles reduint l'estabilitat de l'esprai. Alternativament, s'han dissenyat altres interfases en les que es crea un regió porosa a l'extrem del capil·lar de separació que es troba a prop de l'elèctrode d'ESI per tancar el circuit elèctric amb el BGE. Aquestes junctons poroses solen ser fràgils i difícils de reproduir. Recentment, *Beckman Coulter (Brea, CA, USA)* ha desenvolupat un nou prototip d'interfase de CE-MS sense líquid auxiliar basat en un disseny d'aquest tipus introduït per M. Moini [147, 148]. En aquest innovador disseny (figura 1.6 e), els últims 3 o 4 cm de la paret del capil·lar de separació presenten un gran nombre de petits porus que permeten el contacte elèctric entre l'interior del capil·lar i l'exterior sense diluir la mostra. A diferència de les interfases de CE-MS amb líquid auxiliar en les que es poden utilitzar capil·lars de separació convencionals (50 i 75 μm id), en aquesta interfase sense líquid auxiliar és imprescindible l'ús de capil·lars de 30 μm id i 150 μm od, que incorporen el nebulitzador d'alta sensibilitat amb punta porosa (HSPS) a l'extrem de sortida. Aquests capil·lars no es troben disponibles comercialment. Tot i així, alguns grups de recerca que col·laboren en la posada a punt de la interfase han obtingut bons resultats en l'anàlisi de fàrmacs, pèptids i proteïnes [7, 27, 28, 144, 149-156].

Ionització per desorció amb làser assistida per una matriu (MALDI)

La tècnica MALDI s'utilitza extensament en proteòmica, ja que és capaç d'ionitzar eficientment molècules de massa molecular molt variada (fins a 1000 kDa). Els ions que es generen tenen poques càrregues, el que en molècules de massa molecular elevada dóna lloc a espectres de masses de major simplicitat i més fàcils d'interpretar que els obtinguts en ESI. D'aquesta manera es pot determinar la massa molecular d'una proteïna sense haver d'aplicar algorismes de deconvolució als espectres de masses obtinguts. A més, és molt senzill d'utilitzar i alguns autors consideren que proporciona una major tolerància a la presència de sals, surfactants i altres interferències [6, 7, 29, 137, 157]. D'altra banda, a diferència del que succeeix en ESI, els ions s'originen des de l'estat sòlid i no es produeixen de forma contínua, sinó en paquets discrets i això limita el seu acoblament en línia amb la LC o la CE, i també el tipus d'analitzadors que s'utilitzen. Els espectròmetres de masses amb analitzadors de temps de vol (TOF-MS) són els més emprats

[101, 157]. S'han dissenyat diferents sistemes per automatitzar i combinar la LC o la CE amb l'espectrometria de masses amb ionització per desorció amb làser assistida per una matriu i analitzador de temps de vol (MALDI-TOF-MS), i actualment es continua investigant l'acoblament d'ambdues tècniques totalment en línia [6, 7, 29, 107, 137, 138].

En MALDI, l'anàlit es mescla amb una solució d'una matriu adequada i es diposita la mescla en una placa metàl·lica. El dissolvent, les molècules d'anàlit i la matriu cristal·litzen juntament. La ionització dels anàlits es produeix quan es fa incidir sobre la mostra un làser de la longitud d'ona i l'energia adequada en el buit elevat de l'espectròmetre de masses, de manera que la matriu absorbeix els fotons de la radiació làser i transfereix l'energia suficient per assistir la ionització de l'anàlit (figura 1.8). El làser de N_2 és el més comú [29, 136, 158].

En general, la selecció de la matriu i el procediment per preparar i cristal·litzar la mescla es realitza empíricament. Les matrius acostumen a ser àcids orgànics de baix pes molecular. Quan s'analitzen pèptids predomina l'ús de les matrius derivades de l'àcid cinàmic (àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic) i l'àcid dihidroxibenzoic (àcid 2,5-dihidroxibenzoic), mentre que quan s'analitzen proteïnes, les matrius derivades de l'àcid sinapínic (àcid trans-3,5-dimetoxi-4-hidroxicinàmic, SA) són les més emprades [157, 159, 160]. Dependent de la matriu seleccionada es pot operar en mode positiu o en mode negatiu.

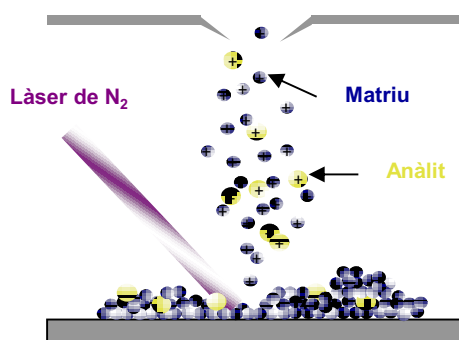


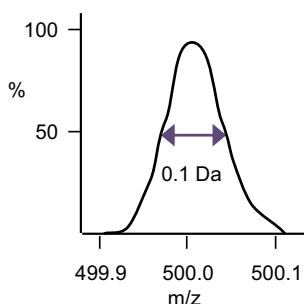
Figura 1.8. Formació dels ions en MALDI.

1.3.4.2. Analitzadors

Existeix una gran varietat d'espectròmetres de masses amb analitzadors diferents, que tenen la finalitat de separar els ions en funció de la seva relació m/z abans d'arribar al detector. La seva elecció depèn de les prestacions que presenten, entre elles la sensibilitat, la resolució (o el poder de resolució), l'exactitud, l'interval de masses escombrat, l'interval dinàmic i la velocitat d'escombratge.

L'exactitud de masses s'expressa en ppm i es calcula en forma d'error associat a la mesura, tal i com es mostra a la figura 1.9 a. Així, per un ió de m/z teòrica 500.0000 que s'observa a m/z 500.0020, l'exactitud de massa és de 4 ppm. La resolució d'un pic, segons la IUPAC, és la relació entre la massa del pic (M) i l'amplada d'aquest (ΔM) a certa alçada ($M/\Delta M$) [141]. La manera més comuna d'expressar la resolució és la FWHM (*full-width/half-maximum*), que es calcula amb el valor de l'amplada del pic a mitja alçada i sempre proporciona valors més elevats que els obtinguts utilitzant qualsevol de les altres definicions. Així, en el cas anterior, la resolució d'un pic amb una amplada a mitja alçada de 0.1 Da seria de 5000 (figura 1.9 a). També, es pot definir ΔM com la diferència de masses entre dos pics adjacents d'alçada similar i separats per una vall que no supera un 10% de la seva alçada. En aquest cas, la massa monoisotòpica M pot ser la del primer pic o bé, la mitjana d'ambdues. Aquesta definició és equivalent a calcular la resolució d'un dels pics amb l'amplada del pic a una alçada del 5%. Aquest mètode s'utilitza poc perquè és difícil trobar dos pics que compleixin aquests requisits. Per tant, a l'hora de comparar resolucions cal tenir en compte com s'han calculat. Pel que fa al poder de resolució, la IUPAC el defineix com la capacitat de diferenciar entre dos ions amb valors de m/z molt propers [141]. Es pot indicar amb l'amplada de pic, mesurada en unitats de massa (ΔM) o bé, calculant novament $M/\Delta M$, almenys en dos punts del pic, generalment en el 5 i el 50% de la màxima alçada del pic [161]. Els termes resolució i poder de resolució estan relacionats i si aquest últim es calcula com $M/\Delta M$ són intercanviables. A la figura 1.9 b es pot observar l'efecte de la resolució en l'espectre de masses de la proteïna Ubiquitina bovina (Ub) a mode d'exemple [162].

a) Determinació de l'exactitud i la resolució de massa



Massa teòrica (m_{teo}) = 500.0000

Massa experimental (m_{exp}) = 500.0020

Amplada de pic (50 %) = 0.1

$$\text{Exactitud de massa} = \frac{M_{\text{teo}} - M_{\text{exp}}}{M_{\text{teo}}} \cdot 10^6 = \frac{0.002}{500} \cdot 10^6 = 4 \text{ ppm}$$

$$\text{Resolució (FWHM)} = \frac{M_{\text{teo}}}{\Delta M} = \frac{500}{0.1} = 5000$$

b) Espectres de masses en funció del poder de resolució

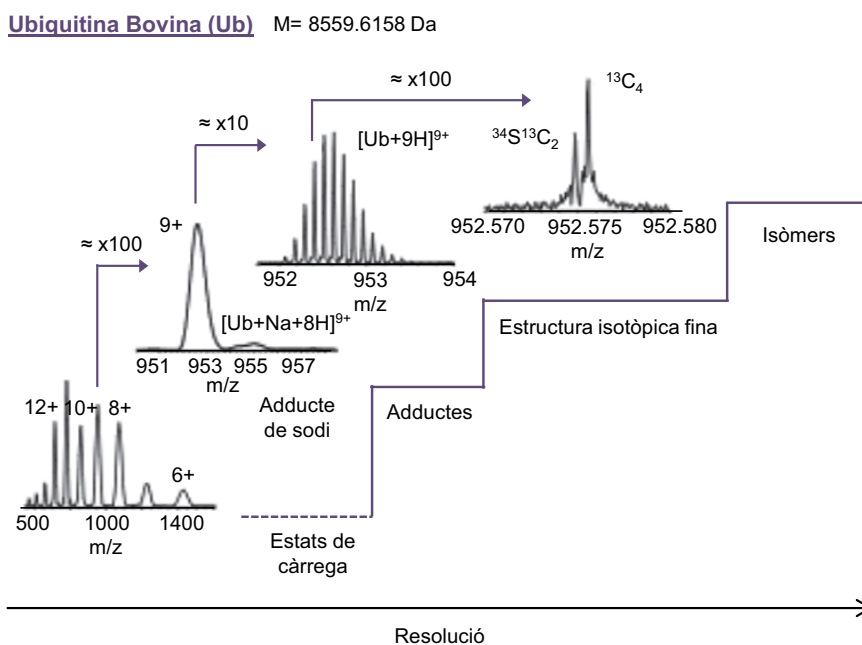


Figura 1.9. Exemples de la determinació de l'exactitud i la resolució de massa (a) i de les espècies que es poden diferenciar a l'espectre depenent de la resolució de l'espectròmetre de masses (b).

A la taula 1.2 s'indiquen els valors d'exactitud i resolució de masses (FWHM) que s'obtenen quan s'analitzen compostos de massa molecular petita mitjançant alguns dels espectròmetres de masses disponibles comercialment a l'actualitat.

Taula 1.2. Exactitud i resolució de masses d'alguns dels espectròmetres de masses disponibles comercialment a l'actualitat quan s'analitzen compostos de massa molecular petita.

Analitzador	Exactitud de masses (ppm)	Resolució (FWHM)
Quadrupol (Q)	10 - 40	1000 - 5000
Trampa d'ions (IT)	10 - 40	1000 - 5000
Temps de vol (TOF)	2 - 5	10 000 - 50 000
Orbitrap	1 - 2	100 000 - 200 000
Ressonància ciclotrònica amb transformada de Fourier (FTICR)	<1 - 2	100 000 - 1 300 000

A l'hora d'acoblar un espectròmetre de masses en línia amb la CE emprant interfases d'ESI, és important que els analitzadors presentin una velocitat d'escombratge elevada, de manera que es puguin adquirir diversos espectres per cadascun dels pics electroforètics si aquests són molt estrets [163]. Quan s'analitzen biomarcadors és recomanable que els analitzadors proporcionin una elevada exactitud i resolució de masses per tal d'identificar els anàlits de forma fiable i diferenciar-los d'altres isòmers o compostos de massa molecular similar. De la mateixa manera, en aquest cas és fonamental la sensibilitat, per la baixa concentració dels anàlits d'interès, i un interval dinàmic ampli, per les diferents concentracions dels anàlits d'interès a la mostra.

Al llarg dels anys s'han utilitzat diversos espectròmetres de masses en CE-MS, entre els quals destaquen el quadrupol (Q), la trampa d'ions (IT) i el temps de vol (TOF), ja que s'han comercialitzat com a sistemes totalment integrats (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya* i *Bruker Daltonics, Bremen, Alemanya*). El primer instrument comercial de CE-MS presentava un analitzador de Q. Malgrat les bones prestacions i el cost raonable, aquests analitzadors presenten una velocitat d'escombratge baixa, una sensibilitat limitada i proporcionen poca informació estructural. Els analitzadors d'IT són més ràpids, permeten adquirir diversos espectres per segon i realitzar experiments de masses en tàndem sense haver de preseleccionar els ions a monitoritzar (MS/MS i MSⁿ), però tenen un interval dinàmic bastant estret a causa de la capacitat limitada de la trampa d'ions [2, 8, 29, 50].

En l'última dècada, l'espectrometria de masses ha evolucionat considerablement gràcies a l'ús d'instruments amb elevada exactitud de masses i resolució, com el temps de vol amb reflector (TOF), la ressonància ciclotrònica amb transformada de Fourier (FTICR) i l'orbitrap (taula 1.2). Aquests nous espectròmetres de masses destaquen per l'elevada resolució que permet distingir les distribucions isotòpiques d'ions moleculars multicarregats així com identificar la seva càrrega; l'elevada exactitud que millora la fiabilitat en la identificació dels anàlits; l'excel·lent sensibilitat i l'ampliació dels intervals dinàmics permetent determinar simultàniament components de la mescla a diferents nivells de concentració [164, 165]. Els espectròmetres de masses de FTICR i orbitrap, tot i les bones prestacions que ofereixen, són poc recomanables quan l'eficàcia de les separacions és molt gran i els pics obtinguts són molt estrets perquè presenten una baixa velocitat d'escombratge. A més, el seu ús és complex i el seu preu és especialment elevat [135, 162, 165].

Avui en dia, una de les millors alternatives en CE-MS són els analitzadors de temps de vol (TOF) amb reflector [101, 135]. En la majoria dels TOF amb font d'ESI moderns, l'acceleració dels ions és ortogonal (oa), on un camp elèctric polsant extrau perpendicularment els ions moleculars abans d'arribar al detector. Les seves prestacions d'exactitud i resolució són lleugerament inferiors a les d'altres analitzadors com el FTICR, l'orbitrap o el sector magnètic i tampoc presenten la possibilitat de fragmentar els anàlits d'interès ni la sensibilitat dels actuals triple quadrupols (QQQ), però presenten una velocitat d'escombratge elevada i un preu més econòmic [2, 162, 163]. Actualment, els espectròmetres de masses amb analitzadors de TOF són la millor opció per a la identificació i caracterització de pèptids i proteïnes en fluids biològics.

1.4. Tècniques de preconcentració en línia

La CE pot combinar-se amb tècniques de preconcentració de manera que existeixi una interconnexió en línia que permeti un flux de líquid continu entre els dos sistemes sense intervenció de l'operador [128]. La finalitat d'aquestes tècniques de preconcentració en línia és purificar els anàlits i disminuir els LOD i així millorar l'aplicabilitat de la CE per a l'anàlisi dels compostos d'interès quan es troben a molt baixa concentració en mostres complexes.

Les tècniques de preconcentració en línia que s'utilitzen en CE es poden classificar en mètodes cromatogràfics (extracció dels anàlits amb fases estacionàries adequades) [122, 128, 166] i mètodes electroforètics (procediments d'enfocament o apilament (*focusing o stacking*)) [51, 129]. En els mètodes electroforètics la quantitat màxima de mostra introduïda depèn del volum total del capil·lar de separació. En canvi, en els mètodes cromatogràfics no existeix aquesta limitació, sino que permeten introduir volums de mostra superiors i per tant, els factors de preconcentració generalment són més grans. D'altra banda, la seva implementació pot ser més complexa per operaris no experts i el temps d'un anàlisi complet acostuma a ser superior. Els mètodes electroforètics requereixen menys temps i menys intervenció humana, però sovint les millores en els LOD són limitades i no ofereixen bons resultats quan s'analitzen mostres complexes, ja que les interferències de la matriu es concentren juntament amb els anàlits, dificultant la separació electroforètica i la detecció. Aquest inconvenient es pot pal·liar mitjançant una etapa de purificació prèvia a l'anàlisi (*off-line*).

Si les condicions són adequades, poden combinar-se seqüencialment dues tècniques de preconcentració en línia per tal d'aconseguir millorar encara més els LOD assolits de forma independent.

1.4.1. Preconcentració cromatogràfica en línia

Els mètodes de preconcentració cromatogràfica en línia amb la CE es poden englobar sota el terme d'extracció en fase sòlida (SPE) [127, 128, 166, 167]. La preconcentració per extracció en fase sòlida acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar (SPE-CE) es basa en la interacció reversible dels anàlits d'interès amb una fase estacionària adequada. La fase estacionària es col·loca en un dispositiu conegut com a preconcentrador o microcartutx d'extracció, que s'incorpora a prop de l'entrada del capil·lar de separació (*on-line* o *in-line*, coexisteixen les dues denominacions) o bé, es situa separat de la CE i s'acoblen les dues tècniques mitjançant un sistema de vàlvules adequat (*on-line* amb vàlvules). Aquest últim acoblament és menys freqüent, probablement per les dificultats tècniques que implica (volums morts entre les vàlvules, dificultat per establir un corrent elèctric continu, etc.) [166, 168].

En general, el procediment emprat en SPE-CE es pot dividir en sis etapes. Primerament, s'introdueix la mostra dins del sistema (μL), de manera que els anàlits queden retinguts per la fase estacionària que es troba en el preconcentrador. A continuació, es realitza una etapa de rentat per eliminar les restes de mostra i possibles interferències que s'hagin pogut unir a la fase estacionària. Posteriorment, es condiciona el capil·lar de separació amb BGE i es procedeix a l'elució dels anàlits injectant un volum petit d'una solució apropiada (nL). Seguidament, els anàlits es separen per CE i es condiciona la fase estacionària rentant-la adequadament pel següent anàlisi. Si s'utilitza un espectròmetre de masses com a detector (SPE-CE-MS), els anàlits d'interès es podran diferenciar de la resta de substàncies que hagin pogut eluir-se del preconcentrador d'acord a les seves masses moleculars.

L'objectiu de la SPE-CE és utilitzar una fase estacionària adequada per a retenir selectivament els anàlits, introduir al capil·lar volums de mostra relativament elevats i finalment, eluir l'anàlit retingut en un volum molt inferior d'una solució adequada per aconseguir com a resultat un augment de la concentració de la mostra i, globalment, una disminució dels LOD amb una mínima manipulació de la mostra.

1.4.1.1. Configuració dels preconcentradors

Donat que els preconcentradors per a SPE-CE no es troben disponibles comercialment i són els propis investigadors qui els fabriquen al laboratori, existeix una gran diversitat de configuracions. Poden ser columnes tubulars obertes en les que la fase estacionària recobreix les parets, partícules de fase estacionària empaquetades en el preconcentrador, monòlits, membranes impregnades, discs d'extracció, partícules magnètiques suportades mitjançant un imant extern o fins i tot microxips [56, 110, 128, 166, 167, 169].

Un dels dissenys més emprats per a la SPE-CE són els preconcentradors de rebliment o empaquetats amb partícules de fase estacionària (figura 1.10). Aquest disseny va ser introduït per N.A. Guzman [170] a principis dels anys 90 i des d'aleshores, s'han publicat una multitud de treballs utilitzant una gran diversitat de fases estacionàries, entre les quals destaquen les fases estacionàries cromatogràfiques convencionals (C_{18} , C_8 , C_2 , etc.) i les fases estacionàries d'immunoafinitat.

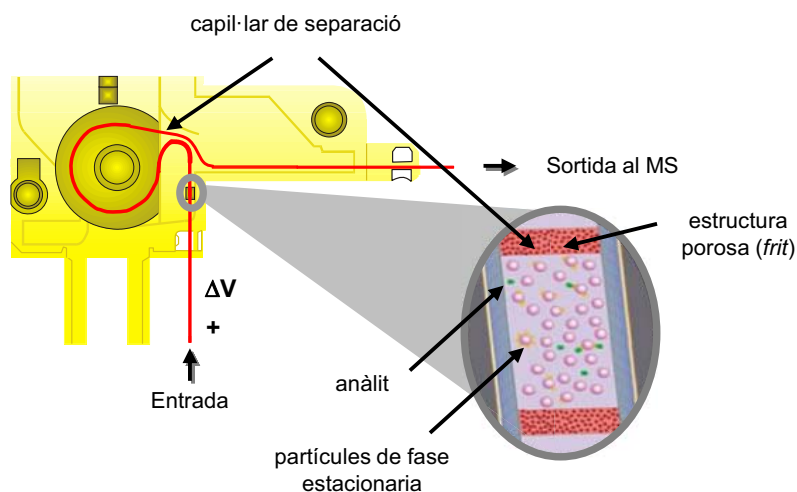


Figura 1.10. Esquema dels capil·lars emprats en SPE-CE-MS.

En la configuració més habitual dels preconcentradors de rebliment, aquests s'insereixen a prop de l'entrada del capil·lar de separació (aproximadament 8 cm) mitjançant dos tubs de plàstic de diàmetre adequat (figura 1.10 i 1.11 a). És molt

important que les totes les unions encaixin perfectament per tal de que el cabal de líquid sigui continu, sinó pot donar lloc a pèrdues de flux i problemes d'inestabilitat de corrent.

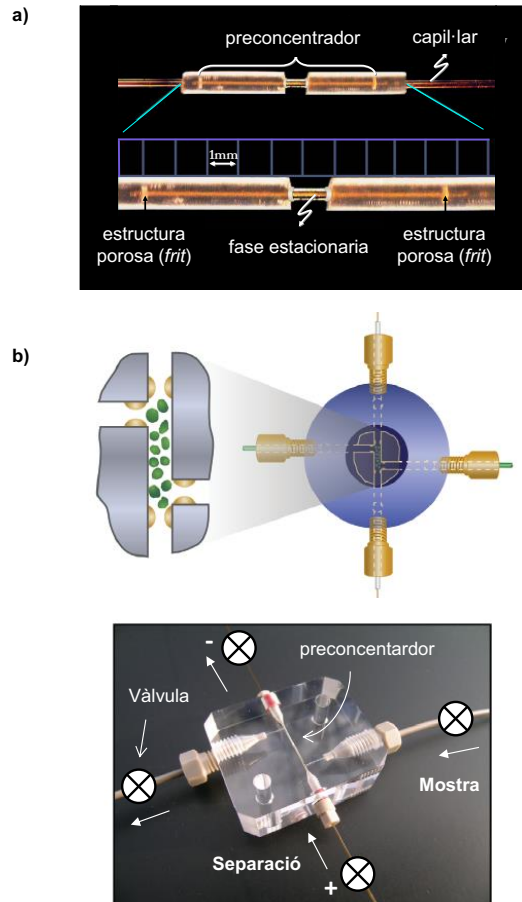


Figura 1.11. a) Preconcentrador amb *frits* en els extrems. La introducció de la mostra i la separació s'efectuen en la mateixa direcció. b) Nou disseny amb canals en forma de Z i vàlvules proposat per N.A. Guzman [166, 169, 181]. La mostra s'introdueix en la direcció perpendicular a la de separació.

La principal diferència entre les diverses variants existents és l'estratègia per mantenir les partícules de fase estacionària a l'interior del preconcentrador. L'alternativa més emprada consisteix en col·locar dues estructures poroses (*frits*) de mida adequada a cadascun dels extrems del preconcentrador, entre les quals es troba empaquetada i retinguda la fase estacionària (figura 1.10 i 1.11 a). Generalment, els *frits* solen ser polimèrics i s'obtenen dels filtres dels cartutxos

convencionals de SPE, d'on sovint també s'extreuen les fases estacionàries cromatogràfiques convencionals. Abans de ser introduïts dins del preconcentrador, és necessari reduir la seva mida, ja que si són massa grans restringiran el cabal de líquid a través del capil·lar de separació i si són massa petits no compliran apropiadament la seva funció.

En algunes ocasions, la presència de *frits* pot provocar un augment significatiu de la contrapressió en el capil·lar de separació, la distorsió de l'EOF, la formació de bombolles i inestabilitat de corrent [171-174]. Per aquest motiu, s'han descrit altres configuracions en les que no s'empren *frits* per a retenir la fase estacionària dins del preconcentrador. En aquests casos, les partícules de la fase estacionària han de ser relativament grans per evitar la seva pèrdua a través del capil·lar de separació, és a dir, han de tenir un diàmetre superior al diàmetre intern del capil·lar de separació, però al mateix temps no han de ser molt grans per tal de disposar d'una superfície activa elevada. A diferència de les configuracions amb *frits*, el diàmetre intern del capil·lar de separació (normalment, 50 o 75 μm) limita l'elecció de la fase estacionària a aquelles que estan constituïdes per partícules d'una determinada mida (<50 o 75 μm). Aquest fet pot ser un inconvenient en certes aplicacions en les que s'obtenen millors resultats si s'utilitza una fase estacionària amb partícules de mida inferior o bé, amb una àmplia varietat de mida de partícula.

Alternativament, en comptes d'emprar preconcentradors amb partícules de fase estacionària empaquetades, es poden utilitzar altres configuracions que no requereixen *frits*, com membranes impregnades amb lligands, discs d'extracció, partícules magnètiques suportades mitjançant un imant extern, monòlits o lligands units directament a la paret del capil·lar que constitueix el preconcentrador. No obstant, en la majoria d'aquestes configuracions la quantitat de fase estacionària és inferior i els resultats en quan sensibilitat o reproductibilitat són, en general, més discrets.

Els preconcentradors empaquetats, tan amb *frits* com sense, s'han emprat àmpliament per a l'anàlisi de diversos compostos en mostres complexes diluïdes per SPE-CE-MS amb interfase de CE-MS amb líquid auxiliar [54-56, 172, 175, 176]. Tot i així, fins l'actualitat no s'han avaluat les prestacions dels preconcentradors amb i sense *frits* per a una mateixa aplicació per tal de conèixer els seus avantatges

i inconvenients, i així seleccionar la més adient per a futures anàlisis (veure capítols 2 i 4.1).

De la mateixa manera, les aplicacions de SPE-CE-MS amb interfase de CE-MS sense líquid auxiliar són reduïdes [177-183] (taula 1.3), probablement perquè les interfases no són comercials i les característiques dels capil·lars de separació emprats no permeten inserir qualsevol tipus de preconcentrador o fins i tot fan necessari desenvolupar noves configuracions compatibles. Aquest és el cas dels preconcentradors per a SPE-CE-MS amb interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar quan s'utilitzen els capil·lars de separació amb nebulitzadors HSPS. Aquests capil·lars presenten unes dimensions reduïdes (30 µm id i 150 µm od) i com que no hi ha tubs de plàstic de diàmetre adequat per subjectar aquests capil·lars i unir-los amb el preconcentrador, és necessari innovar i desenvolupar altres configuracions que resultin apropiades (veure capítols 2 i 4.1). Recentment, Wang et al han descrit la construcció d'un preconcentrador d'1 mm de longitud, 100 µm id i 360 µm od reblert de fase estacionària C₈ retinguda amb un *frit* a l'extrem de sortida [183]. Aquest preconcentrador s'uneix a dos fragments de capil·lar de 30 µm id i 360 i 150 µm od a l'extrem d'entrada i de sortida, respectivament, mitjançant un volum mort i un microfiltre. Actualment, aquest és l'únic disseny descrit per a SPE-CE-MS amb capil·lars amb nebulitzadors HSPS.

El desavantatge més important de les configuracions esmentades fins ara és que la mostra s'introdueix en la mateixa direcció, des de l'entrada a la sortida del capil·lar, en la que posteriorment tindrà lloc la separació electroforètica (figura 1.10 i 1.11 a). Això pot provocar que els compostos de la matriu de la mostra s'adsorbeixin a les parets del capil·lar de separació i ocasionar interferències en les anàlisis. Per tal de solucionar aquest problema, s'han dissenyat altres configuracions de preconcentradors en les que la mostra s'introdueix a través d'un tub o canal en la direcció perpendicular al capil·lar de separació. Principalment, es tracta de les configuracions escalonades, cruciformes o en zig-zag (figura 1.11 b), les quals poden ser molt variades o inclús es poden connectar entre elles en línia o amb altres disposicions [169, 172, 184, 185].

Taula 1.3. Aplicacions de SPE-CE-MS amb interfase de CE-MS sense líquid auxiliar.

SPE-CE-MS amb interfase CE-MS sense líquid auxiliar						
Anàlits	Mostra	Configuració SPE	Fase estacionària	Interfase	LOD	[Ref]
digest de proteïnes	extracte del ribosoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microcartutx empaquetat	fase inversa (Poros 10 R2)	junció líquida amb elèctrode d'or	subfemtomolar	[177]
angiotensina II i gonadorelina	patrons	disc d'extracció	poli(estirè divinil benzè)	junció-T amb filferro d'or	picomolar	[178]
angiotensina II i gonadorelina	plasma	disc d'extracció	poli(estirè divinil benzè)	junció-T amb filferro d'or	nanomolar	[179]
digest de citocrom c i apomiglobina de cavall	patrons	disc d'extracció	C ₁₈	junció líquida porosa	femtomolar	[180]
pèptids (ex. metionina-encefalina, bradiquinina, neurotensina)	patrons	Microxip empaquetat	poli(dimetil siloxà)	punta de grafit	desconegut	[181, 182]
digest de 16 proteïnes (ex. β-galactosidasa, precursor sèrum albúmina i transferrina)	patrons	Microcartutx empaquetat amb frit	C ₈	nano-ESI amb HSPS	desconegut	[183]

Aquestes configuracions ofereixen altres avantatges com la reducció de la possible contrapressió deguda a la presència del preconcentrador en el capil·lar de separació, més versatilitat per a l'establiment de les condicions òptimes necessàries per a certes reaccions i l'increment de la vida útil del capil·lar de separació [172]. A més, disposen d'una major capacitat per a contenir fase estacionària i permeten introduir elevats volums de mostra o de solucions de rentat en un temps reduït, ja que la introducció de la mostra no està condicionada per la longitud total i el diàmetre intern del capil·lar de separació [184]. Els principals desavantatges són l'existència de volums morts com a conseqüència de la presència de vàlvules per regular els cabals, la poca reproductibilitat i les dificultats per assegurar la continuïtat elèctrica del sistema. Aquests són els motius pels quals encara no s'ha estès el seu ús. Altres sistemes de disseny miniaturitzat, com els nanocanals o els microxips, presenten problemes similars. Avui en dia, s'estan invertint esforços en la millora dels sistemes miniaturitzats i poc a poc intenten convertir-se en una excel·lent plataforma per a desenvolupar metodologies d'anàlisi d'alta resolució per a aplicacions clíniques ràpides i eficaces.

1.4.1.2. SPE-CE amb fases estacionàries convencionals

Les fases estacionàries més emprades en SPE-CE són les fases estacionàries cromatogràfiques convencionals, ja que existeix una gran varietat (fases estacionàries de base sílice, polimèriques, de bescanvi iònic, etc.) i la majoria es troben disponibles comercialment. La selecció de la fase estacionària dependrà de l'aplicació per a la qual s'utilitzi, però les més comunes són les fases estacionàries hidrocarbonades de base sílice (C_{18} , C_8 , C_2 , etc.) i principalment les C_{18} [121, 122, 128, 166]. La SPE-CE amb fases estacionàries C_{18} (C_{18} -SPE-CE-MS) ha estat àmpliament estudiada en el nostre grup de recerca i en aquesta tesi doctoral s'inclouen alguns d'aquests estudis (veure capítols 2 i 4.1) [54, 55, 175, 186].

Tot i que aquest tipus de fases estacionàries permeten millorar els LOD en CE fins a quatre ordres de magnitud, no són prou selectives quan s'analitzen mostres biològiques i sovint, és necessari realitzar tractaments de mostra previs per tal d'assolir nivells de concentració similars als de mesclures de patrons [55]. D'aquí que

s'explori l'ús de fases estacionàries més selectives, com les d'afinitat a metall immobilitzat (IMAC) o especialment, les d'immunoafinitat (IA).

1.4.1.3. SPE-CE amb fases estacionàries d'immunoafinitat (IA-SPE-CE)

Les fases estacionàries d'immunoafinitat contenen anticossos o fragments d'anticossos enllaçats que retenen un anàlit o grup d'anàlits de manera molt selectiva mitjançant enllaços d'hidrogen o de Van der Waals, forces electrostàtiques i hidrofòbiques. Això les fa molt adequades per a la determinació de substàncies a baixa concentració en matrius complexes.

Consideracions generals dels anticossos

Els anticossos o immunoglobulines (Ig) són glicoproteïnes formades majoritàriament per quatre subunitats: dues cadenes lleugeres (L) idèntiques d'aproximadament 23 kDa i dues cadenes pesades (H) també idèntiques de 53 a 75 kDa (figura 1.12). Aquestes subunitats estan unides mitjançant enllaços disulfur i interaccions no covalents per a formar un dímer simètric en forma de Y. Els carbohidrats es troben units a les cadenes pesades.

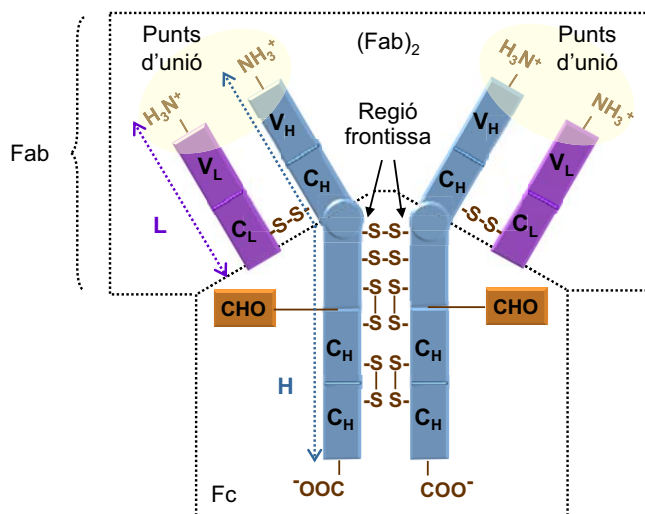


Figura 1.12. Estructura d'una immunoglobulina G (IgG).

Tan les cadenes lleugeres com les cadenes pesades, presenten una regió variable (V) i una regió constant (C). Les regions variables d'ambdues cadenes (V_L , V_H) es troben en els extrems N-terminals i són les que presenten els llocs d'unió amb els antígens o llocs actius [25]. La seqüència d'aminoàcids d'aquestes regions, i per tant la seva conformació, presenta una gran varietat i és la que proporciona a l'anticòs l'especificitat antigènica. Les regions constants (C_L , C_H) es localitzen en els extrems C-terminals de les cadenes lleugeres i pesades. Cada regió constant presenta variacions en la seqüència d'aminoàcids, definint cinc classes diferents d'Ig: IgG, IgA, IgM, IgD i IgE (variabilitat isotípica), sent les IgG la classe més abundant (70-75% de les Ig totals en el sèrum humà) [187]. Els diferents tipus d'Ig presenten diferents propietats biològiques i diferents estructures espacials (monòmers, dímers, pentàmers, etc.) [187, 188]. Per a tots els individus d'una mateixa espècie, les regions constants de les cadenes pesades (C_H) són iguals per a cada classe d'Ig, però les regions constants de les cadenes lleugeres (C_L) varien d'un individu a un altre (variabilitat al·lotípica). En conseqüència, l'heterogeneïtat de les Ig és molt gran.

Els anticossos es poden fragmentar per digestió amb diferents enzims o per tractament amb agents reductors (figura 1.13). El tractament de l'anticòs amb papaïna dona com a resultat el trencament de la molècula per la regió frontissa, obtenint dos fragments d'unió a l'antigen (Fab) idèntics i un fragment constant (Fc). Cada Fab consta d'una cadena L completa i la part N-terminal d'una cadena H. El Fc consta de dos segments C-terminals idèntics de les dues cadenes H. El tractament de l'anticòs amb pepsina dona lloc a un $(Fab)_2$ i varis Fc; i si s'empra un agent reductor com el ditiotreitòl (DTT) o la mercaptoetilamina (2-MEA), s'obtenen dos Fab' idèntics, que contenen un grup sulfhidril de la regió frontissa. L'obtenció de fragments d'anticòs és útil per aplicacions com la preparació de fases estacionàries [189] i d'immunosensors pel diagnòstic i monitorització de diverses malalties [190], així com en el tractament d'altres malalties com el càncer, certes infeccions o intoxicacions, o desordres inflamatoris [191, 192].

Els anticossos són generats pels limfòcits B d'un organisme en resposta del sistema immune a la presència d'un cos estrany, anomenat antigen. Quan un limfòcit B reconeix un antigen, el limfòcit es clona donant lloc a multitud de cèl·lules plasmàtiques productores d'anticossos, que s'uniran als antígens marcant-los per a

que siguin destruïts per fagocitosi [187, 188]. La capacitat inductora de resposta immune d'un antigen es denomina poder immunogènic, i depèn de la diferència estructural amb les substàncies pròpies de l'organisme, i d'altres propietats com la massa molecular, tipus i estructura de la substància, via i dosi d'administració. La interacció entre un antigen i un anticòs és específica. La regió de l'antigen reconeguda per un anticòs s'anomena epítop. Cada antigen presenta diferents epítops o grups específics que poden interaccionar amb anticossos diferents. Per tant, davant d'un antigen, el sistema immune genera múltiples tipus d'anticossos, cadascun dels quals reconeixerà un epítop diferent de l'antigen.

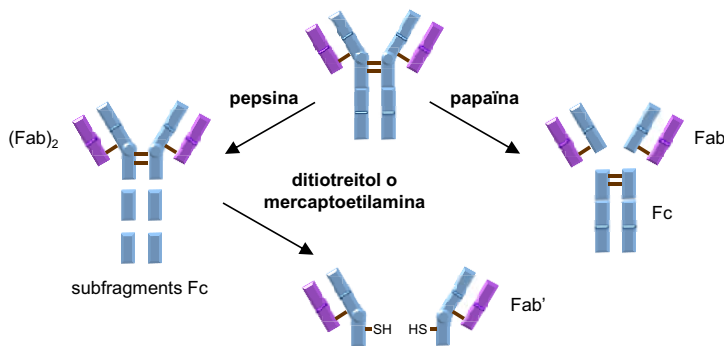


Figura 1.13. Esquema de l'obtenció típica de fragments d'anticòs.

La manera més freqüent d'obtenir anticossos és mitjançant la inoculació de l'antigen a un ésser viu, seguint protocols estandaritzats. El sèrum de l'ésser viu després d'immunitzar-lo, o sèrum post-immune, presenta un elevat nombre d'anticossos produïts per diferents clons de limfòcits B que han reconegut diferents epítops de l'antigen inoculat. Un cop purificat el sèrum, donarà lloc a un anticòs policlonal. Pel contrari, si s'aconsegueix aïllar un clon de limfòcit, els anticossos produïts reconeixeran un únic epítop de l'antigen i es denominen monoclonals, els quals són més específics però més cars i difícils de produir [193, 194]. A l'hora d'utilitzar els anticossos cal considerar la selectivitat de l'anticòs i la magnitud de l'afinitat d'aquest en vers l'antigen, ja que seran decisives per a l'èxit de l'aplicació pràctica, especialment quan s'analitzen substàncies amb estructures similars. En aquest cas, l'ús d'un anticòs policlonal podria ser més recomanable perquè permetria reconèixer diversos anàlits pertanyents a una mateixa família de compostos relacionats estructuralment, mentre que un anticòs monoclonal probablement reconeixeria menys anàlits.

Els anticossos i la interacció antigen-anticòs són la base del desenvolupament de diferents tècniques analítiques que es podrien denominar d'immunoafinitat, com per exemple la immunoprecipitació, els immunoassaigs enzimàtics (EIA, ELISA i RIA), el Western Blot o l'extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar (IA-SPE-CE).

Mètodes de preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat. Inmobilització d'anticòs o de fragments d'anticòs

A diferència de les fases estacionàries convencionals, és difícil trobar fases estacionàries d'immunoafinitat comercials amb els anticossos adequats i que estiguin preparades amb un suport sòlid de porositat i mida adients per a desenvolupar aplicacions concretes per IA-SPE-CE. Generalment, els propis investigadors posen a punt els protocols d'immobilització per enllaçar els anticossos o els seus fragments al suport sòlid, a partir dels procediments tradicionalment utilitzats en immunoassaigs o en IA-SPE. Aquests protocols han de ser reproduïbles i proporcionar fases estacionàries estables, selectives, amb poca retenció inespecífica i amb elevades recuperacions.

El suport sòlid més emprat en IA-SPE-CE és la sílice, per la seva reproductibilitat, bones propietats físiques, eficiència cromatogràfica i compatibilitat amb l'aplicació del camp elèctric per a la separació electroforètica [195]. Es comercialitzen cartutxos de SPE convencional amb partícules de sílice que contenen grups funcionals diversos (diols, amino, hidroxil, clorometil, carboxil, hidrazida, etc.), que constitueixen un excel·lent punt de partida per a la immobilització del lligand d'immunoafinitat. En general, abans de la immobilització pot ser necessari activar convenientment aquestes partícules de partida. Segons la interacció que s'estableix entre el lligand i la sílice, es diferencien quatre mètodes d'immobilització: mètodes basats en l'adsorció, mètodes d'immobilització covalent, IMAC i d'altres, com per exemple els monòlits. Les interaccions per enllaç químic covalent són les més adients perquè en general les fases estacionàries són més estables i permeten la utilització repetida dels preconcentradors sense un deteriorament significatiu de les prestacions del reblliment [195].

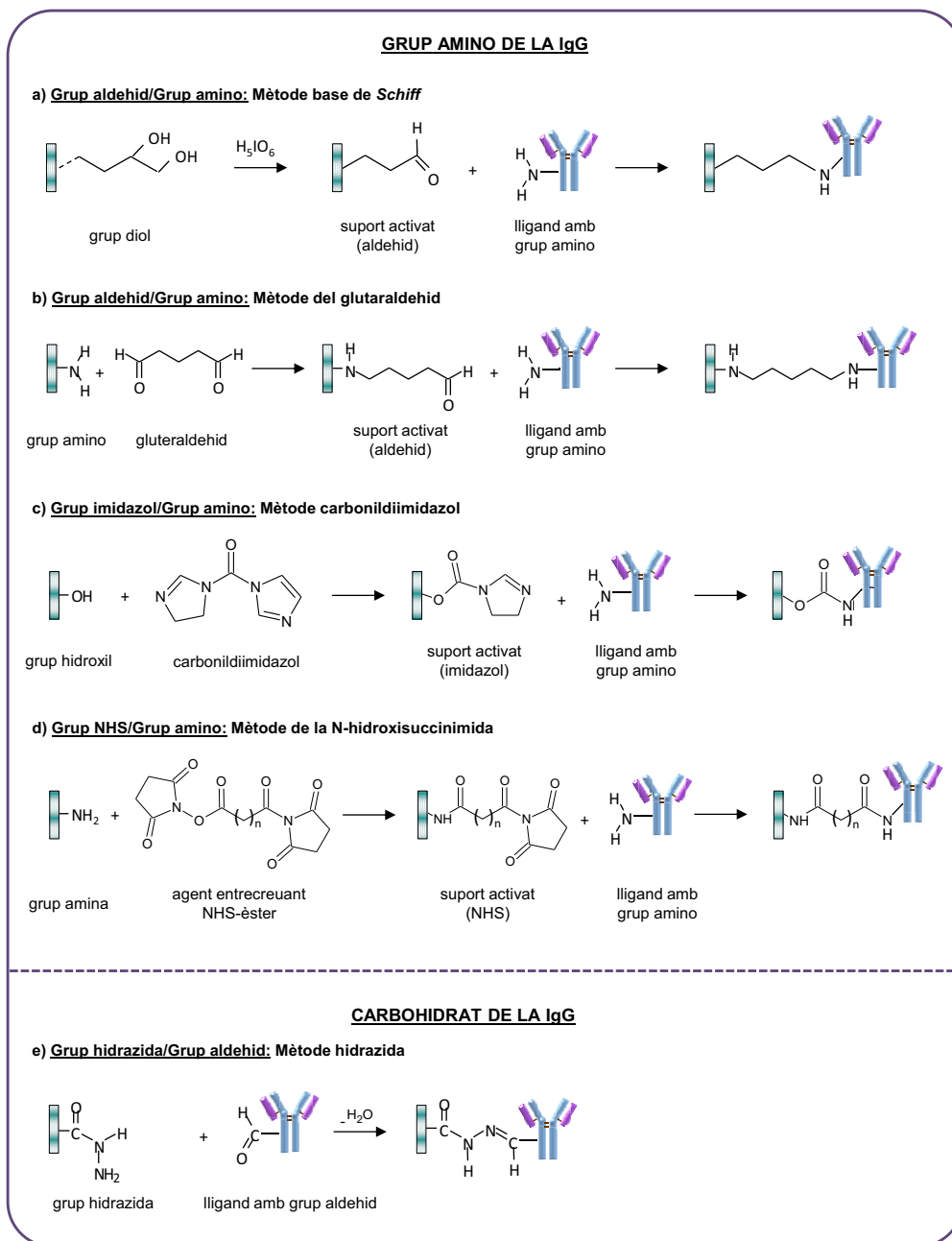


Figura 1.14. Reaccions d'acoblament amb enllaç covalent entre l'anticòs intacte i el suport de sílice activat més importants per a obtenir una fase estacionària d'immunoafinitat.

La manera més habitual d'immobilitzar covalentment l'anticòs és a través dels grups amino lliures de les cadenes H i L. En aquest cas, existeixen diversos mètodes segons quin grup funcional presenti la sílice activada: l'aminació reductiva o el mètode base de *Schiff* (sílice amb grups diol o epòxid), el mètode del glutaraldehid (sílice amb grups amino), el mètode carbonildiimidazol (CDI) (sílice amb grups hidroxil) i el mètode de la N-hidroxisuccinimida (NHS) (sílice amb grups hidroxil o amino) [195, 196]. Les reaccions d'acoblament corresponents es mostren a la figura 1.14 a-d.

En qualsevol cas, el mètode desenvolupat per a la immobilització de l'anticòs amb el suport ha d'evitar que cap grup funcional que intervingui en la interacció amb l'antigen estableixi un enllaç amb el suport (figura 1.15 a i b), i al mateix temps ha de conferir l'orientació apropiada per a facilitar la interacció antigen-anticòs (figura 1.15 c) [197]. A més, les condicions de pH, temperatura i força iònica de les anàlisis per IA-SPE-CE han de ser suaus per tal d'evitar la desnaturalització de l'anticòs o la pèrdua de la seva activitat biològica [189].

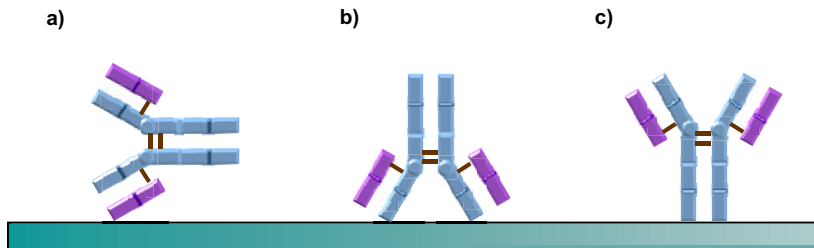


Figura 1.15. Possibles orientacions de l'anticòs intacte immobilitzat en el suport: a) orientació recomanable, només hi ha un lloc actiu disponible; b) orientació poc recomanable, els dos llocs actius no són funcionals; c) orientació òptima, els dos llocs actius són accessibles.

L'acoblament de l'anticòs mitjançant els grups amino lliures dels extrems de les cadenes H i L (figura 1.14 a-d) dona lloc a orientacions molt diverses (figura 1.15 a-c), de manera que els llocs actius poden no ser funcionals o la seva capacitat d'interacció es pot veure disminuïda per impediments estèrics. Per aquesta raó, s'han desenvolupat altres metodologies d'immobilització dels anticòs amb enllaç covalent que proporcionen una orientació més adequada per a la interacció amb l'anàlit. Entre aquestes destaca la que proposa l'acoblament a través dels carbohidrats de l'anticòs, presents només al Fc de la IgG, de manera que els llocs

actius queden sempre lliures a la superfície del suport (figura 1.15 c). La immobilització a través dels carbohidrats té lloc prèvia oxidació a grups aldehid que posteriorment es fan reaccionar amb un suport de sílice activat amb grups hidrazida o amino (figura 1.14 e) [195, 197].

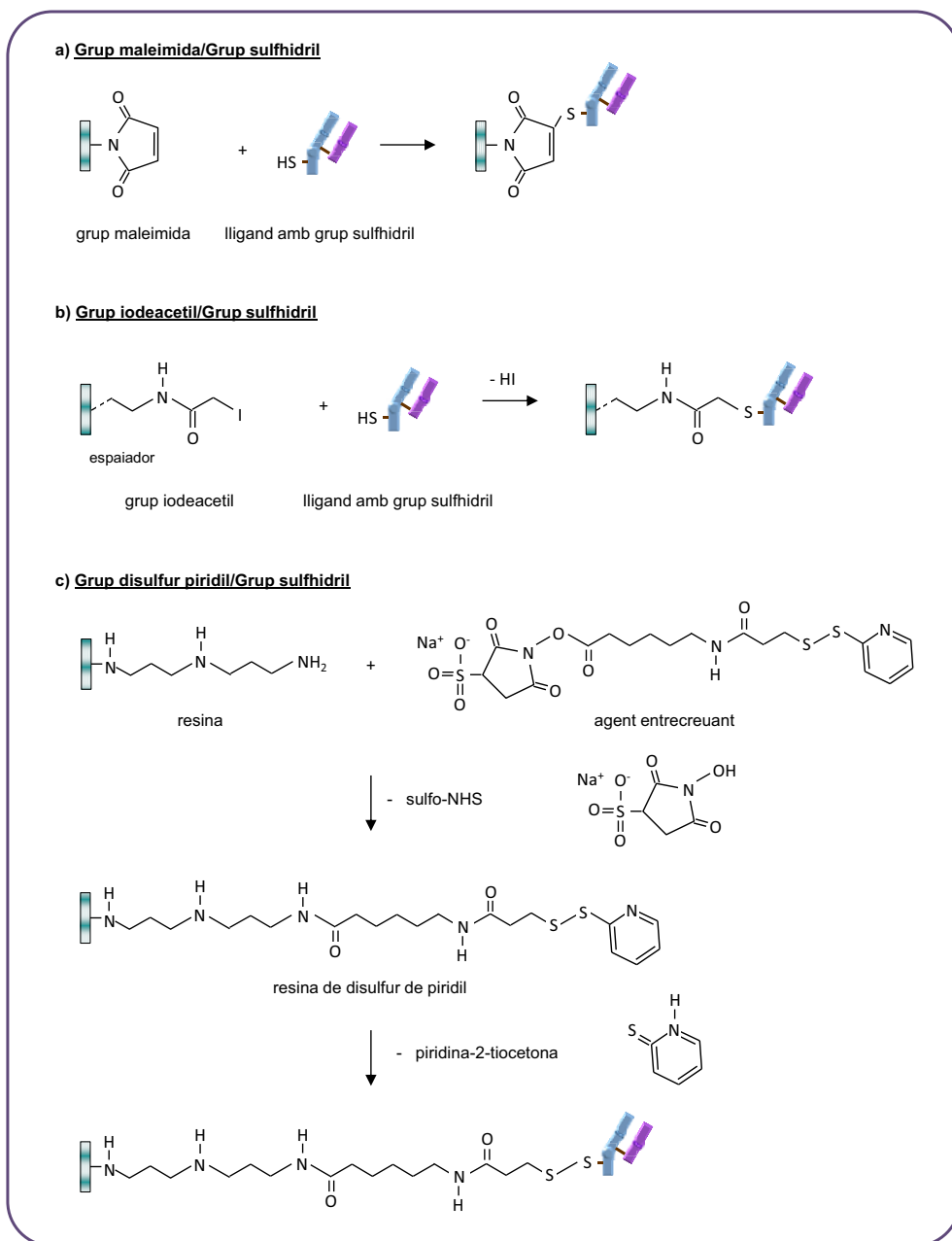


Figura 1.16. Reaccions d'acoblament amb enllaç covalent entre el fragment d'anticòs Fab' i el suport de sílice activat més importants per obtenir una fase estacionària d'immunoafinitat.

Una altra possibilitat a considerar consisteix en immobilitzar, en comptes d'un anticòs intacte, només un fragment que contingui el lloc actiu, prèvia fragmentació de l'anticòs (figura 1.13). La metodologia més emprada consisteix en unir els Fab' de la IgG a través dels grups sulfhidril. A la figura 1.16 es mostren les reaccions d'acoblament dels Fab' més comunes, de les quals la reacció entre el suport de sílice activat amb grups maleimida i el grup sulfhidril és la més habitual (figura 1.16 a).

Es creu que la immobilització de fragments d'anticòs a un suport sòlid proporciona un nombre superior de llocs actius per a la interacció antígen-anticòs i que millora l'impediment estèric, de manera que probablement l'àrea superficial d'immunoafinitat és major, el que milloraria les recuperacions de les extraccions [57, 197]. No obstant, fins l'actualitat no s'ha comparat el comportament d'una fase estacionària d'immunoafinitat amb un anticòs intacte amb els d'una altra amb fragments del mateix anticòs per a una mateixa aplicació analítica (veure capítols 3 i 4.2).

Extracció en fase sòlida d'immunoafinitat (IA-SPE)

L'extracció en fase sòlida d'immunoafinitat (IA-SPE) està basada en la interacció de tipus antígen-anticòs entre els lligands d'immunoafinitat de la fase estacionària i un o més anàlits diana. La IA-SPE permet aïllar i concentrar l'anàlit d'interès de manera molt selectiva, quan es troba a baixa concentració i dissolt en una matriu complexa com la dels fluids biològics. Tot i l'elevada selectivitat, quan s'analitzen aquests tipus de mostres és recomanable realitzar algun tipus de tractament de mostra previ (filtració, dilució, etc.) per evitar la saturació de la fase estacionària d'immunoafinitat dels preconcentradors [195].

L'extracció en fase sòlida d'immunoafinitat acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar (IA-SPE-CE) combina la selectivitat de les tècniques immunoquímiques amb el poder de resolució de la CE [198-200]. El funcionament és molt semblant al descrit per a SPE-CE amb fases estacionàries cromatogràfiques convencionals, però les diferents etapes s'han de dur a terme en presència de solucions que regulin la interacció antígen-anticòs, preservin la integritat de l'anticòs i s'adeqüin al

mètode d'anàlisi. Aquesta tècnica ofereix diversos avantatges respecte les tècniques immunoquímiques tradicionals, com l'ELISA o el Western Blot: fàcil automatització, purificació eficient dels anàlits d'interès, separació eficient i ràpida dels components retinguts, baix consum de reactius i mostres, i possibilitat de confirmar les substàncies detectades mitjançant l'acoblament en línia a l'espectrometria de masses i així disminuir el nombre de falsos positius [198, 200].

El potencial de la IA-SPE-CE ha estat àmpliament demostrat per a la preconcentració selectiva de compostos immunoreactius de baix pes molecular en fluids biològics i teixits emprant la detecció per UV i especialment per LIF [47, 59, 60, 98, 169, 184, 201]. Tot i així, les dificultats per compatibilitzar els requeriments de la IA-SPE-CE amb la detecció en línia per MS fan que l'ús de la IA-SPE-CE-MS no s'hagi explorat en profunditat [196, 197]. A la taula 1.4 s'indiquen les aplicacions d'IA-SPE-CE-MS que s'han descrit fins l'actualitat [57, 58, 202] (algunes es descriuen als capítols 3 i 4.2).

Taula 1.4. Aplicacions d'IA-SPE-CE-MS descrites fins l'actualitat a la bibliografia.

IA-SPE-CE-MS						
Anàlit	Mostra	Configuració SPE	Fase estacionària	Analitzador	LOD	[Ref.]
Hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH)	sèrum i orina	Microcartutx amb <i>frits</i>	Fab' d'IgG monoclonal units a partícules de sílice	Q	1 ng·mL ⁻¹	[57]
pèptids EPO (77–97) i NESP (77–97)	Patrons i digestos amb tripsina	Microcartutx amb <i>frits</i>	IgG policlonal unida a suport sòlid de CNBr-Sefarosa	IT	25 mg·L ⁻¹	[58]

1.4.2. Preconcentració electroforètica en línia

Els mètodes de preconcentració electroforètics, comunament coneguts com mètodes d'enfocament o apilament (*focusing* o *stacking*), modifiquen la velocitat de migració dels anàlits en diferents zones del capil·lar de separació per preconcentrar-los en regions estretes [203]. Aquests canvis en la velocitat de migració dels anàlits són deguts principalment a diferències entre les propietats de la mostra i del BGE, com la conductivitat elèctrica o la força iònica, l'addició d'additius que poden establir interaccions amb els anàlits o modificar el flux electroosmòtic i el valor de pH. Depenent del mecanisme que té lloc es diferencien bàsicament quatre tipus de mètodes de preconcentració: l'enfocament de mostra (*sample stacking*), la isotacoforesi (ITP), la junció dinàmica de pH (*dynamic pH junction*) i el *sweeping* [127].

El principal desavantatge d'aquests mètodes és la limitació de la quantitat de mostra introduïda abans de la preconcentració, ja que si s'introdueix hidrodinàmicament, és a dir, per pressió, no pot sobrepassar el volum total del capil·lar de separació. Aquest inconvenient es pot superar mitjançant la introducció electrocinètica. D'aquesta manera els anàlits s'introdueixen al capil·lar en funció de la seva mobilitat electroforètica i de l'EOF, però llavors es discrimina entre els ions dels diferents anàlits i les quantitats injectades són més sensibles a diferències en la matriu de la mostra [204].

Els factors de preconcentració que s'aconsegueixen mitjançant les tècniques electroforètiques són molt variats depenent dels anàlits, de la matriu de la mostra, del sistema de detecció i evidentment, del mètode de preconcentració emprat. En el cas dels pèptids i les proteïnes, en condicions ideals els factors de preconcentració poden arribar a ser de l'ordre de mil vegades mitjançant alguns dels mètodes d'enfocament de mostra, com el *field-amplified sample stacking* (FASS) i el *field-amplified sample injection* (FASI), la ITP i la junció dinàmica de pH, mentre que mitjançant altres mètodes d'enfocament de mostra, com el *large-volume sample stacking* (LVSS), únicament s'aconsegueixen preconcentrar entre 10 i 100 vegades [51, 124, 125, 127].

1.4.2.1. *Sample stacking*

Els mètodes de *sample stacking* es basen en el fet de que la velocitat de migració dels anàlits en CE és directament proporcional a la seva mobilitat i a la intensitat del camp elèctric. De manera que si la conductivitat de la solució de mostra és menor que la del BGE, la intensitat del camp elèctric en la solució de mostra serà major i consegüentment, els anàlits migraran més ràpidament i s'enfocaran en la regió fronterera entre la solució de mostra i el BGE, mentre es produeix la separació electroforètica [51, 127, 129]. L'enfocament dels anàlits provoca un augment de l'alçada i una disminució de l'amplada dels pics electroforètics i permet millorar els LOD. Per tal d'aconseguir els millors resultats, és recomanable que la solució de mostra contingui una elevada quantitat de solvent orgànic, que disminueix la conductivitat, però aquestes condicions poden afavorir la precipitació d'alguns dels components de la mostra, com les sals i les proteïnes. Per tant, l'aplicació d'aquests mètodes a l'anàlisi de mostres biològiques és limitada. El mètode de preconcentració electroforètic més simple basat en aquest mecanisme d'enfocament és el FASS [51, 123].

Els mètodes de *field-amplified injection* (FAI) també es basen en la diferent velocitat de migració dels anàlits en la solució de mostra i en el BGE, però a diferència dels mètodes anteriors en que l'enfocament esdevé quan s'aplica el voltatge de separació, en FAI, el procés d'enfocament s'inicia quan la mostra s'ha introduït parcialment i de forma electrocinètica en el capil·lar de separació [51, 127, 129]. D'aquesta manera és possible introduir més quantitat d'anàlit i generalment, els factors de preconcentració són millors. Els desavantatges més importants dels mètodes FAI són la influència de la matriu en la conductivitat i la discriminació dels anàlits durant la injecció electrocinètica. Aquests mètodes rarament s'empren per a l'anàlisi de compostos en mostres biològiques [18, 123]. La variant més comuna és el *field-amplified sample injection* (FASI) [51, 123].

1.4.2.2. *Isotacoforesi* (ITP)

La ITP és una eina de preconcentració en línia particularment útil per a l'anàlisi de mostres biològiques, les quals tenen un elevat contingut en sals, perquè permet

concentrar traces d'anàlits en presència dels components més abundants d'una matriu complexa [18, 123]. A més, és més fàcil de compatibilitzar amb la detecció per MS [205].

En ITP, la mostra es posiciona entre una solució d'electròlit inicial (*leading electrolyte*, LE) i una solució d'electròlit terminal (*terminating electrolyte*, TE), les quals contenen, respectivament, ions amb mobilitats electroforètiques superiors i inferiors a la dels anàlits. Quan s'aplica voltatge, es crea un camp elèctric no uniforme, i com a conseqüència, els anàlits es separen en bandes estretes en ordre decreixent de mobilitat electroforètica. Els anàlits que s'endarrereixen fins a la zona de l'electròlit terminal, s'acceleraran i els anàlits que migrin en la zona de l'electròlit inicial, es desacceleraran. Aquest fenomen sovint també rep el nom d'**isotacoforesi transitòria** (tITP) quan precedeix a una separació per CE [49, 51, 123, 125, 127, 203, 206-208]. Quan el procés s'estabilitza, els ions inicials, els anàlits i els ions terminals es mouen a la mateixa velocitat [49, 123-125].

L'èxit de la tITP depèn principalment de la composició dels electròlits i de les condicions d'injecció d'aquestes solucions. Els ions que contenen els electròlits inicial i terminal es seleccionen en funció dels anàlits per tal de complir els requeriments de mobilitat electroforètica. A més, si s'utilitza la detecció en línia per espectrometria de masses, aquestes solucions han de ser volàtils. Generalment, com a electròlit inicial s'utilitza una solució d'amoníac i com a electròlit terminal, el propi BGE o una solució d'àcid acètic o d'àcid fòrmic. També, es poden afegir modificadors orgànics com acetonitril o metanol. La concentració de l'electròlit inicial és especialment important, ja que la quantitat d'ions d'aquesta solució determina la longitud durant la qual tindrà lloc la isotacoforesi. Quan més concentrada sigui aquesta solució o més volum s'injecti, la mostra es concentrarà més però es disposarà de menys temps per a la separació electroforètica [209].

1.4.2.3. Junció dinàmica de pH

La junció dinàmica de pH és un mètode de preconcentració en línia per a espècies dèbilment iòniques. Consisteix en crear una zona fronterera entre la mostra i el BGE, en la que hi ha una discontinuïtat en el pH, de manera que quan les espècies

ióniques travessen aquesta zona, es produeix un canvi en el seu estat d'ionització que indueix un canvi en la mobilitat electroforètica dels anàlits. Com a resultat d'aquest canvi, els anàlits s'enfoquen en la zona fronterera [123, 125].

1.4.2.4. *Sweeping*

El *sweeping* és un mètode de preconcentració adequat per a espècies carregades, però sobretot per a espècies neutres. Es basa en la interacció entre un additiu, que generalment és una fase pseudo-estacionària o un agent complexant, en el BGE i els anàlits presents en la mostra que no conté l'additiu. L'additiu més comú és el dodecilsulfat de sodi (SDS). La interacció additiu-anàlit, sovint de partició cromatogràfica o de complexació, es veu afavorida per l'electroforesi i causa l'enfocament dels anàlits. El nivell d'enfocament depèn de la força de la interacció involucrada [123]. Tot i que l'enfocament resultant del *sweeping* és independent de l'EOF, a vegades els anàlits arriben al detector conduïts per l'EOF abans de que la preconcentració hagi finalitzat. Per tal de disminuir l'EOF, s'acostuma a emprar un BGE amb un valor de pH molt baix [126].

1.4.3. Combinació de mètodes de preconcentració

La combinació de dos o més mètodes de preconcentració pot resultar d'utilitat per a millorar encara més els LOD de la CE [125, 126, 208].

Una de les primeres combinacions de dos mètodes va involucrar el FASI i el *sweeping*, i permetia augmentar la quantitat de mostra injectada i al mateix temps enfocar els anàlits, aconseguint una disminució dels LOD de milers de vegades [210]. Aquest mètode s'aplica a compostos bàsics amb micel·les de SDS com a fase pseudoestacionària en condicions àcides o bé, a compostos àcids amb surfactants catiónics com el clorur de cetiltrimetilamoni emprant capil·lars recoberts per a suprimir l'EOF [211]. Des d'aleshores, s'han descrit combinacions del *sweeping* amb altres mètodes de preconcentració electroforètica (LVSS, junció de pH dinàmic, etc.) [123, 126]. De la mateixa manera, la ITP s'ha combinat amb, per

exemple, el FASI originant l'anomenat *electrokinetic supercharging* (EKS), que ha permès aconseguir millores de 3000 vegades dels LOD [208, 212].

Tot i que algunes de les combinacions anteriors permeten incrementar el volum de mostra analitzat, aquest generalment està limitat per la longitud total del capil·lar de separació. Aquest inconvenient es pot superar combinant la tITP amb un mètode de preconcentració no electroforètic, com la SPE-CE.

En SPE-CE, la quantitat de mostra que es pot introduir és considerablement superior al de les tècniques de preconcentració electroforètiques, perquè els anàlits de la mostra es retenen en la fase estacionària que conté el preconcentrador i la separació electroforètica es produeix després d'haver eluït aquests anàlits en un volum molt inferior d'una solució adequada. L'única limitació pel que fa al volum de mostra a introduir ve marcada pel volum de ruptura que no es pot sobrepassar. Aquest volum és el volum de mostra a partir del qual s'elueixen quantitativament els anàlits que han quedat retinguts a la fase estacionària i és, juntament amb el nombre de llocs actius del preconcentrador, el principal causant de que els LOD no puguin ser disminuïts infinitament [166]. La tITP és una de les tècniques de preconcentració electroforètiques més fàcils de combinar amb la SPE-CE, ja que únicament s'ha d'injectar l'electròlit inicial i l'electròlit terminal, abans i després, respectivament, de la solució que conté els anàlits. A més, permet emprar l'espectrometria de masses com a sistema de detecció. El potencial de la combinació de la tITP amb la SPE-CE amb deteccions UV i LIF ha estat avaluat per diversos autors [49, 52, 53, 204, 209, 213]. En canvi, les aplicacions descrites emprant l'espectròmetre de masses com a detector (SPE-tITP-CE-MS) són poc nombroses (veure capítols 2 i 4.1). Tomlinson et al han estudiat extensament la combinació de la tITP amb la preconcentració mitjançant una membrana acoblada en línia amb l'electroforesi capil·lar amb detecció per espectrometria de masses (mPC-tITP-CE-MS) amb una interfase de CE-MS amb líquid auxiliar [52, 53]. Recentment, Wang et al han descrit una metodologia per a SPE-tITP-CE-MS emprant una interfase de CE-MS sense líquid auxiliar [183].

1.5. Tendències actuals i futures

Tan a l'actualitat com en un futur pròxim, la recerca en l'anàlisi de pèptids i proteïnes en fluids biològics continuarà estant dirigida a la millora dels límits de detecció i de la fiabilitat de la informació estructural facilitada per les tècniques emprades. Això engloba el tractament de les mostres biològiques, les separacions de mescles complexes i la detecció.

Pel que fa al tractament de les mostres, es continuaran dedicant esforços per minimitzar la manipulació humana emprant tècniques automatitzades que permetin obtenir mostres purificades amb la màxima recuperació dels anàlits d'interès. Es desenvoluparan noves tècniques de tractament de mostra que al mateix temps que preconcentraran els anàlits, reduiran les interferències de la matriu biològica. En aquest sentit, la SPE-CE ha demostrat ser una opció amb àmplies perspectives de futur. La construcció de nous dissenys de preconcentradors que permetin extraccions més eficients i l'ús de fases estacionaries amb més capacitat d'extracció, selectivitat i eficiència incrementaran les possibilitats d'aquesta tècnica i faran possible la combinació amb altres tècniques de preconcentració, cromatogràfiques o electroforètiques. La miniaturització dels sistemes de preconcentració i separació, pels avantatges que comporta, serà explorada en profunditat. Avui en dia, aquests nous dispositius basats en sistemes miniaturitzats, tipus microxips, s'estan convertint en una excel·lent plataforma per a desenvolupar aplicacions analítiques ràpides i eficaces. D'altra banda, la preparació de fases estacionaries d'immunoafinitat és un camp amb un ampli ventall de possibilitats relacionades amb la sensibilitat i la selectivitat que encara resta per desenvolupar [214, 215].

Per últim, es continuaran realitzant esforços per a millorar les prestacions dels detectors, especialment les dels espectròmetres de masses amb les corresponents interfases d'acoblament, i així millorar la seva sensibilitat i selectivitat [165, 216]. Aquesta millora pot implicar avenços en el hardware dels detectors, el disseny d'interfases de nanoESI per CE-MS més robustes o bé, el desenvolupament d'eines (p.e. derivatitzacions selectives de determinats grups funcionals), que permetin millorar les propietats d'interès pel tipus de detecció emprat, com per exemple la

intensitat de fluorescència o l'eficiència de la ionització en espectrometria de masses.

Capítol 2. Anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE amb fases estacionàries cromatogràfiques convencionals

El desenvolupament de metodologies de purificació, separació i caracterització de pèptids i proteïnes que puguin ser emprats com a biomarcadors de processos fisiològics o patològics presenta un gran interès farmacològic i biomèdic. En aquest sentit, una de les famílies de neuropèptids més conegudes, els pèptids opiacis, s'utilitzen com a biomarcadors de certes patologies associades amb síndromes de dolor crònic, com ara la fibromiàlgia.

Les principals dificultats que es plantegen a l'hora d'establir aquestes metodologies són degudes a la disponibilitat de volums petits de mostra, la baixa concentració a la que es troben els pèptids d'interès i l'extrema complexitat de les matrius biològiques, per exemple, plasma, orina i líquid cerebrospinal (CSF). La CE és una tècnica de separació que permet obtenir excel·lents resultats en l'anàlisi de pèptids i proteïnes, però que no permet detectar concentracions molt petites. Com s'ha indicat en la introducció, s'han descrit diferents estratègies per a disminuir els LOD en CE i la SPE-CE és una de les millors alternatives. A més, si després de la preconcentració per SPE, les condicions de separació electroforètica són adequades i s'utilitza un detector d'espectrometria de masses (SPE-CE-MS), els anàlisis d'interès es podran separar de la resta de substàncies que hagin pogut quedar retingudes en el preconcentrador i identificar-les d'acord a les seves masses moleculars. La SPE-CE-MS es troba, encara avui en dia, en fase de recerca i desenvolupament per tal d'aprofitar tot el seu potencial.

En aquesta tesi doctoral s'han desenvolupat metodologies de SPE-CE-MS per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de plasma humà i CSF. S'ha avaluat l'ús de diverses fases estacionàries cromatogràfiques convencionals i comercials, a més de diverses configuracions de preconcentradors, incloent configuracions innovadores. També, s'ha explorat la possibilitat de combinar la tITP, un mètode de preconcentració electroforètic, amb la SPE-CE-MS, per a millorar els factors de preconcentració d'ambdues tècniques per separat. Paral·lelament, s'han investigat noves metodologies pel tractament de les mostres de fluids biològics com a pas previ abans de l'anàlisi per SPE-CE. Pel que fa a la detecció, s'han avaluat les prestacions dels espectròmetres de masses amb analitzadors de trampa d'ions (IT) i de temps de vol (TOF) emprant interfases d'ESI per CE-MS amb i sense líquid auxiliar.

El treball realitzat ha conduït a les següents publicacions:

- **Article 2.1.** Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE. Fernando Benavente, Silvia Medina-Casanellas, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot. *Journal of Separation Science* 2010, 33, 1294–1304.
- **Article 2.2.** Transient isotachopheresis in on-line solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry for peptide analysis in human plasma. Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot. *Electrophoresis* 2011, 32, 1750–1759.
- **Article 2.3.** Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid. Silvia Medina-Casanellas, Yvonne H. Tak, Fernando Benavente, Victoria Sanz-Nebot, Javier Sastre Toraño, Govert W. Somsen, Gerhardus J. de Jong. *Electrophoresis* 2013, en viat.
- **Article 2.4.** Lowering the limits of detection of opioid peptides at the picomolar level by fritless solid-phase extraction coupled on-line to sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry. Silvia Medina-Casanellas, Elena Domínguez-Vega, Fernando Benavente, Victoria Sanz-Nebot, Govert W. Somsen, Gerhardus J. de Jong. *Journal of Chromatography A* 2013, en viat.

Fernando Benavente
Silvia Medina-Casanellas
José Barbosa
Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical
Chemistry, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Received October 15, 2009
Revised January 13, 2010
Accepted January 13, 2010

Research Article

Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE

In this study, we investigated the performance of several commercial sorbents (Sep-pack[®] C18, ¹C18, C8 and ¹C2, Oasis[®] HLB, Isolute[®] ENV+, Strata[™]-X and Oasis[®] MCX) for the determination of opioid peptides by solid-phase extraction coupled on-line to capillary electrophoresis (SPE-CE). First, standard solutions were analyzed in order to achieve the lowest LOD and the best electrophoretic separations using UV detection. The best results were obtained using C18, C8 and ¹C2 sorbents, which were examined for the analysis of spiked human plasma samples. A double-step sample clean-up pretreatment, which consisted of precipitation with acetonitrile and filtration, was needed to prevent saturation of the on-line SPE microcartridge. The filtration step was critical to obtain optimum analyte recovery and to clean up the sample matrix. A range of centrifugal filters and filtration conditions were tested and the recoveries of the sample pretreatment were evaluated by CE-ESI-MS. The LODs attained through SPE-CE-UV were approximately ten-fold better with C18 than with C8 and ¹C2. The 0.1 µg/mL LODs achieved by C18-SPE-CE-UV were further improved until we could detect 1 ng/mL concentrations of opioid peptides in plasma samples by C18-SPE-CE-ESI-MS, due to the outstanding selectivity of the MS detection.

Keywords: MS / Neuropeptides / On-line / Preconcentration / Plasma / UV
DOI 10.1002/jssc.200900669

1 Introduction

CE is a versatile, high-performance separation technique with many desirable characteristics including instrumental simplicity, fully automation, high efficiency, low consumption of sample and reagents and reduced analysis times. However, like many other microanalytical techniques, it has poor concentration sensitivity for most analytes, from low molecular mass compounds to polymers such as proteins [1–5]. Several strategies have been proposed to improve CE sensitivity [6–11]. Today, SPE-CE is becoming widely recognized as a powerful approach that overcomes this major drawback [8–11]. In SPE-CE [9–15], a microcartridge placed near the inlet of the separation capillary contains a sorbent, which selectively retains the target analyte and thus enables large volumes of sample to be introduced. The retained analyte is eluted in a small volume of an appropriate solution, which results in sample clean-up and concentration enhancement with minimum sample handling.

Many drawbacks need to be addressed before SPE-CE can be routinely used to analyze low-abundance analytes in complex samples. For example, it is difficult to select a sorbent for optimum performance in SPE-CE, due to the reduced dimensions of the microcartridges and the fact that the extraction is undertaken on-line with the electrophoretic separation [8, 9, 12–15]. In SPE, selectivity is mainly governed by the specific affinity of the sorbent to the target analyte, while sorbent capacity also depends on the number of active sites available for the extraction [16]. Reversed phase, ionic exchange, size-exclusion, molecular imprinted polymers, antibodies or lectin-based sorbents that are commonly developed for SPE or affinity chromatography can also be applied to SPE-CE [8–15]. However, in SPE-CE, highly selective sorbents with good extraction capacities are essential, due to the reduced dimensions of the microcartridges. Furthermore, the porosity of the sorbent, the material used for the sorbent core and its particle size help to ensure maximum active surface area and to guarantee optimum current stability during the electrophoretic separations [8, 9, 12–15].

Currently, the silica-based sorbents typically used in SPE fulfill most of the requirements for SPE-CE. They provide a large active surface area, but do not interfere with the on-line electrophoretic separations [8, 10–14]. Furthermore, they are commercially available, have been extensively used in the analysis of different compounds and can be purchased at a reasonable price. However, the major drawback is their

Correspondence: Dr. Fernando Benavente, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain
E-mail: fbenavente@ub.edu
Fax: +34-934021233

Abbreviations: BPE, base peak electropherograms; NaOH, sodium hydroxide; XIE, extracted ion electropherograms

limited selectivity, which precludes the direct analysis of complex samples. In such cases, a previous clean-up pretreatment, which can be more or less sophisticated [17–19], is required to isolate and enrich the target analytes in order to prevent microcartridge saturation [10, 11, 13, 14].

In this study, several typical chromatographic sorbents are investigated for the analysis of opioid peptides in human plasma by SPE-CE. Endogenous opioid peptides are an important group of neuropeptides that play a major role in nociception. Furthermore, they are supposed to be related to a wide range of behavioral and physiological states, several neurological disorders and human pituitary tumors [20–24]. The challenge is their low concentration in the different body fluids and tissues (usually 1000–1 pg/mL for the neuropeptides that are typically measured in different body fluids and tissues [9, 15, 20–24]). A simple double-step sample clean-up pretreatment that consists of precipitation with acetonitrile and filtration is investigated to prevent the saturation of on-line SPE microcartridges [13, 25–27]. A range of centrifugal filters and filtration conditions are tested and the optimum conditions of sample pretreatment are established. Finally, the LOD by SPE-CE-UV and SPE-CE-ESI-MS are evaluated. The results highlight the need of off-line sample pretreatments, the limitations of the typical chromatographic sorbents for SPE-CE and the convenience of highly sensitive and selective detectors, to analyze low-abundance components of complex biological samples when using these sorbents of limited selectivity for SPE-CE.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All the chemicals used in the preparation of buffers and solutions were analytical reagent grade. Acetonitrile, methanol, isopropanol, formic acid (HFor) (98–100%), acetic acid (HAc) (glacial), ammonia (25%), hydrochloric acid (25%), disodium hydrogenphosphate, sodium dihydrogenphosphate, sodium chloride, potassium dihydrogenphosphate, potassium chloride and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, 573.23 Da, Met), endomorphin 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 610.29 Da, End) and BSA were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). Dynorphin A (1-7) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 867.47 Da, DynA) was supplied by Bachem (Bubendorf, Switzerland). PEG 8000 and Tween[®] 20 were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Water with conductivity lower than 0.05 µS/cm was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

2.2 Electrolyte, sheath liquid and standard solutions

An aqueous standard solution (2500 mg/L) of each peptide was prepared and stored in a freezer at –20°C when not in

use. Working standard solutions containing all the opioid peptides at different concentrations were obtained by mixing and diluting with Milli-Q water. These mixtures were used to spike human plasma samples in order to obtain fortified samples for the CE and SPE-CE experiments. The BGE for the separation contained 50 mM of acetic acid and 50 mM of formic acid and was adjusted to pH 3.5 with ammonia. The sheath liquid solution for CE-ESI-MS experiments consisted of a hydroorganic mixture of 60:40 v/v isopropanol/water, with 0.05% v/v of formic acid. All solutions were passed through a 0.45 µm nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA) before analysis and were stored at 4°C when not in use. The sheath liquid was degassed for 15 min by sonication before use.

Solutions of 1% w/v of BSA in PBS (0.011 M disodium hydrogenphosphate, 0.0015 M potassium dihydrogenphosphate, 0.14 M sodium chloride, 0.0027 M potassium chloride, pH 7.2), 5% v/v of PEG in water and 5% v/v of Tween[®] 20 in water were used to passivate the centrifugal filters.

2.3 Human plasma and sample preparation

Human plasma samples from healthy blood donors were kindly supplied by the *Banc de Sang i Teixits* (Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona). Venous blood was collected from 16 volunteers in standard clinical vials and placed on ice. Plasma was separated from the blood cells, pooled, placed into polyethylene tubes and frozen at –20°C.

Different aliquots of the frozen plasma were thawed at room temperature. An appropriate amount of the standard peptide mixture was added to each aliquot and was vortexed thoroughly in order to prepare spiked samples at concentrations ranging from 100 µg/mL to 0.1 ng/mL. The concentration of the peptides in the standard mixtures was sufficient to avoid excessive dilution of the plasma matrix. The plasma samples were pretreated off-line, in order to eliminate salts and high molecular mass compounds (e.g. proteins) before the CE or SPE-CE analysis. The sample pretreatment consisted of precipitation with acetonitrile followed by filtration [13, 17, 25–30]. For the precipitation with acetonitrile, 1200 µL of cold solvent were added to 200 µL of the plasma sample. The mixture was then vortexed for 30 s and kept at –20°C for 1 h. The supernatant was collected after centrifugation of the mixture at 3000 rpm for 8 min. The solid residue was rinsed with 100 µL of acetonitrile. After centrifugation of the mixture at 4000 rpm for 8 min, the supernatant was pooled with the first one. Finally, the micropipette tip used to deliver the supernatants was rinsed with 100 µL of acetonitrile and the washing volume was collected. The pooled solution was evaporated to dryness at room temperature under a stream of air, and the solid residue was reconstituted with 100 µL of water. The reconstituted sample was subjected to centrifugal filtration. Several types of centrifugal filters with different membrane types and pore sizes were investigated for microfiltration or

ultrafiltration [28–30]. Costar[®] Spin-X[®], 0.22 μm nylon filters (Corning B.V., Schipol-Rijk, The Netherlands) and VectaSpin[™] Micro, 0.2 μm polysulphone and 0.02 μm Anopore[®] aluminum oxide filters (Whatman, Kent, UK) were used for the microfiltration. Amicon centrifugal devices of 3, 10 and 30 kDa cut-off cellulose acetate filters (YM-3, YM-10 and YM-30, respectively) (Millipore, Billerica, MA, USA) and VectaSpin[™] Micro 12 kDa cut-off cellulose acetate filters (Whatman) were used for ultrafiltration. All the centrifugation steps were performed at a centrifugal force of 12 000 rpm and at room temperature unless otherwise indicated. First, the filter was washed with Milli-Q water for 15 min and the filtrate was discarded. Then, the reconstituted sample was centrifuged for 10 min. The filtration residue was washed three times for 10, 10 and 8 min with 50 μL of water. In all cases, the filtrates were pooled together and sufficient water was added until the final volume was adjusted to 200 μL .

The recovery for each peptide was estimated from a comparison of the peak areas obtained by CE-ESI-MS for a plasma sample spiked at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ before and after the whole off-line clean-up procedure. The recovery of the first step was obtained in the same way. For the calculations, 100% recovery was considered for the plasma samples spiked after the sample pretreatment.

The YM-3 centrifugal devices were passivated with BSA following the manufacturer's instructions [31]. A volume of 500 μL of the passivation solution was pipetted into the reservoir of the centrifugal device, capped and allowed to stand 24 h at room temperature. The reservoirs were uncapped and rinsed thoroughly with tap water. A quantity of 500 μL of distilled water was added to remove any residual, and the centrifuge was then spun to dead stop (30 min at 12 000 rpm). The remaining water was eliminated by inverting the reservoir in a vial and spinning once more at a reduced centrifugal force (2 min at 2000 rpm).

2.4 Apparatus and procedures

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer and a Crison electrode 52-03 (Crison Instruments, Barcelona, Spain). Centrifugal filtration procedures at room temperature were carried out in a 5417R centrifuge (Eppendorf Ibérica, Madrid, Spain). Centrifugal filtration procedures at 5°C were carried out in an Avanti TM J-25 centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

2.4.1 CE-UV

CE-UV experiments were performed in an Agilent technologies HP^{3D}CE system (Waldbronn, Germany) with a diode-array detector. A 57 cm \times 75 μm id fused-silica capillary supplied by Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) was inserted into the capillary cartridge and thermostated to 25°C. All capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). New capillaries were activated by flushing for

20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 15 min with water and 30 min with the separation electrolyte. Between days or after a change of buffer, the capillary was conditioned by rinsing it successively for 2 min with water, 2 min with 0.1 M aqueous NaOH, 5 min with water and 10 min with running buffer. In both activation and conditioning methods, a 25 kV voltage was applied for 15 min after the last flush with the buffer. Between runs, the capillary was successively rinsed for 1 min with 0.1 M aqueous NaOH, for 1 min with water and finally for 1 min with running buffer. Samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 3 s and the separation was conducted under normal polarity (cathode in the outlet) by applying a voltage of 17 kV. The UV window was placed 48.5 cm from the inlet of the capillary and the detection was undertaken at 214 nm. The capillary was stored overnight filled with working buffer electrolyte. For longer storage periods, it was rinsed for 10 min with water and for 5 min with air to avoid salt crystallization.

2.4.2 CE-ESI-MS

For the CE-ESI-MS experiments, a MSD IT mass spectrometer (Agilent Technologies) was coupled to the HP^{3D}CE system using an electrospray G1603A sprayer as a sheath flow CE-ESI-MS interface (Agilent Technologies) [13, 32, 33]. A 57 cm $L_T \times 75 \mu\text{m}$ id \times 360 μm od bare fused-silica capillary was used for the electrophoretic separations. All capillary rinses were performed at 930 mbar, and the duration of the different steps was twice that used in the CE-UV experiments. Both activation and conditioning procedures were performed off-line in order to avoid the unnecessary entrance of NaOH into the MS system. Samples were hydrodynamically injected at 33.5 mbar for 3 s. Analyses were carried out at 25°C under normal polarity. A separation voltage of 17 kV was employed for the electrophoretic separations, while the ESI potential was applied in the MS entrance. A sheath liquid of 60:40 v/v 2-propanol/water containing 0.05% v/v of HFor resulted in optimum detection sensitivity in positive ion mode. The sheath liquid was delivered by an infusion pump KD Scientific 100 Series (Holliston, MA, USA) at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. The parameters that affect the coupling of CE and MS instruments have been discussed in detail elsewhere, as has the automatic tuning of the mass spectrometer parameters for the analysis of neuropeptides [32, 33]. Full scan mass spectra were acquired in the m/z range from 250 to 1250, as the average of every seven spectra (speed = m/z 5500/s). The ESI voltage was set at 4000 V in the MS entrance. Voltages on the capillary exit and skimmer were 150 and 50 V, respectively. Octopole voltages were set at 15.41 and 3.34 V and the octopole radiofrequency was 267.21 Vpp. The lense voltages were –11.32 and –100 V and the trap drive value was 70.41 (arbitrary units). Nebulizer gas (N_2) pressure was 7 psi, the drying gas (N_2) flow rate was 2 L/min and the drying temperature was set at 300°C. Instrument control, data acquisition and data processing

were performed using CE/MSD Trap Software (Agilent Technologies). Between runs, the capillary was rinsed for 3 min with separation buffer. The capillary was filled with working buffer electrolyte when it was stored overnight. For longer storage periods, it was rinsed for 10 min with water and for 5 min with air to avoid salt crystallization.

2.4.3 SPE-CE

2.4.3.1 Construction of an SPE microcartridge

The construction of the SPE microcartridge or analyte concentrator was carried out as described elsewhere using sorbents from commercial SPE cartridges with different chemical properties: Silica-based (C18, ¹C18, C8 and ¹C2), polymeric (HLB, ENV+ and Strata-X) and a polymeric sorbent with strong cation exchange groups (mixed-mode cation exchange, MCX) [12–14, 32]. For SPE-CE-UV, a 57 cm $L_T \times 75 \mu\text{m id} \times 360 \mu\text{m od}$ fused-silica capillary was prepared and activated as described above. It was cut into two pieces of 7.5 and 48.8 cm in order to insert the microcartridge. The fabrication process was monitored under a stereomicroscope. A polyethylene frit (0.1 cm), obtained from a small fragment of the original filters found in the commercial SPE cartridges, *i.e.* a small piece of bare fused-silica capillary (7 mm $L_T \times 250 \mu\text{m id} \times 360 \mu\text{m od}$, Polymicro Technologies), was introduced into the body of the microcartridge. The body of the microcartridge was coupled to the 7.5 cm piece of capillary using a 0.5 cm polyethylene sleeve (280 $\mu\text{m id} \times 610 \mu\text{m od}$, “Intramedic” PE 10, Clay Adams division of Becton Dickinson, NJ, USA). Thus, it was easily vacuum-filled with the sorbent from the SPE cartridge. When the tube was almost completely full, a second polyethylene frit (0.1 cm) was inserted in the end side. The column was extended to full length with the

48.8 cm piece of capillary, which was fitted using another polyethylene sleeve. As the junction was tight, no adhesive sealing was required and the microcartridge was completely replaceable. The joining ends connected by the plastic sleeves had to be cleanly cut in order to minimize dead volume. A good connection avoided leaking at the joints. The 57 cm full-length column, which contained the microcartridge at 7.5 cm from the inlet, was prepared to fit into a commercial cartridge-cassette device, which held the capillary in a coiled configuration, as usual. The system was checked for abnormal flow restriction before the analysis using a plastic syringe with the appropriate connector. The 57 cm (L_T) columns for SPE-CE-ESI-MS were prepared in a similar way.

2.4.3.2 SPE-CE methodology

The optimum experimental conditions used for SPE-CE-UV with the different commercial sorbents are summarized in Table 1, and will be discussed in detail below. The separation columns were first conditioned by consecutive flushes of water (1 min), methanol (1 min), water (1 min) and BGE (3 min) at 930 mbar. Standard mixtures and spiked or blank plasma samples were then hydrodynamically introduced at 930 mbar for 10, 30 or 45 min (approximately 75, 230 or 340 μL using the Hagen–Poiseuille equation [34]). A final rinse with the separation BGE (2 min at 930 mbar) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before the elution and the electrophoretic separation. Retained peptides were eluted by injecting an appropriate hydroorganic solution containing 50 mM HAC and 50 mM HFor at 50 mbar for 50 s. Separation was carried out at 25 °C by applying a voltage of 17 kV (normal polarity). A hydrodynamic pressure of 15 mbar towards the outlet was used during the separations to decrease the analysis time.

Table 1. SPE-CE-UV conditions for the different commercial sorbents

Sorbent	Conditioning	Sample loading	Washing	Elution
C18	Water (1 min) Methanol (1 min) Water (1 min) BGE (3 min) (at 930 mbar)	Aqueous solutions (10 min at 930 mbar)	BGE (2 min at 930 mbar)	60:40 v/v Methanol/H ₂ O with 50 mM HAC and 50 mM HFor (50 s at 50 mbar)
¹ C18				
C8				
¹ C2				50:50 v/v Methanol/H ₂ O with 50 mM HAC and 50 mM HFor (30 s at 50 mbar)
HLB				70:30 v/v Methanol/H ₂ O with 50 mM HAC and 50 mM HFor (50 s at 50 mbar)
ENV+				60:40 v/v Methanol/H ₂ O with 50 mM HAC and 50 mM HFor (50 s at 50 mbar)
Strata-X				
MCX		Acidic aqueous solutions (10 min at 930 mbar)		60:40 v/v Methanol/H ₂ O with 5% NH ₃ (50 s at 50 mbar)

Between runs, the capillary was rinsed for 2 min with water and 2 min with acetonitrile, in order to avoid carry-over between consecutive analyses. The duration of the conditioning, injection and post-conditioning steps in SPE-CE-ESI-MS procedures was twice that indicated for SPE-CE-UV. No hydrodynamic pressure was used during the separations. The samples were loaded for 10 min at 930 mbar (approximately 60 μL using the Hagen–Poiseuille equation [34]) and retained peptides were eluted by injecting the hydroorganic solution containing 50 mM HAC and 50 mM HF employed in SPE-CE-UV at 50 mbar for 10 s. In all cases, the LOD for each peptide were obtained by analyzing low-concentration solutions. Standard or spiked plasma samples of decreasing concentrations were prepared and analyzed until no further peptides were detected. The lowest concentration to give a signal that was significantly different from the baseline of a blank sample was considered the LOD (S/N values were always higher than 3). All the SPE-CE columns were filled with acetonitrile when they were stored overnight.

3 Results and discussion

3.1 Standard solutions

UV detection has been widely used in CE to analyze a large variety of compounds of different chemical classes. In general, it is the first choice for the detection of UV absorbing compounds in CE, because of its simplicity, its versatility in the selection of separation conditions and its availability in compact commercial instruments at a reasonable price. However, the reduced light paths of the separation capillaries result in poor concentration LOD, which precludes the determination of low-abundance compounds (*e.g.* neuropeptides) at the levels found in complex samples (*e.g.* biological fluids) [8].

In this study, we examined the use of several commercial sorbents in SPE-CE-UV to overcome this major drawback. A preliminary study was performed with sorbents that have different chemical properties. Silica-based (C18, $^1\text{C18}$, C8 and $^1\text{C2}$), polymeric (HLB, ENV+ and Strata-X) and a polymeric sorbent with strong cation exchange groups (MCX) should allow the loading of aqueous peptide samples at neutral or acidic pH, elution with hydroorganic solutions and separation using acidic volatile BGEs that would also be compatible with on-line ESI-MS detection [32, 35]. This last feature would add an extra value to the SPE-CE-UV methodologies that could be immediately transferred to SPE-CE-ESI-MS. The starting composition of the solutions used for conditioning, sample loading, washing and elution were selected taking into account the manufacturer's instructions. Furthermore, we observed that before beginning the SPE-CE-UV experiments, we needed to optimize the composition and duration of the elution plug, in order to avoid current instability and breakdown during the electrophoretic separations [8, 12]. Some other parameters were

also studied, such as the loading sample conditions (time and pressure) and the washing step duration, in order to maximize peptide preconcentration. Table 1 summarizes our optimum conditions for each sorbent. As shown, the conditioning procedure was common for all the sorbents. Then, the aqueous samples were loaded, except for the MCX sorbent, which required acidic samples to ensure that the peptides were in their cationic forms. Once the sample had been loaded, the capillary was washed with the acidic BGE to eliminate non-retained molecules. The capillary was then filled before the elution and the electrophoretic separation. The elution plug consisted of an acidic hydroorganic mixture containing around 60% v/v of methanol. However, the MCX sorbent required a basic pH, due to the cation-exchange extraction mechanism. In all cases except for the $^1\text{C2}$ sorbent, an elution plug of 50 s at 50 mbar allowed optimum peptide extraction efficiency and peak shapes while stable currents were maintained during the electrophoretic separations. The best results in terms of LOD were obtained with the C18, C8 and $^1\text{C2}$ sorbents (*i.e.* 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The values obtained with $^1\text{C18}$, HLB, ENV+ and Strata-X sorbents were 10-fold higher (*i.e.* 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No peptides could be preconcentrated with MCX sorbents. Hence, in general, the reversed phase hydrophobic silica-based sorbents were the most convenient for peptide preconcentration. The exception was $^1\text{C18}$ sorbent and further investigations might be necessary to elucidate this fact. The reversed-phased polymeric sorbents (HLB, Strata-X and ENV+) had some hydrophobic-hydrophilic balance and gave worse results, suggesting that peptide hydrophobicity was more important than polarity for retention. In agreement with this observation, the worst results were obtained with the mixed mode cation-exchange and reversed phase MCX sorbents. Figure 1 shows the SPE-CE-UV electropherograms obtained for a mixture containing 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each peptide using C18, C8 and $^1\text{C2}$ sorbents. The electrophoretic profile was similar in all cases: three baseline resolved peaks corresponded to DynA, End and Met, two peaks corresponded to neutral substances of the elution plug migrating with the EOF and several minor peaks were probably due to UV absorbing impurities, which were also preconcentrated from the standard solutions. The peaks were slightly wider than by CE-UV (data not shown), but peptides were also baseline resolved. Under these conditions, as indicated above, LODs were 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the studied peptides. This represented around a 100-fold improvement on the values that could be obtained by CE-UV (*i.e.* 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No significant improvements were obtained after decreasing concentration of the mixtures and increasing the loading times from 10 to 30 or 45 min. Thus, the peak area of the eluted peptides for a mixture containing 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each peptide loaded for 10, 30 and 45 min was similar for C18, C8 and $^1\text{C2}$ sorbents, probably because of analyte breakthrough during the extended sample loading steps [12, 16]. These sorbents were subsequently investigated in the analysis of opioid peptides in plasma samples.

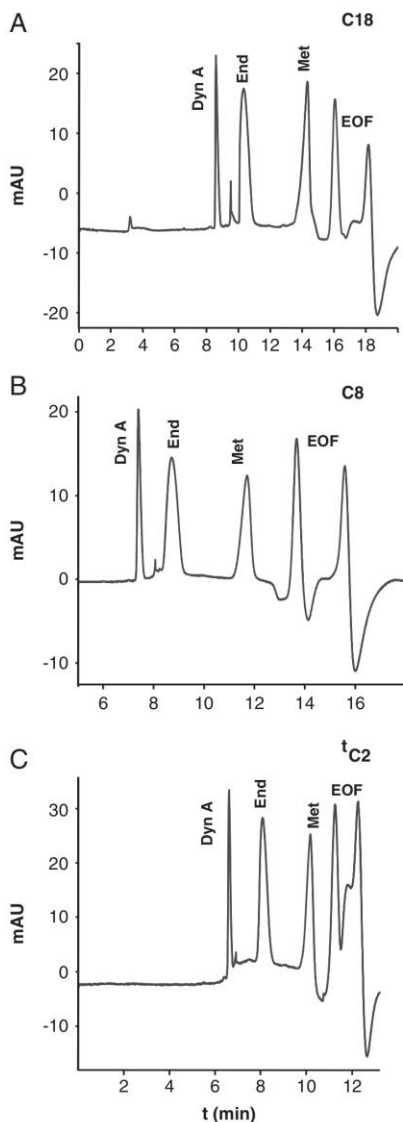


Figure 1. SPE-CE-UV: electropherograms for a 0.1 µg/mL standard mixture of the opioid peptides using (A) C18, (B) C8 and (C) C2 sorbents.

3.2 Plasma samples

3.2.1 CE-ESI-MS

The analysis of complex samples by SPE-CE using sorbents of limited selectivity such as C18, C8 and C2 requires the use of a clean-up pretreatment in order to prevent microcartridge saturation [13]. This requirement is particularly important

when UV detection was used, in order to eliminate other UV-absorbing interferents from the sample matrix. An alternative to removing salts and high-molecular-mass compounds (e.g. proteins) from plasma samples before the analysis of opioid peptides is an off-line double-step pretreatment that consists of precipitation with acetonitrile followed by filtration through centrifugal microdevices [13, 27]. In this study, we investigated in depth the parameters that affected peptide recovery during this sample pretreatment. The study was performed by CE-ESI-MS in order to ensure the accuracy of peak identification and peak area integration. Matrix clean-up and peptide recovery for the precipitation step were suitable when the volume ratio between acetonitrile and plasma was 6:1 v/v. Similar results may be obtained when strong inorganic acids (hydrochloric, perchloric, trifluoroacetic or sulfuric acid) or salting-out with ammonium acetate are used [17, 25, 26]. However, the use of organic solvents, such as acetonitrile and methanol, produces extracts of lower ionic strength that can be easily evaporated before further experimental operations and that do not interfere with the electrophoretic separation. Under these conditions for the first step, the recovery values were excellent for End and Met (91 and 102%) and lower for DynA (49%). This was probably because DynA was the opioid peptide with the largest molecular mass and the highest number of basic amino acids (i.e. arginine). As this type of deproteinization method is strictly based on solubility, it is difficult to finely tune it for mixtures of compounds. Moreover, we cannot discard the precipitation of DynA to some extent, due to nonspecific binding to the plasma proteins [21]. Once the conditions for the first clean-up step had been selected, we studied the recovery in the whole procedure. Several types of centrifugal filters with different membrane types and pore sizes (0.22 µm nylon, 0.2 µm polysulphone, 0.02 µm aluminum oxide, 3000 Da cut-off cellulose acetate and 12 000 Da cut-off polysulphone) were used in the preliminary optimization of the double-step clean-up pretreatment. Appropriate results were only obtained using 3000 Da cut-off cellulose acetate filters (YM-3) after deproteinization with acetonitrile. This is probably because this was the membrane with the lowest pore size and the smallest amount of active binding sites. As it can be observed in the bar plot in Fig. 2, the recovery of the three peptides with the YM-3 filters was limited, with values between 17 and 42% at 25 °C and between 10 and 24% at 4 °C. As recovery was better at 25 °C, this temperature was selected for the rest of the experiments.

The sample reservoir and the filtrate vial of the YM series centrifugal devices were made of polycarbonate and polypropylene, respectively. In order to avoid adsorption of proteins or RNA on the polycarbonate inner walls of the sample reservoir, the manufacturer recommends passivating the plastic when handling highly dilute solutions [31]. We investigated peptide recoveries after passivation of the YM-3 sample reservoirs with 1% w/v BSA (in PBS), 5% v/v PEG (in water) and 5% v/v Tween[®] 20 (in water). The filters were broken using the Tween[®] 20 solution during the first

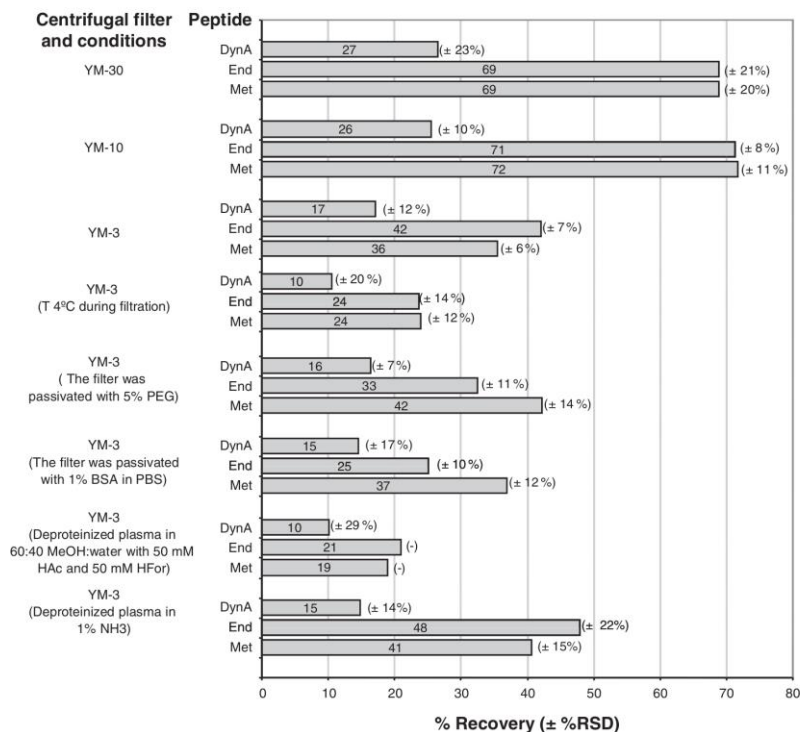


Figure 2. Evaluation of peptide recovery using cellulose acetate centrifugal filters of different cut-off (3000 Da, YM-3, 10 000, YM-10 and 30 000, YM-30) under several conditions. Temperature was 25°C unless otherwise indicated. Analysis was performed by CE-ESI-MS.

centrifugation step. In the other cases, as it can be seen from the recovery values in Fig. 2, results were not significantly better than those obtained without passivation.

Finally, we considered that target peptides were being lost when they passed through the cellulose acetate membrane of the YM-3 filters [28–30]. The cellulose acetate membrane on the bottom of the sample reservoir, which is sealed with a medical-grade silicone rubber O-ring, is a sieving device, which is supposed to have low-binding capacity. However, size exclusion, hydrophobic interactions and electrostatic repulsion cannot be ruled out [28–30]. First we investigated changing the solvent composition of the sample solutions before filtration. Instead of reconstituting with water the solid residues after precipitation, they were dissolved in a hydroorganic solution of acidic pH (60:40 v/v methanol/water with 50 mM HAc and 50 mM HFor, pH* 2.3) or an aqueous solution of basic pH (1% v/v of NH₃). In this way, we ensured that the studied opioid peptides were in their cationic and anionic forms respectively, and changed the elutropic strength of the solvent in the first case. As can be observed in Fig. 2, in both cases recovery was similar to that obtained with aqueous solutions. However, repeatability (expressed as %RSD) was lower, especially when the hydroorganic acidic solution was filtered. In this last case, filtration was difficult as membranes were frequently broken and repeatability was the poorest.

As no improvement was observed when we changed the solvent composition, we decided to evaluate the influence of the pore size on peptide recovery in order to discard retention based on a size-exclusion mechanism [28–30]. YM-10 and YM-30 cellulose acetate filters, which only differ in their cut-off with respect to the YM-3 filters (*i.e.* 10 000 and 30 000 Da, respectively) were selected. As shown in Fig. 2, in both cases the recovery was clearly improved and ranged between 26 and 72% and between 27 and 69% for the YM-10 and the YM-30 filters, respectively. However, repeatability was better with the YM-10 filters, which allowed similar %RSD values to those obtained with YM-3 filters. This could be due to the detrimental effect on CE-ESI-MS of increased amounts of interferences from the plasma matrix in the analyzed samples when the pore size was increased to a cut-off of 30 000 Da. Figures 3A–C (i) show the extracted ion electropherograms (XIE) for plasma samples spiked with 10 µg/mL of each peptide after precipitation with acetonitrile followed by filtration with YM-30, YM-10 and YM-3 filters, respectively. As can be observed, the separations obtained for the studied peptides were similar in the three cases, with the small differences in migration time commonly found from run-to-run in CE. Figures 3A–C (ii and iii) show the XIE and the base peak electropherograms (BPE) between *m/z* 250 and 1250 for the analysis of blank plasma samples after sample pretreatment. As can be

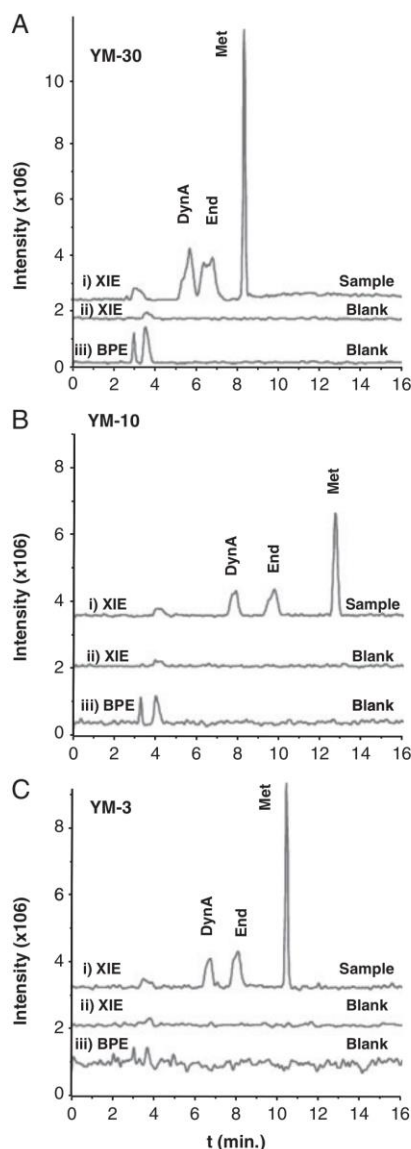


Figure 3. CE-ESI-MS: (i) XIE (m/z 434.8, 868.6, 611.3, 574.2) for a plasma sample spiked with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each opioid peptide after the double step sample pretreatment. (ii) XIE and (iii) BPE (m/z 250–1250) of the blanks using (A) YM-3, (B) YM-10 and (C) YM-30 filters.

observed from a comparison of the XIE and the BPE that correspond to the blank plasma samples using different filters, the best clean-up was obtained with YM-3 filters. The electropherograms of the YM-10 and YM-30 filters showed several electrophoretic peaks due to remaining matrix

components. However, no significant differences could be observed between both electrophoretic profiles that justified the lower repeatability of CE-ESI-MS with YM-30 filters.

3.2.2 SPE-CE-UV

The double-step sample pretreatment using YM-3, YM-10 and YM-30 filters was investigated for the SPE-CE-UV analysis of opioid peptides in plasma samples. The use of YM-30 filters was rapidly ruled out, due to instability or breakage of the current during the electrophoretic separations. This result was in agreement with the preconcentration in the elution plug of a matrix of increased complexity, which was similar to the negative effect observed in the repeatability of CE-ESI-MS experiments. No difficulties were encountered with samples filtered through YM-3 and YM-10 filters. Figures 4A–C show the UV electropherograms for plasma samples spiked with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of each peptide using YM-3 filters and C18, C8 and $^1\text{C}2$ sorbents. Figures 4D and F show the electropherograms obtained using YM-10 filters and the same sorbents. As can be observed, the electrophoretic profiles obtained for the sorbents were not influenced by the filter in any case. The electropherograms for each sorbent were so similar that no difference could be observed in the detected UV absorbing impurities. A comparison of the different sorbents revealed that the worst results in terms of the peak area of the studied peptides were obtained with $^1\text{C}2$ (Figs. 4C and F), followed by C8 (Figs. 4B and E). Hence, the LOD obtained for the three peptides in plasma samples with $^1\text{C}2$ and C8 sorbents were, in the best of the cases, tenfold higher than those obtained with C18. Under optimum conditions with the C18 sorbent, using YM-10 or YM-3 filters, the LOD was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, that is to say tenfold higher than the values in standard samples. As no differences were observed between the results with both filters, the limited recovery of the off-line pretreatment did not influence this decrease in sensitivity. In our opinion, the decrease in sensitivity may be related to the remaining matrix interferences, which lead to lower extraction efficiency of the studied peptides from deproteinized plasma. Thus, the binding sites on the small amount of chromatographic sorbent with limited selectivity that was packed in the microcartridges were saturated faster with plasma samples than they were with standard solutions, which resulted in higher LOD. This problem can only be addressed by using sorbents with improved selectivity (e.g. immunoaffinity-based sorbents) and capacity, either off-line before SPE-CE-UV or on-line in the extraction microcartridges. Meanwhile, a straightforward strategy to decrease the LOD is the use of detection methods that have higher sensitivity and selectivity, such as mass spectrometry or laser-induced fluorescence detection [1–5, 8, 9, 15].

3.2.3 SPE-CE-ESI-MS

The SPE-CE-UV methodology was easily transferred to SPE-CE-ESI-MS, due to the appropriate volatility of the solutions [32, 33]. We validated similar SPE-CE methodologies in the

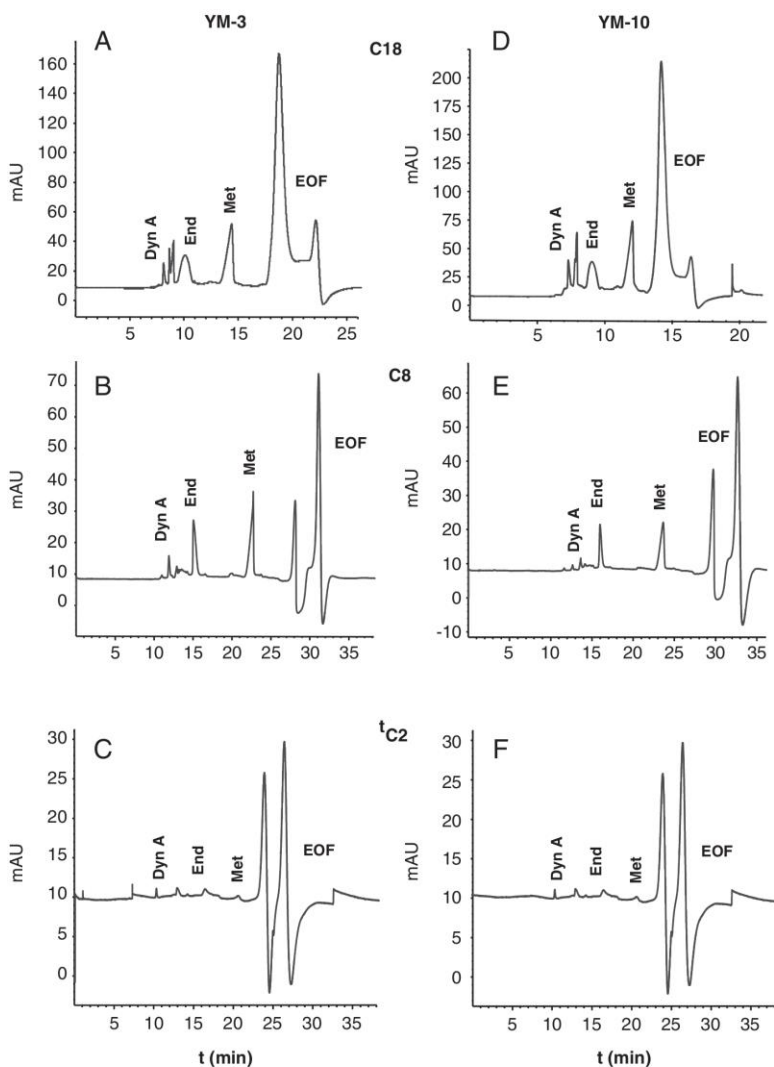


Figure 4. SPE-CE-UV: electropherograms for a plasma sample spiked with 1 $\mu\text{g/mL}$ of each opioid peptide using YM-3 and YM-10 filters and C18, C8 and $^t\text{C}2$ sorbents.

past and the expected performance now was similar [12, 14, 32]. Figures 5A and B show the SPE-CE-ESI-MS electropherograms for plasma samples that were spiked with 10 and 1 ng/mL of the studied peptides, respectively, using the C18 sorbent and the YM-3 filters. The three studied peptides were detected at 10 ng/mL (Fig. 5A), but only End and Met were detected at 1 ng/mL. These LOD values represent a 10-fold improvement for DynA and a 100-fold improvement for End and Met with respect to the values obtained before by SPE-CE-UV. This shows the higher potential of SPE-CE-ESI-MS in the analysis of opioid peptides at the low concentrations expected in biological fluids. End could be detected at 0.1 ng/mL when the spiked plasma samples

were pre-concentrated tenfold from 2000 μL of sample, using the double-step clean-up pretreatment [33]. This value is in the concentration range expected for the neuropeptides that are typically measured in biological fluids using the most sensitive approaches, such as RIA or immunoprecipitation followed by HPLC-MS or MALDI-MS [9, 15, 20–24, 36]. Furthermore, the proposed SPE-CE-ESI-MS method has the advantage of avoiding the extensive use of radioactive materials or organic solvents while maintaining the requirements of selectivity and sensitivity needed for the analysis of highly diluted complex samples. We are directing our current research efforts towards improving the specificity and capacity of the sorbents to further improve

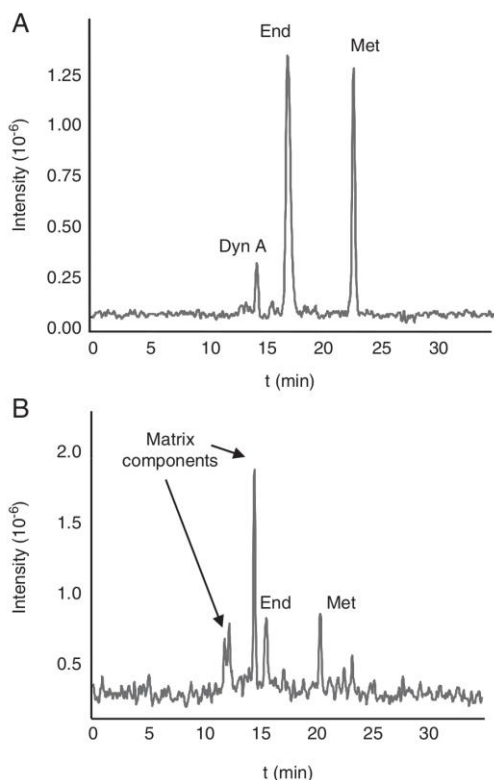


Figure 5. SPE-CE-ESI-MS: XIE for plasma samples spiked with (A) 10 ng/mL and (B) 1 ng/mL of each opioid peptide using YM-3 filters and a C18 sorbent.

detection of neuropeptides for easily achieving the levels found in biological fluids of those that are found at extremely low concentration.

4 Concluding remarks

We have demonstrated that SPE-CE can improve the sensitivity of CE in the analysis of opioid peptides in biological fluids. The use of typical chromatographic sorbents of limited selectivity such as C18, C8 and C2 in the analysis of such complex biological samples requires an off-line clean-up pretreatment in order to prevent microcartridge saturation. A double-step procedure consisting of precipitation with acetonitrile and filtration using 3000 Da (YM-3) and 10 000 Da (YM-10) cut-off cellulose-acetate filters that require only 200 μ L of plasma sample was applied for optimum performance of SPE-CE. Although YM-10 led to improved peptide recovery, both filters allowed an effective clean-up that was compatible with SPE-CE, because LODs were similar. Using any of the filters, the

lowest LODs for the three opioid peptides in plasma samples were obtained using the C18 sorbent in SPE-CE-UV (i.e. 0.1 μ g/mL) and SPE-CE-ESI-MS (i.e. 10 ng/mL for DynA and 1 ng/mL for Met and End). The LODs by SPE-CE-ESI-MS were in the upper part of the range that is usually found for neuropeptides that are typically measured in biological fluids. We are currently working to use sorbents with improved capacity and selectivity (such as immunoaffinity-based sorbents) and mass spectrometers with greater sensitivity in order to further decrease LODs in the analysis of low-abundance peptides in complex biological samples.

This study was supported by a grant from the Spanish government (CTQ2008-00507/BQU).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Kostal, V., Katzenmeyer, J., Arriaga, E. A., *Anal. Chem.* 2008, 80, 4533–4550.
- [2] Nesbitt, C. A., Zhang, H., Yeung, K. K. C., *Anal. Chim. Acta* 2008, 627, 3–24.
- [3] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2009, 30, 276–291.
- [4] Gaspar, A., Englmann, M., Fekete, A., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., *Electrophoresis* 2008, 29, 66–79.
- [5] Dolnik, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 143–156.
- [6] Stutz, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1254–1290.
- [7] Lin, C. H., Kaneta, T., *Electrophoresis* 2004, 25, 4058–4073.
- [8] Guzman, N. A., Majors, R. E., *LC-GC N. Am.* 2002, 19, 14–22.
- [9] Guzman, N. A., Blanc, T., Phillips, T. M., *Electrophoresis* 2008, 29, 3259–3278.
- [10] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 664–678.
- [11] Tempels, F. W. A., Underberg, W. J. M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 108–128.
- [12] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N. A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1140, 205–212.
- [13] Hernández, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2008, 29, 3366–3376.
- [14] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C., *Anal. Chim. Acta* 2007, 587, 208–215.
- [15] Guzman, N. A., Stubbs, R. J., *Electrophoresis* 2001, 22, 3602–3628.
- [16] Pawliszyn, J., *Anal. Chem.* 2003, 75, 2543–2558.
- [17] Visser, N. F. C., Lingeman, H., Irth, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 535–558.
- [18] Hernandez-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., Rodriguez-Delgado, M. A., Cifuentes, A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1153, 214–226.

- [19] Lloyd, D. K., *J. Chromatogr. B* 2008, 866, 154–166.
- [20] Sewald, N., Jakubke, H.-D., *Peptides: Chemistry and Biology*, 1st edn., Wiley-VCH, Weinheim 2002.
- [21] Fehder, W. P., Wen-Zhe, H., Campbell, D. E., Tourtelotte, W. W., Michaels, L., Cutilli, J. R., Uvaydova, M., Douglas, S. D., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, 5, 303–307.
- [22] Fischer, H. P., Eich, W., Rusell, I. J., *Sem. Arthr. Rheum.* 1998, 6, 348–359.
- [23] Pavlova, Z. V., Laktionov, K. P., Isakova, M. E., Kushlinskii, N. E., *Bull. Exp. Biol. Med.* 1999, 128, 1150–1154.
- [24] Baraniuk, J. N., Whalen, G., Cunningham, J., Clauw, D. J., *Biomed Chromatogr. Musculoskelet. Disord.* 2004, 5, 48–55.
- [25] Ralston, P. B., Strein, T. G., *Microchem. J.* 1997, 55, 270–283.
- [26] Daykin, C. A., Foxall, P. J. D., Connor, S. C., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., *Anal. Biochem.* 2002, 304, 220–230.
- [27] Ban, E., Choi, O. K., Chung, W. Y., Park, C. S., Yoo, E. A., Chung, B. C., Yoo, Y. S., *Electrophoresis* 2001, 22, 2173–2178.
- [28] Chaufer, B., Rabiller-Baudry, M., *J. Chromatogr. B* 2001, 753, 3–16.
- [29] Menon, M. K., Zydney, A. L., *J. Membr. Sci.* 2001, 181, 179–184.
- [30] Darnon, E., Lafitte, L., Belleville, M. P., Rios, G. M., *Sep. Purific. Tech.* 2002, 26, 283–293.
- [31] Passivation of Amicon Microcon Microconcentrators for Improved Recovery P99394 Protocol Note, 1999, Millipore Corporation.
- [32] Hernandez, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 3957–3965.
- [33] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Hernández, E., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2006, 577, 68–76.
- [34] Heiger, D., *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction*, Agilent Technologies, Germany 2000, pp. 83–86.
- [35] Pantuckova, P., Gebauer, P., Bocek, P., Krivankova, L., *Electrophoresis* 2009, 30, 203–214.
- [36] Portelius, E., Tran, A. J., Andreasson, U., Persson, R., Brinkmalm, G., Zetterberg, H., Blennow, K., Westman-Brinkmalm, A., *J. Proteom. Res.* 2007, 6, 4433–4439.

Silvia Medina-Casanelas
Fernando Benavente
José Barbosa
Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical
Chemistry, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Received January 7, 2011
Revised February 18, 2011
Accepted February 24, 2011

Research Article

Transient isotachopheresis in on-line solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry for peptide analysis in human plasma

In this study, we evaluated the combination of transient isotachopheresis with on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry (SPE-tITP-CE-TOF-MS) to improve sensitivity of peptide analysis, using several opioid peptides as model compounds. First, standard solutions were analyzed in order to establish the tITP-CE methodology using UV and TOF-MS detection. The volume and composition of the leading and terminating electrolytes (i.e. LE and TE) for an efficient tITP were investigated to obtain optimum detection sensitivity and electrophoretic separation. In the best cases, LODs in tITP-CE-TOF-MS were tenfold better than those obtained in CE-TOF-MS (i.e. 5 versus 50 ng/mL). Afterwards, the tITP-CE-TOF-MS methodology was adapted to perform SPE-tITP-CE-TOF-MS. Repeatability, linearity and LODs were investigated and compared to the values obtained by SPE-CE-TOF-MS. Furthermore, human plasma samples fortified with the opioid peptides were analyzed in order to show the potential of SPE-tITP-CE-TOF-MS for peptide analysis in biological fluids. The LODs attained in standard solutions and plasma samples for some of the studied peptides (i.e. 0.01 and 0.1 ng/mL, respectively) were tenfold better than those obtained in SPE-CE-TOF-MS, proving the enhanced sensitivity that could be achieved when both on-line preconcentration approaches were combined together.

Keywords:

CE / MS / Neuropeptides / On-line preconcentration / tITP / TOF
DOI 10.1002/elps.201100017

1 Introduction

CE is now an evolved technique with a broad range of application areas, among which stands out the separation of biomolecules, such as peptides and proteins [1–7]. However, the applicability of CE in trace analysis is restricted due to the low concentration sensitivity for most analytes. Numerous strategies have been developed to enhance concentration sensitivity of CE [8–24]. The most popular approaches are based on the use of more selective and sensitive detectors (e.g. MS detectors) or the on-column preconcentration of the analytes after the injection of a large volume of sample using electrophoresis [8–13] or chromatography-

based techniques [13–24], such as sample stacking, isotachopheresis (ITP) or on-line SPE [8–24].

A number of reviews have covered the application of CE-MS over the last years [1–7, 25]. In recent years, orthogonal acceleration reflectron TOF (oa-TOF) mass spectrometers are being regarded as an excellent choice for CE-MS because they provide high resolution and mass accuracy at a reasonable cost, as well as reduced bench space, user friendly operation, high acquisition rates and potentially unlimited mass acquisition ranges in a single run [25, 26].

Transient ITP (tITP) is a variant of ITP that can be transiently implemented before CE in a single capillary column [8–13]. In tITP, the sample zone is sandwiched in the CE separation BGE between two small volumes of leading and terminating electrolytes (i.e. LE and TE), which contain ions with, respectively, faster and slower electrophoretic mobilities than that of the analytes. After voltage application, when the steady state is reached, the analytes migrate with the same velocity and are preconcentrated, before the CE separation, in discrete narrow bands in the order of decreasing electrophoretic mobilities. Several authors have shown that tITP can be followed by CE-MS if

Correspondence: Dr. Fernando Benavente, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain
E-mail: fbenavente@ub.edu
Fax: +34-934021233

Abbreviations: IT, ion trap; LE, leading electrolyte; oa-TOF, orthogonal acceleration TOF; TE, terminating electrolyte; tITP, transient ITP; XIE, extracted ion electropherogram

Colour Online: See the article online to view Figs. 1–4 in colour.

the LE and the TE meet the volatility required for optimum detection sensitivity with on-line ESI-MS detection [8–13]. However, only a few have realized about the potential of combining tTTP with SPE-CE [13, 27–31].

In SPE-CE, the loading capacity is not limited by the total volume of the separation capillary [13–24]. The SPE micro-cartridge, which is inserted near the inlet of the separation capillary, contains a sorbent, which retains the target analyte, enabling the introduction of a large volume of sample. The retained analytes are eluted in a smaller volume of an appropriate solution, resulting in sample cleanup and concentration enhancement, with minimum sample handling before separation and detection. SPE-CE has been often coupled to on-line ESI-MS detection (SPE-CE-MS), providing a powerful tool for the separation and identification of peptides in highly diluted complex samples, such as biological fluids [22–24]. However, research about the combination of tTTP with SPE-CE-MS have attracted limited attention, with the exception of Tomlinson et al. who have extensively studied the combination of tTTP with membrane preconcentration capillary electrophoresis mass spectrometry (mPC-CE-MS), a variant of SPE-CE-MS using a membrane as a sorbent [28, 29].

In this paper, we investigated the combination of tTTP with SPE-CE-TOF-MS (SPE-tTTP-CE-TOF-MS) to improve sensitivity in peptide analysis, using several opioid peptides as model compounds. Opioid peptides play a major role in nociception and, as many other neuropeptides or endogenous compounds of biomedical interest, are usually found at extremely low concentration in body fluids and tissues of limited availability [32]. To establish a SPE-tTTP-CE-TOF-MS methodology, it was needed to make compatible the requirements of SPE, tTTP and ESI-MS. First, tTTP-CE-UV and tTTP-CE-TOF-MS methodologies were developed using standard solutions. Then, these methodologies were adapted to analyze by SPE-tTTP-CE-TOF-MS standards and spiked plasma samples.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

All the chemicals used in the preparation of buffers and solutions were of analytical reagent grade. Acetonitrile,

methanol, isopropanol, formic acid (HFor) (98–100%), acetic acid (HAc) (glacial), ammonia (25%) and sodium hydroxide were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The studied opioid peptides were Dynorphin A (1–7) (DynA), Endomorphin 1 (End1) and Methionine enkephalin (Met), which were supplied by Bachem (Bubendorf, Switzerland), Sigma (St. Louis, MO, USA) and Neomps (Strasbourg, France), respectively. Sequences and theoretical monoisotopic molecular mass (*M*) values of these opioid peptides are shown in Table 1 [33]. Water with conductivity lower than 0.05 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

2.2 Electrolytes, sheath liquid and standard solutions

An aqueous standard solution (2500 mg/L) of each peptide was prepared and stored in a freezer at -20°C when not in use. Working standard solutions containing all the opioid peptides at different concentrations were obtained by mixing and diluting with the appropriate solutions: 60:40 (v/v) methanol:water with 50 mM of HAc and 50 mM of HFor for CE-UV, CE-TOF-MS, tTTP-CE-UV and tTTP-CE-TOF-MS or water for SPE-CE-TOF-MS and SPE-tTTP-CE-TOF-MS. Aqueous mixtures were used to spike human plasma samples for SPE-CE-TOF-MS and SPE-tTTP-CE-TOF-MS. The background electrolyte (BGE) for the separation contained 50 mM of HAc and 50 mM of HFor and was adjusted to pH 3.5 with NH_3 . The amounts of NH_3 and HAc in the aqueous solutions used in tTTP as the LE and TE, respectively, are stated later in the text. The sheath liquid solution for CE-TOF-MS consisted of 60:40 (v/v) isopropanol:water, with 0.05% (v/v) of HFor. All solutions were passed through a 0.45- μm nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA) before analysis and were stored at 4°C when not in use. The sheath liquid was degassed for 15 min by sonication before use.

2.3 Human plasma and sample preparation

Human plasma samples from healthy blood donors were kindly supplied by the Banc de Sang i Teixits (Hospital de la

Table 1. Sequence, theoretical monoisotopic molecular mass (*M*), ionizable groups and *m/z* values of the detected molecular ions with TOF-MS detection for the studied peptides

	Sequence	<i>M</i> (Da)	[<i>M</i> + <i>z</i> H] ^{<i>z</i>+} <i>m/z</i>	Ionizable groups [33]	
				Acidic (<i>pK</i> _a)	Basic (<i>pK</i> _a)
DynA	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	867.4715	868.4788 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr) (9.67)	1 amino (Tyr) (6.20)
			434.7430 (<i>z</i> = 2)	1 carboxylic acid (Arg) (2.17)	2 guanidines (Arg) (12.5)
End1	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂	610.2904	611.2976 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr) (9.68)	1 amino (Tyr) (6.90)
Met	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	573.2257	574.2330 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr) (10.47)	1 amino (Tyr) (7.37)
				1 carboxylic acid (Met) (3.19)	

Vall d'Hebron, Barcelona). Venous blood was collected in standard clinical vials and placed on ice. Plasma was separated from the blood cells, pooled, placed into polyethylene tubes and frozen at -20°C .

Different aliquots of the frozen plasma were thawed at room temperature. An appropriate amount of the standard peptide mixture was added to each aliquot and was vortexed thoroughly in order to prepare spiked samples at concentrations of 1 and 0.1 ng/mL. The concentration of the peptides in the standard mixtures was sufficient to avoid excessive dilution of the plasma matrix. The plasma samples were pretreated off-line, in order to eliminate salts and high molecular mass compounds (e.g. proteins) before SPE-CE-TOF-MS or SPE-tITP-CE-TOF-MS. The sample pretreatment consisted of precipitation with acetonitrile followed by filtration using Amicon centrifugal devices of 3 kDa cut-off cellulose acetate filters (YM-3) (Millipore, Billerica, MA, USA) [23, 24, 34].

2.4 Apparatus and procedures

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA). Centrifugation was carried out in a Mikro 20 centrifuge with a 2073 rotor (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). CE experiments were performed in an Agilent technologies HP^{3D}CE system (Waldbronn, Germany).

2.4.1 CE-UV

A 57 cm \times 75 μm id fused-silica capillary supplied by Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) was inserted into the capillary cartridge and thermostated to 25°C . All capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). New capillaries were activated by flushing for 20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 20 min with water and 15 min with the BGE. Between days, the capillary was conditioned by rinsing it for 10 min with BGE. In both activation and conditioning methods, a 17 kV voltage was applied for 10 min after the last flush with BGE. Between runs, the capillary was rinsed for 3 min with BGE. Separation was conducted under normal polarity (cathode in the outlet) by applying a voltage of 17 kV. The UV window was placed 48.5 cm from the inlet of the capillary and the detection was undertaken with the diode-array detector operating at 195 nm.

In CE-UV, samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s. In tITP-CE-UV, samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s between the LE and TE. Under optimum conditions, the LE and TE were injected at 50 mbar for 15 s and consisted of 0.25% (v/v) of NH_3 and 0.1% (v/v) of HAc, respectively. The capillary was stored overnight filled with BGE.

2.4.2 CE-TOF-MS

A 6220 oa-TOF LC/MS mass spectrometer (Agilent technologies) with the orthogonal G1603A sheath-flow interface (Agilent Technologies) was coupled to the CE system [26]. The sheath liquid was delivered at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump. CE control and separation data acquisition (e.g. voltage, temperature and current) were performed using ChemStation software (Agilent Technologies) that was running in combination with the MassHunter workstation software (Agilent Technologies) for control, data acquisition and analysis of the TOF mass spectrometer. The CE-TOF-MS and tITP-CE-TOF-MS separations were performed in a 72 cm \times 75 μm id fused-silica capillary (Polymicro Technologies) at 25°C . All capillary rinses were performed as with UV detection. However, the activation procedure was performed offline in order to avoid the unnecessary entrance of NaOH into the mass spectrometer. Separation voltage was 17 kV (normal polarity). In CE-TOF-MS, samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s. In tITP-CE-TOF-MS, samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 10 s between the LE and the TE. Under optimum conditions, the LE and TE were injected at 50 mbar for 15 s and consisted of 0.1% (v/v) of NH_3 and 0.1% (v/v) of HAc, respectively. The capillary was stored overnight filled with BGE.

The oa-TOF mass spectrometer was operated in positive mode using the following parameters: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 200°C , drying gas flow rate 4 L/min, nebulizer gas 7 psig, fragmentor voltage 215 V, skimmer voltage 60 V, OCT 1 RF Vpp voltage 300 V [26]. Unless otherwise indicated, data were collected in profile at 1 spectrum/s (approx. 10 000 transients/spectrum) between m/z 100 and 1250 working in the extended dynamic range (2 GHz) mode with the mass range set to standard (1700 m/z). The reference mass correction was enabled for continuous internal mass recalibration. The reference compounds were not added to the sheath liquid because spray was unstable, resulting in current breakdown during SPE-CE-TOF-MS and SPE-tITP-CE-TOF-MS experiments. Internal mass recalibration was satisfactory selecting the single molecular ions of phthalic anhydride and diisooctyl phthalate (i.e. 149.0233 and 391.2843, respectively), which were commonly found in the background mass spectra [26].

2.4.3 SPE-CE-TOF-MS

A SPE microcartridge (7 mm L_T \times 250 μm id \times 360 μm od fused-silica capillary, Polymicro technologies) containing C18 sorbent from Sep-Pak cartridges (Waters, Milford, MA, USA) was inserted at 7.5 cm from the inlet of the separation capillary column as described elsewhere [22–24, 34]. The SPE-CE columns were first conditioned by consecutive flushes of water (1 min), methanol (1 min), water (1 min) and BGE (3 min) at 930 mbar. Standard mixtures and spiked or blank plasma samples were then hydrodynamically introduced at 930 mbar for 10 min (approx. 60 μL using

the Hagen–Poiseuille equation [35]). A final rinse with the separation BGE (2 min at 930 mbar) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before the elution and the electrophoretic separation. The retained peptides were eluted by injecting a solution of 60:40 (v/v) methanol/water containing 50 mM HAc and 50 mM HFor (apparent pH 1.9) at 50 mbar for 10 s (approx. 50 nL [35]). In tITP-SPE-CE-TOF-MS, this elution plug was injected between the LE and the TE. Under optimum conditions, the LE and TE were injected at 50 mbar for 15 s and consisted of 0.1% (v/v) of NH_3 and 0.1% (v/v) of HAc, respectively. A 5-mbar pressure was applied for 660 s before beginning the separation in order to guarantee that the elution plug pass through the sorbent [30]. tITP immediately occurred after applying the separation voltage of 17 kV (normal polarity). Separations were carried out at 25 °C. Between runs, the capillary was rinsed for 2 min with water and 2 min with acetonitrile, in order to avoid carry-over between consecutive analyses. All the SPE-CE columns were filled with acetonitrile when they were stored overnight.

2.4.4 Quality parameters

All quality parameters were calculated from data obtained by measuring the peak area, the migration time and the monoisotopic mass from an extracted ion electropherogram (XIE) of each peptide. The m/z values of the molecular ions considered for each peptide are shown in Table 1.

Repeatability studies ($n = 10$) were performed with a mixture of the studied opioid peptides at a concentration of 1 $\mu\text{g/mL}$, 1 ng/mL and 0.1 ng/mL for tITP-CE-TOF-MS, SPE-CE-TOF-MS and SPE-tITP-CE-TOF-MS, respectively. Repeatability values were calculated as a percentage of the RSD (%RSD) of peak area, migration time or experimental monoisotopic molecular mass (M). M accuracy was expressed in ppm as an average of the ratio between the difference of the experimental M and the theoretical M and the theoretical M [26].

The LODs for each peptide were obtained by analyzing low-concentration samples. Standard or spiked plasma samples of decreasing concentrations were prepared and analyzed until no peptides were detected. In each case, the lowest concentration giving a signal significantly different from the baseline of a blank sample was considered as the LOD (S/N ratio was always higher than 3). The linearity ranges were determined by injecting the samples at the appropriate concentrations in each case.

3 Results and discussion

3.1 tITP-CE-UV

For the sake of simplicity and widespread availability, a preliminary optimization of the tITP conditions for the on-line preconcentration of the opioid peptides was performed by CE-UV. Our starting conditions were taking into account

the specific electrophoretic mobility requirements of the ions of the LE and TE for an efficient tITP and their mandatory volatility for an optimum detection sensitivity with on-line ESI-MS detection [8–13, 28–29, 33, 36]. This fact limited the choice to using LEs, TEs and BGEs containing NH_3 , ammonium salts and volatile organic acids at appropriate concentrations [28, 29, 33, 36]. Tomlinson et al. have extensively used with good results NH_3 and acetic acid solutions as LE and TE for tITP in combination with mPC-CE-MS [28, 29]. In addition to the type and concentration of the LE and TE components, their volume was another important factor affecting preconcentration and separation. Hence, we analyzed a 10- $\mu\text{g/mL}$ standard mixture of the opioid peptides (DynA, End1 and Met) by tITP-CE-UV using different volumes of NH_3 and HAc solutions as LE and TE, prepared at different concentrations. Specifically, the LE and TE were introduced hydrodynamically at 50 mbar for 10, 15, 25 and 50 s (LE) or 10 and 15 s (TE). The concentrations of NH_3 and HAc in the LE and TE were tested in ranges that from our experience were supposed to allow acceptable sensitivity with on-line ESI-MS detection, namely 0.1, 0.25 and 0.5% (v/v) of NH_3 and 0, 0.1, 0.25, 0.5 and 1% (v/v) of HAc. The composition of the BGE was established in a previous work for peptide analysis by SPE-CE-MS using an ion trap (IT) mass spectrometer [23]. The standard mixture was prepared in the hydroorganic solution that later would be used for the elution of the retained peptides. Thereby, the tITP-CE methodology would probably be suitable later in SPE-tITP-CE. Figure 1 shows some of the electropherograms obtained by CE-UV and tITP-CE-UV for the mixture of opioid peptides. As can be observed, the three peptides were baseline resolved in less than 25 min of analysis by CE-UV (Fig. 1A) while End1 and Met comigrated in an extremely sharp peak by tITP-CE-UV (Figs. 1B–D). In contrast to the efficient focusing of End1 and Met during the tITP state, results were less remarkable for DynA. After the separation voltage was applied, only the peptides with mobilities between those of the leading ion (NH_4^+) and the terminating ion (H_3O^+) were temporarily focused. As can be observed in Table 1, DynA was bearing an increased number of basic groups that were supposed to be positively charged at these pH conditions. Therefore, the focusing of this peptide was less efficient because its mobility was higher than those expected for Met and End1 and closer to the mobility of the leading ion. In a similar way, Met and End1 comigrated because the differences between their mobilities were not enough to allow separation if a transient isotachophoretic state was induced. As expected, the unstacking of some peptides when reaching the detector could be not enough to achieve good resolution. The highest and sharpest peaks were obtained when 0.25% (v/v) NH_3 and 0.1% HAc (v/v) (50 mbar 15 s and 10 s, respectively) were used as LE and TE (Fig. 1B). Decreasing the concentration of the LE (data not shown) or lowering the volume of the TE resulted in a lower peak height and a slightly improved resolution (Fig. 1C). A similar effect was observed after changing the injection time of the LE (data

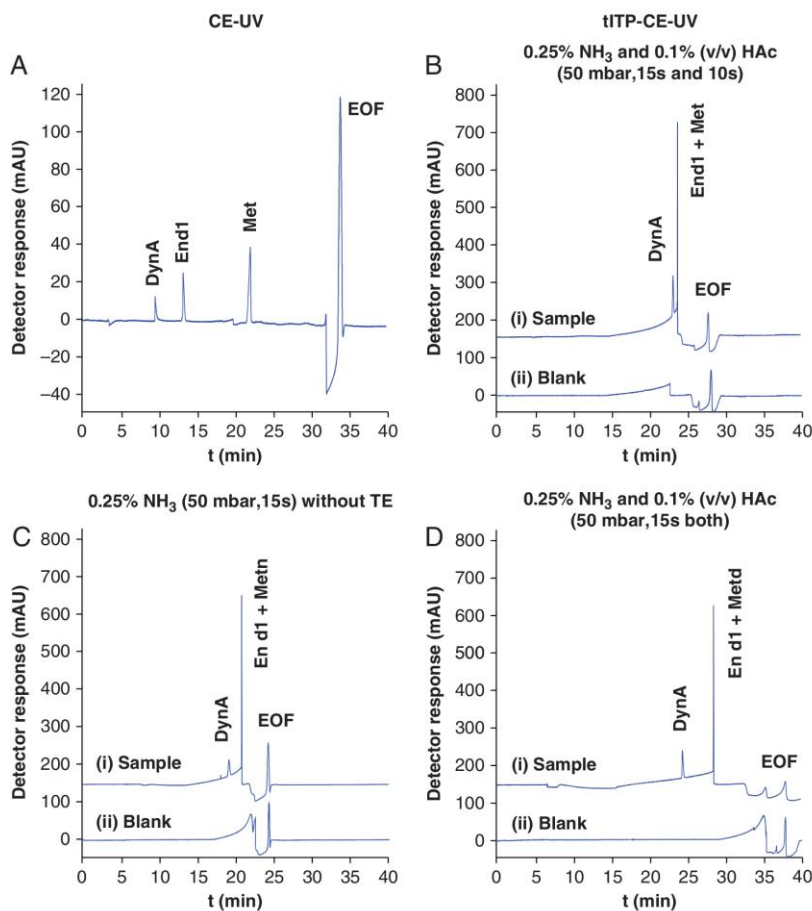


Figure 1. Electropherograms for a 10 µg/mL standard mixture of the opioid peptides by CE-UV (A) and tITP-CE-UV (B, C and D).

not shown). Finally, the best compromise between peak height and separation resolution was reached using 0.25% (v/v) NH₃ and 0.1% HAC (v/v) (50 mbar 15 s both) as LE and TE (Fig. 1D).

3.2 tITP-CE-TOF-MS

The optimum tITP-CE-UV conditions could be immediately transferred to use with on-line ESI-MS detection. However, due to the specific features of both instrumental set-ups, it was convenient to run some experiments to finely tune those conditions [34, 36]. We analyzed a 10 µg/mL standard mixture of the opioid peptides by CE-TOF-MS and tITP-CE-TOF-MS. In the second case, we injected different volumes of LE and TE (i.e. 10 or 15 s at 50 mbar), which contained 0.1, 0.25 or 0.5% (v/v) of NH₃ or HAC, respectively. Figure 2 shows some of the electropherograms. As can be observed, the analysis times were shorter than before with UV detection because of the aspirating effect of the nebulizer

gas, which promoted a decrease of migration times and separation resolution [36]. The results regarding peptide separation were in good agreement with our previous observations using UV detection. The three peptides were baseline resolved by CE-TOF-MS (Fig. 2A) while End1 comigrated with Met with tITP (Figs. 2B–D). Now, a separated extracted ion electropherogram (XIE) could be obtained for each peptide (Figs. 2A–D from i to iii) due to their differences of *M* values (Table 1). Thus, while End1 and Met were focused under the different tITP conditions, the process had a detrimental effect on peak width and height of DynA. The best compromise in terms of peak height and separation resolution was now reached using 0.1% (v/v) NH₃ and 0.1% HAC (v/v) (50 mbar 15 s both) as LE and TE (Fig. 2B). The slight decrease in NH₃ concentration of the LE in relation to the value indicated with UV detection (i.e. 0.25% (v/v) NH₃, Fig. 1D), allowed improved results for Met and DynA, while End1 focusing remained unaffected (compare Figs. 2B and C). Results could not be further improved. Thus, for example, when the concentration

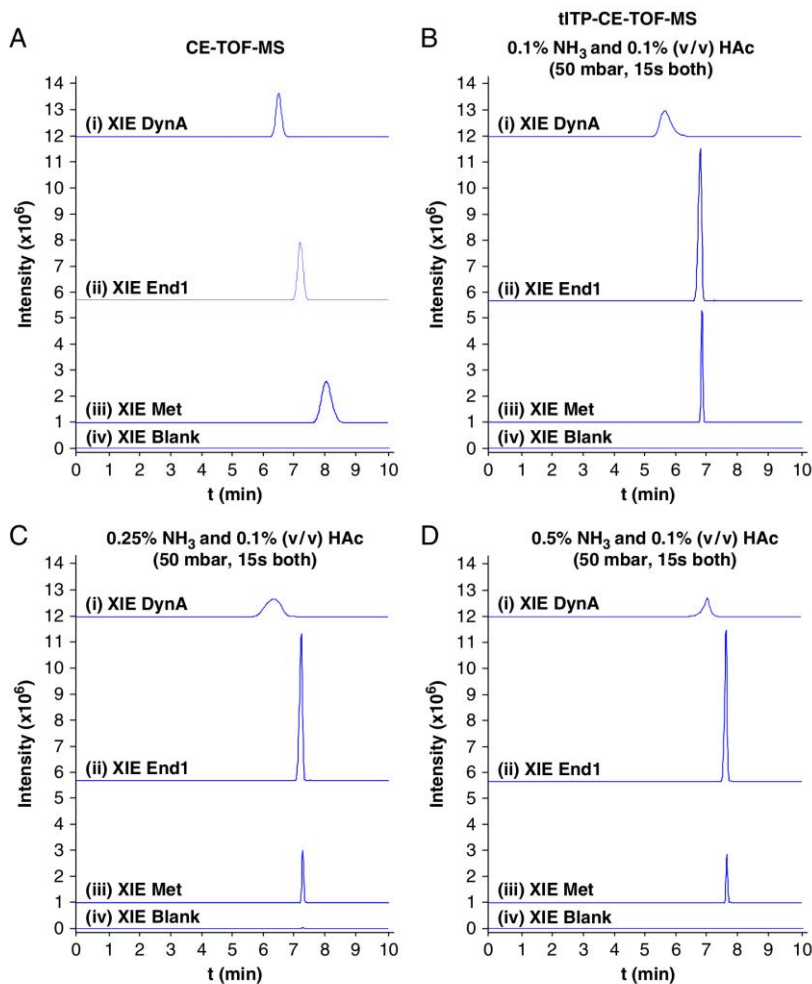


Figure 2. Extracted ion electropherograms (XIEs) of each opioid peptide for a 10- $\mu\text{g}/\text{mL}$ standard mixture and a blank solution by CE-TOF-MS (A) and tITP-CE-TOF-MS (B, C and D). (i) DynA, (ii) End1, (iii) Met and (iv) blank (all the peptide ions). See Table 1 for the m/z values. m/z window was 10 ppm.

of HAC in the TE was increased further than 0.1% (v/v), spray was unstable resulting in current breakdown.

Table 2 summarizes the %RSD values for repeatability of peak areas, migration times and M values, besides M accuracies and LODs for the studied peptides under the optimum tITP-CE-TOF-MS conditions. The %RSD values for repeatability ranged between 3 and 12% for peak areas, 0.4 and 1% for migration times and 2×10^{-5} and $5 \times 10^{-5}\%$ for M values. M accuracies were ranging between 1 and 5 ppm. All these results were consistent with the values obtained for the analysis of opioid peptides by CE-TOF-MS in a previous work [26]. According to the LODs, End1 and Met could be detected at 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and DynA, at 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. This meant a tenfold improvement of the LODs compared to those that could be achieved by CE-TOF-MS (0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, see Table 2), except for DynA that was not focused during the tITP process.

3.3 SPE-tITP-CE-TOF-MS

In a previous work, a SPE-CE-MS methodology for the analysis of opioid peptides was developed and validated using an IT mass spectrometer as detector [23]. Therefore, first we evaluated this methodology using the accurate mass and high-resolution TOF mass spectrometer. Figure 3A–C shows the XIEs obtained for a mixture containing 1 ng/mL of each opioid peptide (i) and a blank solution (ii) by SPE-CE-TOF-MS. As expected, separations were similar to those previously obtained by CE-TOF-MS (Fig. 2A) and SPE-CE-IT-MS [23]. Table 2 summarizes the %RSD values for repeatability of peak areas, migration times and M values, besides M accuracies, linearity ranges and LODs for the analysis of the opioid peptides by SPE-CE-TOF-MS. The %RSD values for repeatability ranged between 11 and 13% for peak areas and 7 and 10% for migration times. These

Table 2. Summary of quality parameters for the analysis of the studied opioid peptides

		DynA	End1	Met	
CE-IT-MS [23]	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	1	1	1	
CE-TOF-MS	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.05	0.05	0.05	
tITP-CE-TOF-MS	Repeatability (%RSD) ($c = 1 \mu\text{g/mL}$, $n = 10$)	Peak area	3	12	9
		t_m	1	0.4	0.4
		M ($\times 10^{-5}$)	2	3	5
		M accuracy (ppm)	4	5	1
		LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.05	0.005	0.005
SPE-CE-IT-MS [23]	LOD (ng/mL)	0.1	0.1	1	
SPE-CE-TOF-MS	Repeatability (%RSD) ($c = 1 \text{ ng/mL}$, $n = 10$)	Peak area	13	11	11
		t_m	10	7	9
		M ($\times 10^{-4}$)	1	1	1
		M accuracy (ppm)	1	1	1
		Linearity ($c = 0.1\text{--}10 \text{ ng/mL}$) ($R^2 > 0.99$)	$A = 2 \times 10^5 C - 7 \times 10^4$	$A = 2 \times 10^6 C - 3 \times 10^5$	$A = 2 \times 10^6 C - 6 \times 10^5$
	LOD (ng/mL)	0.1	0.1	0.1	
SPE-tITP-CE-TOF-MS	Repeatability (%RSD) ($c = 0.1 \text{ ng/mL}$, $n = 10$)	Peak area	38	24	21
		t_m	7	5	5
		M ($\times 10^{-4}$)	3	3	3
		M accuracy (ppm)	4	6	2
		Linearity ^{a)} ($c = 0.01\text{--}1 \text{ ng/mL}$) ($R^2 > 0.99$)	$A = 8 \times 10^6 C - 2 \times 10^5$	$A = 3 \times 10^6 C - 1 \times 10^5$	$A = 8 \times 10^6 C + 4 \times 10^3$
	LOD (ng/mL)	0.1	0.01	0.01	

a) Linearity range for DynA was 0.1–10 ng/mL.

values were consistent with the values previously obtained by SPE-CE-IT-MS [23]. %RSD values for M and M accuracies were 1×10^{-4} % and 1 ppm, respectively, similar to those of tITP-CE-TOF-MS (Table 2). Linearity was observed over the range between 0.1 and 10 ng/mL ($R^2 > 0.99$), which was slightly narrower than the previously reported by SPE-CE-IT-MS [23]. The LODs were 0.1 ng/mL for all the studied peptides, hence only the LOD of Met was improved tenfold in relation to SPE-CE-IT-MS (Table 2, [23]). Therefore, the expected improved sensitivity that can be derived from comparison of CE-TOF-MS and CE-IT-MS LODs (Table 2, [23]) was not confirmed in this case. In our opinion, we were not taking full advantage of the improved sensitivity of the TOF mass spectrometer because the maximum extraction efficiency of the C18 sorbent contained in the microcartridge was reached.

The combination of tITP with SPE-CE-TOF-MS was not straightforward. To perform SPE-tITP-CE-TOF-MS, it was necessary to guarantee the arrival to the microcartridge of the elution plug sandwiched between the LE and the TE. Therefore, a small pressure must be applied from the BGE inlet vial after injection of the TE and before applying the separation voltage [30]. The BGE was introduced at 5, 15 and 50 mbar during 660, 220 and 66 s, respectively. These pressure and introduction time values were equivalent to a volume of roughly 350 nL, which approximately filled a length of 8 cm from the beginning of the separation capillary column [35]. The best results were obtained at 5 mbar during 660 s, confirming that the applied pressure could not

be too high to avoid mixing of the LE, the eluent and the TE before passing through the microcartridge. No improvements were obtained when the BGE was introduced at 5 mbar for 500 or 820 s (i.e. approximately 270 nL in 6 cm and 442 nL in 10 cm of capillary column [35]).

Figures 3D–F show the XIEs obtained for a mixture containing 1 ng/mL of each opioid peptide (i) and a blank solution (ii) by SPE-tITP-CE-TOF-MS under the optimum analysis conditions. As can be observed, migration times were shorter than by SPE-CE-TOF-MS (Figs. 3A–C), probably because of the pressure applied before switching on the separation voltage. As expected from the experiments with tITP-CE-TOF-MS (Fig. 2B), while End1 and Met were focused to some extent, the tITP process had no benefits for DynA. Furthermore, while End1 (Fig. 3E) comigrated with Met (Fig. 3F), DynA was resolved (Fig. 3D) because unstacking was enough to achieve a good resolution before reaching the detector.

Table 2 summarizes the %RSD values for repeatability of peak areas, migration times and M values, besides M accuracies, linearity ranges and LODs for the analysis of the opioid peptides by SPE-tITP-CE-TOF-MS. The %RSD values for repeatability ranged between 21 and 38% for peak areas and 5 and 7% for migration times. The repeatabilities of peak areas were lower than in tITP-CE-TOF-MS or SPE-CE-TOF-MS probably due to the differences on the studied concentrations (Table 2), but the values for migration times were similar to those previously obtained in SPE-CE-TOF-MS. The peak of DynA was less intense than those of Met

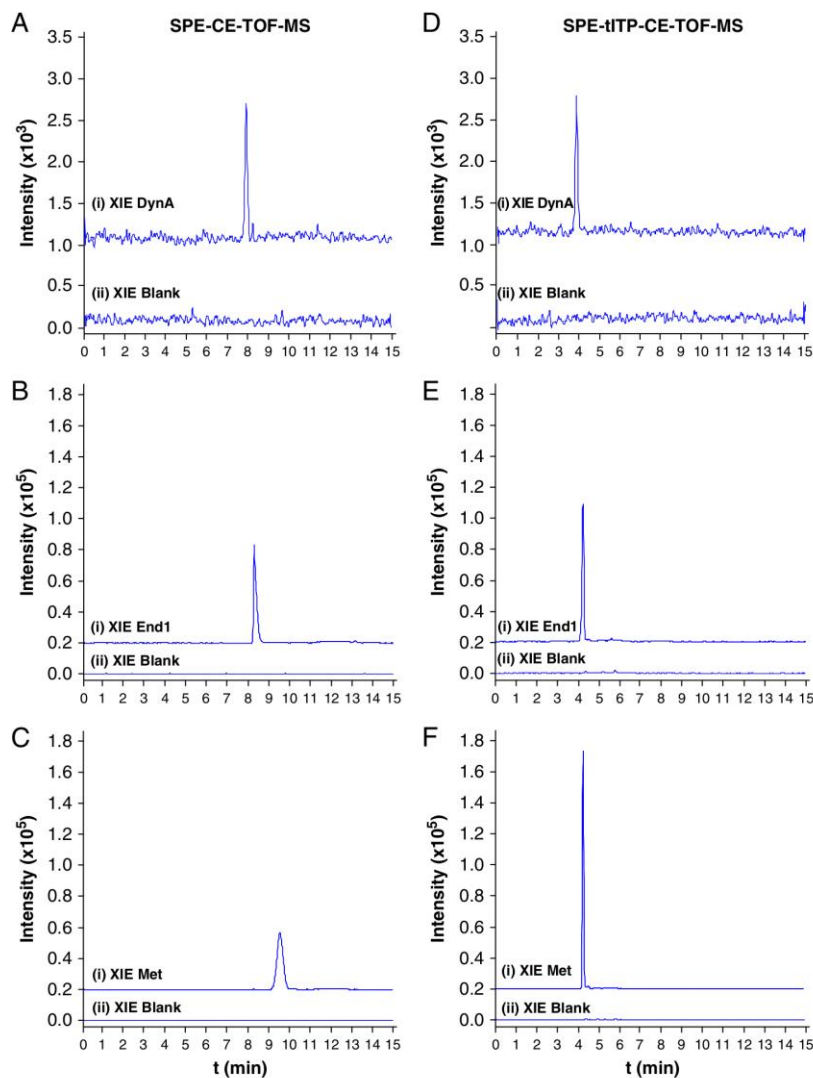


Figure 3. XIEs of each opioid peptide for a 1 ng/mL standard mixture and a blank solution by SPE-CE-TOF-MS (A, B and C) and SPE-tITP-CE-TOF-MS (D, E and F) using 0.1% (v/v) NH₃ and 0.1% (v/v) HAc (50 mbars 15 s both). (i) DynA, End1 or Met and (ii) blank (for each opioid peptide). See Table 1 for the *m/z* values. *m/z* window was 10 ppm.

and End1 (Figs. 3D–F) resulting in the highest %RSD values for peak areas and migration times. %RSD values for *M* and *M* accuracies were 3×10^{-4} % and around 4 ppm, respectively, similar to those summarized before (Table 2). Linearity was observed over the ranges between 0.01 and 1 ng/mL (R^2 0.99) for Met and End1 and between 0.1 and 10 ng/mL (R^2 0.99) for DynA, which were of a similar width as the previously reported by SPE-CE-TOF-MS (Table 2). According to the LODs, Met and End1 could be detected at 0.01 ng/mL and DynA at 0.1 ng/mL, which meant for Met and End1 a 10-fold and a 5000-fold improvement of the LODs compared to those previously achieved by SPE-CE-TOF-MS (0.1 ng/mL) and CE-TOF-MS (0.05 µg/mL), respectively (Table 2).

As an example of the potential of the SPE-tITP-CE-TOF-MS methodology for the analysis of opioid peptides in biological fluids, Fig. 4 shows the XIEs obtained for the analysis of a blank plasma sample and a plasma fortified with 1 ng/mL of each opioid peptide by SPE-CE-TOF-MS with and without tITP. The XIEs of the blank plasma samples without tITP (Figs. 4A–C (ii)) contained different matrix peaks that were separated to some extent from the opioid peptide peaks in the XIEs of the fortified samples (Figs. 4A–C (i)). The peaks corresponding to each opioid peptide in Figs. 4A–C (i) could be reliably identified from their molecular mass spectra due to the excellent mass accuracy and resolving power of the TOF-MS detector (see the mass spectra of Met at 2 and 4 GHz in Fig. 4C) [25, 26].

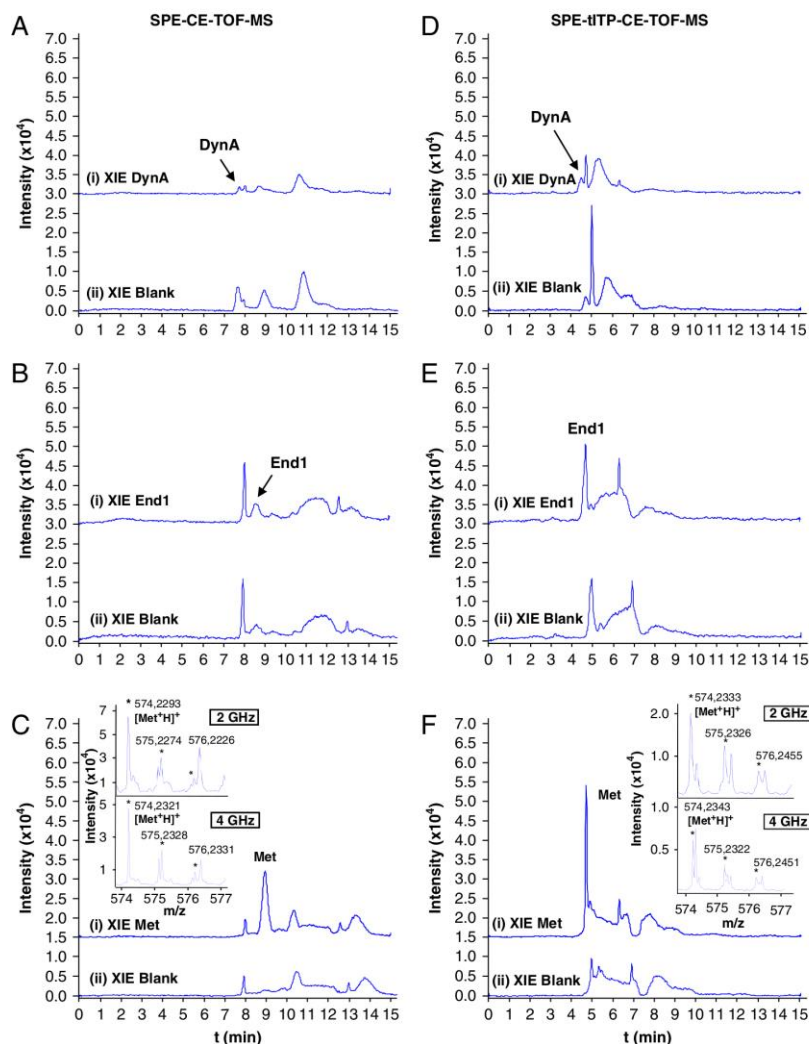


Figure 4. Electropherograms for a plasma sample spiked with 1 ng/mL of each opioid peptide and a blank plasma sample by SPE-CE-TOF-MS (A, B and C) and SPE-tITP-CE-TOF-MS (D, E and F) using 0.1% (v/v) NH_3 and 0.1% (v/v) HAc (50 mbars 15 s both). (i) DynA, End1 or Met and (ii) blank (for each opioid peptide). m/z window was 10 ppm. See C for the mass spectra of Met at 2 and 4 GHz and Table 1 for all the m/z values.

As expected, the tITP process promoted focusing of some of the matrix peaks together with the opioid peptides and a decrease of resolution (Figs. 4D–F). The decrease of resolution had a serious detrimental effect on the separation of the opioid peptides from some of the matrix compounds, resulting in single electrophoretic peaks containing several comigrating components. Therefore, to confirm the presence of the opioid peptides in highly diluted samples, it was necessary to scan at 4 GHz to get accurate molecular mass values from mass spectra with the highest resolution [26]. This conclusion could be easily drawn comparing the mass spectra at 2 and 4 GHz for Met in Figs. 4C and F. High resolution was needed with tITP to obtain a reliable molecular mass for Met in the presence of the comigrating

components. Under optimum conditions in plasma samples, DynA could be detected until 1 ng/mL by SPE-CE-TOF-MS and SPE-tITP-CE-TOF-MS while the LODs for Met and End1 were tenfold better with tITP (0.1 ng/mL) than without (1 ng/mL).

4 Concluding remarks

In this study, we have demonstrated that tITP can be combined with C18 SPE-CE-TOF-MS to improve sensitivity of peptide analysis. Preconcentration during tITP depended on the electrophoretic mobility of the analytes, the LE and the TE ions. The specific requirements of the LE and TE

ions for an efficient tITP and their mandatory volatility for an optimum detection sensitivity with on-line ESI-MS detection, limited the choice to diluted NH₃ and HAC solutions, and hence the potential to preconcentrate peptides with a wide range of electrophoretic mobilities. Using 0.1% (v/v) of NH₃ and HAC solutions as LE and TE, respectively, LODs in SPE-tITP-CE-TOF-MS were decreased tenfold in relation to SPE-CE-TOF-MS for Met and End1, while no improvements were obtained for DynA. The major drawback of using tITP, together with a slight decrease of peak area repeatability, was the lower separation resolution, which becomes crucial when plasma samples were analyzed due to the limited extraction selectivity of the C18 sorbent. In such cases, the excellent mass accuracy and resolving power of the TOF-MS detector resulted of special interest to achieve a reliable identification of the target peptides. However, the feasibility of SPE-tITP-CE-TOF-MS for the analysis of low-abundance components in complex biological samples may increase using sorbents with improved extraction selectivity (e.g. immunoaffinity sorbents).

Silvia Medina acknowledges the Generalitat de Catalunya for a FI (Formación Investigadora) fellowship. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Gaspar, A., Englmann, M., Fekete, A., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., *Electrophoresis* 2008, 29, 66–79.
- [2] Klampfl, C. W., *Electrophoresis* 2009, 30, S83–S91.
- [3] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2009, 30, 276–291.
- [4] Nesbitt, C. A., Zhang, H., Yeung, K. K. C., *Anal. Chim. Acta* 2008, 627, 3–24.
- [5] Dolnik, V., *Electrophoresis* 2008, 29, 143–156.
- [6] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, 31, 174–191.
- [7] Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 2148–2160.
- [8] Lin, C. H., Kaneta, T., *Electrophoresis* 2004, 25, 4058–4073.
- [9] Simpson, S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504–541.
- [10] Timerbaev, A. R., Hirokawa, T., *Electrophoresis* 2006, 27, 323–340.
- [11] Urbánek, M., Krivánková, L., Bocek, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 466–485.
- [12] Malá, Z., Krivánková, L., Gebauer, P., Bocek, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 243–253.
- [13] Veraart, J. R., Lingeman, H., Brinkman, U. A. Th., *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 483–514.
- [14] Guzman, N. A., Majors, R. E., *LC-GC North America* 2002, 19, 14–22.
- [15] Guzman, N. A., Blanc, T., Phillips, T. M., *Electrophoresis* 2008, 29, 3259–3278.
- [16] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 664–678.
- [17] Tempels, F. W. A., Underberg, W. J. M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 108–128.
- [18] Visser, N. F. C., Lingeman, H., Irth, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 535–558.
- [19] Breadmore, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 254–281.
- [20] Guzman, N. A., Phillips, T. M., *Anal. Chem.* 2005, 77, 61A–67A.
- [21] Guzman, N. A., *Electrophoresis* 2003, 24, 3718–3727.
- [22] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N. A., *J. Chrom. A* 2007, 1140, 205–212.
- [23] Hernandez, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 3957–3965.
- [24] Hernandez, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2008, 29, 3366–3376.
- [25] Staub, A., Schappler, J., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *Electrophoresis* 2009, 30, 1610–1623.
- [26] Borges-Alvarez, M., Benavente, F., Giménez, E., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2489–2498.
- [27] Kasicka, V., Prusik, Z., *J. Chromatogr.* 1983, 273, 117–128.
- [28] Tomlinson, A. J., Naylor, S., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1995, 18, 384–386.
- [29] Yang, Q., Tomlinson, A. J., Naylor, S., *Anal. Chem.* 1999, 71, 183A–189A.
- [30] Waterwal, J. C. M., Hommels, G., Teeuwssen, J., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W. J. M., *Electrophoresis* 2000, 21, 2851–2858.
- [31] Breadmore, M. C., Palmer, A. S., Curran, M., Macka, M., Avdalovic, N., Haddad, P. R., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2112–2118.
- [32] Haskins, W. E., Watson, C. J., Cellar, N. A., Powell, D. H., Kennedy, R. T., *Anal. Chem.* 2004, 76, 5523–5533.
- [33] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Hernández, E., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* 2006, 577, 68–76.
- [34] Benavente, F., Medina-Casanellas, S., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1–11.
- [35] Heiger, D., *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction*. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2000, pp. 83–86.
- [36] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Balaguer, E., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1457.

EVALUATION OF FRITLESS SOLID-PHASE EXTRACTION COUPLED ON-LINE WITH CAPILLARY ELECTROPHORESIS - MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF OPIOID PEPTIDES IN CEREBROSPINAL FLUID

Silvia Medina-Casanellas^a, Yvonne H. Tak^b, Fernando Benavente^{a*}, Victoria Sanz-Nebot^a, Javier Sastre Toraño^b, Govert W. Somsen^{bc}, Gerhardus J. de Jong^b

^a Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Biomolecular Analysis, Utrecht University, P.O. Box 80082, 3508 TB Utrecht, The Netherlands

^c AIMMS Division of BioMolecular Analysis, VU University, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

Keywords: Capillary Electrophoresis/ Cerebrospinal Fluid/ In-line/ Neuropeptide/ Mass spectrometry/ On-line/ Preconcentration.

Abstract

A method was developed for the analysis of opioid peptides by on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis with UV and mass spectrometry detection (SPE-CE-UV and SPE-CE-MS) using a fritless microcartridge. Sample loading volume, elution time and microcartridge length were optimised by SPE-CE-UV and adapted to use MS detection. The optimised fritless microcartridge of 4 mm length and 150 μm id was packed with a C_{18} sorbent of particle size above 50 μm . Peak area and migration time repeatabilities for the studied peptides by SPE-CE-MS were between 12-27% and 4-5%, respectively. Linearity was excellent for all peptides between concentrations of 5 and 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Recovery was less efficient for the less hydrophobic peptide dynorphin A (22%) than for endomorphin 1 (66%) and methionine enkephaline (78%). The limits of detection (LODs) of all opioid peptides were improved 100-fold by SPE-CE-MS regarding CE-MS (1 and 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively). These results were compared with those obtained in our previous works using a double-frit microcartridge, which yielded LODs of 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and shorter analysis times, but at cost of a lower resolution. Spiked cerebrospinal fluid (CSF) samples were analysed by SPE-CE-MS to demonstrate the applicability of the system to biological samples. A simple off-line CSF deproteination pre-treatment was used, obtaining similar peak area and migration time repeatabilities as for standard mixtures and LODs around 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful and well-established technique for the analysis of a wide variety of biomolecules, such as peptides and proteins [1-6]. Biomolecules are often present at low concentration in biological samples and trace analysis by CE has

some limitations due the poor concentration sensitivity that originates from the very small sample injection volumes [7]. Several strategies have been reported in order to overcome sensitivity issues in CE. The most common proposals include the use of selective and sensitive detectors (e.g. laser-induced-fluorescence (LIF) and mass spectrometry

(MS) detection) [1, 6, 8-12] and the application of electrophoretic and chromatographic preconcentration techniques [13-26]. Electrophoretic preconcentration techniques (e.g. stacking, dynamic pH junction, transient-isotachopheresis, sweeping, etc.) have achieved a considerable on-line sensitivity enhancement, although in most cases the injected sample volume is limited to that of the capillary volume [18-21]. In general, chromatographic preconcentration techniques, such as solid-phase extraction (SPE), allow the analysis of larger volumes of sample.

In SPE, a selective sorbent retains the analytes from a large volume of sample and, after rinsing, the retained analytes are eluted in a small volume of an appropriate solvent, resulting in sample clean-up and preconcentration. SPE and CE can be coupled in several ways [18, 22-26]. In off-line and at-line SPE-CE there is no physical connection between both techniques, i.e. the sample is transferred from the SPE to the CE. While off-line SPE-CE is time-consuming because it requires extensive manual handling, in at-line SPE-CE a device transfers the SPE extracts to the CE system [18, 23-25]. An advantageous alternative coupling approach involves the integration of the SPE microcartridge with the CE capillary directly or via a valve or tee connector [22-29]. These systems are commonly referred as in-line or on-line SPE-CE. In one of the typical configurations for on-line SPE-CE, the SPE microcartridge or analyte concentrator containing an appropriate sorbent is inserted near the inlet of the separation capillary. In order to avoid bleeding, the sorbent particles are usually

packed and retained in the microcartridge body with two frits. Microcartridges with frits have been widely applied for preconcentration of peptides, proteins, and drugs, providing good results [30-36]. Nevertheless, frits may promote column back pressure, electrosmotic flow (EOF) disturbance, bubble formation and current drops or breakdowns [26, 39-41]. For this reason, fritless packed microcartridges have been developed, where the sorbent particle size is slightly higher than the inner diameter of the separation capillary to prevent bleeding [39-43]. Maijón et al. showed the suitability of a fritless microcartridge containing Oasis® HLB sorbent with particle size around 60 μm for the analysis of pharmaceutical compounds in river samples by SPE-CE-UV obtaining LODs in the range 0.06 and 0.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for standard solutions and 0.19 and 1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for river water samples [39]. Lara et al. have also described various applications of fritless microcartridges for SPE-CE with UV and MS detection using a separation capillary of 50 μm id and several sorbents with an average particle size above 55 μm [40-42]. For example, the analysis of eight quinolone antibiotics in chicken muscle by SPE-CE-MS using a mixed-mode Oasis MCX sorbent allowed to achieve LODs ranged between 0.017 and 0.059 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for standard solutions and 40 and 140 $\text{ng}\cdot\text{Kg}^{-1}$ for chicken muscle samples [40]. In other applications, triazine herbicides were detected at concentrations between 0.2 and 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ by SPE-CE-UV with a commercial molecularly imprinted polymer (MIP) [41] or the LODs of sulfonamides in water samples ranged between 0.3 and 0.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ by fritless SPE-CE-UV using an Oasis HLB sorbent [42]. This sorbent

has also been employed by Botello et al. for the analysis of several drugs, such as 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) and codeine (COD), in water and human urine by SPE-CE-UV and SPE-CE-MS, respectively, achieving LODs in the ranges 0.07 and 0.27 ng·mL⁻¹ for water samples and 0.013 and 0.210 ng·mL⁻¹ for human urine samples [43-44]. Tak et al. decreased the LODs of these drugs in standard mixtures until a few pg·mL⁻¹ by SPE-CE-MS [45].

In the present article, we have optimised the performance of a fritless microcartridge packed with a C₁₈ sorbent for the analysis of opioid peptides by SPE-CE-UV and SPE-CE-MS. Opioid peptides play a major role in nociception and are usually found at extremely low concentration in body fluids. As we have widely evaluated microcartridges with frits in previous works [33-38], we have subsequently compared the performance of both approaches. The aim is to elucidate and generalize the advantages and disadvantages of double-frit and fritless microcartridges for SPE-CE. Moreover, spiked CSF was analysed to demonstrate the applicability to biological samples.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals were of analytical reagent grade. Acetonitrile and methanol were provided by Biosolve (Dieuze, France). Isopropanol, formic acid (HFor, 98-100%), acetic acid (HAc, 96-98%), ammonia (25%), sodium hydroxide (98-100%), dynorphin A (1-7) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 867.4715 Da, DynA), endomorphin 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂,

610.2904 Da, End1) and methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, 573.2257 Da, Met) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Purified water was obtained using a Synergy UV water purification system (Millipore, Molsheim, France). Sep-Pak C₁₈ cartridges (silica, 55-105 µm particle diameter, 125 Å pore size) were supplied by Waters (Milford, MA, USA).

Aqueous standard solutions of each peptide (1000 mg·L⁻¹ of DynA and 500 mg·L⁻¹ of End1 and Met) were prepared and stored in a freezer at -21°C. Working standard solutions were obtained by diluting with water. The background electrolyte (BGE) contained 50 mM of HAc and 50 mM of HFor, adjusted to pH 3.5 with ammonia. The elution solvent was 60:40 (v/v) methanol/water containing 50 mM HAc and 50 mM HFor (pH 2.3). The sheath liquid solution was 60:40 (v/v) isopropanol-water, with 0.05% (v/v) of HFor. All solutions were prepared fresh at least weekly and stored at 4°C when not in use. The sheath liquid was degassed for 15 min by sonication before use.

2.2. Cerebrospinal fluid sample preparation

CSF samples (typically between 25 and 100 µL) were spiked (1:10 v/v) with working standard solutions to yield final concentrations of the peptides ranging from 1 to 500 ng·mL⁻¹. The spiked CSF samples were pretreated off-line, in order to eliminate high molecular mass compounds. They were mixed with ice cold acetonitrile (1:6, v/v), vortexed for 30 s and incubated at -21°C for 45 min. After centrifugation (5 min, 5900 g) the supernatant was collected. One hundred

μL of ice cold acetonitrile were added to the precipitate, which was then vortexed and centrifugated (5 min, 5900 g). Then, the supernatant was collected and combined with the first one. The resulting solution was evaporated to dryness with nitrogen and reconstituted with water to the original volume.

2.3. Apparatus and procedures

All experiments were carried out in an Agilent Technologies G1600 HPCE system. Control, data acquisition and UV data analysis (λ 214 nm) were performed using ChemStation software (Agilent Technologies, Waldrom, Germany). MS detection was performed using a micrOTOF orthogonal accelerated time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Control, data acquisition and MS data analysis were performed using MicroTOF control and data analysis softwares (Bruker Daltonics). MS parameters were tuned for the analysis of the studied peptides in positive mode by infusion experiments with a standard peptide mixture of $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [37-38]. The optimum parameters were: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 200°C , drying gas flow rate $4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizer gas 9 psi, capillary exit -100 V, skimmer voltages 60 and 40 V and hexapole RF voltage 300 Vpp. Data were collected in profile at 1 Hz between 100 and 1250 m/z. The micrOTOF mass spectrometer was coupled to the CE system with an orthogonal G1603A sheath-flow interface (Agilent Technologies). Sheath liquid was delivered at a flow rate of $3.3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump (Holliston, MA, USA).

2.3.1. CE-UV and CE-MS

All the experiments were conducted at 25°C . Capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). New capillaries (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) were activated on-line (CE-UV) or off-line (CE-MS) flushing with 1 M NaOH (15 min), water (15 min) and BGE (10 min). For CE-UV, a 57 cm L_T (total length) \times 50 μm id \times 365 μm od fused-silica capillary was used (L_D , effective length, 48.5 cm). Samples were hydrodynamically injected at 50 mbar for 15 s (approx. 20 nL) and separation voltage was 25 kV (normal polarity). For CE-MS, a 72 cm L_T \times 50 or 75 μm id \times 365 μm od fused-silica capillaries were used. Samples were hydrodynamically injected at 33.5 mbar for 15 s or 3 s (approx. 10 nL) and 25 or 17 kV were applied for the separation. CE-UV and CE-MS capillaries were rinsed between runs for 3 min with BGE. Sample volumes were estimated using the Hagen–Poiseuille equation [7]. All capillaries were stored overnight filled with water.

2.3.2. SPE-CE-UV and SPE-CE-MS

Construction of the microcartridge

The fabrication of the microcartridge, schematically described in fig. 1, was monitored under a stereomicroscope. The capillaries with microcartridges were set up to fit a commercial capillary cassette (Agilent Technologies). Around 2 mm of a piece of fused-silica capillary of 150 μm id and 365 μm od was introduced into an 8-10 mm polytetrafluoroethylene (PTFE) sleeve (350 μm id). Then, it was cut using a ceramic cutter to obtain the body of the microcartridge (4 mm L_T \times 150 μm id \times

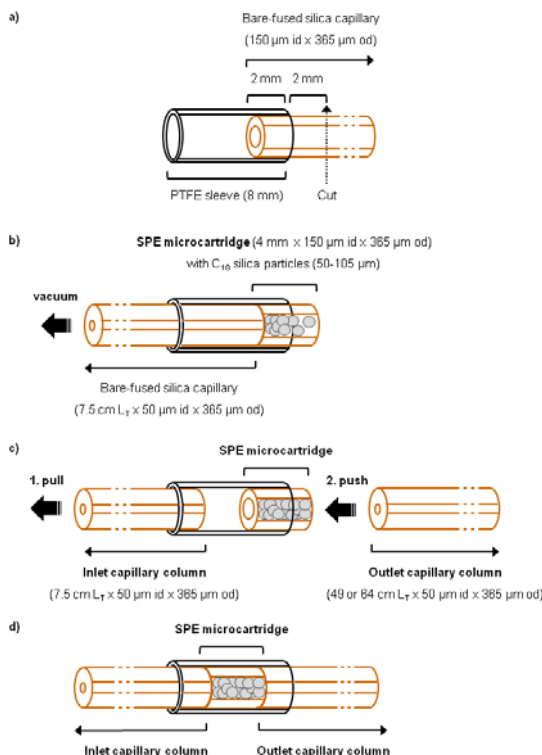


Figure 1. Scheme of the construction procedure for the fritless microcartridge.

365 μm od) (fig. 1a). The inlet end of the capillary, 7.5 cm \times 50 μm id \times 365 μm od, was connected to the microcartridge using the PTFE sleeve. Then, it was vacuum-packed with C_{18} SPE sorbent. The irregularly shaped particles were previously sieved using a 50 μm iron steel sieve (VWR international, Amsterdam, The Netherlands) to discard fine particles (fig. 1b). After packing, the microcartridge was carefully pushed towards the middle of the PTFE sleeve with the outlet end of the capillary (either 49 or 64 cm \times 50 μm id \times 365 μm od, for SPE-CE-UV and SPE-CE-MS, respectively (fig. 1c)). The PTFE sleeve provided a tight junction and no adhesive sealing was required. All capillary ends were cleanly cut, in order to minimize dead volume and leaking at the joints (fig. 1d). The microcardruges were

checked for abnormal flow restriction before the analysis using a plastic syringe with an appropriate connector.

SPE-CE-UV and SPE-CE-MS methods

All the experiments were conducted at 25°C. Capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). Before the first use and between runs, the SPE-CE capillaries were flushed with water (2 min), methanol (2 min), water (2 min) and BGE (3 min). The sample was introduced at 930 mbar for 10 min (19 and 12 μL for SPE-CE-UV and SPE-CE-MS, respectively). Sample volumes were determined measuring the flow through the capillaries flushing at 930 mbar by measuring the time required to collect 1.0 μL of water in a micro pipette tip with ring

marks (Hirschmann, Eberstadt, Germany). A final rinse with BGE (2 min) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before electrophoretic separation. Retained peptides were eluted by injecting the elution solvent at 50 mbar for 50 s or 63 s in SPE-CE-UV or SPE-CE-MS, respectively (approx. 67 nL in both cases [7]). Separation was carried out at 25 kV (normal polarity). In SPE-CE-UV, a pressure of 25 mbar was applied during separation to reduce analysis time. To avoid carryover, the capillary was rinsed with water (4 min) and acetonitrile (4 min) after a run. All capillaries were stored overnight filled with water.

Recoveries of the SPE-CE method were estimated as an average of 28 measurements by comparing the peak areas obtained by CE-UV and SPE-CE-UV for the analysis of standard peptide mixtures at concentration ranges of 12.5-200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 12.5-800 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. The absolute amount of each peptide was calculated using the peptide concentration and the loaded sample volume.

3. Results and discussion

3.1. SPE-CE-UV

The SPE-CE methodology with the fritless microcartridge was optimized using a UV detector. The starting conditions such as BGE, elution solution and sorbent were selected based on our previous works [36, 37]. In our experience using double-frit microcartridges in SPE-CE, silica-based C_{18} sorbents provided the best results for preconcentration of opioid peptides [36]. Several experimental conditions were studied using the

standard mixtures of DynA, End1 and Met. Various pressures during the electrophoretic separation (0-50 mbar) and separation voltages (5-30 kV) were tested. As the pressure during separation was increased from 0 to 50 mbar, the total analysis time was reduced from 33 to 11 min, but resolution also decreased. For instance, the resolution between DynA and End1 was reduced from 4.6 to 3.3. Finally, we selected 25 kV and 25 mbar because these values provided the best compromise between separation resolution and analysis time. Sample loading time at 930 mbar was evaluated between 5 and 60 min using fritless microcartridges of different lengths (2, 4 and 7 mm) and a standard mixture of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each peptide. The performance of the 7 mm-microcartridge was hampered by an elevated backpressure (data not shown), which was estimated measuring the flow through the capillary as indicated in the experimental section. In 7 mm-microcartridges, much more time was required to introduce a certain volume of sample than with shorter microcartridges (no backpressure was observed), resulting in significant smaller peak areas for a given sample introduction time (data not shown). As can be observed in fig. 2, the peak areas of the eluted peptides increased with loading time. Similar peak areas were obtained using the microcartridges with a length of 2 and 4 mm, but relative standard deviation (%RSD) values were higher for the 2 mm-microcartridge (i.e. above 25% for all peptides). As a larger amount of sorbent was expected to allow an increased sample loadability, the 4 mm cartridge was selected for further experiments.

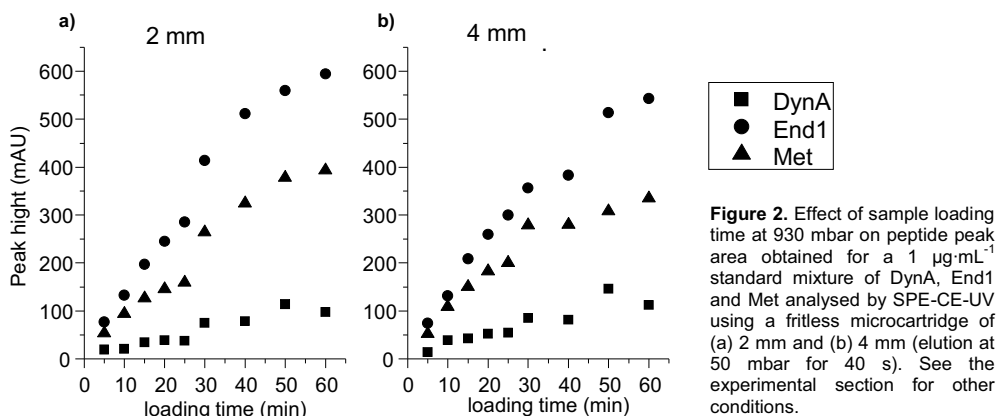


Figure 2. Effect of sample loading time at 930 mbar on peptide peak area obtained for a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture of DynA, End1 and Met analysed by SPE-CE-UV using a fritless microcartridge of (a) 2 mm and (b) 4 mm (elution at 50 mbar for 40 s). See the experimental section for other conditions.

Furthermore, a 4 mm microcartridge was also easier to construct due to its longer length. The use of a loading time above 50 min turned out to be disadvantageous, as the peak areas were no further increased for DynA. The sample loading time for the rest of experiments was maintained at 10 min in order to avoid long analysis time. The composition of the elution solution optimised in a previous work was 60:40 (v/v) methanol/water containing 50 mM HAc and 50 mM HFor (pH 2.3) [36, 37]. As the dimensions of the fritless microcartridge were considerably smaller, we revisited the eluent composition, testing different percentages of methanol. However, with methanol content below 60% (v/v) elution was not quantitative, while CE separation current became unstable using methanol contents higher than 70% (v/v). The elution solution with 60% (v/v) methanol was injected at 50 mbar for 30, 40, 50 and 60 s, after loading a $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ peptide mixture for 10 min. The highest peak areas were obtained injecting the elution solution for 50 s, although only slight differences were observed with regard to the other eluent conditions. Fig. 3 shows the SPE-CE-MS analysis of a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

standard mixture of opioid peptides using a 4 mm fritless microcartridge under optimum loading and elution conditions. Peak shape and resolution of the peptides were satisfactory. Recoveries were determined by comparing CE-UV and SPE-CE-UV results, as indicated in the experimental section. Results indicated that SPE was more efficient for End1 and Met (66 and 78%, respectively) than for DynA (22%). The lower retention of DynA on the C_{18} sorbent was probably due to its lower hydrophobicity as compared to End1 and Met [46].

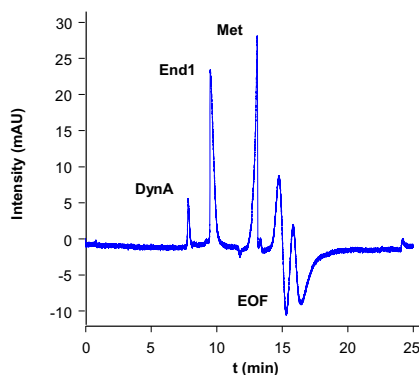


Figure 3. Electropherogram for a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture of the studied opioid peptides by SPE-CE-UV with a fritless microcartridge under optimum conditions.

Table 1. Summary of quality parameters for the analysis of the studied opioid peptides.

	50 $\mu\text{m id}$				75 $\mu\text{m id}$
	FRITLESS				DOUBLE-FRIT
	Repeatability ¹ (%RSD) (c=0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, n=15)		Linearity ² c ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ³ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3)	LOD ³ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3) [36]
a) SPE-CE-UV	Peak area	t _m			
DynA	17	7.0	0.5 – 10	0.5	0.01
End1	10	7.0	0.1 – 4	0.1	0.01
Met	12	6.7	0.1 – 2	0.1	0.01
	WITHOUT SPE				WITHOUT SPE
	Repeatability ¹ (%RSD) (c=1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, n=15)		Linearity ² c ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ³ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3)	LOD ³ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3)
	b) CE-MS	Peak area			
DynA	9.9	1.2	0.1 – 100	0.1	0.05
End1	11	1.5	0.1 – 100	0.1	0.05
Met	9.2	2.1	0.1 – 100	0.1	0.05
	FRITLESS				DOUBLE-FRIT
	Repeatability ¹ (%RSD) (c=25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, n=15)		Linearity ² c ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ³ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3)	LOD ³ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (S/N>3)
	c) SPE-CE-MS	Peak area			
DynA	12	4.4	5 – 60	1	0.1
End1	15	5.0	5 – 60	1	0.1
Met	27	4.6	5 – 60	1	0.1

¹A single capillary was used within the same day.

²Standard mixtures were analysed in duplicate at a minimum of four different concentrations.

³Diluted standard mixtures were analysed until no peptides were detected (S/N was always higher than 3).

Table 1-a summarises some quality parameters that were evaluated for the SPE-CE-UV analysis of standard mixtures using a 4 mm fritless microcartridge. Acceptable %RSD values for repeatability of peak areas and migration times were obtained for the three peptides. Linearity (peak area vs. concentration) was evaluated in the range between 0.1 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, yielding $R^2 > 0.99$ for DynA (0.5-10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), End1 (0.1-4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and Met (0.1-2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). LODs were

0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for DynA and 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for End1 and Met, which represented a 10 and a 50-fold improvement, respectively, on the values that were obtained by CE-UV (i.e. 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Taking into account our previous observations in fig. 2-b, these LODs could be potentially improved increasing the sample loading time from 10 min to 60 min. Indeed, only End1 could be detected at lower concentration (i.e. 0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

3.2 SPE-CE-MS

We first studied the analysis of the opioid peptides by CE-MS using a separation capillary of 50 μm id. Fig. 4-a shows the sum of the extracted ion electropherograms (EIEs) of each peptide obtained for a 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture. Baseline resolved peaks were detected in less than 20 min. Table 1-b summarises the analytical parameters that were evaluated. LODs were 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for all the peptides, which represents a 50-fold improvement as compared to CE-UV (i.e. 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). %RSD values for repeatability of peak area and migration time were between 9.2-11% and 1.2-2.1%, respectively. Good linearity ($R^2 > 0.99$) was observed between 0.1 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

The SPE-CE-UV method was transferred to SPE-CE-MS. As the total capillary length was 72 cm in SPE-CE-MS vs. 57 cm in SPE-CE-UV, the injection time for the elution solution was increased from 50 s to 63 s to inject the same volume. Fig. 4-b show the sum of the EIEs for a 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ peptide mixture analysed by SPE-CE-MS. The three peaks were resolved in a slightly longer time than by CE-MS (fig. 4-b), which could be caused by the initial lower current induced by the presence of a 60% (v/v) of less-conductive methanol in the elution solution. DynA and End1 showed similar relative peak height by SPE-CE-MS than in CE-MS, whereas the relative peak height for Met was significantly higher. The differences in peak heights could be attributed to the differences in recoveries. The extraction process seemed to be more effective for End1 and Met, hence the relative peak heights were significantly

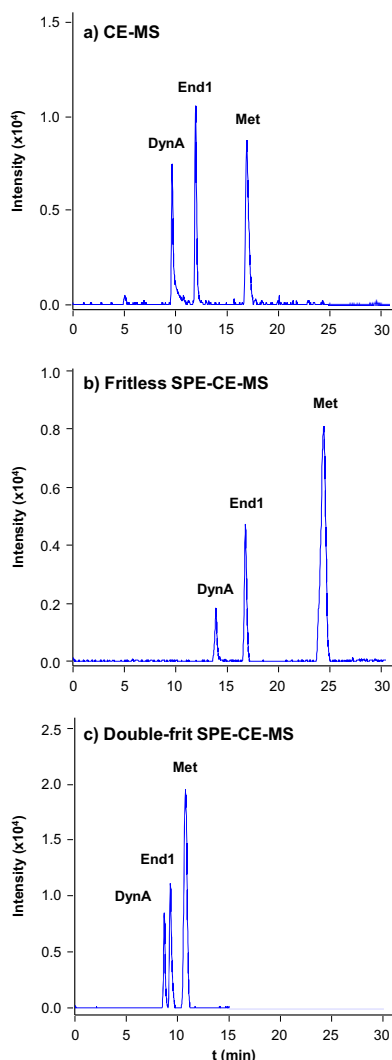


Figure 4. Sum of the extracted ion electropherograms (EIEs) of 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 60 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard peptide mixtures analysed by (a) CE-MS, (b) fritless SPE-CE-MS and (c) double-frit SPE-CE-MS under optimum conditions. Separation capillaries with (a, b) 50 μm id and (c) 75 μm id were used.

higher for these peptides in Fig. 4-b. Table 1-c shows the analytical parameters obtained for the studied peptides by SPE-CE-MS. The %RSD values for peak areas of DynA and End1 were similar to those obtained by CE-MS and SPE-CE-UV, whereas %RSD values for Met were two times higher. The use of the

microcartridge also increased the %RSD values for migration times. The linear range was narrower than in CE-MS but wider than in SPE-CE-UV. The LODs for the peptides in SPE-CE-MS were 100-fold lower than the LODs by CE-MS (i.e. $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ table 1-b).

3.3 Comparison of double-frit and fritless microcartridges

The results with the current fritless microcartridge were compared with those that were obtained using the double-frit microcartridge described in our previous works [33-36]. In that case, the microcartridge was inserted at the same place in the separation capillary but the C_{18} sorbent from Sep-Pak cartridges was retained between two polyethylene frits (0.1 cm) obtained from small fragments of the original filters found in the SPE cartridges. The total column lengths were identical as those described before (i.e. 57 cm in SPE-CE-UV and 72 cm in SPE-CE-MS). With the double-frit microcartridge, $75 \mu\text{m}$ id separation capillaries were used, which means that larger sample volumes were introduced at 930 mbar for 10 min ($76 \mu\text{L}$ and $60 \mu\text{L}$ in SPE-CE-UV and SPE-CE-MS, respectively [7]). Furthermore, the microcartridge had a bigger inner volume (0.34 mm^3 for a $7 \text{ mm L}_T \times 250 \mu\text{m}$ id double-frit microcartridge vs. 0.07 mm^3 for a $4 \text{ mm L}_T \times 150 \mu\text{m}$ id fritless microcartridge) and sorbent particles were not sieved, resulting in a wider range of diameters. Fig.4-c shows the sum of the EIEs for a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture by double-frit SPE-CE-MS. Baseline separation was achieved in only 12 min. Comparing these results to those obtained with the fritless

microcartridge (fig. 4-b), the analysis time were significantly shorter. However, the analysis times for CE-MS using a $75 \mu\text{m}$ id capillary (data not shown) were similar to those obtained with a $50 \mu\text{m}$ id capillary (fig. 4-a). With fritless microcartridges, a gradual increase in current was observed at the beginning of the run by SPE-CE-MS, which may cause a slower onset of the separation. This phenomenon was less significant using the double-frit microcartridge, probably because the elution solution was shorter with regard to the total capillary volume (12 mm vs. 34 mm for double-frit and fritless SPE-CE-MS, respectively), leading to a faster start of the separation and eventually to shorter analysis time.

Different LODs were found using the fritless and double-frit microcartridges. In SPE-CE-UV, for the fritless microcartridge $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ was found for Met and End1 and $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for DynA (table 1-a). However, peptides were detected at $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ by the double-frit microcartridge (table 1-a). In the same way, LODs were also lower by double-frit SPE-CE-MS ($0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, table 1-c). These differences are mainly caused by the larger injected sample volume due to the wider capillary id. However, as there is only a 4 or 5-fold difference in the loaded sample volume, probably, the sorbent amount and particle size also play a minor role, resulting in a better extraction of the opioid peptides. Moreover, the double-frit microcartridge yielded improved peak efficiency, which also leads to lower LODs. To further explore the differences in sensitivities, it would be interesting to prepare a fritless microcartridge using $75 \mu\text{m}$ id capillaries. However, if particles larger than $75 \mu\text{m}$ were selected by

sieving the sorbent, these particles would have an even lower active surface area, which probably would cause a decrease on the extraction performance for the peptides.

3.4 Analysis of CSF

The performance of the SPE-CE-MS methodology with fritless microcartridges was evaluated for the analysis of biological samples. To this end, CSF samples were spiked with the three studied peptides. At first, CSF samples were analysed without any off-line sample pretreatment, but migration times increased with the number of analysis. The flow through the capillaries was probably reduced due to the elevated backpressure promoted by microcartridge clogging with high molecular mass CSF components. Therefore, a simple sample pretreatment with acetonitrile, which provided excellent results to precipitate proteins from plasma samples before the analysis of opioid peptides [35], was applied. With this clean-up step, several sample measurements could be done with the same microcartridge, separations were similar to those observed with standard peptide mixtures (fig. 4-a) and replacement was required only after 6-8 runs. Peak area and migration time repeatability were determined analysing 40 ng·mL⁻¹ spiked CSF samples (n=4) and %RSD values were between 8-11% and 6-9%, respectively. LODs were also similar to those found for standards (5 ng·mL⁻¹ vs. 1 ng·mL⁻¹, table 1-c). Overall, the SPE-CE-MS method shows potential for the analysis of real biological samples with minimum off-line sample pretreatment. Furthermore, the

reconstitution of the evaporated analytes after protein precipitation in less than the original volume could even further concentrate the peptides, resulting in lower LODs.

4. Concluding remarks

We have optimised a SPE-CE-UV methodology with the fritless microcartridge that has been later adapted to SPE-CE-MS. The use of the microcartridge improved the LOD of the studied peptides until a factor of 50 and 100 when using UV and MS detection, respectively. Peak area and migration time repeatability and linearity were satisfactory. Besides, the described results with spiked CSF samples suggest that the method can also be applied to biological samples. We have subsequently compared the performances of double-frit and a fritless microcartridge for SPE-CE-UV and SPE-CE-MS. The three peptides could be detected at 0.1 and 1 ng·mL⁻¹ by SPE-CE-MS using the microcartridge with frits and without frits, respectively, which represented a 500 and 100-fold improvement of the LODs obtained by CE-MS. The LODs of the studied opioid peptides were 10-fold better by double-frit SPE-CE-MS, probably because of the difference in the microcartridge design, the sample volume loaded and the improved peak efficiency promoted by shorter migration times. In contrast, construction of fritless microcartridges was straightforward and separation resolution was enhanced, at a cost of increasing total separation time. These results with fritless microcartridges could be further improved using particulate and nonparticulate sorbents,

such as monoliths, of higher active surface area and appropriate porosity. Moreover, other on-line microcartridge designs that allow loading larger sample volumes in shorter times, such as the cruciform and staggered designs proposed by N. Guzman, are very promising [26]. In such designs sample loading time by pressure is not determined by the separation capillary dimensions, because loading direction is orthogonal to separation direction.

Acknowledgements

Sílvia Medina acknowledges the Generalitat de Catalunya for a FI (Formació Investigadora) and a BE (BE-DGR 2011, Beques per a la recerca a l'estranger) fellowships. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2011-27130).

5. References

- [1] Kasicka, V. *Electrophoresis* 2012, 33, 48-73.
- [2] Bytzek, A.K., Hartinger, C.G. *Electrophoresis* 2012, 33, 622-634.
- [3] Pascali, J.P., Bortolotti, F., Tagliaro, F., *Electrophoresis* 2012, 33, 117-126.
- [4] Jabeen, R., Payne, D., Wiktorowicz, J., Mohammad, A., Petersen, J. *Electrophoresis* 2006, 27, 2413-2438.
- [5] Rabanes, H.R., Guidote, A.M., Quirino, J.P. *Electrophoresis* 2012, 33, 180-195.
- [6] Dolník, V. *Electrophoresis* 2008, 29, 143-156.
- [7] Heiger, D., High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2000, pp. 83-86.
- [8] Pioch, M., Bunz, S.C., Neusüß, C. *Electrophoresis* 2012, 33, 1517-1530.
- [9] Gaspar, A., Englmann, M., Fekete, A., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P. *Electrophoresis* 2008, 29, 66-79.
- [10] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J. *Electrophoresis* 2009, 30, 276-291.
- [11] Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A. *Electrophoresis* 2008, 29, 2148-2160.
- [12] Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Electrophoresis* 2011, 32, 66-82.
- [13] Wen, Y., Li, J., Ma, J., Chen, L. *Electrophoresis* 2012, 33, 2933-2952.
- [14] El Rassi, Z. *Electrophoresis* 2010, 31, 174-191.
- [15] Breadmore, M.C. *Electrophoresis* 2007, 28, 254-281.
- [16] Nesbitt, C.A., Zhang, H., Yeung, K.K.C. *Anal. Chim. Acta* 2008, 627, 3-24.
- [17] Simpson Jr., S.L., Quirino, J.P., Terabe, S. *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504-541.
- [18] Veraart, J.R., Lingeman, H., Brinkman, U.A. Th. *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 483-514.
- [19] Lin, C.H., Kaneta, T. *Electrophoresis* 2004, 25, 4058-4073.
- [20] Timerbaev, A.R., Hirokawa, T. *Electrophoresis* 2006, 27, 323-340.
- [21] Malá, Z., Krivánková, L., Gebauer, P., Bocek, P. *Electrophoresis* 2007, 28, 243-253.
- [22] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C. *Anal. Chim. Acta* 2008, 616, 1-18.
- [23] Ramautar, R., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *Electrophoresis* 2012, 33, 243-250.
- [24] Ramautar, R., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *Electrophoresis*, 2010, 31, 44-54.
- [25] Alexander Tempels, F. W., Underberg, W.J. M., Somsen, G.W., de Jong, G. J. *Electrophoresis* 2008, 29, 108-128.
- [26] Guzman, N.A., Phillips, T.M. *Electrophoresis* 2011, 32, 1565-1578.
- [27] Alexander Tempels, F. W., Underberg, W.J. M., Somsen, G.W., de Jong, G. J. *Electrophoresis* 2007, 28, 1319-1326.
- [28] Puig, P, Alexander Tempels, F.W., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *J. Chromatogr. B*, 2007, 856, 365-370.
- [29] Puig, P, Alexander Tempels, F.W., Somsen, G.W., de Jong, G.J., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M. *Electrophoresis* 2008, 29, 1339-1346.

- [30] Macià, A., Borrull, F., Calull, M., Benavente, F., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Aguilar, C. *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 872-880.
- [31] Guzman, N.A. *J. Chromatogr. B* 2000, 749, 197-213.
- [32] Benavente, F., Hernández, E., Guzman, N.A., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J. *Anal Bioanal Chem* (2007) 387:2633-2639.
- [33] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N.A. *J. Chrom. A*, 2007, 1140, 205-212.
- [34] Hernandez, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J. *Electrophoresis*, 2007, 28, 3957-3965.
- [35] Hernandez, E., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J. *Electrophoresis*, 2008, 29, 3366-3376.
- [36] Benavente, F., Medina-Casanellas, S., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. *J. Sep. Sci.*, 2010, 33, 1294-1304.
- [37] Medina-Casanellas, S.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. *Electrophoresis* 2011, 32, 1750-1759.
- [38] Medina-Casanellas, S.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. *Anal. Chim. Acta* 2012, 717, 134-142.
- [39] Maijó, I., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C. *Electrophoresis* 2011, 32, 2114-2122.
- [40] Lara, F.J., García-Campaña, A.M., Alés-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M. *Electrophoresis* 2008, 29, 2117-2125.
- [41] Lara, F.J., Lynen, F., Sandra, P., García-Campaña, A.M., Alés-Barrero, F. *Electrophoresis* 2008, 29, 3834-3841.
- [42] Lara, F.J., García-Campaña, A.M., Neusüss, C., Alés-Barrero, F. *J. Chrom. A* 2009, 1216, 3372-3379.
- [43] Botello, I., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M. *Electrophoresis* 2012, 33, 528-535.
- [44] Botello, I., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *Anal Bioanal Chem* 2012, 403, 777-784.
- [45] Tak, Y.H., Sastre Toraño, J., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 138-143.
- [46] Kyte, J., Doolittle, R.F. *J. Mol. Biol.* 1982, 157, 105-132.

LOWERING THE LIMITS OF DETECTION OF OPIOID PEPTIDES AT THE PICOMOLAR LEVEL BY FRITLESS SOLID-PHASE EXTRACTION COUPLED ON-LINE TO SHEATHLESS CAPILLARY ELECTROPHORESIS-MASS SPECTROMETRY

Silvia Medina-Casanellas^{a, b}, Elena Domínguez-Vega^b, Fernando Benavente^{a*},
Victoria Sanz-Nebot^a, Govert W. Somsen^{b, c}, Gerhardus J. de Jong^b

^aDepartment of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain.

^bBiomolecular Analysis, Utrecht University, P.O. Box 80082, 3508 TB Utrecht, The Netherlands.

^cAIMMS Division of BioMolecular Analysis, VU University, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands

Keywords: Capillary Electrophoresis/ In-line/ Neuropeptide/ Mass spectrometry/ On-line/ Preconcentration/ Sheathless

Abstract

On-line solid phase extraction (SPE) was investigated to improve the sensitivity of sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry (sheathless CE-MS). A novel fritless SPE microcartridge was designed for combination with a separation capillary with a porous tip allowing nanoelectrospray ionization (nanoESI). The inlet of the separation capillary (30 μm inner diameter (id), 150 μm outer diameter (od)) was inserted in a 4 mm long SPE microcartridge (150 μm id, 365 μm od) packed with a C_{18} sorbent of 55-105 μm particle size. Use of polyether ether ketone (PEEK) connectors and frits was avoided in order to minimize band broadening. Performance of the SPE-CE-MS system was evaluated using diluted solutions of the three opioid peptides dynorphin A (1-7) (DynA), endomorphin 1 (End1) and met-enkephalin (Met). Sample volumes of 1.5 μL were loaded on the SPE microcartridge and the retained peptides were eluted with 22 nL of an acidic methanol/water (60:40, v/v) solution. Using a pressure of 50 mbar during separation to speed up the analysis, good peptide resolution was obtained with acceptable plate numbers (between 53000-92000). Intraday relative standard deviations (% RSD) for peptide migration times and peak areas were below 4% and 9%, respectively. The SPE-CE-MS method showed good linearity up to 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of loaded peptide concentration and limits of detection (LODs) were 10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. However, loading a larger volume of sample (8 μL), LODs could be decreased down to 2 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. This represents an improvement of a factor of 5000 with respect to sheathless CE-MS, demonstrating the potential of on-line SPE for further enhancing sheathless CE-MS sensitivity.

1. Introduction

Capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) is developing into a well-established analytical technique for analysis of a variety of compounds (e.g. drugs, peptides, metabolites, etc.) related

to many different application fields, such as biotechnology, pharmaceutical or food research [1-7]. CE-MS combines the high efficiency, versatility, low sample and reagent consumption and instrumental simplicity of CE with the high selectivity and improved sensitivity offered by MS

[1-8]. The most popular ionization technique for interfacing CE to MS is electrospray ionization (ESI), which allows on-line MS detection of a wide range of analytes [1, 9]. CE-MS coupling is generally achieved using a sheath liquid interface which provides closure of the electrical circuit of CE and the flow rates required for conventional ESI sources. Sheath liquid CE-MS is well established but, especially when compared with liquid chromatography (LC-MS), its sensitivity is relatively low. Main reasons are the very small injection volumes in CE and the dilution of the CE effluent by the sheath liquid. This reduced sensitivity is obviously inconvenient when analytes are present in low concentrations, as often it is the case in bioanalytical queries.

Many preconcentration techniques coupled to CE allow introduction of increased volumes of sample to decrease the LODs. On-line preconcentration can be based on electrophoretic or chromatographic techniques, such as isotachopheresis (ITP) or solid-phase extraction (SPE) [10-15]. In on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE), a SPE microcartridge is inserted near the inlet of the separation capillary. The microcartridge contains a sorbent that retains the target analyte, enabling large volumes of sample to be introduced. The retained analytes are eluted in a small volume of an appropriate solution, resulting in sample clean-up and concentration enhancement. On-line solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry (SPE-CE-MS) has been extensively applied with sheath liquid interfaces for the analysis of various compounds, such as drugs and peptides, in complex samples [16-23].

Sheathless interfacing offers an alternative for improving sensitivity in CE-MS. In sheathless interfaces, electrical contact is made directly to the background electrolyte (BGE) using metal coated capillary tips, microelectrodes or liquid junctions [24-29]. As there is no sheath liquid, dilution of the analyte is avoided and nanoESI conditions may apply, yielding strongly improved concentration sensitivity. However, sheathless designs often are fragile and not robust, and so far no commercially available sheathless interface has been produced. Recently, Beckman Coulter has introduced a novel prototype of sheathless interface called the high-sensitivity porous sprayer (HSPS), which is based on a nanoESI sheathless interface described by M. Moini [25]. In the HSPS, the last 3-4 cm of the fused-silica separation capillary (30 μm id) are etched with hydrofluoric acid producing a thin porous wall tip that is conductive when immersed in electrolyte, and thus allow electrical contact. NanoESI of the CE effluent is conducted from the capillary tip providing sensitive analysis of metabolites, peptides and proteins [30-37].

By utilizing both on-line SPE and sheathless interfacing, in theory ultimate sensitivity may be achieved in CE-MS. Sheathless SPE-CE-MS using laboratory made interfaces have been demonstrated in limited occasions. Tong et al. used SPE microcartridges and a sheathless liquid-metal junction interface for the analysis of peptides from protein digests [26]. Good coverage of the peptides was obtained, but information on the sensitivity obtained with the system was not reported. Waterval et al. have described a poly(styrenedivinylbenzene) extraction

disk for on-line SPE-CE in combination with a T-junction sheathless interface employing a gold wire microelectrode for peptide analysis [27-28]. For this system LODs of $20 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ were obtained using a loading volume of $30 \text{ }\mu\text{L}$ of sample containing gonadorelin and angiotensin-II. Janini et al. have analysed peptides with a C_{18} impregnated extraction disk for on-line SPE and a liquid-junction CE-MS interface [29]. The sensitivity using this on-line SPE system was improved 50 times by loading $10 \text{ }\mu\text{L}$ of [Glu1]-fibrinopeptide B, reaching LODs of $8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

The HSPS capillary has a $150 \text{ }\mu\text{m}$ od instead of the conventional $365 \text{ }\mu\text{m}$ od, making the combination with an on-line SPE cartridge challenging. So far, only Wang et al. have reported SPE-CE-MS using HSPS capillaries [38]. They used a single-frit SPE microcartridge (1 mm total length, $100 \text{ }\mu\text{m}$ id and $360 \text{ }\mu\text{m}$ od) packed with a C_8 sorbent which was connected to the inlet of the CE capillary by a PEEK connector. The sheathless SPE-CE-MS system was employed for the analysis of protein tryptic digests. This system showed to be more effective in peptide and protein identification as compared with nanoLC-MS and direct CE-MS when limited amounts of tryptic digest (5 ng) were analyzed [38]. However, the obtained peptide resolution was relatively low when standard 90 cm capillary lengths were used and no explicit data on gain in sensitivity (LODs) were provided [38].

The aim of the present paper is to evaluate a novel and simple design to perform sheathless SPE-CE-MS employing a HSPS capillary, with emphasis on preserving analyte resolution and sensitivity enhancement. A new C_{18}

packed and fritless SPE microcartridge (4 mm total length, $150 \text{ }\mu\text{m}$ id and $365 \text{ }\mu\text{m}$ od), was designed and connected to the HSPS separation capillary ($30 \text{ }\mu\text{m}$ id and $150 \text{ }\mu\text{m}$ od). The performance of the sheathless SPE-CE-MS system was studied using three opioid peptides, which are related to nociception and are usually found at very low concentrations in body fluids. The LODs, repeatability and linearity of the total system were assessed.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals used in preparation of buffers and solutions were analytical reagent grade. Acetonitrile and methanol were provided by Biosolve (Dieuze, France). Isopropanol, formic acid (HFor, 98-100%), acetic acid glacial (HAc, 100%), ammonia (25%) and sodium hydroxide (98-100%) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Epoxy adhesive (Araldit Rapido) was supplied by Ceys (Barcelona, Spain). Water with conductivity lower than $0.05 \text{ }\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ was obtained using a Synergy UV water purification system (Millipore, Molsheim, France). Dynorphin A (1-7) (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg, 867.4715 Da , DynA), endomorphin 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 610.2904 Da , End1) and methionine enkephalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met, 573.2257 Da , Met) were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). Sep-Pak C_{18} cartridges ($55\text{-}105 \text{ }\mu\text{m}$ particle diameter, 125 \AA pore size) were supplied by Waters (Milford, MA, USA). Bare fused-silica capillaries were provided by Polymicro Technologies Inc. (Phoenix, AZ, USA).

Bare fused-silica capillaries with the HSPS tip were kindly provided by Beckman Coulter (Brea, CA, USA).

Aqueous standard solutions of each peptide (1000 mg·L⁻¹ of DynA, and 500 mg·L⁻¹ of End1 and Met) were prepared and stored at -21°C. Working standard solutions containing the studied opioid peptides at different concentrations were obtained by diluting with water.

2.2. Construction of the microcartridge

The microcartridge was constructed following a modification of previous methods (Fig. 1) [18-20, 39-41]. The entire process of fabrication was monitored under a stereomicroscope. The body of the microcartridge was a piece of bare fused-silica capillary (4 mm total length, 150 µm id, 365 µm od). The microcartridge was coupled to a piece of capillary of 7.5 cm length (50 µm id, 365 µm od), using an 8 mm polytetrafluoroethylene (PTFE) sleeve (Fig. 1a). Then, it was vacuum-packed with irregularly shaped C₁₈ silica particles from Sep-Pack cartridges, which were previously sieved with a 50 µm iron steel sieve (VWR international, Amsterdam, The Netherlands) to discard particles with a diameter smaller than 50 µm (Fig. 1b). When the microcartridge was completely full, it was completely introduced into the PTFE sleeve. The 7.5 cm capillary was replaced by a piece of bare-fused silica capillary with 30 µm id and 365 µm od of the same length, which served as the inlet end of the SPE-CE-MS system (Fig. 1c). The separation capillary was 82 cm length, 30 µm id and 150 µm od equipped with a porous tip (3–4 cm of the outlet end). Approximately 1 mm of the

polyimide coating of the inlet end of the separation capillary was removed (fig. 1c) and carefully introduced into the PTFE sleeve against the microcartridge body and sealed with epoxy resin with care of leaving no dead volumes (drying time was approximately 14 hrs) (Fig. 1d). The PTFE sleeve was sufficiently tight to provide an efficient connection at the inlet side of the microcartridge. The resulting SPE-CE-MS capillary was installed into the capillary cartridge of the CE instrument.

2.3. CE-MS

Sheathless CE-MS was performed with a P/ACE MDQ™ CE instrument (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). The capillary column was placed in a grounded stainless steel needle that could be positioned by an XYZ-stage (Beckman Coulter) in the entrance of the Bruker microTOF orthogonal accelerated time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A specific end plate and gas diverter were installed in the mass spectrometer to allow nanoESI [30-31, 33]. The stainless needle was filled with BGE (static electrolyte) to establish the electrical contact. The mass spectrometer was operated in positive mode using the following parameters: capillary voltage 1100-1500 V, drying gas temperature 200°C, drying gas flow rate 2 L·min⁻¹, capillary exit -100 V, skimmers voltages 60 and 40 V and hexapole RF voltage 300 Vpp. Data were collected in profile at 1 GHz between 100 and 1250 m/z. MS control and data acquisition was performed using micrOTOF control software (Bruker Daltonics). MS data were analysed using Bruker Daltonics data analysis software.

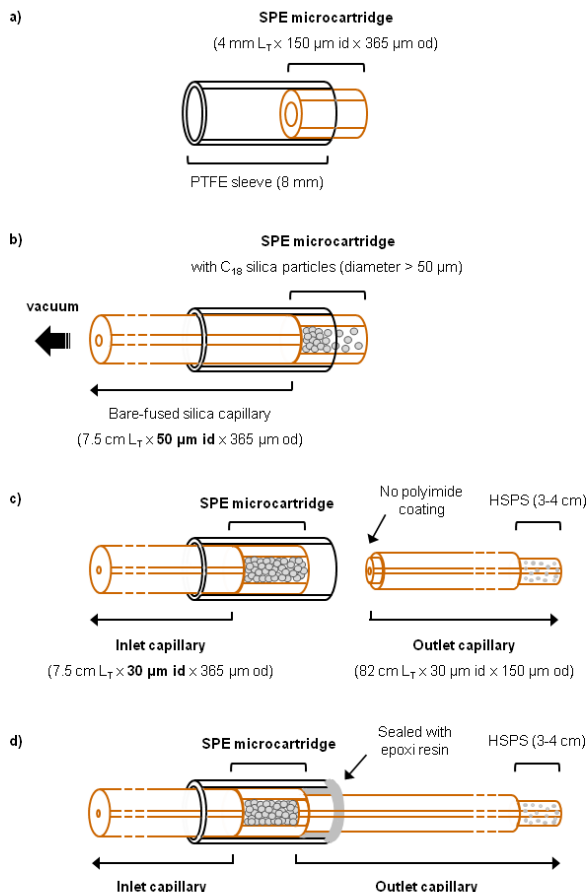


Figure 1. Scheme of the procedure of the construction of the SPE microcartridge.

The sheathless CE-MS separations were performed at 25°C in a 90 cm length, 30 μm id and 150 μm od fused silica capillary equipped with a HSPS tip. Between runs, the capillary was rinsed for 3 min with BGE at 3450 mbar. The BGE was 50 mM HAc and 50 mM HFor adjusted to pH 3.5 with ammonia. Separation was conducted at 30 kV (normal polarity) applying 15 mbar of pressure. Samples were injected at 345 mbar for 10 s (approx. 8 nL). CE control and separation data acquisition were performed using 32 Karat software (Beckman Coulter).

2.4. SPE-CE-MS

Sheathless SPE-CE-MS experiments were performed with an Agilent Technologies HP^{3D}CE instrument (Waldbronn, Germany) coupled to the mass spectrometer as described in the section 2.3. In the specific case of sheath liquid SPE-CE-MS experiments the microTOF mass spectrometer was coupled to the CE system with the orthogonal G1603A sheathflow interface (Agilent Technologies). The sheath liquid consisted of a mixture of 60:40 (v/v)

isopropanol/water containing 0.05% (v/v) HFor and was delivered at a flow rate of $3.3 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump (Holliston, MA, USA). MS conditions were as described in section 2.3.2., except for the capillary voltage (4000 V), the drying gas flow rate ($4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) and the nebulizer gas (9 psi).

For the SPE-CE-MS experiments, the system was first conditioned by consecutive flushes of water (4 min), methanol (4 min), water (4 min) and BGE (5 min) at 930 mbar. Peptide samples were then introduced at 930 mbar for 12.5 min or 62.5 min (approx. $1.5 \mu\text{L}$ or $8 \mu\text{L}$ respectively), followed by a rinse with BGE (6 min at 930 mbar). Retained peptides were desorbed by injecting the elution solution (methanol/water 60:40 (v/v) containing 50 mM HAc and 50 mM HFor) at 50 mbar for 200 s (approx. 22 nL). Separation was carried out at 25°C by applying a voltage of 30 kV (normal polarity) and 15 or 50 mbar. Between runs, the capillary was rinsed for 5 min with water and 5 min with acetonitrile. CE control and separation data acquisition were performed using ChemStation software (Agilent Technologies).

3. Results and discussion

3.1. CE-MS

Interfacing parameters for the analysis of the opioid peptides DynA, End1 and Met were optimized using sheathless CE-MS (no SPE). The position of the porous tip in front of the MS entrance was optimized by direct infusion of a $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mixture of DynA, End1 and Met in BGE at a flow rate of

$50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Good spray stability and analyte signal intensity was achieved when the capillary tip was positioned between 3 and 5 mm from the MS entrance and the ESI voltage was between 1100 and 1500 V. These conditions were similar to those established by other authors [25, 30-31, 34]. Based on previous work [18], a BGE of 50 mM HAc and 50 mM HFor (pH 3.5) was selected for the separation of the three opioid peptides. A small pressure (15 mbar) was applied during the analysis to ensure a stable spray. The flow rate of drying gas (180°C) was briefly evaluated but appeared to cause no significant differences in the studied range ($1\text{-}4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) and a value of $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ was selected. A separation voltage of 30 kV was applied without causing excessive current or Joule heating. Fig. 2a shows the sum of the extracted ion electropherograms (EIEs) of DynA, End1 and Met ($0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ each) analyzed by sheathless CE-MS. The peptides were well separated exhibiting plate numbers (N) of 58000, 56000 and 33000 for DynA, End1 and Met, respectively. The LODs (S/N = 3) obtained were $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for DynA and End1 and $5.0 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for Met. These values were similar to those estimated for peptides from the work of Busnel et al. ($2\text{-}8 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) [42]. Furthermore, they were 10 to 20-fold lower than those measured by conventional sheath liquid CE-MS using a $50 \mu\text{m}$ id capillary and the same MS instrument (i.e. $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ for each peptide). This nicely confirms the increase of sensitivity offered by the HSPS.

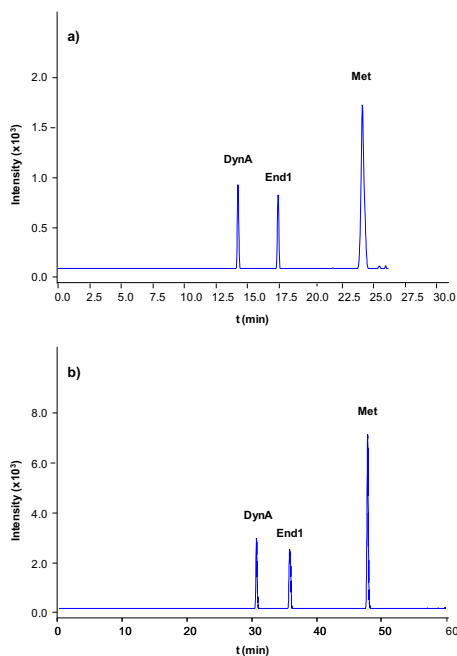


Figure 2. Sum of the extracted ion electropherograms (EIEs) of standard mixtures of DynA, End1 and Met by (a) sheathless CE-MS ($0.15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and (b) sheathless SPE-CE-MS ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Separations were performed by applying 15 mbar and a voltage of 30 kV. Other conditions as described in experimental section.

3.2. SPE-CE-MS

The main difficulty for constructing a microcartridge for sheathless SPE-CE-MS employing the HSPS lies in its $150 \mu\text{m}$ od. In our previous works [18-20, 39-41], the capillary pieces needed to produce the SPE-CE construct (i.e. inlet capillary, microcartridge and outlet capillary) were all of $365 \mu\text{m}$ od and were joined by means of plastic tubing sleeves [18-20, 26-28, 39-41]. However, it was not possible to find now plastic tubes with the appropriate id features to connect $150 \mu\text{m}$ od capillaries. Furthermore, $75 \mu\text{m}$ was the widest id available for fused silica capillaries with $150 \mu\text{m}$ od, which would seriously limit the volume of the SPE microcartridge and thus the amount of C_{18}

sorbent particles ($55\text{-}105 \mu\text{m}$) packed inside [18-20, 39-41]. Consequently, capillary pieces with different od needed to be joined. Wang et al. proposed the use of a single-frit microcartridge (1 mm total length, $100 \mu\text{m}$ id and $360 \mu\text{m}$ od) packed with $5 \mu\text{m}$ C_8 particles connected with PEEK connectors [38]. However, these connections may lead to dead volumes, band broadening and current leakage or breakdown. Therefore, we developed an alternative SPE microcartridge design for the HSPS capillary. The production of the SPE microcartridge is described in detail in Section 2.2. Briefly, our design consisted of the use a 4 mm microcartridge with an id ($150 \mu\text{m}$) that matched with the od of the HSPS separation capillary ($150 \mu\text{m}$). Consequently, the separation capillary could be introduced inside the microcartridge lumen and sealed with an epoxy resin, avoiding the use of PEEK connectors (see Fig. 1). In addition, as the microcartridge body was filled with C_{18} sorbent particles of sizes larger than $50 \mu\text{m}$ and the connecting capillaries presented an id of $30 \mu\text{m}$, frits were not required to keep the sorbent in place.

As the number of HSPS capillaries available to us was limited, the performance of the novel microcartridge was evaluated first by using a $30 \mu\text{m}$ id and $150 \mu\text{m}$ od separation capillary without porous tip, carrying out sheath-flow SPE-CE-MS. Approximately $1.5 \mu\text{L}$ of a peptide mixture (80 ng/mL each) was loaded on the SPE microcartridge. Methanol/water ($60:40$, v/v) containing 50 mM HAc and 50 mM HFor was used for peptide elution [18]. The effect of the elution solution volume

(7-38 nL, i.e. 60-300 s injection time) on the observed peak area of the eluted opioid peptides was studied. Elution volume was critical because no peptides were detected for values lower than 12 nL (100 s) and current breakdown occurred for values higher than 38 nL (300 s). An elution solution of 22 nL (200 s) provided the highest peak areas without producing current breakdowns.

Subsequently the microcartridge design was evaluated for sheathless SPE-CE-MS using the 30 μm id and 150 μm od outlet HSPS capillary. Fig. 2b shows the sum of the EIEs obtained for a mixture of $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each opioid peptide. Longer analysis times were obtained compared with those achieved for the HSPS capillary without SPE (Fig. 2a). This was caused by the presence of the SPE microcartridge which generated an increased backpressure on the system, as was reflected in the lower flow through the capillary that was measured when pressure was applied during analysis (15 mbar). Despite the long analysis times, very good separation efficiency was obtained with plate numbers of 189000, 101000, and 240000 for DynA, End1, and Met, respectively. The increased efficiency as compared with the system without SPE could be explained by the reduced laminar hydrodynamic flow. In order to speed up the separation, the pressure during the run was increased. Using 30 kV and 50 mbar (maximum pressure provided by the instrument in CE mode while applying voltage) the separation of DynA, End1 and Met was reached in 30 min (Fig. 3a), with acceptable plate numbers of 92000, 53000, and 85000 for DynA, End1 and Met, respectively.

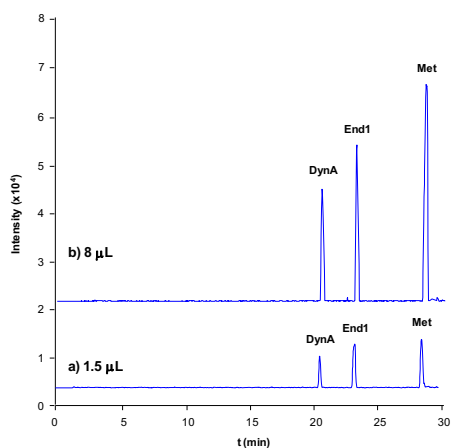


Figure 3. Sum of the extracted ion electropherograms (EIEs) of standard mixtures of DynA, End1 and Met by sheathless SPE-CE-MS loading (a) 1.5 μL and (b) 8 μL of a $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard mixture. Separations were performed by applying 50 mbar and a voltage of 30 kV. Other conditions as described in experimental section.

Repeatability of migration time and peak area (%RSD), linearity and LODs of the sheathless SPE-CE-MS system for the three studied peptides were evaluated under optimum conditions (Table 1). The sheathless SPE-CE-MS system showed good linearity (concentration vs. peak area) for the studied peptides in the 0.1 and $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ range. Repeatability was evaluated by injection of 5 replicates of a mixture of $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each peptide on the same day. %RSDs below 3.8% and 8.4% were obtained for migration times and peak areas, respectively. Using the loading time of 12.5 min at 930 mbar (i.e. 1.5 μL injected), LODs were estimated to be $10 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for each opioid peptide. Aiming at even better sensitivities, the sample loading volume was increased to 8 μL (62.5 min at 930 mbar). The results (Fig. 3b) show a proportional increase (factor of approximately 5) of signal intensity without loss of efficiency.

Therefore, loading of 8 μL of sample allowed to achieve LODs of 2 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ of each peptide. Further increase in the sample loading volume was not considered as these would take extremely long loading times due to the limited pressure (max. 930 mbar) allowed by the CE instrument.

Table 1. Linearity, repeatability, and LODs obtained for DynA, End1 and Met in sheathless SPE-CE-MS (Sample loading time was 12.5 min at 930 mbar (1.5 μL) unless otherwise indicated).

	DynA	End1	Met
Linear range ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.1 - 5	0.1 - 5	0.1 - 5
Calibration curve ($\cdot 10^4$)	$y = 23x + 0.7$	$y = 94x + 23$	$y = 300x - 4.5$
r^2	0.991	0.987	0.994
Repeatability ^a			
t_m (%RSD)	3.7	3.8	2.3
Area (%RSD)	8.4	7.0	6.2
LOD ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	10 2 ^b	10 2 ^b	10 2 ^b

^a Intraday analysis (n = 5)

^b Sample loading time was 62.5 min at 930 mbar (8 μL)

Considering the LODs obtained for the opioid peptides by sheathless CE-MS (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) an improvement of sensitivity of 5000-fold was achieved by incorporating the on-line SPE microcartridge into the system. This was significantly higher than the 50-fold improvement reported by Janini et al. for sheathless SPE-CE-MS [29]. Unfortunately, comparison with Wang et al. was not possible because they did not provide any data on the sensitivity enhancement achieved with their sheathless SPE-CE-MS system employing a HSPS capillary [38]. In a previous work on SPE-CE-MS using

sheath-liquid interfacing and a similar mass spectrometer [18], DynA, End1 and Met were detected at 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ loading a sample volume of 60 μL . Thereby, now concentration sensitivity was 50 times better than in that work, despite the fact that in sheathless SPE-CE-MS the sample loading volume was around 6 times lower (8 μL). Overall, the present results clearly demonstrate that the combination of on-line SPE and sheathless CE-MS represents a powerful tool to increase sensitivity, providing LODs that cannot be achieved by sheathless CE-MS or other high performance separation techniques coupled to nanoESI-MS.

4. Concluding remarks

A novel on-line SPE microcartridge has been designed for coupling with a HSPS capillary in order to achieve sheathless SPE-CE-MS. The SPE microcartridge allowed preconcentration of sample volumes up to 10 μL while maintaining good peptide separation in a reasonable time with satisfactory efficiency. Concentration sensitivity enhancement for opioid peptides up to a factor of 5000 was achieved as compared to sheathless CE-MS, allowing detection in the low $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ range. These results indicate the potential of the novel on-line SPE microcartridge to further enhance sensitivity of sheathless CE-MS based on porous tip spraying. Further reduction of LODs seems very well possible by loading larger sample volumes. However, due to the limited maximum pressure provided by the used CE instrument, this is now practically hindered by the time needed to load sample on the SPE microcartridge connected to the 30 μm id separation

capillary. It should be possible to circumvent this drawback by employing a CE apparatus that permits higher pressures to be used for capillary flushing with an external pressure source. Another alternative would be the use of other on-line microcartridge designs that allow loading by pressure very large volumes of sample in the shortest times, such as the cruciform and staggered designs proposed by N. Guzman [21]. In such designs sample loading time by pressure is not determined by the separation capillary dimensions, because loading direction is orthogonal to separation direction.

Acknowledgements

Sílvia Medina acknowledges the Generalitat de Catalunya for a FI (Formació Investigadora) and a BE (BE-DGR 2011, Beques per a la recerca a l'estranger) fellowships. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2011-27130).

5. References

- [1] Herrero, M., Ibañez, E., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 2148-2160.
- [2] Ramautar, R., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2009, 30, 276-291.
- [3] Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Electrophoresis* 2011, 32, 66-82.
- [4] Mischak, H., Schanstra, J.P. *Proteomics Clin. Appl.* 2011, 5, 9-23.
- [5] Bytzek, A.K., Hartinger, C.G., *Electrophoresis* 2012, 33, 622-634.
- [6] Pascali, J.P., Bortolotti, F., Tagliaro, F., *Electrophoresis* 2012, 33, 117-126.
- [7] Rabanes, H.R., Guidote, A.M., Quirino, J.P., *Electrophoresis* 2012, 33, 180-195.
- [8] Heiger, D., *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction.* Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2000, pp. 83-86.
- [9] Hommerson, P., Khan, A.M., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Mass Spectrometry Reviews*, 2011, 1-25.
- [10] Lin, C. H., Kaneta, T., *Electrophoresis* 2004, 25, 4058-4073.
- [11] Simpson, S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504-541.
- [12] Timerbaev, A. R., Hirokawa, T., *Electrophoresis* 2006, 27, 323-340.
- [13] Puig, P., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 664-678.
- [14] Tempels, F. W. A., Underberg, W. J. M., Somsen, G. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* 2008, 29, 108-128.
- [15] Breadmore, M., *Electrophoresis* 2007, 28, 254-281.
- [16] Ramautar, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Electrophoresis* 2010, 31, 44-54
- [17] Ramautar, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *Electrophoresis* 2012, 33, 243-250
- [18] Medina-Casanellas, S.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. *Electrophoresis* 2011, 32, 1750-1759.
- [19] Medina-Casanellas, S.; Benavente, F.; Barbosa, J.; Sanz-Nebot, V. *Anal. Chim. Acta.* 2012, 717, 134-142.
- [20] Tak, Y.H., Sastre Toraño, J., Somsen, G.W., de Jong, G.J. *J. Chromatogr. A* 2012, 1267, 138-143.
- [21] Guzman, N.A., Phillips, T.M. *Electrophoresis* 2011, 32, 1565-1578.
- [22] Maijo, I., Fontanals, N., Borrull, F., Neususs, C., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2013, 34, 374-382.
- [23] Kohler, I., Schappler, J., Rudaz, S., *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405, 125-141
- [24] Edmonds, C.G., Loo, J.A., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., Smith, R.D., *J. Chromatogr.* 1989, 474, 21-37.
- [25] Moini, M., *Anal. Chem.* 2007, 79, 4241-4246.
- [26] Tong, W., Link, A., Eng, J.K., Yates, J.R. *Anal. Chem.* 1999, 71, 2270-2278.
- [27] Waterval, J.C.M., Bestebreurtje, P., Lingeman, H., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., Underberg, W.J.M. *Electrophoresis* 2001, 22, 2701-2708.

- [28] Waterval, J.C.M., Hommels, J.C.M., Bestebreurtje, P., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., Lingeman, H., Underberg, W.J.M. *Electrophoresis* 2001, 22, 2709-2716.
- [29] Janini, G.M., Zhou, M., Yu, L.R., Blonder, J., Gignac, M., Conrads, T.P., Issaq, H.J., Veenstra, T.D. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5984-5993.
- [30] Bonvin, G., Veuthey, J.L., Rudaz, S., Schappler, J., *Electrophoresis* 2012, 33, 552-562.
- [31] Haselberg, R., Ratnayake, C.K., de Jong, G.J., Somsen, G.W. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 7605-7611.
- [32] Haselberg, R., Harmsen, S., Dolman, M.E.M., de Jong, G.J., Kok, R.J., Somsen, G.W. *Anal. Chim. Acta* 2011, 698, 77-83.
- [33] Hirayama, A., Tomita, M., Soga, T. *Analyst*. In press.
- [34] Faserl, K., Sarg, B., Kremser, L., Lindner, H. *Anal. Chem.* 2011, 83, 7297-7305.
- [35] Kawai, M., Iwamuro, Y., Iio-Ishimaru, R., Chinaka, S., Takayama, N., Hayakawa, K. *Anal. Sciences* 2011, 27, 857-860.
- [36] Ramautar, R., Shyti, R., Schoenmaker, B., de Groote, L., Derks, R.J.E., Ferrari, M.D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Deelder, A.M., Mayboroda, O.A. *Anal Bioanal Chem* 2012, 404, 2895-2900.
- [37] Ramautar, R., Busnel, J.-M., Deelder, A.M., Mayboroda, O.A. *Anal. Chem.* 2012, 84, 885-892.
- [38] Wang, Y., Fonslow, B.R., Wong, C.C.L., Nakorchevsky, A., Yates, J.R. *Anal. Chem.* 2012, 84, 8505-8513.
- [39] Benavente, F., Vescina, M. C., Hernández, E., Sanz- Nebot, V., Barbosa, J., Guzman, N. A., *J. Chrom. A* 2007, 1140, 205-212.
- [40] Hernández, E., Benavente, F., Sanz- Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2007, 28, 3957-3965.
- [41] Hernández, E., Benavente, F., Sanz- Nebot, V., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2008, 29, 3366-3376.
- [42] Busnel, J.M., Schoenmaker, B., Ramautar, R., Carrasco-Pancorbo, A., Ratnayake, C., Feitelson, J.S., Chapman, J.D., Deelder, A.M., Mayboroda, O.A., *Anal. Chem.* 2010, 82, 9476-9483.

**Capítol 3. Anàlisi de pèptids opiacis i proteïnes per
SPE-CE amb fases estacionàries d'immunoafinitat**

Les fases estacionàries cromatogràfiques convencionals presenten una selectivitat limitada que dificulta l'anàlisi de biomolècules a molt baixa concentració en mostres biològiques per SPE-CE-MS. Aquest inconvenient es pot superar emprant fases estacionàries d'immunoafinitat que aprofiten la interacció específica antigen-anticòs. No obstant, no hi ha fases estacionàries d'immunoafinitat disponibles comercialment amb les característiques adients per a SPE-CE. Per aquest motiu, els investigadors han desenvolupat metodologies per a la immobilització de l'anticòs o fragments d'anticòs a suports sòlids apropiats basades en els procediments emprats tradicionalment en altres tècniques immunoquímiques (immunoassaigs, cromatografia d'immunoafinitat, etc.).

Les aplicacions d'IA-SPE-CE-MS són escasses a causa de la dificultat d'emprar electròlits volàtils per a la separació electroforètica que no desnaturalitzin la fase estacionària d'immunoafinitat i que permetin una ionització òptima. A més, si l'anàlit és una proteïna és necessari minimitzar l'adsorció a les parets del capil·lar de separació. En aquest últim cas, la millor alternativa consisteix en utilitzar capil·lars amb recobriments, els quals han de ser suficientment estables per evitar el seu despreniment, ja que sovint són molècules poc volàtils que també poden fer malbé la fase estacionària d'immunoafinitat i dificultar la ionització dels anàlits d'interès.

En aquesta tesi doctoral s'han optimitzat dues metodologies per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat per a l'anàlisi de pèptids opiacis per IA-SPE-CE-TOF-MS. Una d'elles consisteix en l'acoblament d'un anticòs intacte, a través dels carbohidrats, a un suport de sílice activat amb grups hidrazida. Aquesta metodologia també s'ha avaluat per a la preparació d'una fase estacionària d'immunoafinitat per a l'anàlisi d'una biomolècula d'elevat pes molecular, concretament la transferrina humana, que requereix l'ús de capil·lars recoberts. L'altra metodologia consisteix en l'acoblament de fragments d'anticòs, a través dels grups sulfhidril, a un suport de sílice activat amb grups succinimidil. En ambdós casos, els llocs actius de l'anticòs o del fragment d'anticòs queden lliures a la superfície del suport per facilitar la interacció amb els anàlits. Els resultats obtinguts han permès comparar les prestacions que ofereix una fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte i una fase estacionària d'immunoafinitat amb fragments d'anticòs i les dificultats addicionals que implica l'anàlisi de biomolècules d'elevat pes molecular per IA-SPE-CE-TOF-MS.

El treball realitzat ha donat lloc a les següents publicacions:

- **Article 3.1.** Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by online immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry. Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot. *Analytica Chimica Acta* 2012, 717, 134–142.

- **Article 3.2.** On-line immunoaffinity SPE-CE-MS for the analysis of large biomolecules using transferrin as a model compound. Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente, Estela Giménez, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot. *Microchimica Acta*, 2013. Enviat.

- **Article 3.3.** Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent with Fab' antibody fragments for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis-mass spectrometry. Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot. *Analytica Chimica Acta* 2013, 789, 91-99.



Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry

Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente*, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2011
Received in revised form
23 November 2011
Accepted 26 November 2011
Available online 14 December 2011

Keywords:

Capillary electrophoresis
Endomorphin
Immunoaffinity
Neuropeptide
On-line preconcentration
Time-of-flight mass spectrometry

ABSTRACT

In this study, we explored a procedure for the preparation of an immunoaffinity (IA) sorbent for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry (IA-SPE-CE-MS). We followed a site-specific antibody immobilization approach based on the covalent attachment of the oxidized antibodies through their carbohydrate moieties to hydrazide silica particles, using a polyclonal antibody against Endomorphin 1 and 2 (End1 and End2). The main features of the IA sorbent were studied, such as the amount of hydrazide groups and antibodies attached onto oxidized diol silica particles. Once the procedure was optimized, standard solutions of End1 and End2 were used in order to establish the IA-SPE-CE-MS methodology. Acceptable repeatability, reproducibility and linearity range values were obtained for the proposed methodology. The limits of detection (LODs) of 1 ng mL^{-1} were approximately 100-fold better than those obtained by CE-MS. Selectivity of the IA sorbent was good but some cross-reactivity against Dynorphin A (1–7) was observed when a mixture of several opioid peptides was analyzed. Human plasma samples spiked with End1 and End2 were also analyzed and both peptides could be detected down to 100 ng mL^{-1} .

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The great potential of capillary electrophoresis (CE) for peptide analysis, especially using mass spectrometry detection (CE-MS), is widely recognized [1–3]. Over the last decade CE has become a useful tool to perform immunoassays involving different compounds, including peptides, in biological samples, including blood, plasma, urine, cerebral-spinal fluid and tissues [4–13]. ‘CE immunoassay’ can be regarded as a particular case of affinity capillary electrophoresis (ACE) and some authors prefer the term immunoaffinity capillary electrophoresis (IACE) [4–6]. IACE is carried out in several formats which differ in the set-up to establish the specific interaction for the complexation of the antigenic analyte and the antibody before the electrophoretic separation [4–13]. In one of these formats, the antibody is immobilized onto the inner wall or onto an appropriate solid support as a small binding area integrated usually at the beginning of the separation capillary or the channels of a microchip [6–13]. These approaches can be regarded as a variant of on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE), which has been extensively used with typical chromatographic sorbents for sample clean-up and analyte preconcentration [14–19]. In

one of the typical configurations for on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis (IA-SPE-CE), an extraction microcartridge or analyte concentrator containing the IA sorbent is inserted near the inlet of the separation capillary [6–13]. This microcartridge contains the IA sorbent, which retains the antigenic analyte, enabling large volumes of sample to be introduced. The retained analyte is eluted in a small volume of an appropriate solution, resulting in sample clean-up and concentration enhancement.

SPE-CE has been extensively explored using the silica-based sorbents typically used in SPE. These sorbents provide a large active surface area, without interfering with the on-line electrophoretic separations [14–19]. Furthermore, they are commercially available, have been extensively used in the analysis of different compounds and can be purchased at a reasonable price. However, the major drawback is their limited selectivity, which hinders the analysis of complex samples such as biological fluids. In that case, the use of on-line mass spectrometry detection provides a big help for the reliable detection of compounds found at low concentration [14–19]. In a previous work, we demonstrated that C18-SPE-CE-MS was useful to lower the LODs for the analysis of opioid peptides in plasma samples up to 1000-fold compared to the values previously obtained by CE-MS [17–19]. IA sorbents have the potential of providing improved selectivity, as well as extraction efficiency when the immunoactivity of the antibody and the active surface area on the IA sorbent are optimum [6–13]. However, IA sorbents with

* Corresponding author. Tel.: +34 934039123; fax: +34 934021233.
E-mail address: fbenavente@ub.edu (F. Benavente).

Table 1
Sequence, theoretical monoisotopic molecular mass (*M*), ionizable groups and detected ions for the studied peptides.

	Sequence	<i>M</i> (Da)	[<i>M</i> + <i>zH</i> ⁺] ^{<i>z</i>} <i>m/z</i>	Ionizable groups [30]	
				Acidic (p <i>K</i> _a)	Basic (p <i>K</i> _a)
DynA	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg	867.4715	868.4788 (<i>z</i> = 1) 434.7430 (<i>z</i> = 2)	1 phenol (Tyr-) (9.67) 1 carboxylic acid (-Arg) (2.17)	1 amino (Tyr-) (6.20) 2 Guanidines (-Arg-Arg) (12.5)
Met-NH ₂	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH ₂	572.2417	573.2490 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr-) (10.02)	1 amino (Tyr-) (6.97)
Meap	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	876.3952	877.4025 (<i>z</i> = 1) 439.2049 (<i>z</i> = 2)	1 phenol (Tyr-) 1 carboxylic acid (-Phe)	1 amino (Tyr-) 1 guanidine (-Arg)
End1	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂	610.2904	611.2976 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr-) (9.68)	1 amino (Tyr-) (6.90)
End2	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	571.2795	572.2867 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr-)	1 amino (Tyr-)
Des	Gly-Gly-Phe-Leu	392.2060	393.2132 (<i>z</i> = 1)	1 carboxylic acid (-Leu) (3.46)	1 amino (Gly-) (7.96)
Met	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	573.2257	574.2330 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr-) (10.47) 1 carboxylic acid (-Met) (3.19)	1 amino (Tyr-) (7.37)
[Ala]-Met	Tyr-Ala-Gly-Phe-Met	587.2414	588.2486 (<i>z</i> = 1)	1 phenol (Tyr-) (10.36) 1 carboxylic acid (-Met) (3.16)	1 amino (Tyr-) (7.50)

the most appropriate features for IA-SPE-CE are not commercially available, precluding a widespread application of this approach. IA-SPE-CE has most often been demonstrated with laser-induced-fluorescence detection for the selective preconcentration of low molecular mass immunoreactive compounds from biological fluids and tissues [6–11]. In contrast, due to the difficulties of making compatible the requirements of IA-SPE-CE with on-line MS detection, IA-SPE-CE-MS have been demonstrated only in a few papers [12,13].

A wide variety of methods exist to immobilize intact antibodies or their active fragments onto different surfaces suitable to be used in immunoaffinity separations [20–23]. The coupled antibody is usually an immunoglobulin G (IgG) which is easier to obtain due to its major abundance in serum [23]. The most important concern is the orientation of the IgG on the support material to make binding sites available for analyte-antibody interaction, while ensuring appropriate accessibility of analyte molecules and maximum sorbent stability. In addition, when working with antibodies, the analysis conditions (e.g. ionic strength, concentration and pH of the background electrolyte and washing solutions and temperature) have to be controlled carefully because they may affect the analyte-antibody interaction as well as the antibody stability. Extreme ionic strengths, temperatures and acidic or alkaline conditions may cause antibody denaturation [23].

The present article describes the development of a lab-made IA sorbent prepared by the site-specific covalent immobilization of an intact IgG to derivatized hydrazide silica particles [24–26]. By this method, the binding sites of the immobilized antibodies are supposed to be oriented out of the support facilitating the capture of the target analytes [21,24–26]. An IA sorbent against Endomorphin 1 and 2 (End1 and End2, respectively), which are opioid peptides related to nociception [27–29], has been prepared and evaluated for IA-SPE-CE-MS.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All the chemicals used in the preparation of buffers and solutions were analytical reagent grade. Acetonitrile, methanol, isopropanol, formic acid (HFor, 98–100%), acetic acid glacial (HAc), ammonia (25%), sodium hydroxide (98–100%), sodium acetate (99%), ammonium acetate (99%) and potassium dihydrogen phosphate anhydride (99.5%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Periodic acid (99%), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, 5%), sodium borohydride (99%), sodium chloride (99.5%), potassium chloride (99%), potassium iodide (99%), sodium azide (99.5%), sodium thiosulphate (98%), polyethylene glycol (8000 Da),

sucrose (99.5%), oxalic dihydrazide (98%) and starch (98%) were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). Water with conductivity lower than 0.05 μS cm⁻¹ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

Dynorphin A (1–7) (DynA) was supplied by Bachem (Bubendorf, Switzerland). Methionine enkephalinamide (Met-NH₂), methionine enkephalin (Met) and [Ala]-Methionine enkephalin ([Ala]-Met) were provided by Neomps (Strasbourg, France). Endomorphin 1 (End1), endomorphin 2 (End2) and methionine enkephalin-Arg-Phe acetate salt hydrate (Meap) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Des-Tyr-Leucine enkephalin (Des) was supplied by Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, USA). Sequences and theoretical monoisotopic molecular mass (*M*) values of these opioid peptides are shown in Table 1 [30]. The antibody to test the IA sorbent preparation procedure was an immunoglobulin G from rabbit serum (IgG, 95%) supplied by Sigma (St. Louis, MO, USA). The antibody to prepare the IA sorbent against End1 and End2 was a rabbit polyclonal IgG against End1 and End2 (immunogen affinity purified) provided by Gene Tex (Irvine, CA, USA). Sep-Pak Diol cartridges (37–55 μm particle diameter, 125 Å pore size, 53–220 μmol of diol per gram of particle) were provided by Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Electrolytes, sheath liquid, standard solutions

An aqueous standard solution (2500 mg L⁻¹) of each peptide was prepared and stored in a freezer at –20 °C when not in use. Working standard solutions containing the studied opioid peptides at different concentrations were obtained by mixing and diluting with water. These mixtures were used to spike human plasma samples in order to obtain fortified samples. The phosphate buffers for the preparation of the IA sorbent were prepared from 0.1 M of potassium dihydrogen phosphate and pH was adjusted with NaOH (1 M). The buffer concentration is referred to the final solution and pH value was adjusted before making up solution to the final volume. All the oxidizing HIO₄ solutions were protected from exposure to light. The background electrolyte (BGE) for CE-MS and IA-SPE-CE-MS contained 20 mM of ammonium acetate and was adjusted to pH 7.00 with ammonia (25%) as indicated above. The sheath liquid solution consisted of a hydroorganic mixture of 60:40 (v/v) isopropanol:water, with 0.05% (v/v) of HFor. All solutions were passed through a 0.45 μm nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA) before analysis and were stored at 4 °C when not in use. The sheath liquid was degassed for 15 min by sonication before use.

2.3. Human plasma and sample preparation

Human plasma samples from healthy blood donors were kindly supplied by the *Banc de Sang i Teixits* (Hospital de la Vall d'Hebron,

Barcelona). Venous blood was collected in standard clinical vials and placed on ice. Plasma was separated from the blood cells, pooled, placed into polyethylene tubes and frozen at -20°C .

Different aliquots of the frozen plasma were thawed at room temperature. The plasma samples were pretreated off-line, in order to eliminate salts and high molecular mass compounds (e.g. proteins) before IA-SPE-CE-MS. The sample pretreatment consisted of precipitation with acetonitrile followed by filtration using Amicon centrifugal devices of 3 kDa cut-off cellulose acetate filters (YM-3) (Millipore, Billerica, MA, USA) [17,18]. The final solutions contained 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) and different concentrations of peptides ranging from 1 ng mL^{-1} to $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4. Apparatus and procedures

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA). Centrifugations were carried out in a Mikro 20 centrifuge with a 2073 rotor and in a cooled Rotanta 460 centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttingen, Germany) for centrifugations at room temperature and at controlled temperature, respectively. CE experiments were performed in an Agilent technologies HP^{3D}CE system (Waldbronn, Germany).

2.4.1. Preparation of the IA sorbent

The preparation of the IA sorbent consisted of the derivatization of commercial diol silica particles with hydrazide groups and the oxidation of the carbohydrate residues of the heavy-chain constant (Fc) region of the IgG so as to covalently attach the antibody to the hydrazide solid support through the resulting aldehyde groups (Fig. 1) [22,24,25].

Quantification of diol groups

In order to plan the preparation procedure, it was advisable to confirm the amount of diol groups on the commercial diol silica particles, which contained between 53 and 220 μmol of diol per gram of particle according to the manufacturer. The number of diol groups was determined following an iodometric method described to analyze hydroxyl groups on adjacent carbon atoms [31,32]. Diols were oxidized to aldehydes with an excess of periodic acid. An excess of iodide was then added, which reacted with both the excess of periodate and the resulting iodate to generate iodine, which was titrated with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. 0.25 g of diol silica particles were combined with 3.5 mL of oxidizing reagent (0.5% (m/v) HIO_4 in 1:4

$\text{H}_2\text{O}:\text{HAc}$). This mixture reacted for 2 h and 30 min at room temperature under stirring in the darkness. After that, 1 mL of a 20% (m/v) KI solution was added and the liberated iodine was titrated with 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ using starch as indicator. The same procedure was applied to a blank solution in the absence of diol silica particles. By comparing the results of the blank and sample titrations, it was possible to determine the consumed periodate during the diol oxidation and hence the content of diols on the diol silica particles.

Derivatization of diol silica

The first step of the preparation procedure was the derivatization of diol silica to obtain the activated hydrazide silica. For that purpose, diol groups were oxidized to aldehyde groups, which were subsequently reacted with oxalic dihydrazide [7,24,25] (Fig. 1a,b). 0.01 g of diol silica particles were suspended in 250 μL of oxidizing reagent (1% (m/v) HIO_4 in 1:9 $\text{H}_2\text{O}:\text{HAc}$) (Fig. 1a). The mixture, which was protected from the light, was sonicated for 15 min and then shaken for 15 min at room temperature. The aldehyde silica produced was washed with water to remove any excess of HIO_4 and centrifuged at room temperature (4000 g, 2 min). The aldehyde silica particles were mixed with 625 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 5.00) containing a 5-fold molar excess of oxalic dihydrazide with regard to the amount of the initial diol groups (Fig. 1b(i)). The mixture was shaken for 2 h and the resulting hydrazide silica particles were washed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00). Then, 250 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.00) containing a 25-fold molar excess of NaBH_4 (vs. the initial diol groups) were added to reduce any underivatized aldehyde groups (Fig. 1b(ii)). The mixture was shaken for 90 min. The activated hydrazide silica particles were washed with water and later with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00). Finally, they were stored in 250 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) at 4°C .

Quantification of hydrazide groups

The total amount of hydrazide groups on the activated hydrazide silica particles was evaluated using the TNBS spectrophotometric assay for primary amino groups [24,33–36]. First, 150 μL of the supernatant store solution of the 0.01 g activated hydrazide silica particles were discarded. Next, 625 μL of 0.65% (v/v) TNBS solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) were added to 100 μL of the remaining solution containing 0.01 g activated hydrazide silica particle, which corresponded to a five-fold molar excess of TNBS (vs. the initial diol groups). The suspension was mixed with 3 mL of a saturated sucrose solution, so that light scattering from silica

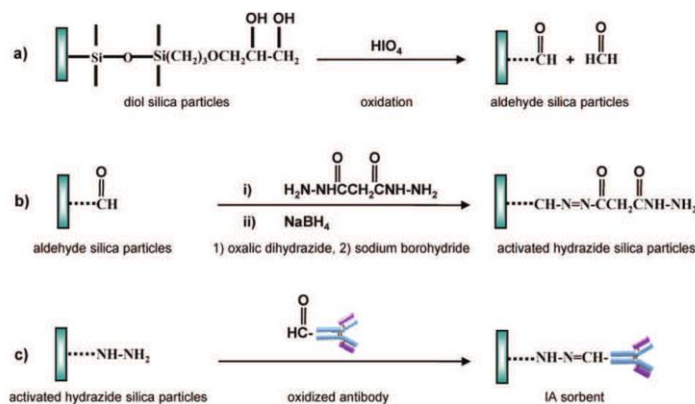


Fig. 1. Preparation procedure of the IA sorbent: (a) derivatization of commercial diol silica particles to aldehyde silica particles, (b) activation of aldehyde silica particles to hydrazide silica particles and (c) immobilization of the oxidized antibodies to the activated silica particles.

particles was negligible because the saturated sucrose solution had approximately the same refractive index as the silica particles [36]. A blank sample was prepared in a similar way from 0.01 g of raw diol silica particles. The mixtures were incubated during 1 h at 60 °C and afterward, the absorbance was measured at 425 nm. Five standards of oxalic dihydrazide in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) were prepared for calibration at concentrations between 6.3×10^{-5} and 2.5×10^{-2} M. 100 μL of each standard were then added to 625 μL of 0.65% (v/v) TNBS solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00). The solution was mixed with 3 mL of saturated sucrose solution [24,36]. A reagent blank without containing oxalic dihydrazide was also prepared. All solutions for calibration were also incubated during 1 h at 60 °C before measuring the absorbance at 425 nm [24,33]. In all cases, mixtures were vortexed and sonicated before the measurements in order to achieve a proper homogenization as well as to remove air bubbles.

Oxidation of IgG

The IgG was oxidized with periodate, which cleaved diols located in the carbohydrate chains of the Fc fragment to form reactive aldehyde groups [37,38]. 250 μL of a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ IgG solution were mixed with the same volume of a 20 mM solution of HIO_4 , both prepared in 20 mM sodium acetate and 0.15 M sodium chloride at pH 5.00. Before mixing, both solutions were placed into a water bath for 10 min at 25 °C. The reaction mixture was shaken smoothly and allowed to react for 30 min in the dark. In order to quench the reaction, 125 μL of ethylene glycol were added and mixed. The oxidized IgG was separated by centrifugal filtration using Amicon centrifugal devices of 10 kDa cut-off cellulose acetate filters (YM-10) (Millipore). All the centrifugation steps were performed at controlled temperature (25 °C) and at $10,000 \times g$ unless otherwise indicated. First, the filter was washed with water. Later, the sample was centrifuged for 20 min at $12,000 \times g$. Then it was washed with sodium acetate buffer (pH 5.00) and 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00). The oxidized IgG was recovered from the filter device by centrifugation upside down into a new collection tube (3 min at 1000 g). 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) was added until the final volume was adjusted to 250 μL .

Coupling of IgG

The last step of the preparation procedure was the covalent binding to the activated hydrazide silica particles of the oxidized IgG through the aldehyde groups of the Fc fragment [21,22,24,25] (Fig. 1c). 125 μL of the 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ oxidized IgG solution and 0.01 g of activated silica particles were combined and allowed to react with constant stirring for 24 h at 4 °C. After the immobilization reaction, the IA sorbent was successively washed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00), the same buffer containing 2 M sodium chloride and water. The IA sorbent was separated after each washing by centrifugation (3 min, 1000 g and 25 °C). Finally, it was stored in 250 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) at 4 °C during 1 month. For longer storage periods, the phosphate buffer also contained 0.1% sodium azide [23].

The amount of oxidized IgG coupled to the activated hydrazide silica particles was estimated by comparing the concentration of oxidized IgG before and after the coupling reaction. The concentration of oxidized IgG was estimated by spectrophotometry using a UV–Vis diode array system 845 (Agilent Technologies) [23]. Absorbance was measured at 214 nm using a quartz micro-cell. Five calibration standards of oxidized IgG solutions in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) were prepared at concentrations between 18 and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2. CE-TOF-MS

A 6220 orthogonal accelerated TOF (oa-TOF) LC/MS mass spectrometer (Agilent technologies) with an orthogonal G1603A sheath-flow interface (Agilent Technologies) was coupled to the

CE system [19,39]. The sheath liquid was delivered at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump. CE control and separation data acquisition (e.g. voltage, temperature and current) were performed using ChemStation software (Agilent Technologies) that was running in combination with the MassHunter workstation software (Agilent Technologies) for control, data acquisition and analysis of the TOF mass spectrometer.

The CE-MS separation was performed in a 72 cm \times 75 μm I.D. \times 360 μm O.D. fused-silica capillary (Polymicro Technologies Phoenix, AZ, USA) at 25 °C. All capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). New capillaries were activated by flushing for 20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 20 min with water and 15 min with the BGE. These washings were performed offline in order to avoid the unnecessary entrance of NaOH into the mass spectrometer. After the last flush with BGE, a 18 kV voltage was applied for 15 min. Between runs, the capillary was rinsed for 3 min with BGE. Samples were hydrodynamically injected at 33.5 mbar for 3 s without turning off the nebulizing gas and the separation voltage was 18 kV (normal polarity).

The oa-TOF mass spectrometer was operated in positive mode using the following parameters: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 200 °C, drying gas flow rate 4 L/min, nebulizer gas 7 psig, fragmentor voltage 215 V, skimmer voltage 60 V, OCT 1 RF Vpp voltage 300 V [19,39]. Data were collected in profile at 1 spectrum/s (approx. 10,000 transients/spectrum) between m/z 100 and 1250 working in high resolution mode (4 GHz) with the mass range set to standard (1700 m/z). The reference mass correction was enabled. Internal mass recalibration was satisfactory selecting the single molecular ions of phthalic anhydride and diisooctyl phthalate (i.e. 149.0233 and 391.2843, respectively), which were commonly found in the background mass spectra [19,39].

2.4.3. IA-SPE-CE-MS

The construction of the IA-SPE microcartridge or analyte concentrator was carried out as described elsewhere [15–18]. The separation capillary for IA-SPE-CE-MS was a 72 cm L_T \times 75 μm I.D. \times 360 μm O.D. fused-silica capillary supplied by Polymicro Technologies. The microcartridge (7 mm L_T \times 250 μm I.D. \times 360 μm O.D., fused-silica capillary, Polymicro Technologies) was inserted at 7.5 cm from the inlet of the separation capillary using two 0.5 cm polyethylene sleeves (280 μm I.D. \times 610 μm O.D., “Intramedic” PE 10, Clay Adams division of Becton Dickinson, NJ, USA). Previously, it was filled with the IA sorbent which was retained between two polyethylene frits (0.1 cm) obtained from a small fragment of the original filters found in the Sep-Pak Diol cartridges (Waters).

The IA-SPE-CE columns were first conditioned by a flush of BGE for 3 min at 930 mbar. Standard mixtures and spiked or blank plasma samples were then hydrodynamically introduced at 930 mbar for 10 min (approx. 60 μL using the Hagen–Poiseuille equation [40]). A final rinse with the neutral BGE (2 min at 930 mbar) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before the elution and the electrophoretic separation. Retained peptides were eluted by injecting a solution of 50 mM HAC and 50 mM HFor (pH 2.3) at 50 mbar for 10 s (approx. 50 μL [40]). Separation was carried out at 25 °C by applying a voltage of 18 kV (normal polarity). Between runs, the capillary was rinsed for 2 min with the elution solution and 2 min with neutral BGE, in order to avoid carry-over between consecutive analyses. All the IA-SPE-CE columns were filled with water when they were stored overnight to avoid salt crystallization.

The parameters of the oa-TOF mass spectrometer were the same indicated above for CE-MS. The quality parameters were calculated from data obtained by measuring the peak area and the migration time from an extracted ion electropherogram (XIE) of each peptide. The m/z values of the molecular ions considered for each peptide are shown in Table 1. Studies of repeatability (intraday, $n=8$ with one

microcartridge) and reproducibility (interday, $n = 16$ in two days and with a new microcartridge each day) were performed by analyzing a mixture of End1 and End2 at a concentration of 10 ng mL^{-1} . These parameters were calculated as a percentage of the RSD (% RSD) of peak area and migration time. The limits of detection (LOD) for each peptide were obtained by analyzing low-concentration samples. Standard or spiked plasma samples of decreasing concentrations were prepared and analyzed until no peptides were detected. In each case, the lowest concentration that gave a signal significantly different from the baseline of a blank sample was considered as the LOD (S/N ratio was always higher than 3). The linearity ranges were determined by injecting in duplicate standard mixtures of End1 and End2 at four different concentrations ranging from 1 to 100 ng mL^{-1} .

Details about C18-SPE-CE-MS experiments are described in reference 19.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the IA sorbent

In SPE-CE, the physical properties of the sorbents, such as material type, particle size and porosity, are a key tool to avoid flow restriction and bubble formation inside the microcartridges which could hinder sample introduction or promote current instability and breakdown during the electrophoretic separation [15]. Unlike the activated sepharose gels commonly used to prepare IA sorbents, the silica particles typically used in SPE fulfil most of the desired requirements [13,20–23].

In this work, we studied a procedure for the preparation of IA sorbents based on the covalent attachment of oxidized antibodies through their carbohydrate moieties to activated hydrazide silica particles (Fig. 1) [22,24,25]. This procedure was originally described to prepare sorbents for IA chromatography and was selected because it allowed a suitable orientation of the antibody binding sites while maintaining their functionality [24]. As no activated hydrazide silica particles were commercially available, the first step of the preparation procedure was the activation of diol silica particles originally found in Sep-Pak Diol cartridges to obtain hydrazide silica particles. Before beginning the activation, it was advisable to confirm the amount of diol groups on the diol silica particles. Several methods exist for determining the diol content on solid particles using flow-injection analysis, CE or titration [24,31,32]. All of them are based on the oxidation of the diol groups using periodic acid. This reaction is quite specific, owing to the fact that single hydroxyl groups or hydroxyl groups not on contiguous carbon atoms are generally not attacked [31,32]. Using an iodometric titration, which was easy, rapid and inexpensive, we confirmed that the diol silica particles contained $274 (\pm 5, n = 3) \mu\text{mol}$ of diols per gram of particle. The value was higher than the upper limit of the range given by the manufacturer (i.e. $53\text{--}220 \mu\text{mol}$ of diols per gram of particle). A similar content of diol groups was reported in the diol silica particles used as starting material by other authors (i.e. $220 (\pm 20, n = 3) \mu\text{mol}$ of diols per gram of particle [24]). Furthermore, the pore size and particle diameter of the diol silica particles (i.e. 125 \AA and $37\text{--}55 \mu\text{m}$, respectively) were similar to the values of the C18 silica particles used in a previous work for the analysis of opioid peptides by C18-SPE-CE-MS [15–19]. Considering the average size of an IgG (approximately $80\text{--}100 \text{ \AA}$), the pore size was also potentially suitable for the immobilization of antibodies in order to obtain IA sorbents of maximum binding surface area [22,24,41].

Before introducing the active hydrazide sites, the diol groups of the diol silica particles were oxidized to aldehyde groups [22,24,25]. In this step, the main factor influencing later the amount of active

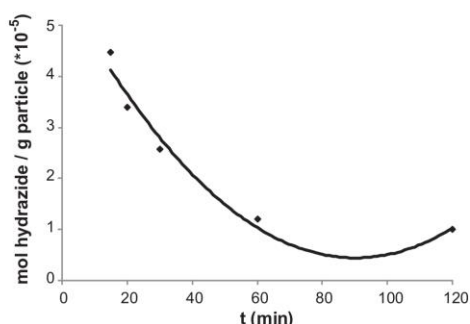


Fig. 2. Effect of the oxidation time of the diol silica particles to aldehyde on the fraction of active hydrazide sites produced using oxalic dihydrazide.

hydrazide sites was the oxidation time. First, the reaction mixtures of diol silica particles with periodic acid were sonicated for 15 min. Then, several oxidation times (15, 20, 30, 60 and 120 min) were tested, and the total amount of active hydrazide groups on the silica particles was determined using the TNBS spectrophotometric assay. Fig. 2 shows the amount of active hydrazide groups as a function of the oxidation time of diol silica particles to aldehyde. As can be observed, the amount of active hydrazide groups decreased with the oxidation time. F.R. Ruhn et al. already suggested that the probability that both ends of the oxalic dihydrazide molecule become inactive (i.e. unavailable for antibody attachment) after reaction with two neighbouring aldehyde sites increased with the degree of oxidation of the particles [24]. We selected an oxidation time of 15 min because it provided the maximum number of active hydrazide groups in the shortest reaction time. Under these conditions, $45 (\pm 0.2, n = 3) \mu\text{mol}$ of active hydrazide groups per gram of particle were obtained. Taking into account this result and the maximum number of active hydrazide groups calculated from the diol content indicated above, only a 16% of the diol groups on the silica particles originated active hydrazide groups. These results were consistent with those proved by other authors [24].

The antibody must be oxidized before the immobilization onto the activated hydrazide silica particles. The usual approach is the oxidation of the diols located in the carbohydrate chains of the Fc fragment, under mild conditions with periodate to form aldehyde groups. The major advantage of this oxidation method is that the carbohydrate residues are usually situated in distant regions from the antigen binding sites and so, no change is expected in the binding activity of antibodies [24,37,38]. Several factors as periodate concentration, reaction time, pH and temperature were adapted from a procedure found in the literature in order to preserve the antibody reactivity and obtain an appropriate conversion to aldehydes while minimizing overoxidation to acids [24,37,38]. The oxidation conditions were tested using an IgG fraction from rabbit serum, which was cheaper than the purified IgG against End1 and End2. This IgG fraction has demonstrated to be a good general model for such purpose, despite results could be slightly different depending on the size and structure of each IgG [41]. The oxidized IgG from rabbit serum was used to evaluate by spectrophotometry the covalent bonding to the activated hydrazide silica particles before preparing the IA sorbent against End1 and End2. The amount of oxidized IgG coupled to the activated hydrazide silica particles was estimated by measuring the absorbance at 214 nm and comparing the concentration of oxidized IgG before and after the immobilization reaction. The spectrophotometric method was linear between 10 and $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ of oxidized IgG ($y = 0.0101x - 0.2039$, $R^2 > 0.99$). The lowest concentration

giving a signal with a S/N ratio higher than 10 (LOQ) was $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Thus, it could be calculated that 74% ($\pm 7\%$, $n = 3$) of the available oxidized IgG for the reaction was coupled to the activated silica particles, which meant $1.23 \times 10^{-4} \mu\text{mol}$ (74%, 125 μL of a solution containing $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ of IgG, $M_r \sim 150,000 \text{ Da}$). The relative amount of coupled IgG was high because the $45 \times 10^{-2} \mu\text{mol}$ of hydrazide groups on the 0.01 g of activated silica particles (45 μmol of active hydrazide groups per gram of particle, see above) were in molar excess with regard to the IgG. However, it was not convenient to work with a large excess of antibody to improve the coverage of the available hydrazide groups, especially with the purified IgG against End1 and End2, due to the price of the antibodies and the need of preparing enough IA sorbent to build the microcartridges (approximately 0.001 g of IA sorbent per microcartridge) [15–18].

The IA sorbent against End1 and End2 for IA-SPE-CE was prepared following this procedure and evaluated for IA-SPE-CE-MS. A polyclonal antibody was selected because they recognize and bind multiple different epitopes of an antigen. Furthermore, the variability of the effects of periodate oxidation was supposed to be lower for polyclonal than for monoclonal antibodies [20,38]. The manufacturer declared that the IgG against End1 and End2 was purified against the immunogen, which was also important to ensure an optimum immunoreactivity of the IA sorbent.

3.2. IA-SPE-CE-MS

Various requirements arised when it came to establish the IA-SPE-CE-MS methodology. On the one hand, the IA sorbent contained immobilized antibodies which were not supposed to tolerate extreme conditions. On the other hand, as on-line MS detection was used, solutions must be volatile to prevent salt build-up in the mass spectrometer. In this regard, a BGE of 20 mM of ammonium acetate adjusted to pH 7.00 with ammonia, which had a very low buffer capacity, had already provided good results in the analysis of human erythropoietin peptides by IA-SPE-CE-MS if it was refreshed frequently [13]. Several other experimental conditions were studied using standard mixtures of End1 and End2.

Loading pressure was 930 mbar because no opioid peptides were detected when the same volume of sample was loaded at a lower pressure (50 mbar). Fig. 3 shows the peak area of the eluted End1 and End2 as a function of the sample loading time at 930 mbar. As can be observed, peak area of End1 increased with loading time until approximately 20 min and the effect was less significant for End2. After 20 min, peak areas decreased probably because analytes were washed away after exceeding the breakthrough volume for the IA sorbent contained in the microcartridge [15]. The slopes of the End1 graphic were larger because the immobilized antibody was more immunoreactive against this peptide in accordance to the manufacturer. Although 20 min provided higher signal, the consumption of sample was too large which could be a disadvantage for the analyses of certain types of biological samples. Finally, a sample loading time of 10 min at 930 mbar was selected. No improvements were obtained loading the sample at 930 mbar for 10 min in steps of 2 min separated by a waiting time of 1 min in order to increase the contact between peptides and the antibody [42,43].

It is difficult to find elution solutions for IA chromatography containing volatile components. The best alternatives are usually certain types of acidic solutions in water or with a low content of organic solvent [12,13,23]. Anyway, the elution plug should be in contact with the IA sorbent for the minimum period of time to avoid the denaturation of the antibody, while allowing the quantitative elution of the retained peptides. In the present paper, several aqueous solutions of HAc and HFoR, both at 50 or 100 mM (pH 2.3 and 2.1, respectively), and the same solutions with 1 and 10% (v/v) of acetonitrile or methanol were tested. A 50 mM mixture of

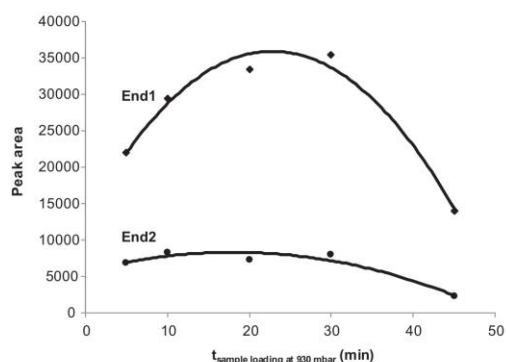


Fig. 3. Effect of sample loading time at 930 mbar on peak areas of the eluted End1 (◆) and End2 (●) analyzed by IA-SPE-CE-MS. The neutral BGE was used.

both acids provided good results in a previous work for IA-SPE-CE-MS analysis of glycoprotein digests [13]. In the present work, the best results in terms of peptide peak areas were also obtained with an aqueous solution of 50 mM HAc and 50 mM HFoR. The use of organic modifier promoted a decrease of peak areas, being this effect more significant for End2 until hindering its detection in some cases (e.g. 10% (v/v) of methanol). With regard to the injection time, no remarkable differences were observed after injecting 10 or 15 s at 50 mbar. Furthermore, with an injection plug of 10 s, no improvements were achieved using 10 mm microcartridges, which contained an increased amount of IA sorbent than those of 7 mm. Fig. 4a shows the XIEs of End1 and End2 for the analysis by IA-SPE-CE-MS of a 5 ng mL^{-1} standard mixture under optimum conditions, as well as those of a 100 ng mL^{-1} standard mixture by CE-MS (Fig. 4b). Both peptides had a similar migration time, because they only differed in the third amino acid, which in both cases do not have any ionizable group in the side chain (Trp and Phe in End1 and End2, respectively) (Table 1). Preconcentration potential of IA-SPE-CE is evident because concentration of the standard mixture in Fig. 4a was 20-fold lower than in Fig. 4b. In accordance to our previous observation about the enhanced immunoreactivity of the antibody against End1 and End2, peak height of End1 was 5-fold higher than End2 (Fig. 4a), a difference that was not so important by CE-MS (Fig. 4b). LODs will be discussed later in detail.

For the purpose of evaluating the selectivity of the prepared IA sorbent, a standard mixture of eight opioid peptides, including End1 and End2, was analyzed by IA-SPE-CE-MS (Table 1). As shown in Fig. 5, only End1, End2 and DynA could be detected. Detection of a low amount of DynA was not expected, because no similarities could be observed between the amino acid sequences of DynA and the endomorphins (Table 1). DynA and Meap were the studied opioid peptides with the largest molecular mass and the highest number of ionizable groups (Table 1). As DynA contains two basic arginines, it would be probably more susceptible to non specific interactions with the IA sorbent. However, no improvements were obtained by washing the microcartridge for extended periods of time with BGE, after loading the mixture of eight opioid peptides before the elution and the electrophoretic separation.

Table 2 summarizes some quality parameters that were evaluated for the analysis of End1 and End2. As can be observed, similar values were obtained for both peptides. The % RSD values for reproducibility of peak areas were slightly higher than those obtained for repeatability, whereas the % RSD values for reproducibility of migration times were twice as much as for repeatability. These variations in peak areas and migration times could be due to the

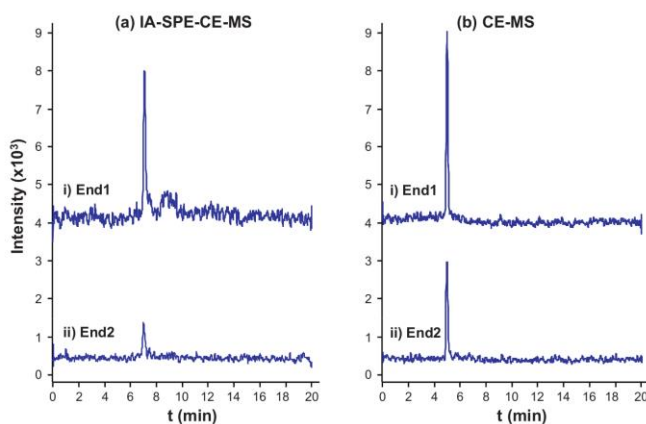


Fig. 4. Extracted ion electropherograms of standard mixtures of (i) End1 (611.2976 m/z) and (ii) End2 (572.2867 m/z) by (a) IA-SPE-CE-MS (5 ng mL^{-1}) and (b) CE-MS (100 ng mL^{-1}), respectively. The neutral BGE was used in both cases.

differences in the home-made microcartridges and IA sorbents, because a new IA-SPE-CE column was used each day for the reproducibility study. These results were consistent with those that were previously obtained by C18-SPE-CE-MS [15–19]. However, the IA microcartridges could be used only up to 8 runs without problems

of extraction performance, current instability or breakage (20 runs for C18). With regard to long-term storage, the IA sorbent provided the same performance after five months of preservation in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.00) with 0.1% sodium azide at 4 °C. Linearity was evaluated in the range between 1 and 100 ng mL^{-1} , but signal vs. concentration was only linear until a concentration of 10 ng mL^{-1} ($R^2 > 0.99$). According to the LODs, End1 and End2 could be detected at 1 ng mL^{-1} in the standard mixtures. Table 3 summarizes the LODs obtained for End1 and End2 by CE-MS and SPE-CE-MS using C18 and IA sorbents [19,39]. In the case of C18 sorbent, the BGE contained 50 mM HAC and 50 mM HFor and was adjusted to pH 3.5 with ammonia [19,39], whereas the IA sorbent required the neutral BGE described above. As can be observed, LODs by CE-MS were twice higher with the neutral BGE (100 ng mL^{-1} vs 50 ng mL^{-1}), due to its lower volatility and ionization efficiency [13]. However, it was highly recommended to use a neutral, as well as volatile, BGE for IA-SPE-CE-MS because, in addition to the interferences with elution, the immobilized antibodies were not supposed to tolerate extreme conditions (e.g. an acidic BGE) for the extended periods of times that required the electrophoretic separation. The LODs with the neutral BGE were 100-fold better by IA-SPE-CE-MS (1 ng mL^{-1}) than by CE-MS (100 ng mL^{-1}). The gain in sensitivity achieved was slightly better with the commercial C18 sorbent of a previous work (Table 3) [19,39]. However, results were acceptable, taking into account the limited amount of lab-made IA sorbent contained in the microcartridge, as well as its low immunoreactive surface area.

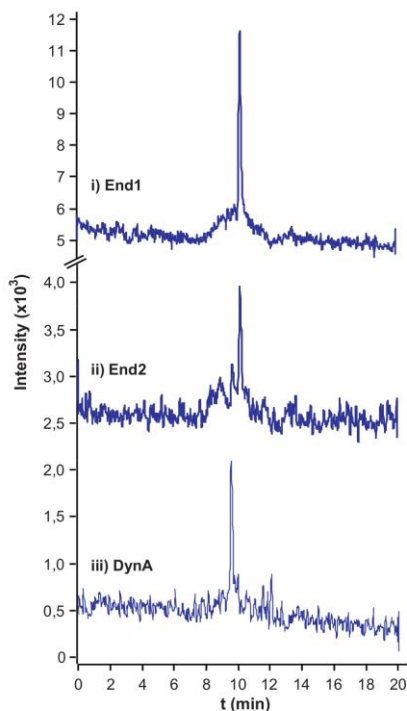


Fig. 5. Extracted ion electropherograms of the detected compounds for a 10 ng mL^{-1} standard mixture of eight opioid peptides (Table 1): (i) End1 (611.2976 m/z), (ii) End2 (572.2867 m/z) and (iii) DynA (868.4788, 434.7430 m/z). The neutral BGE was used.

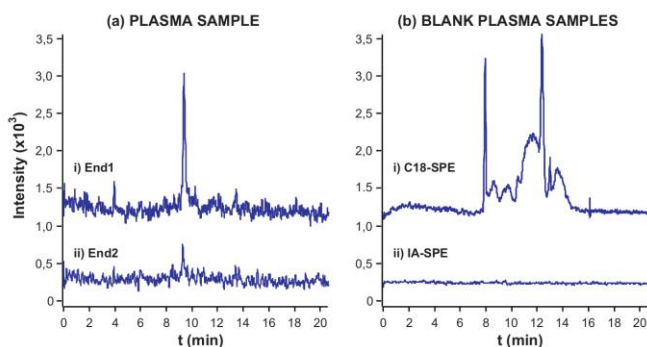
Human plasma samples fortified with the opioid peptides were analyzed by IA-SPE-CE-MS in order to show the potential of the established methodology for peptide analysis in biological fluids. Untreated biological samples or subjected to a mere dilution or filtration process have been traditionally analyzed by IA chromatography due to the excellent selectivity of antibodies [4–7,12]. Plasma samples spiked with End1 and End2 at concentrations ranging from 1 ng mL^{-1} to 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were filtered through 0.22 μm nylon filters. Filtrates were then diluted at a 1:1 ratio with 20 mM of ammonium acetate at pH 7.00 (IA-SPE-CE-MS BGE) or 0.1 M KH_2PO_4 at pH 7.00. However, neither of these treatments allowed the subsequent detection of the opioid peptides by IA-SPE-CE-MS. Plasma samples needed to be subjected to a harsher treatment. In previous works about the analysis of opioid peptides in plasma samples by C18-SPE-CE-MS, a double-step sample clean-up based on precipitation with acetonitrile followed by filtration provided

Table 2
Repeatability, reproducibility, linearity and LODs for the analysis of standard mixtures of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS.

	Repeatability (%RSD) (10 ng mL ⁻¹ , n = 8)		Reproducibility (%RSD) (10 ng mL ⁻¹ , n = 16)		Linearity (1–10 ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)
	Peak area	t _m	Peak area	t _m	Regression line (R ² > 0.99)	
End1	6.5	9.0	8.2	17.0	A = 6732.8 C–3111.0	1
End2	2.3	8.9	9.8	16.8	A = 3080.8 C–1774.8	1

Table 3
LODs for the analysis of the standard mixtures of End1 and End2 by CE-MS and SPE-CE-MS with a C18 or an IA sorbent.

LOD (ng mL ⁻¹)	BGE (pH 3.50) ^b [19,39]		BGE (pH 7.00) ^b	
	CE-MS ^a	C18-SPE-CE-MS ^a	CE-MS ^a	IA-SPE-CE-MS ^a
	50	0.1	100	1

^a The same oa-TOF mass spectrometer was used in all cases.^b The BGEs were 50 mM HAC and 50 mM HFor (pH 3.50) [19,39] and 20 mM ammonium acetate (pH 7.00) (this work).**Fig. 6.** (a) Extracted ion electropherogram for a plasma sample spiked with 100 ng mL⁻¹ of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS: (i) End1 and (ii) End2. (b) Sum of End1 and End2 XIEs for blank plasma samples by (i) C18-SPE-CE-MS and (ii) IA-SPE-CE-MS. In C18-SPE-CE-MS 50 mM HAC and 50 mM HFor (pH 3.50) was used as BGE [19,39].

good results to prevent saturation of C18 microcartridges [17,18]. Plasma samples were first subjected to a single-step of precipitation with acetonitrile. After evaporating the solvent, the residue was dissolved in water and analyzed. As results were not satisfactory, the whole double-step treatment was carried out. After filtration, the samples were reconstituted with phosphate buffer (pH 7.00). Under these conditions, End1 and End2 could be only detected at 100 ng mL⁻¹. These LODs were higher than those obtained for standard mixtures, as in our previous work with a C18 sorbent [19]. Probably, some of the plasma matrix components were hindering the interaction among antibodies and opioid peptides due to the presence of residual groups on the IA sorbent that establish non-specific interactions with matrix components. Moreover, coelution of analytes with matrix components could cause ionization suppression of the opioid peptides. In our previous work, End1 in fortified plasma samples could be detected at 1 ng mL⁻¹ by C18-SPE-CE-MS (End2 was not studied). It is worth remembering that in C18-SPE-CE-MS, the use of an acidic BGE promotes slightly better LODs [19].

Fig. 6a shows the XIEs of End1 and End2 for the analysis of a plasma sample fortified with 100 ng mL⁻¹ of each opioid peptide. Fig. 6b shows the sum of XIEs of End1 and End2 obtained for a blank plasma sample by C18-SPE-CE-MS (i) and IA-SPE-CE-MS (ii). The electropherograms of Fig. 6b proved that the selectivity of the IA sorbent against End1 and End2 was significantly better than for the C18 sorbent, hence most of the isobaric matrix components retained by the C18 sorbent were not captured by the antibody. However, we could not rule out retention of some other matrix

components as a cause of the limited preconcentration factors achieved using this IA sorbent for plasma samples. These matrix components would be retained by non specific interactions with the IA sorbent, as occurred with DynA. Again, it is worth pointing out the limited immunoreactive surface area in the IA sorbent, which may contain between others: diol, aldehyde and hydrazide residual groups.

4. Concluding remarks

We have demonstrated that a procedure traditionally followed to prepare silica-based sorbents from intact antibodies for IA chromatography can be optimized to be applied in IA-SPE-CE. The IA sorbent preparation procedure proved valuable to obtain a highly selective sorbent against End1 and End2. However, the extraction capacity may be improved in order to get enhanced extraction efficiencies which are necessary for high sensitivity measurements in microanalytical techniques such as IA-SPE-CE-MS. Minimizing bifunctional dihydrazide attachment while maximizing the amount of active hydrazide groups was important to obtain silica particles with a large active surface area for the antibody immobilization. Results obtained for the analysis of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS in terms of repeatability, reproducibility, linearity and LODs were acceptable, taking into account the multi-step synthetic approach, the limited amount of IA sorbent contained in the lab-made microcartridges, as well as its low immunoreactive surface area. Despite these limitations, the LODs for End1 and End2 of 1 ng mL⁻¹ were approximately 100-fold better than those

obtained by CE–MS. However, for spiked plasma samples End1 and End2 could be only detected down to 100 ng mL^{-1} . These LODs are 10-fold and 100-fold higher, respectively, than those that can be obtained by C18-SPE-CE–MS. In the future, selectivity, capacity and efficiency of the IA sorbents should be improved in order to quantify opioid peptides at the levels found in real samples. Results could be further enhanced increasing the binding surface area of the IA sorbent using a large molar excess of purified antibody during the coupling reaction, decreasing non-specific binding or exploring other preparation procedures to couple intact antibodies or its active fragments.

Acknowledgements

The authors thank the Solution Equilibria and Chemometrics group from the University of Barcelona for allowing use of the UV–Vis diode array system 845 (Agilent Technologies). Sílvia Medina acknowledges the Generalitat de Catalunya for a FI (Formación Investigadora) fellowship. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2008-00507/BQU) and the European regional development fund (ERDF) (UNBA08-4E-003).

References

- [1] V. Kasicka, *Electrophoresis* 31 (2010) 122–146.
- [2] M. Herrero, E. Ibanez, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 29 (2008) 2148–2160.
- [3] K.E. Scriba, A. Psurek, Separation of peptides by capillary electrophoresis, in: P. Schmitt-Kopplin (Ed.), *Capillary Electrophoresis*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2008, pp. 483–506.
- [4] A.C. Moser, D.S. Hage, *Electrophoresis* 29 (2008) 3279–3295.
- [5] L.K. Amundsen, H. Sirén, *Electrophoresis* 28 (2007) 99–113.
- [6] N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips, *Electrophoresis* 29 (2008) 3259–3278.
- [7] N.A. Guzman American Laboratory, 2008, Vol. 40, No. 20, 18–29.
- [8] T.M. Phillips, E. Wellner, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 106–111.
- [9] H. Kalish, T.M. Phillips, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1605–1612.
- [10] H. Kalish, T.M. Phillips, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 194–200.
- [11] F. Benavente, E. Hernández, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2633–2639.
- [12] N.A. Guzman, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 197–213.
- [13] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2574–2582.
- [14] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. Jong, *Electrophoresis* 31 (2010) 44–54.
- [15] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 205–212.
- [16] E. Hernandez, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Electrophoresis* 28 (2007) 3957–3965.
- [17] E. Hernandez, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Electrophoresis* 29 (2008) 3366–3376.
- [18] F. Benavente, S. Medina-Casanellas, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1–11.
- [19] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Electrophoresis* 32 (2011) 1750–1759.
- [20] M. Nisnevitch, M.A. Firer, J. Biochem. Biophys. Methods 49 (2001) 467–480.
- [21] J. Turková, *J. Chromatogr. B* 722 (1999) 11–31.
- [22] J.E. Shiel, R. Mallik, S. Soman, K.S. Joseph, D.S. Hage, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 719–737.
- [23] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek, *Immunology. The Experimenter Series*, 1st ed., Academic Press Elsevier, 2006.
- [24] F. Ruhn, P.S. Garver, D.S. Hage, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 9–19.
- [25] D.J. O'Shannessy, W.L. Hoffman, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 9 (1987) 488–496.
- [26] M.R. Oates, W. Clarke, E.M. Marsh, D.S. Hage, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 459–465.
- [27] J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin, J-C Do Rego, *Pharm. Rev.* 59 (2007) 88–123.
- [28] D.S. Jessop, A. Fassold, C. Wolff, R. Hofbauer, A. Chover-Gonzalez, L.J. Richards, R.H. Straub, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1193 (2010) 117–122.
- [29] H. Mizoguchi, H. Watanabe, T. Hayashi, W. Sakurada, T. Sawai, T. Fujimura, T. Sakurada, S. Sakurada, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 362–368.
- [30] V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Hernández, J. Barbosa, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 68–76.
- [31] S. Siggia, J.G. Hanna, *Quantitative Organic Analysis via Functional Groups*, 4th ed., Wiley, New York, 1979, pp. 42–43.
- [32] A. Chattopadhyay, D.S. Hage, *J. Chromatogr. A* 758 (1997) 255–261.
- [33] J. Adler-Nissen, *J. Agric. Food Chem.* 27 (1979) 1256–1262.
- [34] P.M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann, *J. Food Sci.* 66 (2001) 642–646.
- [35] J.K. Inman, H.M. Dintzis, *Biochemistry* 8 (1969) 4074–4082.
- [36] P.O. Larsson, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 212–223.
- [37] A.C. Carrie, C.A.C. Wolfe, D.S. Hage, *Anal. Biochem.* 231 (1995) 123–130.
- [38] D.S. Hage, C.A.C. Wolfe, M.R. Oates, *Bioconjugate Chem.* 8 (1997) 914–920.
- [39] M. Borges-Alvarez, F. Benavente, Estela Giménez, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2489–2498.
- [40] D. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction*, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2000, pp. 83–86.
- [41] W. Clarke, J.D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E.M. Karle, D.S. Hage, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 13–22.
- [42] T.M. Phillips, J.J. Chmielinska, *Biomed. Chromatogr.* 8 (1994) 242–246.
- [43] T.M. Phillips, L.M. Kennedy, E.C. De Fabo, *J. Chromatogr. B* 697 (1997) 101–109.

ON-LINE IMMUNOAFFINITY SPE-CE-MS FOR THE ANALYSIS OF LARGE BIOMOLECULES USING TRANSFERRIN AS A MODEL COMPOUND

Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente, Estela Giménez,
José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Keywords: Capillary electrophoresis / coating / immunoaffinity / mass spectrometry / on-line preconcentration / transferrin

Abstract

On-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry (IA-SPE-CE-MS) for the analysis of large biomolecules remains unexplored because of the complex issues that need to be addressed. In this preliminary study, we used the human glycoprotein transferrin (Tf) as a model of a large biomolecule. First, we established by CE-UV a novel method compatible with IA-SPE-CE-MS, based on the use of a fused silica capillary coated with an anionic derivative of polyacrylamide (UltraTrol™ Dynamic Pre-Coat High Normal, HN) to avoid protein adsorption. The methodology allowed the detection of the most abundant Tf sialoforms. Repeatability studies demonstrated high stability of the coated capillaries, which was required for on-line immunoextraction and MS detection. IA-SPE-CE-UV and IA-SPE-CE-MS methods were optimized for the analysis of Tf in standard solutions and human serum samples using a laboratory-made IA sorbent. Three peaks corresponding to Tf were detected with UV detection when the on-line immunoextraction process was applied to the standard solutions. The use of MS detection, however, reduced the resolution of electrophoretic separation. Nevertheless, we demonstrated that it was possible to detect Tf in human serum samples, after off-line serum sample de-salting by centrifugal filtration.

1. Introduction

Immunoaffinity capillary electrophoresis (IACE) is a particular type of affinity capillary electrophoresis (ACE) using antibodies as the affinity ligands. IACE comprises a set of formats that differ in the way to establish the specific interaction between the antigenic analyte and the antibody before electrophoretic separation [1-5]. Approaches based on immobilized antibodies for sample clean-up and analyte enrichment can be regarded as a variant of on-line

solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE), which has been extensively applied with typical chromatographic sorbents [5]. In one of the most widely-used configurations of IA-SPE-CE, the IA microcartridge is inserted near the inlet of the separation capillary to selectively retain the antigenic analyte from a large volume of sample. The retained analyte is subsequently eluted in a small volume of an appropriate solution, resulting in sample purification and concentration enhancement before electrophoretic separation [3-9].

IA-SPE-CE performance can be further increased using a sensitive and selective detection method such as mass spectrometry (MS), which also provides valuable structural information [7-9].

Nowadays, researchers develop their own IA sorbents for IA-SPE-CE because those with the most suitable features for optimum results are not commercially available. There is a wide variety of methods for preparing IA sorbents, which immobilize intact antibodies or their active fragments onto different support surfaces [10-12]. When it comes to selecting the solid support, silica particles typically used in SPE are one of the best choices [6, 8-10]. Regarding the immobilization method, the orientation of the antibody on the solid support is of particular importance as it ensures good accessibility to the binding sites [2, 11-12]. In addition, analyte-antibody interaction and antibody stability can be substantially altered by the analysis conditions. Composition, ionic strength and the pH of buffers and sample solutions, as well as temperature, should be carefully controlled to favor analyte retention and prevent antibody denaturation [2, 13]. Furthermore, with on-line MS detection, solutions must be volatile to prevent salt build-up in the detector. Due to all these issues, only a few authors have applied IA-SPE-CE-MS for the selective preconcentration of low molecular mass immunoreactive peptides from biological fluids [7-9]. Reports on the analysis of large biomolecules, such as proteins or glycoproteins, by IA-SPE-CE are also scarce [6, 14-17]. Moreover, to the best of our knowledge, full on-line IA-SPE-CE-MS has not been demonstrated yet.

In the IA-SPE-CE-MS analysis of proteins, another issue lies in the need for coated capillaries, which are necessary to prevent protein adsorption onto the fused silica inner capillary wall [18-21]. As in CE-MS, covalently or physically adsorbed coatings are preferred because dynamic coatings require the use of a background electrolyte (BGE) containing a considerable amount of a non-volatile compound (i.e. the coating agent), which suppresses analyte ionization and damages the antibody [19-21]. Physically adsorbed coatings can be easily prepared by flushing bare fused silica capillaries with an appropriate polymer solution that can be washed out before assembling the microcartridge [6]. In most cases, the coverage of the silica surface by the coating is complete, regeneration is only necessary after several runs, reproducibility among the capillaries is better than with covalently bonded coatings and the operation is compatible with on-line MS detection [6, 18-22]. Some papers have described the use of commercially available physically adsorbed polymeric coatings in the separation of intact glycoproteins, including transferrin (Tf), by CE-MS [18-22]. However, one of the obstacles faced by these CE-MS methods is the limited stability of the coated capillaries. We have previously reported that the bleeding of some coatings rapidly leads to a decrease in signal stability and sensitivity in CE-MS due to contamination of the mass spectrometer [21]. This issue is aggravated in the analysis of the majority of glycoproteins, such as erythropoietin, for which extremely acidic separation conditions are often applied

for optimum glycoform separation and detection in the positive ESI mode [6, 21]. This would also probably have a negative impact on antibody performance in IA-SPE-CE-MS.

The aim of this work was to investigate for the first time the suitability of IA-SPE-CE-MS for the analysis of large biomolecules, using Tf as the model. Tf (approximately 80 kDa) is an iron transporting glycoprotein with two N-glycosylation sites containing carbohydrates that differ in the number and composition of sugar antennas terminating in sialic acid residues. Sialic acid residues vary from 0 to 6, generating different sialoforms (S0-S6). S4, which shows two bi-antennary chains with four sialic acid groups, is the most abundant (approximately 80%), followed by S5, S6 and S3. Sialoforms S0, S1 and S2, which are practically non-existent in the serum of healthy individuals, are biomarkers for carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and chronic alcoholism [17, 22-28]. Several authors have demonstrated that Tf sialoforms can be resolved and quantified by CE-UV at a pH of between 8 and 9, using borate buffers containing several modifiers, such as putrescine, for dynamic capillary coating [17, 22-28]. Furthermore, a method using a volatile separation buffer of ammonium acetate and a capillary coated with a physically adsorbed double layer of polybrene (cationic polymer) and dextran sulfate (anionic polymer) has provided acceptable sialoform separation by CE-MS [22]. However, novel alternatives to CE-MS are still being sought to improve separation and avoid coating bleeding, which compromises MS performance over extended periods of time [21-22].

Here, we propose a novel methodology using a fused silica capillary coated with a physically adsorbed anionic derivative of polyacrylamide (UltraTrol™ Dynamic Pre-Coat HN [21, 29-30]) that shows improved stability. This method was adapted to analyze Tf in standards and serum samples by IA-SPE-CE-UV and IA-SPE-CE-MS, using a laboratory-made IA sorbent. This paper can be regarded as a case study highlighting the challenges faced by IA-SPE-CE-MS in the analysis of complex large biomolecules, including issues associated with immunoextraction, adsorption in the inner capillary walls, separation resolution and on-line ESI.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals used in the preparation of buffers and solutions were of analytical grade. Acetonitrile, methanol, isopropanol, formic acid (HFor) (98-100%), acetic acid (HAc) (glacial), hydrochloric acid (25%), ammonia (25%), sodium hydroxide, glycine (99.7%), sodium acetate (99%), ammonium acetate (NH₄Ac) (99%) and potassium dihydrogen phosphate anhydride (99.5%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Dry calcium chloride (96%) was supplied by Prolabo (Paris, France). Periodic acid (99%), sodium borohydride (99%), sodium chloride (99.5%), sodium azide (99.5%), sodium bicarbonate (99.5%), polyethylene glycol (8000 Da), oxalic dihydrazide (98%) and human transferrin (Tf) (partially saturated, min 98%) were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). Iron (III) chloride 6-hydrate (87%) and diethylamine (99%) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). UltraTrol™ Dynamic

Pre-Coat High Normal (HN) was purchased from Target Discovery (Palo Alto, CA, USA). Water with conductivity less than $0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

Goat polyclonal IgG antibody against human Tf ($1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, immunogen affinity purified) was provided by Abcam (Cambridge, UK). Sep-Pak Diol cartridges ($37\text{-}55 \mu\text{m}$ particle diameter, 125 \AA pore size, $53\text{-}220 \mu\text{mol}$ of diol per gram of particle) were supplied by Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Electrolytes, sheath liquid and standard solutions

An aqueous standard solution ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of Tf was prepared and stored in a freezer at -20°C when not in use. Saturated Tf solution ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) was prepared to avoid the heterogeneity in glycoform charge caused by incomplete iron saturation by dissolving the protein in an aqueous solution containing 0.27 mM FeCl_3 and 18.7 mM NaHCO_3 [17, 23-28]. Working standard solutions of Tf at different concentrations were obtained by diluting with water. Phosphate buffers for the preparation of the IA sorbent were made from potassium dihydrogen phosphate, the pH being adjusted with NaOH. All the oxidizing HIO_4 solutions were protected from light exposure. The BGE for optimum separation contained $25 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$ and was adjusted to pH 8.5 with NH_3 . The sheath liquid solution for CE-MS and IA-SPE-CE-MS consisted of 60:40 (v/v) isopropanol:water, with 0.1% (v/v) of HFor. All solutions were passed through $0.45 \mu\text{m}$ nylon filters (MSI, Westboro, MA, USA) before analysis and

were stored at 4°C when not in use. Sheath liquid was degassed by sonication for 15 min before use.

2.3. Human serum sample preparation

Universal control human serum (lyophilized) was supplied by Human (Wiesbaden, Germany). Serum was diluted according to the manufacturer's instructions, subjected to a filtration process using $0.45 \mu\text{m}$ nylon filters to remove particulate matter and stored at -20°C when not in use. Working serum solutions were obtained by diluting 1:6 in water and centrifugal filtration. Amicon centrifugal devices containing cellulose acetate filters with a 10 kDa cut-off (YM-10) (Millipore, Billerica, MA, USA) were used to eliminate salts. All centrifugation steps were performed at 13000 g and room temperature, unless otherwise indicated. First, the filter was washed with water for 10 min and the filtrate discarded. Then, $300 \mu\text{L}$ of working serum solution were added and centrifuged for 15 min. The remaining solution was washed twice with $200 \mu\text{L}$ of water for 10 and 5 min, respectively. It was subsequently recovered from the filter device by being centrifuged upside down in a new collection tube (3 min at 1000 g). The final sample volume was adjusted to $100 \mu\text{L}$ with water.

2.4. Apparatus and procedures

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA). Centrifugations were carried out in a Mikro 20 centrifuge with a

2073 rotor (at room temperature) or in a cooled Mikro 220R centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany) (at controlled temperature).

CE experiments were performed in an Agilent technologies HP^{3D} CE system (Waldbronn, Germany). A 6220 oa-TOF LC/MS mass spectrometer (Agilent technologies) with the orthogonal G1603A sheath-flow interface (Agilent Technologies) was coupled to the CE system. The sheath liquid was delivered at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump (Holliston, MA, USA). CE control and separation data acquisition (e.g. voltage, temperature and current) were performed using the ChemStation software (Agilent Technologies), which was run in combination with the MassHunter workstation software (Agilent Technologies) for control, data acquisition and analysis of the TOF-MS data.

The oa-TOF mass spectrometer was operated in the positive mode, using the following parameters: capillary voltage 4000 V, drying gas temperature 300°C, drying gas flow rate 4 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizer gas 7 psig, fragmentor voltage 430 V, skimmer voltage 65 V, and OCT 1 RF Vpp voltage 300 V. Unless otherwise indicated, data were collected in profile at 1 spectrum/s (approximately 10,000 transients/spectrum) between m/z 1500 and 3200, working in the high resolution (4 GHz) mode with the mass range set to 3200 m/z .

2.4.1. Preparation of the IA sorbent

Preparation of the IA sorbent consisted of derivatization of commercially

obtained diol silica particles with hydrazide groups and oxidation of carbohydrate residues of the Fc region of the IgG to covalently attach the antibody to the hydrazide solid support through the resulting aldehyde groups [9, 31]. The experimental procedure is described in detail in a previous work preparing an IA sorbent for low molecular mass peptides [9]. Next, we highlight the most significant changes. As IgG oxidation was performed at pH 5, the buffer of the commercial antibody solution was replaced by centrifugal filtration with 10 kDa cut-off cellulose acetate filters (YM-10, Millipore) at 25°C. Fifty microliters of the commercial Tf antibody solution were preconcentrated for 2 min at 12000 g and washed three times with 200 μL of 20 mM sodium acetate and 0.15 M sodium chloride at pH 5 for 10 min at 10,000 g. The IgG was recovered from the filter device by being centrifuged upside down in a new collection tube for 3 min at 1000 g. The final volume was adjusted with a solution of 20 mM sodium acetate and 0.15 M sodium chloride at pH 5 to obtain an IgG concentration of approximately 200 or 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (results were similar in both cases). The effect of endcapping active hydrazide groups on the sorbent was studied [31-33]. The sorbent containing active hydrazide groups, but no oxidized antibody, was mixed off-line with an excess of glyceraldehyde or acetaldehyde for 24 h at 4°C [32-33], or a SPE-CE-UV column was rinsed with a 5% (v/v) solution of glyceraldehyde or acetaldehyde at 5 mbar for 2 h. Endcapped hydrazide sorbents retained Tf and were therefore discarded.

2.4.2 CE-UV and CE-MS

Separations were performed at 20°C in a 58 cm L_T x 50 μm id x 360 μm od fused silica capillary supplied by Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). All capillary rinses were performed at high pressure (930 mbar). New capillaries were activated by flushing for 15 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 15 min with water and 20 min with HN. After 10 min of waiting, the coated capillary was flushed for 30 min with BGE. Between days, the capillary was conditioned by rinsing with HN for 10 min, waiting 10 min, flushing with water for 5 min, followed by 5 min with BGE. In both activation and conditioning methods, a 10 kV voltage was applied for 10 min after the last flush with BGE. Between runs, the capillary was rinsed for 10 min with BGE. In CE-MS, the activation procedure was performed offline to avoid the unnecessary entrances of the NaOH and HN solutions into the mass spectrometer. Activated capillaries were conditioned by CE-UV analysis of a standard solution of Tf ($1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) at least 3 times to remove any residual coating that was weakly attached to the capillary wall. Samples were hydrodynamically injected at 33 mbar for 3 s. Separation was conducted under normal polarity (cathode in the outlet) by applying a voltage of 5 or 10 kV (CE-UV and CE-MS, respectively). The UV window was placed 49.5 cm from the inlet of the uncoated capillary and detection was undertaken at 200 nm. The capillary was stored overnight in BGE.

2.4.3. IA-SPE-CE-UV and IA-SPE-CE-MS

Construction of the IA-SPE microcartridge or analyte concentrator

was carried out as described elsewhere [6, 9]. We used HN coated capillaries activated and conditioned as described in the previous section. The microcartridge (7 mm L_T x 250 μm id x 360 μm od, fused silica capillary, Polymicro Technologies) was inserted 7.5 cm from the inlet of the 58 cm long separation capillary using two plastic sleeves. It was earlier filled with the IA sorbent, which was positioned between two polyethylene frits (0.1 cm) obtained from a small fragment of the original filters found in the Sep-Pak Diol cartridges (Waters).

The IA-SPE-CE columns were first conditioned with BGE (3 min at 930 mbar). Standards and serum samples were hydrodynamically introduced at 930 mbar for 10 min (approximately 15 μL using the Hagen-Poiseuille equation [34]). A final rinse with BGE (2 min at 930 mbar) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before electrophoretic separation. Retained Tf was eluted by injecting a solution of 0.1 M NH_3 (pH 11.2) at 50 mbar for 40 s (approx. 53 nL [34]). All these steps were performed by switching off the nebulizer gas and the ESI capillary voltage to prevent HN entrance into the MS. Then, both were switched on and separation carried out at 20°C by applying a voltage of 5 or 10 kV (normal polarity, CE-UV and CE-MS, respectively). Between runs, to avoid carry-over, the capillary was rinsed with eluent for 2 minutes and with BGE for another 2 minutes. The UV and MS detection parameters are indicated above.

3. Results and discussion

3.1. CE-UV

Previously, we established a method

for separating Tf sialoforms by CE-UV and CE-MS using a volatile BGE of 25 mM ammonium acetate at pH 8.5 and a capillary coated with a double layer of polybrene and dextran sulfate (PB-DS) [22]. The PB-DS coating provided a pH-independent cathodic electroosmotic flow (EOF) that was lower than that in the bare fused silica capillaries at pH 8.5. The separation resolution of the Tf sialoforms was acceptable and reproducibility good, but coating bleeding precluded CE-MS operation over extended periods of times. Here, we tested a single-layer physically adsorbed coating developed from polyacrylamide derivatized with anionic substituents (UltraTrol™ Dynamic Pre-Coat HN). UltraTol™ is the commercial name of a family of coatings based on derivatized polyacrylamide. Depending on the nature of the substituent, the polyacrylamide polymer provides anodic EOF (high reverse, HR) or cathodic EOF (high normal, HN, or low normal, LN) [21, 29-30]. HR coated capillaries behave similarly to PB-coated capillaries and both give good results in the analysis of several acidic glycoproteins such as recombinant human erythropoietin (rHuEPO) [21]. However, they are not appropriate for less acidic glycoproteins like Tf, which need basic pH, cathodic EOF and normal polarity for optimum separation. LN coating has already been applied to the separation of Tf sialoforms by CE-UV [29], but our experience of rHuEPO analysis by CE-MS demonstrated against its use in routine analysis because of its low stability [21]. To the best of our knowledge, HN coated capillaries has not been evaluated in CE-MS.

The initial experimental conditions with HN capillaries were similar to those

used with the PB-DS capillaries [22]. The BGE (25 mM ammonium acetate) was adjusted with ammonia to different pH values around 8.5, while applying a separation voltage of 5 kV. As can be observed in Figure 1 a-c, a BGE of pH 8.5 provided the best separation (Figure 1 b), while a small pH variation around this value significantly affected resolution. The analysis time increased considerably when applying a lower separation voltage (3 kV), but the resolution was not significantly improved. No improvements were obtained with decreasing the sample injection volume or analyzing Tf after saturation with Fe to ensure a constant metal content in Tf [17, 23-28].

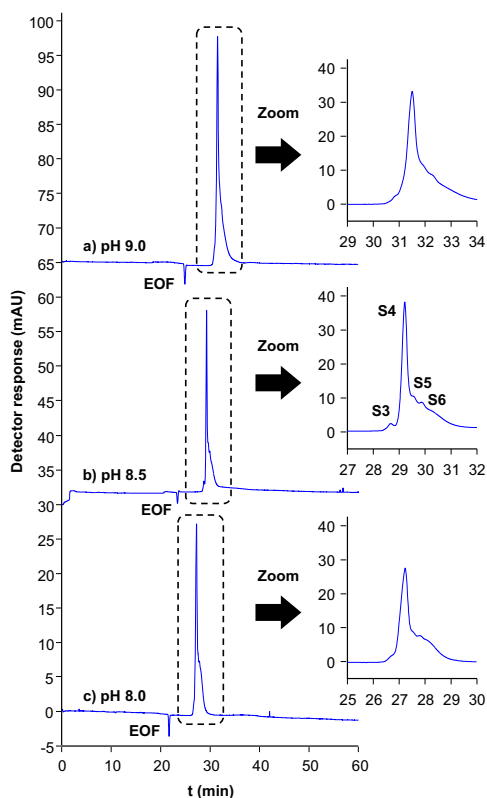


Figure 1. Electropherograms at 200 nm of a 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution of Tf analyzed by CE-UV at 5 kV using a BGE of pH (a) 8.0, (b) 8.5 and (c) 9.0.

Separation at pH 8.5 was worse than that observed with the PB-DS coating. Moreover, S3, S4, S5 and S6 sialoforms were poorly resolved after the negative dip indicating the EOF [23]. Limited resolution with the PB-DS-coated capillary was probably due to a combination of higher cathodic EOF in the HN capillary and the specific influence on separation selectivity that this type of coating could exert. To test the stability of the HN coating, we evaluated repeatability of peak area and migration time. Repeatability studies ($n=10$) were performed with a standard solution of Tf at a concentration of $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The percentage of RSD (%RSD) obtained were 5 and 2% for peak area and migration time, respectively. These results suggested high stability of the HN coated capillaries, which was necessary to confirm by IA-SPE-CE-UV and CE-MS before IA-SPE-CE-MS.

3.2. IA-SPE-CE-UV

Using the laboratory-made IA sorbent [9], the IA-SPE-CE methodology was optimized with UV detection using an aqueous standard solution of Tf ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Several volatile solutions were tested for elution. According to the literature, the best volatile eluents for IA sorbents are formic or acetic acid solutions in water or those with a low content of organic solvent, as well as some aqueous amine solutions [2, 6-9, 13, 35-36]. Figure 2 a-d show the results for the Tf and blank samples analyzed after elution with aqueous solutions of 50 mM HAc and 50 mM HFor, 5 mM diethylamine and 0.1 or 1 M

ammonia (results were similar to those obtained with hydro-organic solutions of isopropanol or acetonitrile of less than 20% (v/v)). As can be observed in Figure 2 b-d, only the alkaline solutions allowed the elution of the retained Tf to varying degrees. A solution of 0.1 M ammonia (Figure 2 c) was the best alternative in terms of peak height and resolution. In addition to several peaks (blank peaks) due to the specific eluent composition, three Tf peaks were detected after the EOF in a time window of almost 15 min (similar profiles were obtained at the other detection wavelengths between 200 and 280 nm). These peaks agreed with the order and relative concentrations expected for S4, S5 and S6. The improved separation resolution with regard to CE-UV (see Figure 1 b) could be tentatively explained by the pH gradient generated during elution due to the differences in pH between the eluent (11.2) and BGE (8.5). Alkaline elution has been used in IA chromatography with a high degree of success [13,35-36]. However, it is often overlooked because high pH can be detrimental to the stability of the protein or silica support. A single sharp peak was obtained after CE-UV analysis of Tf dissolved in 0.1 M of ammonia, with repeatability being good and no evidence of protein denaturation. Regarding IA sorbent stability, the peak area of the detected peaks decreased after 5 consecutive runs of the $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf standard, suggesting certain sorbent degradation.

Before elution with 0.1 M ammonia, potential interferences or retained non-specific molecules were eliminated with a rinse of BGE at 930 mbar for 2 min.

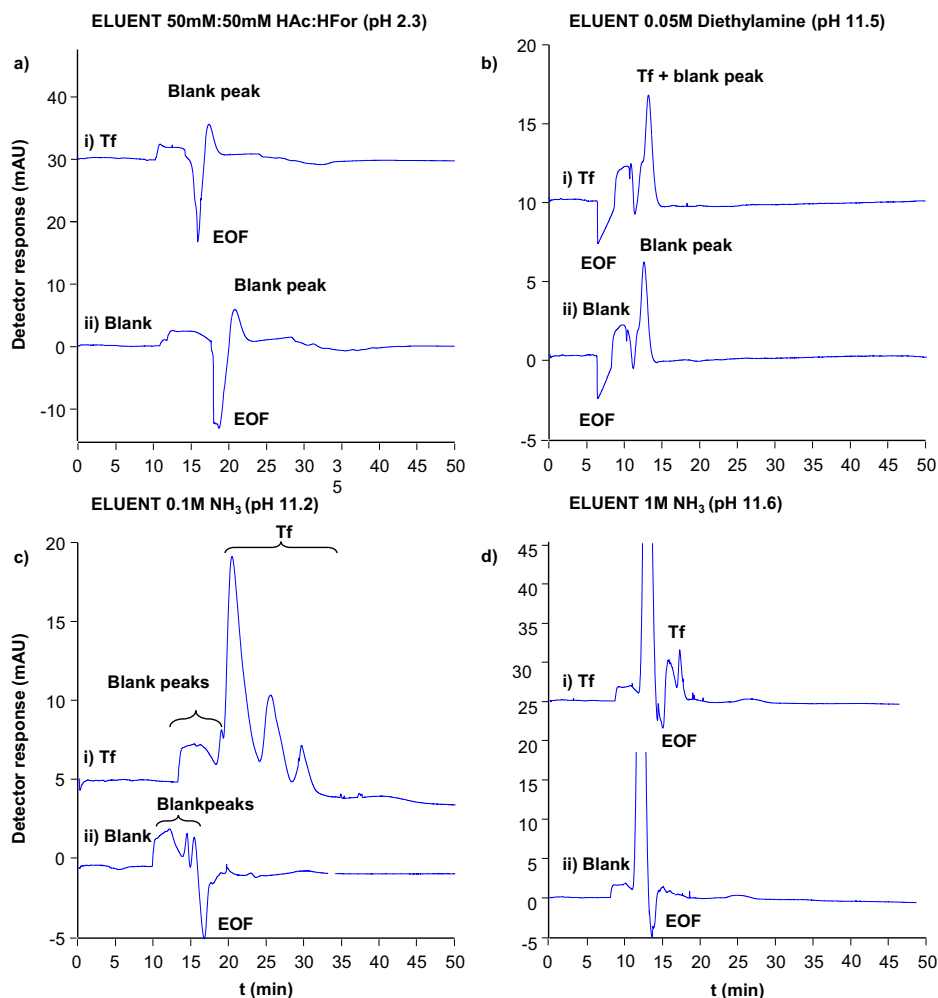


Figure 2. Electropherograms at 200 nm of a $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution of (i) Tf (930 mbar, 10 min) and (ii) a blank by IA-SPE-CE-UV using several elution plugs (50 mbar, 40 s): (a) 50 mM:50 mM HAC:HFor (pH 2.3); (b) 0.05 M diethylamine (pH 11.5); (c) 0.1 M NH_3 (pH 11.2); and (d) 1 M NH_3 (pH 11.6).

No significant differences were obtained with rinsing for 1 min. We also tested other stronger rinsing solutions such as 0.5 M NaCl in BGE with or without 5% (v/v) acetonitrile or methanol (4 min at 930 mbar) followed by a flush with BGE (5 min at 930 mbar) to equilibrate and fill the capillary before electrophoretic separation [7]. However, the results were less reproducible because of the elution of Tf as well to some extent.

The effect of sample loading time at 930 mbar on the peak area of the eluted Tf was studied by injecting an elution plug of 0.1 M ammonia at 50 mbar for 40 and 80 s. Peak area values were calculated by summing the peak areas of the three Tf peaks (Figure 2 c). Figure 3 shows that in both cases, peak areas increased with loading time until approximately 20 min, after which they decreased, probably because of exceeding the breakthrough

volume of the IA sorbent in the microcartridge [37]. Despite a higher signal in 20 min, a single broad peak of Tf was obtained instead of three peaks. Furthermore, sample consumption was too large, which could be a disadvantage for the analyses of certain types of biological samples. Therefore, a sample loading time of 10 min at 930 mbar was selected. Furthermore, an elution plug of 40 s was preferred instead of 80 s because peak areas were higher (Figure 3), probably because of the lower dilution volume of the eluted Tf (approximately 43 nL vs. 85 nL, respectively [34]). To determine LOD, standard Tf solutions of decreasing concentrations were analyzed until no Tf was detected. The lowest concentration giving a signal that was significantly different from the baseline of a blank sample was $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (S/N ratio was higher than 3). This LOD did not improve after a sample loading time of 20 min.

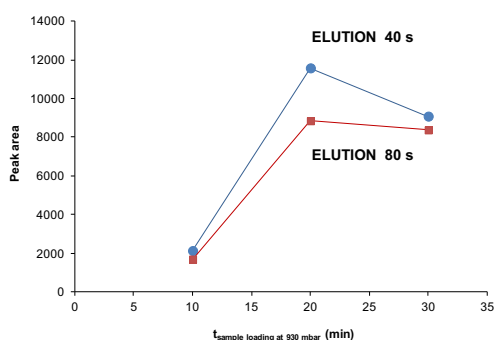


Figure 3. Effect of sample loading time at 930 mbar on peak area of the eluted Tf ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in IA-SPE-CE-UV analysis, eluting with 0.1 M NH_3 at 50 mbar for 40 s (●) and 80 s (■).

3.3. CE-MS and IA-SPE-CE-MS

CE-UV and IA-SPE-CE-UV were evaluated for the analysis of Tf using MS

detection. Volatility of all the solutions was essential for optimum detection sensitivity [7-9]. Furthermore, several precautions were taken to prevent the entrance of NaOH or HN into the mass spectrometer, which hampers efficient and stable spraying, and to minimize salt deposits or contamination at the CE-MS interface or the mass spectrometer. This issue is often overlooked, especially with some physically adsorbed coatings that are claimed to be compatible with on-line MS detection. In many cases, such coatings are not useful over extended periods of time, as they promote a progressive loss in sensitivity and reproducibility due to detector contamination [21]. In our case, those precautions were useful since performance did not decrease over an extended period of analysis. Figure 4 a-b shows the CE-MS electropherograms of a $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution of Tf and a serum sample. In Figure 4 a, Tf appeared as a single electrophoretic peak and the resolution observed with CE-UV (Figure 1 b) was lost due to the lower analysis time conferred by the suction effect generated by the nebulizer gas, as well as the difference in the composition between the acidic hydroorganic sheath liquid and the basic BGE. No improvements in resolution could be achieved by applying a lower separation voltage or decreasing the nebulizer gas pressure. A molecular mass of 79,736 Da was calculated from the multiply-charged cluster ion observed in the mass spectrum. This value agreed with an average molecular mass of the Tf sialoforms that is close to the most abundant sialoform (S4, approximately 79,600 Da [21]).

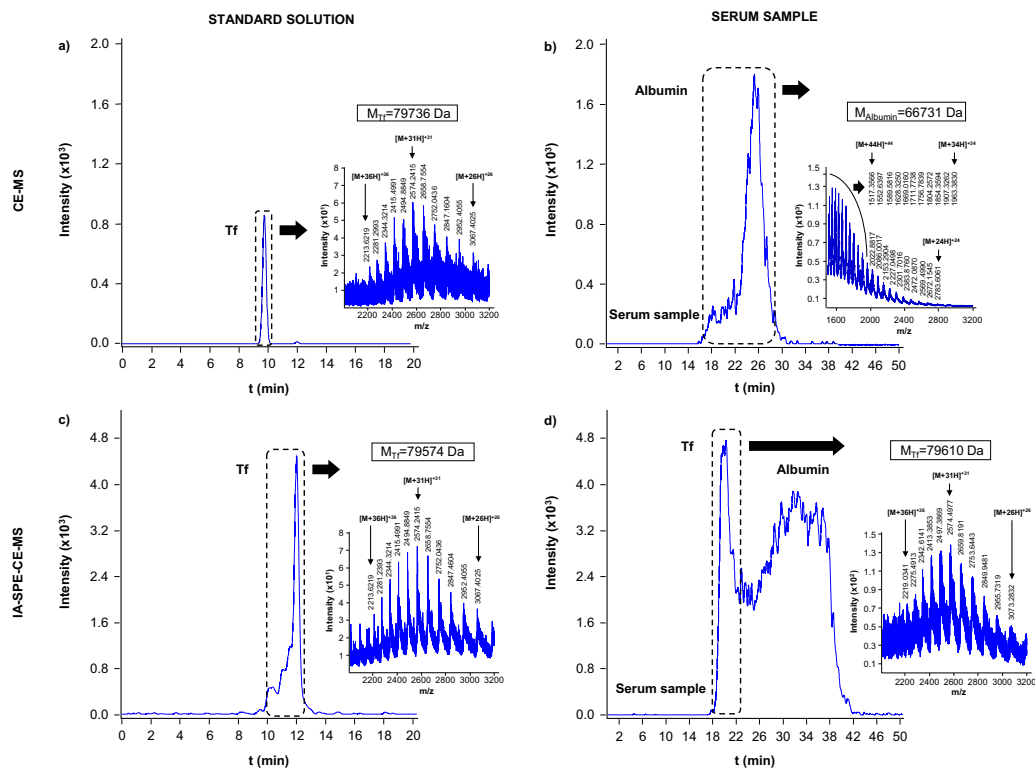


Figure 4. Sum of the extracted ion electropherograms (EIE) of the $[M+30H]^{30+}$, $[M+31H]^{31+}$ and $[M+31H]^{32+}$ ions of the Tf sialoforms (S3-S6). (a) A $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf standard solution examined by CE-MS, (b) a serum sample analyzed by CE-MS, (c) a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Tf standard solution assessed by IA-SPE-CE-MS and (d) a serum sample analyzed by IA-SPE-CE-MS. Mass spectra of the highlighted regions of the electropherograms are shown in the insets.

Despite the excellent mass accuracy and resolution of the TOF analyzer, the extracted ion electropherograms (EIEs) obtained, taking into account the ion m/z values of the different sialoforms (S3-S6), were misleading and showed unexpected sialoform migration order and relative abundances. This could have been due to the poor signal-to-noise ratio of the Tf mass spectra (see Figure 4 a, c and d), as well as certain ion suppression among the different sialoforms (S3-S6) when comigrating as a single electrophoretic peak. With reference to the serum sample, Tf could not be detected because of the main serum components, especially albumin, which could be clearly identified (Figure 4 b).

Figure 4 c-d shows the IA-SPE-CE-MS electropherograms of a $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ standard solution of Tf and a serum sample. As can be observed in Figure 4 c, Tf migrated in a shorter time window here than in that observed with IA-SPE-CE-UV (Figure 2 c) and the resolution was also lost, as explained before for CE-MS. Again, only an average molecular mass close to that of the S4 Tf sialoform was calculated (79,574 Da). Figure 4 d shows the IA-SPE-CE-MS electropherogram of a serum sample. IA-SPE-CE-MS was applied directly to raw serum, serum samples filtered through $0.22 \mu\text{m}$ nylon filters or serum diluted in water (1:3, 1:6 and 1:12 v/v, respectively) [8]. Tf was not detected in any of these samples, but it

was identified in those desalted by centrifugal filtration. From our experience of assessing biological samples, these harsh treatments are usually necessary to prevent saturation, blocking and current breakdowns due to the limited amount of sorbent in the microcartridges [9]. Figure 4 d shows the IA-SPE-CE-MS electropherogram obtained using this sample pretreatment. As can be observed, Tf was detected (79,610 Da) immediately before a broad band corresponding to albumin. Albumin was retained through non-specific interactions with the IA sorbent. Something similar also happens when the IA sorbent is prepared with an antibody against endomorphins [9]. However, in that case, non-specific retention with plasma samples is less important because the protein content in plasma is lower (samples are deproteinized by acetonitrile precipitation followed by centrifugal filtration before IA-SPE-CE-MS). Interferences, such as albumin, due to low antibody selectivity or the presence of residual active groups on the IA sorbent could hinder the interaction between the antibody and Tf. Moreover, coelution of Tf with matrix components could cause poor separation and reduced sensitivity because of ionization suppression. Our attempts to eliminate the retained non-specific matrix components by rinsing with BGE containing 1 M NaCl after sample loading were unsuccessful. Tf could not be detected because it was washed away together with some of the undesired interferences. Furthermore, the results could not be improved by endcapping residual hydrazide groups (that were not interacting with oxidized antibodies) with acetaldehyde or glyceraldehyde [31-33].

4. Concluding remarks

Here, we demonstrate the applicability of silica-based IA sorbents containing intact antibodies for analyzing large biomolecules, such as Tf, by IA-SPE-CE with on-line UV and MS detection. First, we established a novel CE-UV method using physically adsorbed HN coated capillaries compatible with IA-SPE-CE-MS. Separation resolution obtained with CE-UV was lost in CE-MS. To detect Tf in serum samples, an on-line immunoextraction procedure using alkaline elution conditions was optimized using IA-SPE-CE-UV. This allowed the separation of three peaks corresponding to Tf. However, it was not possible to confirm the identity of these different peaks by IA-SPE-CE-MS due to the limited electrophoretic separation resolution with MS detection. Non-specific retention of mainly albumin on the IA sorbent precluded analysis of serum samples. An off-line sample pretreatment based on centrifugal filtration was necessary to detect Tf in such complex samples. Our results could be regarded as a starting point in the IA-SPE-CE-MS analysis of large biomolecules, such as high molecular mass glycoproteins with several glycoforms, in complex biological samples. In this field, improving IA sorbent performance in terms of selectivity, capacity and efficiency due to the limited amount contained in the microcartridges is as important as protein adsorption, glycoform separation or mass spectrometer accuracy, resolution and sensitivity.

Acknowledgments

Silvia Medina acknowledges the

Generalitat de Catalunya for an FI (Formación Investigadora) fellowship. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2011-27130) and the European regional development fund (ERDF) (UNBA08-4E-003).

5. References

- [1] A.C. Moser, D.S. Hage, Capillary electrophoresis-based immunoassays: Principles and quantitative applications, *Electrophoresis* 29 (2008) 3279.
- [2] K.L. Amundsen, H. Sirén, Immunoaffinity CE in clinical analysis of body fluids and tissues, *Electrophoresis* 28 (2007) 99.
- [3] N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips, Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices, *Electrophoresis* 29 (2008) 3259.
- [4] N.A. Guzman, T.M. Phillips, Immunoaffinity capillary electrophoresis: A new versatile tool for determining protein biomarkers in inflammatory processes, *Electrophoresis* 32 (2011) 1565.
- [5] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. Jong, Developments in coupled solid-phase extraction–capillary electrophoresis 2009–2011, *Electrophoresis* 33 (2012) 243.
- [6] F. Benavente, E. Hernández, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Determination of human erythropoietin by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis: a preliminary report, *Anal Bioanal Chem.* 387 (2007) 2633.
- [7] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein digests by immunoaffinity capillary electrophoresis–mass spectrometry, *J. Chrom. A* 1216 (2009) 2574.
- [8] N.A. Guzman, Determination of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in serum and urine by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, *J. Chrom. B* 749 (2000) 197.
- [9] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 134.
- [10] J.E. Shiel, R. Mallik, S. Soman, K.S. Joseph, D.S. Hage, Applications of silica supports in affinity chromatography, *J. Sep. Sci* 29 (2006) 719.
- [11] M. Nisnevitch, M.A. Firer, The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 467.
- [12] J. Turková, Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function, *J Chrom. B* 722 (1999) 11.
- [13] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek, *Immunology*, Elsevier (2006).
- [14] A. Taga, R. Maruyama, Y. Yamamoto, S. Honda, Observation of interactions of human serum components with transferrin by affinity capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biom. Anal.* 46 (2008) 395.
- [15] H.X. Chen, J.M. Busnel, G. Peltre, X.X. Zhang, H.H. Girault, Magnetic Beads Based Immunoaffinity Capillary Electrophoresis of Total Serum IgE with Laser-Induced Fluorescence Detection, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9583.
- [16] N. Gasilova, A.L. Gassner, H.H. Girault, Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS, *Electrophoresis* 33 (2012) 2390.
- [17] J.P. Pascali, F. Bortolotti, D. Sorio, M. Ivanova, T.M. Palmbach, F. Tagliaro, Improved capillary electrophoresis determination of carbohydrate-deficient transferrin including on-line immunosubtraction, *Med. Sci. Law.* 51 (2011) 26.
- [18] R. Haselberg, G. J. de Jong, G.W. Somsen, CE-MS for the analysis of intact proteins 2010–2012, *Electrophoresis* 34 (2013) 99.
- [19] C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhrer, G.W.

- Somsen, Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis–mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 396 (2010) 297.
- [20] A. Elhamili, M. Wetterhall, B. Arvidsson, R. Sebastiano, P.G. Righetti, J. Bergquist, Rapid capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry separations of peptides and proteins using a monoquaternarized piperazine compound (M7C4I) for capillary coatings, *Electrophoresis* 29 (2008) 1619.
- [21] E. Giménez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis–electrospray ion trap mass spectrometry, *Electrophoresis* 29 (2008) 2161.
- [22] V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, C. Neuss, J. Barbosa, Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS, *Electrophoresis* 28 (2007) 1949.
- [23] V. Sanz-Nebot, P. González, I. Toro, A. Ribes, J. Barbosa, Characterization of human transferrin glycoforms by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 798 (2003) 1.
- [24] J. Joneli, U. Wanzenried, J. Schiess, C. Lanz, J. Caslavská, W. Thormann, Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum by capillary zone electrophoresis: Evaluation of assay performance and quality assurance over a ten-year period in the routine arena, *Electrophoresis* (2013) accepted.
- [25] R. Jabeen, D. Payne, J. Wiktorowicz, A. Mohammad, J. Petersen, Capillary electrophoresis and the clinical Laboratory, *Electrophoresis* 27 (2006) 2416.
- [26] C. Lanz, J.B. Falmagne, F. de l'Escaille, U. Marti, W.J. Thormann, Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum with capillary zone electrophoresis Sample preparation strategies for the removal of interferences caused by increased levels of immunoglobulins, *J. Chromatogr. A* 1206 (2008) 33.
- [27] B. Wuyts, J.R. Delanghe, The Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin, Marker of Chronic Alcoholism, Using Capillary Electrophoresis, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (2003) 739.
- [28] C. Lanz, M. Kuhn, F. Bortolotti, F. Tagliaro, W. Thormann, Evaluation and optimization of capillary zone electrophoresis with different dynamic capillary coatings for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum, *J Chromatogr A* 979 (2002) 43.
- [29] W.W.P. Chang, C. Hobson, D.C. Bomberger, L.V. Schneider, Rapid separation of protein isoforms by capillary zone electrophoresis with new dynamic coatings, *Am. Lab.* 37 (2005) 25.
- [30] M. Pattky, C. Huhn, Advantages and limitations of a new cationic coating inducing a slow electroosmotic flow for CE-MS peptide analysis: a comparative study with commercial coatings, *Anal Bioanal Chem* 405 (2013) 225.
- [31] F. Ruhn Peggy, S. Garver, D.S. Hage, Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography, *J. Chrom. A* 669 (1994) 9.
- [32] D.S. Hage, Periodate oxidation of antibodies for site-selective immobilization in immunoaffinity chromatography, *Methods in Molecular Biology* 147 (2000) 69.
- [33] H. Xuan, D.S. Hage, Immobilization of a 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug–protein binding, *Anal. Biochem.* 346 (2005) 300.
- [34] D. Heiger, High Performance Capillary Electrophoresis. An Introduction, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany (2000) 83.
- [35] D.S. Hage, Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition (Chromatographic Science Series) Taylor & Francis (2006) p. 143.
- [36] N. Ibarra, A. Caballero, E. Gonzalez, R. Valdes, Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen, *J. Chromatogr. B* 735 (1999) 271.
- [37] M. Petersson, K.G. Wahlund, S.J. Nilsson, Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 841 (1999) 249.

Analytica Chimica Acta 789 (2013) 91–99



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Preparation and evaluation of an immunoaffinity sorbent with Fab' antibody fragments for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry



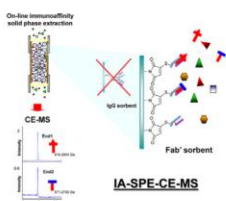
Silvia Medina-Casanellas, Fernando Benavente*, José Barbosa, Victoria Sanz-Nebot

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- We prepared an IA sorbent with antibody fragments for the analysis of opioid peptides by IA-SPE-CE-MS.
- We followed a site-specific antibody immobilization approach.
- The main features of the IA sorbent were studied.
- Endomorphins 1 and 2 were analyzed in standards and plasma samples to achieve the best LODs.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2013
Received in revised form 13 June 2013
Accepted 19 June 2013
Available online 26 June 2013

Keywords:

Antibody fragment
Capillary electrophoresis
Immunoaffinity
Mass spectrometry
Neuropeptide
On-line preconcentration

ABSTRACT

An immunoaffinity (IA) sorbent with antibody fragments was prepared for the analysis of opioid peptides by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis–mass spectrometry (IA-SPE-CE-MS). The antibody fragmentation was evaluated by MALDI-TOF-MS. Fab' fragments obtained from a polyclonal IgG antibody against Endomorphins 1 and 2 (End1 and End2) were covalently attached to succinimidyl silica particles to prepare the IA sorbent. An IA-SPE-CE-MS methodology was established analyzing standard solutions of End1 and End2 and acceptable repeatability, linearity ranges and LODs (0.5 and 5 ng mL⁻¹, respectively) were obtained. The LOD of End1 was slightly better than that previously obtained using an IA sorbent with intact antibodies (1 ng mL⁻¹). In human plasma samples, End1 and End2 could be detected at 1 and 50 ng mL⁻¹, respectively, which meant an improvement of 100 and 2-fold with regard to the LODs using an IA sorbent with intact antibodies (100 ng mL⁻¹).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

During decades, several innovations have been reckoned in order to improve CE selectivity, sensitivity and applicability [1–9], which have given rise to various techniques, such as CE-MS and immunoaffinity capillary electrophoresis (IACE). The benefits of CE-MS for the analysis of peptides and proteins are

world-renowned [1–9]. IACE combines the resolving power of the electrophoretic separation with the sensitivity and specificity of immunoassays so that it can be extremely useful for enrichment and clean-up of low abundant components from complex matrices (e.g. peptides in biological fluids) [10–14]. Among the numerous IACE formats, which mainly differ in the set-up to establish the antigen–antibody interaction before the electrophoretic separation [10–14], it is worth highlighting the relevance of on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis (IA-SPE-CE) [12–14]. IA-SPE-CE is a variant of on-line solid-phase extraction capillary electrophoresis (SPE-CE) based on the

* Corresponding author. Tel.: +34 934033702; fax: +34 934021233.
E-mail addresses: fbenavente@ub.edu, fbenavente75@gmail.com (F. Benavente).

immobilization of antibodies or antibody fragments onto the inner wall or an appropriate solid support as a small binding area integrated usually near the inlet of the separation capillary or the channels of a microchip [12–14]. One of the typical configurations consists in the insertion of an extraction microcartridge or analyte concentrator, which contains the IA sorbent that retains the antigenic analyte, enabling the introduction of large volumes of sample. The retained analyte is later eluted in a small volume of an appropriate solution, resulting in sample clean-up and concentration enhancement [13–18].

Unlike the typical chromatographic sorbents used in SPE [18–20], IA sorbents are highly appreciated because of their prominent selectivity and extraction efficiency when the immunoreactivity of the antibody and the active surface area on the IA sorbent are optimum. However, IA sorbents with the most appropriate features for IA-SPE-CE are not commercially available [11,12,21–28]. Between the wide variety of preparation methods that have been described, the covalent immobilization methods are the most popular to attach intact antibodies or their fragments onto different surfaces [22–28]. In general, first it is necessary to activate the solid support, the antibody or the fragments obtained after digestion [29–31], in order to generate the desired reactive groups so that the immobilization takes place through a specific region. Orientation of the antibodies or antibody fragments on the solid support is of great concern because the performance of the IA sorbent depends on the availability of the binding sites for antigen–antibody interaction [12,26,27]. In addition, the analysis conditions have to be carefully controlled because extreme ionic strengths, temperatures and acidic or alkaline pH values could affect the antigen–antibody interaction or could cause antibody denaturation [12,28]. The coupled antibody is usually an immunoglobulin G (IgG) because in general presents higher affinity for the antigen than other immunoglobulin classes [31]. The use of IgG fragments to prepare IA sorbents for IA-SPE-CE has been described by several authors [12,28]. However, there is no scientific evidence that points out that the use of antibody fragments over intact antibodies, and vice versa, provides improved results in IA-SPE-CE [25].

Laser-induced fluorescence detection has been commonly applied in IA-SPE-CE for the analysis of low molecular mass immunoreactive compounds in biological fluids and tissues [32–36]. In contrast, on-line MS detection has been explored little due to the difficulties of making it compatible with the requirements of IA-SPE-CE [16,37,38]. IA-SPE-CE-MS requires the use of volatile solutions in order to prevent salt build-up in the mass spectrometer. Furthermore, the use of extreme rinsing solutions and acidic BGE could cause the denaturation of the antibodies and antibody fragments of the IA sorbents, as well as analyte elution [12,28]. In a previous work, we demonstrated that the LODs for the CE-MS analysis of standard solutions of End1 and End2, which are opioid peptides related to nociception [39–41], could be improved 10-fold, until detecting 1 ng mL^{-1} by IA-SPE-CE-MS using an IA sorbent containing an intact IgG covalently attached to a solid support through the carbohydrates of the Fc region. However, in human plasma samples both peptides could be only detected down to 100 ng mL^{-1} [38]. As an alternative, the present article describes the preparation of an IA sorbent following the maleimide method (Fig. 1), based on the covalent immobilization of Fab' fragments from the same IgG to succinimidyl silica particles [16,23,24,32–36]. The maleimide method was originally described to couple proteins and peptides to several materials such as quartz disks, polymers and sepharose [24] and it has been used to prepare IA sorbents in the last decade [16,23,24,32–36]. Following this immobilization method, the antigen binding sites of the Fab' fragments are also supposed to be appropriately oriented at the opposite end of their attachment onto the solid support, facilitating the capture of the target analytes. The potential of the IA sorbent for the analysis by

IA-SPE-CE-MS of End1 and End2 at the extremely low concentrations that are usually found in body fluids has been evaluated with standards and plasma samples [39–41].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All the chemicals used in the preparation of buffers and solutions were analytical reagent grade. Acetonitrile, methanol, propan-2-ol, boric acid (99.8%), formic acid (HFor, 98–100%), acetic acid glacial (HAc), trifluoroacetic acid (TFA, 99%), ammonia (25%), sodium hydroxide (98–100%), sodium borate (98%), ammonium acetate (99%) and potassium dihydrogen phosphate anhydride (99.5%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Acetic anhydride (99.0%), sinapinic acid (99.0%), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt 2-hydrate (EDTA, 99–101%), sodium azide (99.5%), diethyl ether (99.7%), pyridine (99.8%), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, 99%), 2-mercaptoethylamine-HCl (2-MEA, 98%) and polyethylene glycol (8000 Da, 50%) were provided by Sigma (St. Louis, MO, USA). ImmunoPure Fab' micro preparation kit (Fab' kit), dithiothreitol (DTT) and sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SSMCC) were supplied by Fisher Scientific (Madrid, Spain). Water with specific electric conductivity lower than $0.05 \mu\text{S cm}^{-1}$ was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

End1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂, 610.2904 Da), End2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂, 571.2795) and the polyclonal IgG fraction from rabbit serum (95%) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The rabbit polyclonal IgG against End1 and End2 (immunogen affinity purified) was provided by Gene Tex (Irvine, CA, USA). Sep-Pak Classic NH₂ cartridges (55–105 μm particle diameters, 125 Å (1 Å = 0.1 nm) pore size, 970 μmol of NH₂ per gram of particle) were provided by Waters (Milford, MA, USA).

2.2. Standard solutions, electrolytes, sheath liquid

An aqueous stock standard solution (2500 mg L^{-1}) of each peptide was prepared and stored in a freezer at -20°C when not in use. Diluted standard peptide mixtures of End1 and End2 were used for the analysis, as well as to spike human plasma samples. The 100 mM phosphate buffer solution (PBS) for the generation of IgG fragments was part of the Fab' kit. The 50 mM borate buffer solution for the preparation of the IA sorbent was adjusted to pH 7.6 with boric acid. A phosphate buffer solution for the storage of the IA sorbent was prepared from 100 mM of potassium dihydrogen phosphate and pH was adjusted to pH 7.4 with NaOH (1 M). The background electrolyte (BGE) for CE-MS and IA-SPE-CE-MS was a solution of 20 mM of ammonium acetate adjusted to pH 7.00 with ammonia. The buffer and BGE concentrations are referred to the final solution and the pH value was adjusted before making up solution to the final volume and then measured again. The BGE was passed through a 0.45 μm nylon filter (MSI, Westboro, MA, USA) before the analysis. The sheath liquid solution consisted of a hydroorganic mixture of 60:40 (v/v) propan-2-ol:water, with 0.05% (v/v) of HFor and was degassed for 15 min by sonication before use. All solutions were stored at 4°C when not in use.

2.3. Human plasma and sample preparation

Human plasma samples from healthy blood donors were kindly supplied by the *Banc de Sang i Teixits* (Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona). Venous blood was collected in standard clinical vials and placed on ice. Plasma was separated from the blood cells, pooled, placed into polyethylene tubes and frozen at -20°C .

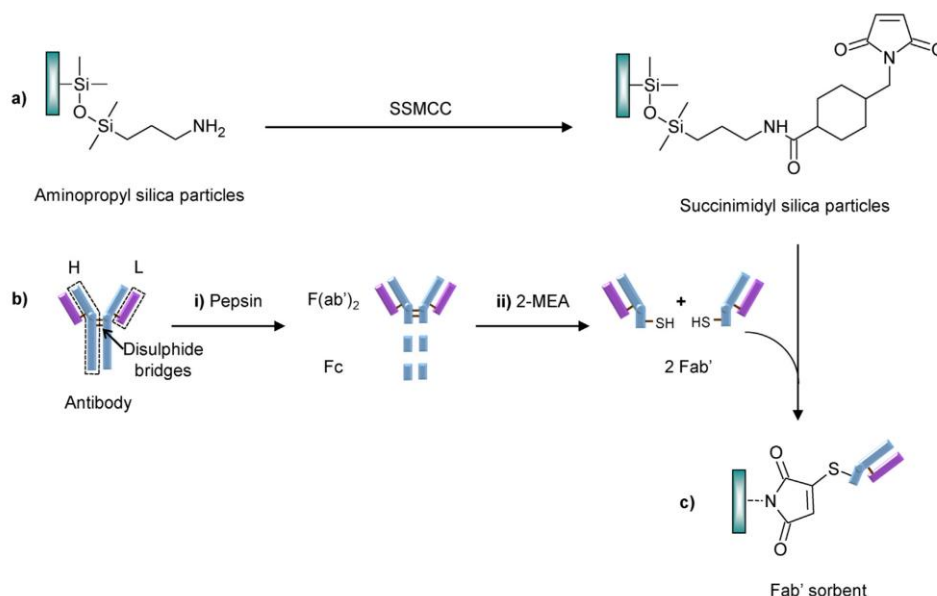


Fig. 1. Preparation procedure of the Fab' IA sorbent: (a) derivatization of aminopropyl silica particles to succinimidyl silica particles by sulfo succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SSMCC), (b) generation of F(ab')₂ fragments from IgG by digestion with pepsin (i) followed by reduction with 2-mercaptoethylamine (2-MEA) (ii) and (c) immobilization of Fab' to the activated silica particles. Heavy and light chains (H and L, respectively) and disulphide bridges of the intact IgG are indicated in Fig. 1b.

Different aliquots of the frozen plasma were thawed at room temperature. The plasma samples were pooled, spiked with different concentrations of peptides, if necessary, and pretreated off-line, in order to eliminate salts and high molecular mass compounds (e.g. proteins) before IA-SPE-CE-MS. The sample pretreatment is described in detail elsewhere and consisted of precipitation with acetonitrile followed by filtration using Amicon centrifugal filters of 10 kDa cut-off cellulose acetate membrane (YM-10) (Millipore, Billerica, MA, USA) [19,20,42]. It is worth mentioning that it was necessary to passivate the centrifugal filters with an aqueous solution of 5% (v/v) of PEG to avoid peptide loss through adsorption [42].

2.4. Apparatus and procedures

pH measurements were performed with a Crison 2002 potentiometer (Crison Instruments, Barcelona, Spain) and a ROSS electrode 8102 (Orion Research, Boston, MA, USA). Centrifugation at room and controlled temperature was carried out in a Mikro 20 centrifuge and in a cooled Rotanta 460 centrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttingen, Germany), respectively. Incubations were carried out in a TS-100 thermoshaker with a SC-18 tubes adapter (Biosan, Riga, Latvian Republic).

CE experiments were performed in an HP^{3D} CE system coupled with an orthogonal G1603A sheath-flow interface to a 6220 orthogonal accelerated TOF (oa-TOF) LC/MS mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The sheath liquid was delivered at a flow rate of 3.3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ by a KD Scientific 100 series infusion pump (Holliston, MA, USA). The oa-TOF mass spectrometer was operated in positive mode with the parameters established in a previous work [38]. Internal mass recalibration was satisfactory enabling correction with the single molecular ions of phthalic anhydride and diisooctyl phthalate (i.e. 149.0233 and 391.2843,

respectively), which were commonly found in the background mass spectra [38].

MALDI mass spectra were obtained using a 4800 MALDI TOF/TOF Analyzer from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) equipped with a nitrogen laser (355 nm). Laser intensities ranging from 60% to 75% of the maximum were used. External calibration was performed with the singly and doubly charged ions from bovine serum albumin (BSA). Mass spectra were acquired over a mass range of 20,000–175,000 Da using the linear high mass positive mode with a uniformly random spot search pattern (600 laser shots/spectrum). Focus molecular mass values were 150,000, 110,000 and 50,000 Da because these values were around the theoretical molecular mass of intact IgG, F(ab')₂, Fab' and Fc fragments, respectively [43,44]. Data acquisition and data processing were performed using the 4000 Series Explorer™ and Data Explorer® softwares (Applied Biosystems). MALDI matrix was prepared daily dissolving sinapinic acid in 50:50 acetonitrile:water, with 0.1% (v/v) of TFA at a concentration of 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sample-matrix solutions were prepared by mixing 2 μL of sample and 2 μL of matrix solution. Sample-matrix spots were obtained applying the dried-droplet method (i.e. 1 μL of sample-matrix solution was deposited onto the stainless steel MALDI plate and allowed to evaporate to dryness in air) [44,45].

2.4.1. Preparation of the IA sorbent

The preparation of the IA sorbent consisted in the derivatization of commercial aminopropyl silica particles with succinimidyl groups and the fragmentation of the IgG so as to covalently attach the Fab' antibody fragments to the succinimidyl solid support through the sulphhydryl groups of the Fab' fragments (Fig. 1) [16,23,24,32–36].

2.4.1.1. Derivatization of aminopropyl silica. The first step of the preparation procedure was the derivatization of

aminopropyl silica particles to obtain the activated succinimidyl silica particles by reaction with SSMCC (Fig. 1a) [16,23,24,32–36]. 0.01 g of aminopropyl silica particles were washed with water twice and were suspended in 1200 μL of a solution of 3.5 mg mL^{-1} of SSMCC in 50 mM sodium borate buffer (pH 7.6). SSMCC hydrolyzes easily and SSMCC solution was prepared and immediately used [24]. The mixture was moderately shaken for 1 h at 30 °C. The resulting activated succinimidyl silica particles were washed with 50 mM borate buffer twice. The particles were separated after each washing by centrifugation (2 min and 4000 \times g). They were stored in 250 μL of borate buffer at 4 °C.

In order to prepare a sorbent for testing end-capping of the unreacted aminopropyl groups, 250 μL of a mixture of 1:1 (v/v) acetic anhydride:pyridine containing 6 mg of DMAP were added to the activated succinimidyl silica particles (the storage borate buffer was removed first) and the mixture was shaken 24 h. The end-capped silica particles were washed with acetonitrile and diethyl ether, dried under vacuum and washed with potassium dihydrogen phosphate buffer [24].

2.4.1.2. Fragmentation of IgG. F(ab')₂ from IgG were generated and purified using the Fab' kit according to the manufacturer's instructions (Fig. 1b-i). 125 μL of a 200 mg mL^{-1} IgG solution were digested using immobilized pepsin [29–31] and the F(ab')₂ fragments were purified with an immobilized Protein A spin column [25–27]. Then, the solvent of the obtained F(ab')₂ solution was changed to 100 mM of PBS containing 1 mM of EDTA by filtration using Amicon centrifugal filters (YM-50, 50 kDa cut-off cellulose acetate membranes, Millipore). Under optimum conditions, the Fab' from F(ab')₂ were generated using 2-MEA (Fig. 1b-ii) [29–31]. The 125 μL of F(ab')₂ solution were mixed with the same volume of a 100 mM 2-MEA solution, both prepared in 100 mM of PBS containing 1 mM of EDTA. The reaction mixture was smoothly shaken for 30 min at 37 °C. Fab' fragments were separated by filtration at 25 °C using Amicon centrifugal filters (YM-30, 30 kDa cut-off cellulose acetate membranes, Millipore). The filters were washed with water (10 min at 16,000 \times g) before filtering the Fab' solution (5 min at 10,000 \times g). The Fab' retentate was washed with 50 mM borate buffer (pH 7.6) three times (3–5 min at 10,000 \times g). The purified Fab' retentate was recovered from the reservoir by centrifugation upside down into a new vial (2 min at 1000 \times g) and borate buffer was added until the final volume was adjusted to 125 μL . The fragmentation procedure was monitored by MALDI-TOF-MS [45].

2.4.1.3. Coupling of Fab' fragments. The last step of the preparation procedure was the covalent binding to the activated succinimidyl silica particles of the Fab' fragments through the sulfhydryl groups (Fig. 1c) [16,23,24,32–36]. 125 μL of the Fab' solution and 0.01 g of activated silica particles were combined and allowed to react with constant stirring for 24 h at 4 °C. After the immobilization reaction, the IA sorbent was washed three times with 200 μL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4). The IA sorbent was separated after each washing by centrifugation (3 min, 1000 \times g and 25 °C). Finally, it was stored in 250 μL of 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) at 4 °C. For storage periods longer than 1 month, the phosphate buffer also contained 0.1% (w/v) of sodium azide [28].

2.4.2. IA-SPE-CE-MS

The construction of the IA-SPE microcartridge or analyte concentrator was carried out as described elsewhere [15,19,20]. The separation capillary for IA-SPE-CE-MS was a 72 cm $L_T \times 75 \mu\text{m}$ id \times 360 μm od fused-silica capillary supplied by Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA), which was activated previously (see below). The microcartridge (7 mm $L_T \times 250 \mu\text{m}$ id \times 360 μm od, fused-silica capillary, Polymicro Technologies) was inserted at 7.5 cm from the inlet of the separation capillary using two plastic

sleeves. Previously, it was filled with the IA sorbent (approximately 0.01 g of IA sorbent) that was retained between two frits (0.1 cm) obtained from the material of the original frits found in the Sep-Pak Classic NH₂ cartridges.

All capillary flushes were performed at 930 mbar. New capillaries were activated by flushing for 20 min with aqueous 1 M NaOH, followed by 20 min with water and 15 min with BGE. These washings were performed offline in order to avoid the unnecessary entrance of NaOH into the mass spectrometer. The IA-SPE-CE columns were first conditioned by a flush of BGE for 3 min. Standard mixtures and spiked or blank plasma samples were then introduced at 930 mbar for 15 min (approximately 90 μL using the Hagen–Poiseuille equation [3]). A final rinse with the neutral BGE (15 min at 50 mbar) eliminated non-retained molecules and equilibrated the capillary before the elution and the electrophoretic separation. Retained peptides were eluted by injecting a solution of 50 mM HAc and 50 mM HFor (pH 2.3) at 50 mbar for 20 s (approximately 107 nL [3]). Separation was carried out at 25 °C by applying a voltage of 18 kV (normal polarity). Between runs, the capillary was flushed for 2 min with the elution solution and 2 min with BGE, in order to avoid carry-over between consecutive analyses. All the IA-SPE-CE columns were filled with water when they were stored overnight to avoid salt crystallization.

The quality parameters were calculated from data obtained by measuring peak area and migration time from an extracted ion electropherogram (XIE) of each peptide. Studies of repeatability (intraday, $n=8$ with one column) and reproducibility (interday, $n=16$ in two days and with a new column each day) were performed by analyzing a mixture of End1 and End2 at a concentration of 10 ng mL^{-1} . These parameters were calculated as a percentage of the RSD (% RSD) of peak area and migration time. The limits of detection (LOD) for each peptide were obtained by analyzing low-concentration samples. Standard or spiked plasma samples of decreasing concentrations were prepared and analyzed until no peptides were detected. In each case, the lowest concentration that gave a signal significantly different from the baseline of a blank sample was considered as the LOD (S/N ratio was always higher than 3). The linearity ranges were determined by injecting in duplicate standard mixtures of End1 and End2 at four different concentrations ranging from 0.5 to 100 ng mL^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the IA sorbent

In this paper, we evaluated the “maleimide method” to immobilize Fab' IgG fragments through their sulfhydryl groups as an alternative to the “hydrazide method” used in a previous work that couples the IgG through the carbohydrates of the Fc region [38]. In both methods, the attachment of the IgG or Fab' fragments to the solid support was remote to the antigen–antibody binding site, and hence facilitated the target analyte capture [12,26,27]. Silica particles were preferred as solid support because they fulfill most of the desired requirements to avoid flow restriction, bubble formation and current instability or breakdowns during the electrophoretic separation in SPE-CE [16,19,20,22]. As no activated succinimidyl silica particles were commercially available, the first step of the preparation procedure was the activation of aminopropyl silica particles originally found in Sep-Pak Classic NH₂ cartridges to obtain succinimidyl silica particles (Fig. 1a) [16,23,24,32–36]. The aminopropyl silica particles contained a considerable amount of aminopropyl groups (i.e. 970 μmol of NH₂ per gram of particle) and pore size and particle diameter (i.e. 125 Å and 55–105 μm , respectively) were similar to the values of the silica particles used in our previous works for the analysis of opioid peptides by

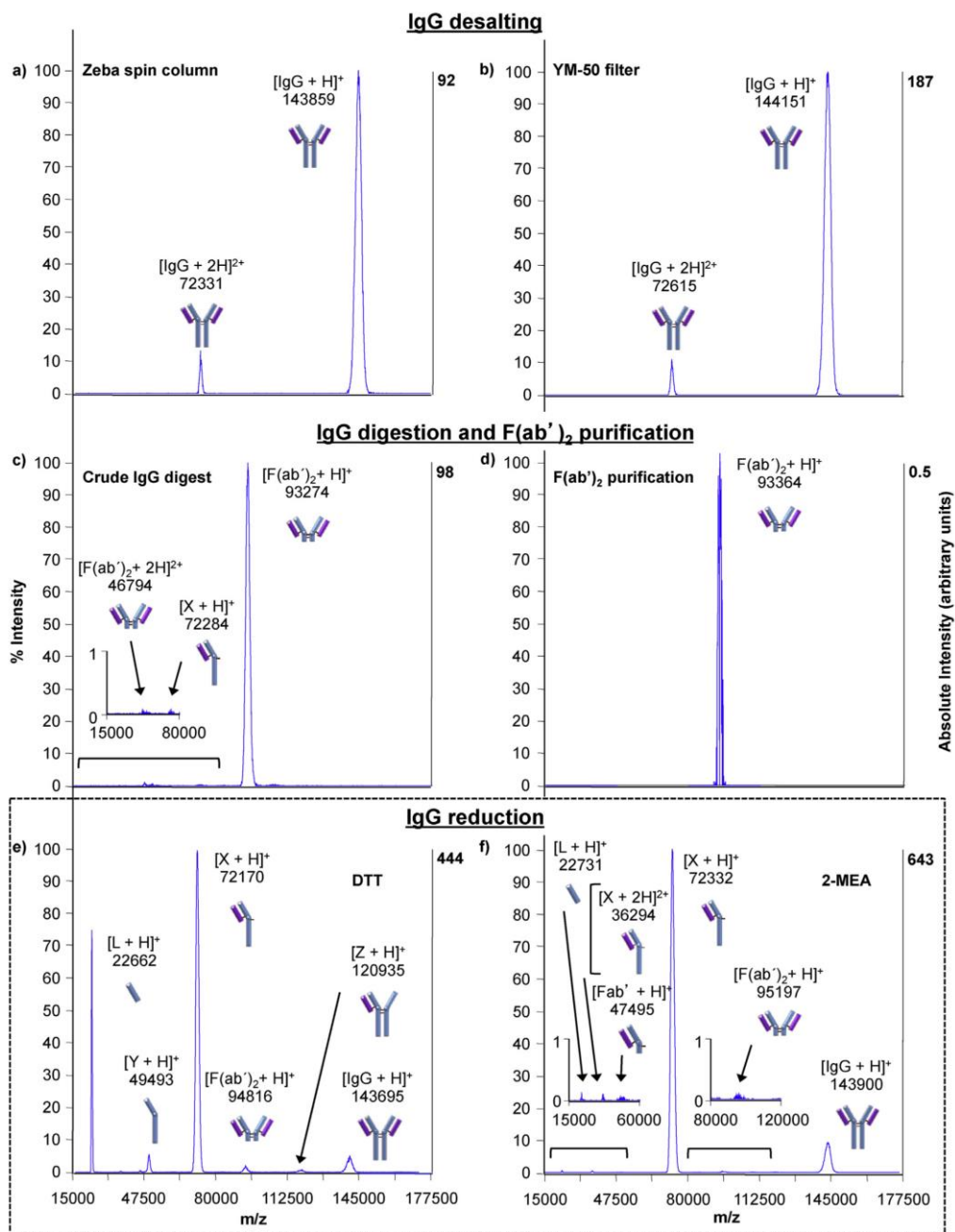


Fig. 2. MALDI-TOF-MS mass spectra of: (a and b) the polyclonal IgG fraction from rabbit serum desalted with a Zeba desalt spin column and a YM-50 filter, respectively, (c) IgG digests obtained with an immobilized pepsin column, (d) IgG pepsin digests purified with a protein A column and (e-f) purified intact IgG reduced with 10 mM of DTT and 100 mM of 2-MEA, respectively.

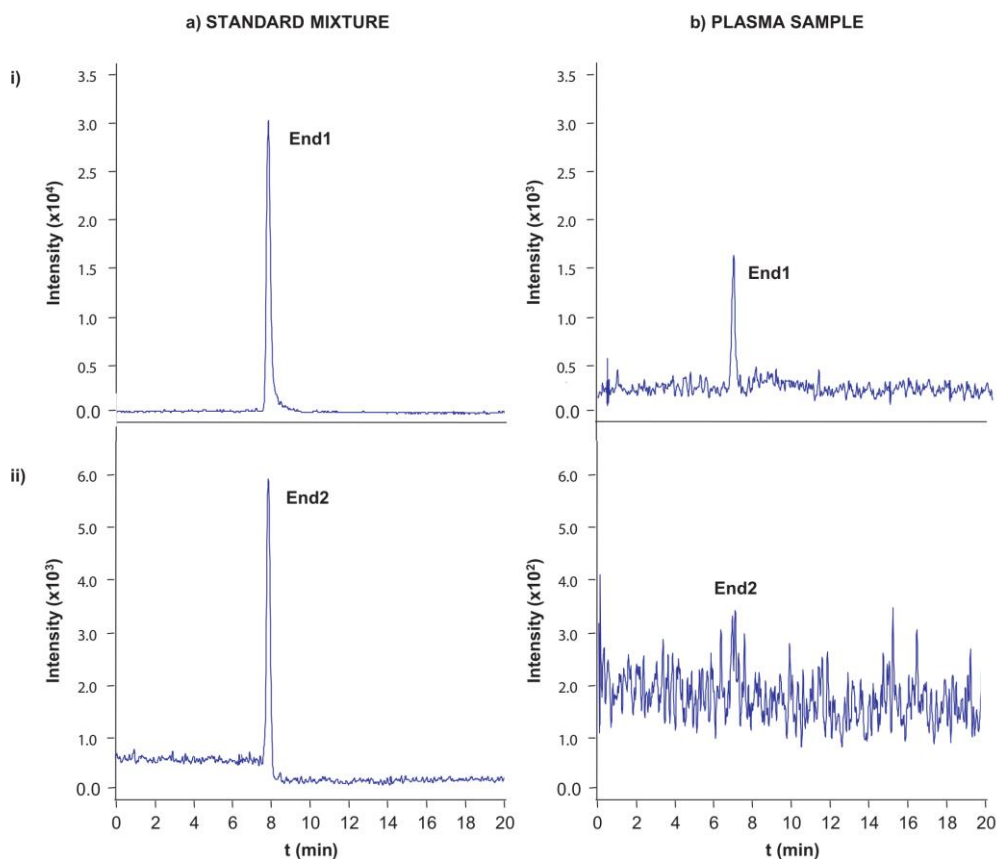


Fig. 3. Extracted ion electropherograms (XIEs) by IA-SPE-CE-MS of (i) End1 and (ii) End2 for (a) standard mixtures at 10 ng mL⁻¹ and 50 ng mL⁻¹ and (b) plasma samples spiked with 10 ng mL⁻¹ and 50 ng mL⁻¹, respectively.

C₁₈-SPE-CE-MS and IA-SPE-CE-MS [19,20,38]. According to Clarke et al. [25], a pore size value of 125 Å was very suitable for the immobilization of Fab' fragments because the maximum loading capacity of a support is supposed to be roughly achieved when the pore size is two-to-three times the diameter of the IgG or Fab' fragments (i.e. between 80–100 and 40–50 Å, respectively).

The reactions of aminopropyl silica particles with SSMCC (Fig. 1a) were carried out at pH 7.6 and 30 °C at two reaction times (1 and 5 h) shaking at various stirring speeds (gently or moderately) in a thermoshaker. Then, the different sorbents were tested for the analyses of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS. While no differences in peak areas were observed changing the reaction time and consequently the shortest reaction time was selected, a moderate shaking was mandatory for activation. Mallik et al. recommended the end-capping of unreacted aminopropyl groups with acetic anhydride to produce acetamide groups in order to prevent non-specific binding [24]. However, in our case, end-capping was discarded after running some experiments by SPE-CE-MS, using three sorbents that did not contain Fab' fragments. Thus, while End1 was not detected by SPE-CE-MS in plasma samples spiked with 10 ng mL⁻¹ of peptide using raw aminopropyl or activated succinimidyl silica particles as sorbents, the

peptide was detected using the end-capped succinimidyl silica particles.

The typical approach to fragment the IgG before the immobilization is the generation of F(ab')₂ fragments with pepsin [29–31], purification using a protein A column [25,27] and the subsequent reduction to Fab' fragments with a disulphide reducing reagent [16,23,24,32–36] (Fig. 1b). A concentrated solution of an IgG fraction from rabbit serum (1500 µg mL⁻¹), which was cheaper than the purified IgG against End1 and End2, was used to study the different steps of the procedure by MALDI-TOF-MS (Fig. 2). First, salt compounds were discarded using Zeba desalt spin columns of the Fab' kit, which provided similar results to YM-50 filters (Fig. 2a and b, respectively). Then, the IgG was digested using an immobilized pepsin column providing mainly F(ab')₂ fragments and traces of other fragment (X) (Fig. 2c) [29–31]. The major advantage of using immobilized pepsin instead of an enzyme solution was that digestion could be immediately stopped by separating the resin from the resulting solution, avoiding overdigestion [30]. The crude digest was purified using an immobilized protein A spin column, which only bound Fc fragments and undigested IgG (Fig. 2d) [25,27]. The main factor influencing F(ab')₂ recovery was the way of mixing and the incubation time. Incubation was performed with

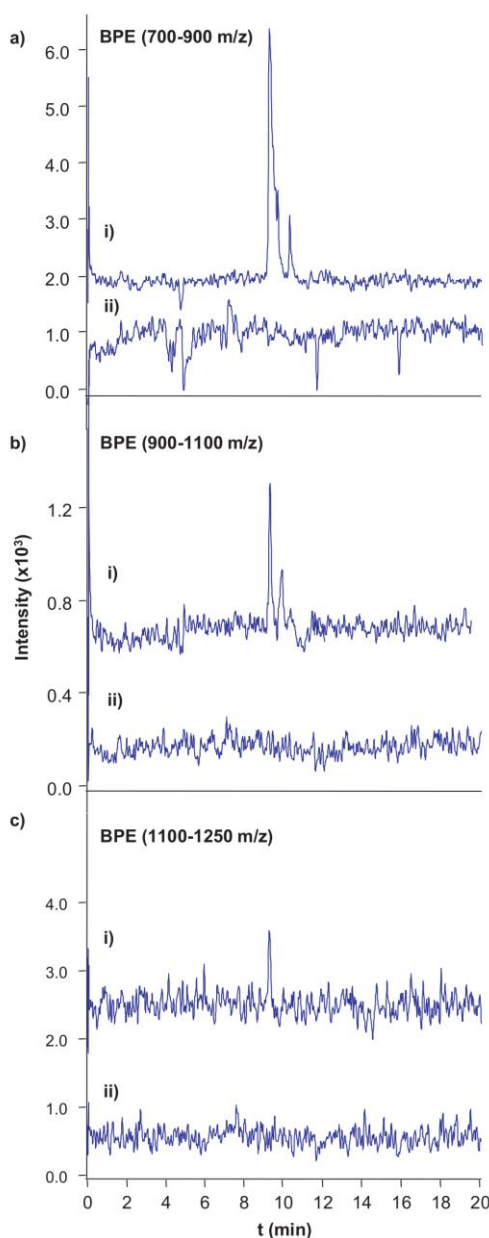


Fig. 4. Base peak electropherograms (BPEs) by IA-SPE-CE-MS between (a) 700–900 m/z , (b) 900–1100 m/z and (c) 1100–1250 m/z for a blank plasma sample using an IA sorbent containing (i) IgG [38] and (ii) Fab' fragments.

end-over-end mixing for 10 min, because no peaks were detected with vortex mixing, even at incubation times longer than 10 min. Although recovery of $F(ab')_2$ was limited (compare the absolute intensity of the y-axis (top right) of Fig. 2c and d, 98 and 0.5 in arbitrary units, respectively), it was more desirable to reduce the purified $F(ab')_2$ fragments to Fab' than the crude $F(ab')_2$ mixture which contained undesired antibody fragments. The most common reducing reagents are DTT [29] and 2-MEA [30,31] and less frequently, tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride (TCEP) [33]. Because of simplicity of operation and low costs, the specificity of DTT and 2-MEA was evaluated with a $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ solution of intact IgG instead of purified $F(ab')_2$ fragments. As shown in Fig. 2e and f, after intact IgG reduction the main peak in both cases was the single charged molecular ion of the partially cleaved heavy-light chain fragment (X, approximately 72 kDa), which was more abundant using 2-MEA (compare the y-axis of Fig. 2d and f). The presence of this fragment demonstrated that the disulphide cleavage was satisfactory using both reducing reagents. However, in case of DTT the detection of a significant amount of the single charged molecular ion of the free light chain (L, approximately 24 kDa) and other by-products indicated also undesired reduction of the disulphide bridges between the heavy and light chains (H and L, respectively, Fig. 1b). This is because, in contrast to DTT, 2-MEA was sufficiently mild to cleave disulphides between the heavy chains of the IgG while preserving the disulphide bridges between the heavy and light chains (H and L, respectively, Fig. 1b) [30]. As part of the intact IgG was remaining in both cases, different reduction conditions were studied. However, similar results were obtained mixing IgG with 10 and 200 mM of DTT (30 min at 37°C) or with 100 mM of 2-MEA during 30, 60 and 90 min. Thereby, 100 mM of 2-MEA and the shortest reaction time were selected for reduction of the $F(ab')_2$ fragments resulting from the digestion of the purified IgG against End1 and End2. These Fab' fragments were finally attached onto the activated succinimidyl silica particles to obtain the IA sorbent for IA-SPE-CE-MS [16,23,24,32–36].

3.2. IA-SPE-CE-MS

The starting point for the establishment of the IA-SPE-CE-MS methodology with the Fab' sorbent were the conditions established in our previous work with the IgG sorbent [38]. Aqueous standard mixtures of End1 and End2 were loaded because the intensities of the peptide peaks were higher than when the BGE was used as solvent. Loading pressure was studied at 930 and 50 mbar and although the opioid peptides were also detected at 50 mbar, at 930 mbar peak areas were always higher. The peak areas obtained for End1 were always considerably higher than for End2 because according to the manufacturer the original IgG was more immunoreactive against this peptide. At 930 mbar, the highest peak area of End1 and End2 were detected loading the sample for 15 and 20 min, respectively. With regard to the injection time of the eluent, current instability was often observed at elution times higher than 40 s because the ionization of a large volume of elution solution was probably hindering the appropriate electrical circuit closure in the sheathflow CE-MS interface. Peak area of End1 increased with elution time until approximately 20 s, then decreased slightly. In contrast, no remarkable differences were observed for End2 at elution times higher than 5 s. A sample loading time of 15 min at 930 mbar and an elution time of 20 s at 50 mbar were finally selected for further experiments. These conditions differed from those established in our previous work for the IgG sorbent, which demonstrated that the extraction performance of the sorbent using intact antibodies or their fragments was different [38].

Several rinsing conditions with BGE were also tested after sample loading to eliminate non-retained molecules and equilibrate capillary before the elution and the electrophoretic separation.

Table 1
Repeatability, reproducibility, linearity and LODs for the analysis of standard mixtures of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS.

	Repeatability (%RSD) (10 ng mL ⁻¹ , n = 8)		Reproducibility (%RSD) (10 ng mL ⁻¹ , n = 16)		Linearity		LOD (ng mL ⁻¹)
	Peak area	Migration time	Peak area	Migration time	Concentration range (ng mL ⁻¹)	Regression line (R ² > 0.99)	
End1	10.7	12.0	16.5	13.3	1–50	A = 54458.3C – 11783.1	0.5
End2	15.7	15.3	24.4	13.9	5–50	A = 1413.9C + 6896.1	5

Results showed that the peak area of End1 increased considerably rinsing with BGE at 50 mbar instead of 930 mbar for the minimum time to fill the separation capillary (i.e. 15 and 1 min, respectively). At a higher pressure the washing-out of End1 was more significant than at a lower pressure, resulting in smaller peaks. The effect was similar for End2, although less noticeable because a lower amount was retained. Fig. 3a shows the XIEs of End1 and End2 for the analysis by IA-SPE-CE-MS of 10 and 50 ng mL⁻¹ standard mixtures, respectively, under optimum conditions. Both peptides had a similar migration time, because they only differed in the third amino acid, which in both cases do not have any ionizable group in the side chain (Trp and Phe in End1 and End2, respectively) [38]. In accordance to our previous observation about the enhanced immunoreactivity of the antibody against End1 as compared to End2, peak height of End1 was significantly higher than End2 taking into account that End1 solution was 5-fold more diluted than End2. Table 1 summarizes repeatability, reproducibility, linearity and LODs for the analysis of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS with the Fab' sorbent. As can be observed, the repeatability and reproducibility values of migration time were similar for both peptides, whereas the reproducibility values of peak areas were slightly higher, especially for End2 that presented lower peak areas. The lower reproducibility of peak areas could be due to the differences in the Fab' sorbent contained in the lab-made microcartridges, because a new IA-SPE-CE column was used each day for the reproducibility study. These results were acceptable, but slightly worse to those obtained previously with the IgG sorbent [38]. However, the IgG sorbent microcartridges could be used only up to 8 runs without problems of extraction performance, current instability or breakage and the present Fab' microcartridges could be used for around 12 analyses. Anyway, this durability is still far away from the 20 runs achievable with C₁₈ microcartridges in C₁₈-SPE-CE-MS [19,20]. Linearity was evaluated in the range between 0.5 and 100 ng mL⁻¹ and signal vs. concentration was linear in the concentration range between 1–50 and 5–50 ng mL⁻¹ for End1 and End2, respectively (R² > 0.99 in both cases). The upper limit of the linearity range was 5-fold higher than in our previous work [38]. Regarding LODs, End1 could be detected in standard mixtures at 0.5 ng mL⁻¹, which only meant a slight improvement of the LOD achieved with the IgG sorbent (i.e. 1 ng mL⁻¹) [38]. The LOD obtained for End1 was 200-fold better than the value obtained by CE-MS with the neutral BGE (i.e. 100 ng mL⁻¹) [38]. This LOD is close to the value obtained by C₁₈-SPE-CE-MS using an acidic BGE that facilitated peptide ionization in positive ion mode (i.e. 0.1 ng mL⁻¹, 500-fold better than in CE-MS with the acidic BGE, 50 ng mL⁻¹) [46]. In contrast, the LOD for End2 with the Fab' sorbent was 5-fold higher than that obtained with the IgG sorbent (i.e. 5 and 1 ng mL⁻¹, respectively), probably because the selected loading sample and elution times were maximizing the immunoelectroextraction of End1 (Table 1).

For the purpose of evaluating the selectivity of the Fab' sorbent and the potential of the established methodology for peptide analysis in biological fluids, human plasma samples spiked with End1 and End2 were analyzed by IA-SPE-CE-MS. Plasma samples were subjected to a double-step sample clean-up based on precipitation with acetonitrile followed by filtration to prevent saturation of the microcartridges [19,20,42,46]. Fig. 3b shows the XIEs of End1

and End2 for the analysis of plasma samples spiked with 10 and 50 ng mL⁻¹ of each opioid peptide. As can be observed, the peak heights of End1 and End2 were 20 and 60 times lower, respectively, than for the standard mixtures (Fig. 3a). Probably, the decrease of peak height was more significant for End2 due again to the lower immunoreactivity of the antibody against that peptide. These differences could be due to the recoveries of the double-step sample pretreatment (approximately 70% [42]) and especially the detrimental presence of plasma matrix components. The presence of undesired matrix components can be easily observed from Fig. 4 that shows the base peak electropherograms (BPEs) on several mass ranges obtained for blank plasma samples by IA-SPE-CE-MS using the IgG sorbent [38] (i) and the Fab' sorbent (ii). The profiles of the electropherograms proved that the selectivity for the analysis of plasma samples of the Fab' sorbent was better than for the IgG sorbent, allowing a greater sensitivity for the analytes detection. Thus, End1 and End2 could be detected with the Fab' sorbent in plasma samples at 1 and 50 ng mL⁻¹, respectively. These values were 100- and 2-fold better LODs than those previously obtained using the IgG sorbent (i.e. 100 ng mL⁻¹ for both peptides) [38]. The sensitivity enhancement was considerably higher for End1 probably because the original IgG was more immunoreactive against this peptide and the extraction conditions (i.e. loading sample time and elution time) were mainly optimized for End1. For End1, the same LOD was achieved in plasma samples by C₁₈-SPE-CE-MS using an acidic BGE [38,46]. In all cases, retention of some of the plasma matrix components on the SPE sorbent hindered extraction of the target peptides, worsening the LODs achieved with standards.

4. Concluding remarks

We have adapted a procedure originally designed for protein immobilization in several materials, to be applied in the preparation of an IA sorbent containing Fab' fragments of an IgG for IA-SPE-CE-MS. The study of the IgG fragmentation and purification by MALDI-TOF-MS demonstrated that these procedures were suitable to obtain Fab' fragments of a polyclonal IgG against End1 and End2 selectively. Later, the Fab' sorbent was prepared by covalent immobilization of the Fab' fragments to succinimidyl silica particles. Results obtained for the analysis of End1 and End2 by IA-SPE-CE-MS in terms of repeatability, reproducibility, linearity ranges and LODs were acceptable, taking into account the multi-step synthetic approach and the limited amount of IA sorbent contained in the lab-made microcartridges. The LODs of End1 and End2 in standard mixtures were 0.5 and 5 ng mL⁻¹, and in plasma samples, 1 and 50 ng mL⁻¹, respectively. These LODs were in general better, especially for plasma samples, than those that were obtained for End1 and End2 in our previous work using the same antibody in an IgG sorbent. Furthermore, the LOD for End1 was similar to the value obtained by C₁₈-SPE-CE-MS. The sensitivity enhancement in the analysis of plasma samples with regard to the IgG sorbent was probably due to the improved selectivity of the Fab' sorbent. Anyway, avoiding non-specific interactions through an efficient end-capping or the use of more specific antibodies, seems to be one of the issues to improve the applicability of Fab' sorbents for the detection of target analytes in biological samples by IA

-SPE-CE-MS in the future. However, the most important issues remain the immunoreactivity of the immobilized antibody or antibody fragments (extraction efficiency) and the available immunoaffinity binding sites in the limited amount of IA sorbent contained in the microcartridge (capacity).

Acknowledgements

The authors thank the members of the Mass Spectrometry Laboratory (Irene Fernández and Laura Ortiz) from the University of Barcelona for assistance with the MALDI-TOF-MS analyses. Sílvia Medina acknowledges the Generalitat de Catalunya for a FI (Formación Investigadora) fellowship. This study was supported by a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (CTQ2011-27130).

References

- [1] M. Pioch, S.C. Bunz, C. Neusüß, *Electrophoresis* 33 (2012) 1517–1530.
- [2] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen, *Electrophoresis* 34 (2013) 99–112.
- [3] D. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis: A Primer*, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany, 2010, pp. 60–63.
- [4] L. Suntornsuk, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 29–52.
- [5] M. Herrero, E. Ibáñez, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 29 (2008) 2148–2160.
- [6] Z. El Rassi, *Electrophoresis* 31 (2010) 174–191.
- [7] V. Kasiccka, *Electrophoresis* 33 (2012) 48–73.
- [8] A. Taichrib, M. Pioch, C. Neususs, *Electrophoresis* 33 (2012) 1356–1366.
- [9] P.G. Righetti, R. Sebastiano, A. Citterio, *Proteomics* 13 (2) (2013) 325–340.
- [10] A.C. Moser, D.S. Hage, *Electrophoresis* 29 (2008) 3279–3295.
- [11] W.S.B. Yeung, G.A. Luo, Q.G. Wang, J.P. Ou, *J. Chromatogr. B* 797 (2003) 217–228.
- [12] L.K. Amundsen, H. Sirén, *Electrophoresis* 28 (2007) 99–113.
- [13] N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips, *Electrophoresis* 29 (2008) 3259–3278.
- [14] N.A. Guzman, T.M. Phillips, *Electrophoresis* 32 (2011) 1565–1578.
- [15] F. Benavente, E. Hernández, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2633–2639.
- [16] N.A. Guzman, *J. Chromatogr. B* 749 (2000) 197–213.
- [17] V. Kasiccka, Z. Prusik, *J. Chromatogr.* 273 (1983) 117–128.
- [18] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. Jong, *Electrophoresis* 33 (2012) 243–250.
- [19] F. Benavente, S. Medina-Casanellas, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1–11.
- [20] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Electrophoresis* 29 (2008) 3366–3376.
- [21] Z. El Rassi, D.N. Gunasena, *Electrophoresis* 33 (2012) 251–261.
- [22] J.E. Shiel, R. Mallik, S. Soman, K.S. Joseph, D.S. Hage, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 719–737.
- [23] H.S. Kim, D.S. Hage, *Immobilization methods for affinity chromatography*, in: D.S. Hage (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis, Boca Raton, FL, USA, 2006, pp. 35–78.
- [24] R. Mallik, C. Wa, D.S. Hage, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1411–1424.
- [25] W. Clarke, J.D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E.M. Karle, D.S. Hage, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 13–22.
- [26] M. Nisnevitch, M.A. Firer, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 467–480.
- [27] J. Turková, *J. Chromatogr. B* 722 (1999) 11–31.
- [28] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek, *Immunology, The Experimenter Series*, 1st ed., Academic Press/Elsevier, 2006.
- [29] D.E. Klaus, *Immunology: Understanding the Immune System*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [30] B.S. DeSilva, G.S. Wilson, *Methods* 22 (2000) 33–43.
- [31] P.J. Gauci, M.R. Alderton, *Pepsin Digestion of Antibodies to Produce Functional Antigen-binding Fragments (Fab): A Scientific Fantasy? DSTO Aeronautical and Maritime Research Laboratory, Australia*, July 2001.
- [32] T.M. Phillips, E. Wellner, *Electrophoresis* 34 (2013) 1530–1538.
- [33] H. Kalish, T.M. Phillips, *Methods* 56 (2012) 198–203.
- [34] H. Kalish, T.M. Phillips, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 194–200.
- [35] T.M. Phillips, E. Wellner, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 106–111.
- [36] H. Kalish, T.M. Phillips, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1605–1612.
- [37] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2574–2582.
- [38] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Anal. Chim. Acta* 717 (2012) 134–142.
- [39] J. Fichna, A. Janecka, J. Costentin, J.-C. Do Rego, *Pharm. Rev.* 59 (2007) 88–123.
- [40] D.S. Jessop, A. Fassold, C. Wolff, R. Hofbauer, A. Chover-Gonzalez, L.J. Richards, R.H. Straub, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1193 (2010) 117–122.
- [41] H. Mizoguchi, H. Watanabe, T. Hayashi, W. Sakurada, T. Sawai, T. Fujimura, T. Sakurada, S. Sakurada, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 362–368.
- [42] L. Pont, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Electrophoresis* (2013) (under review).
- [43] T.S. Raju, B.J. Scallon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341 (2006) 797–803.
- [44] A. Lapolla, D. Fedele, M. Garbeglio, L. Martano, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 153–159.
- [45] E. Giménez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Anal. Bioanal. Chem.* 398 (2010) 357–365.
- [46] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Electrophoresis* 32 (2011) 1750–1759.

Capítol 4. Resultats i discussió

4.1. Anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE amb fases estacionàries cromatogràfiques convencionals

4.1.1. Construcció del preconcentrador

Els preconcentradors o microcartutxos d'extracció que s'han utilitzat en aquesta tesi doctoral per a SPE-CE no es troben disponibles comercialment, i s'han proposat diferents dissenys seguint diversos procediments de construcció. La configuració més habitual en SPE-CE consisteix en inserir a prop de l'entrada del capil·lar de separació un fragment de capil·lar de sílice fosa de reduïdes dimensions, reblert de partícules de fase estacionària. Normalment, la fase estacionària està empaquetada entre dues estructures poroses anomenades *frits* que eviten el despreniment de les partícules. Existeixen diversos tipus de *frits* (vidre sintetitzat, llana de vidre, etc.), però els més senzills i habituals són fragments petits dels que s'empren en els cartutxos comercials de SPE. A la figura 4.1 es descriu el procés de construcció d'un preconcentrador empaquetat amb dos *frits*, que s'ha utilitzat àmpliament en aquesta tesi doctoral (articles 2.1, 2.2, 3.1, 3.2, 3.3) [175]. Aquest procés es supervisa a través d'una lupa binocular. Primerament, s'introdueix un *frit* en un dels extrems del capil·lar que serà el cos del preconcentrador. El diàmetre intern del cos del preconcentrador acostuma a ser molt superior al del capil·lar de separació per contenir la major quantitat de partícules de fase estacionària. A continuació, es connecta al fragment de capil·lar de separació d'entrada mitjançant un tub de plàstic i s'aspira la fase estacionària a l'interior del preconcentrador mitjançant l'aplicació de buit. Una vegada ple, s'introdueix un altre *frit* a l'altre extrem del preconcentrador i es connecta al fragment de capil·lar de separació de sortida mitjançant un altre tub de plàstic. Els extrems dels capil·lars estan perfectament tallats i els tubs de plàstic permeten la connexió sense volums morts. Abans de començar les anàlisis, es comprova passant aigua que no existeix cap restricció en el cabal del sistema per la presència del preconcentrador.

En algunes configuracions, la presència de *frits* pot provocar una contrapressió en el capil·lar de separació, la disminució o distorsió del flux electroosmòtic (EOF), la formació de bombolles i inestabilitat o caigudes de corrent [171-174].

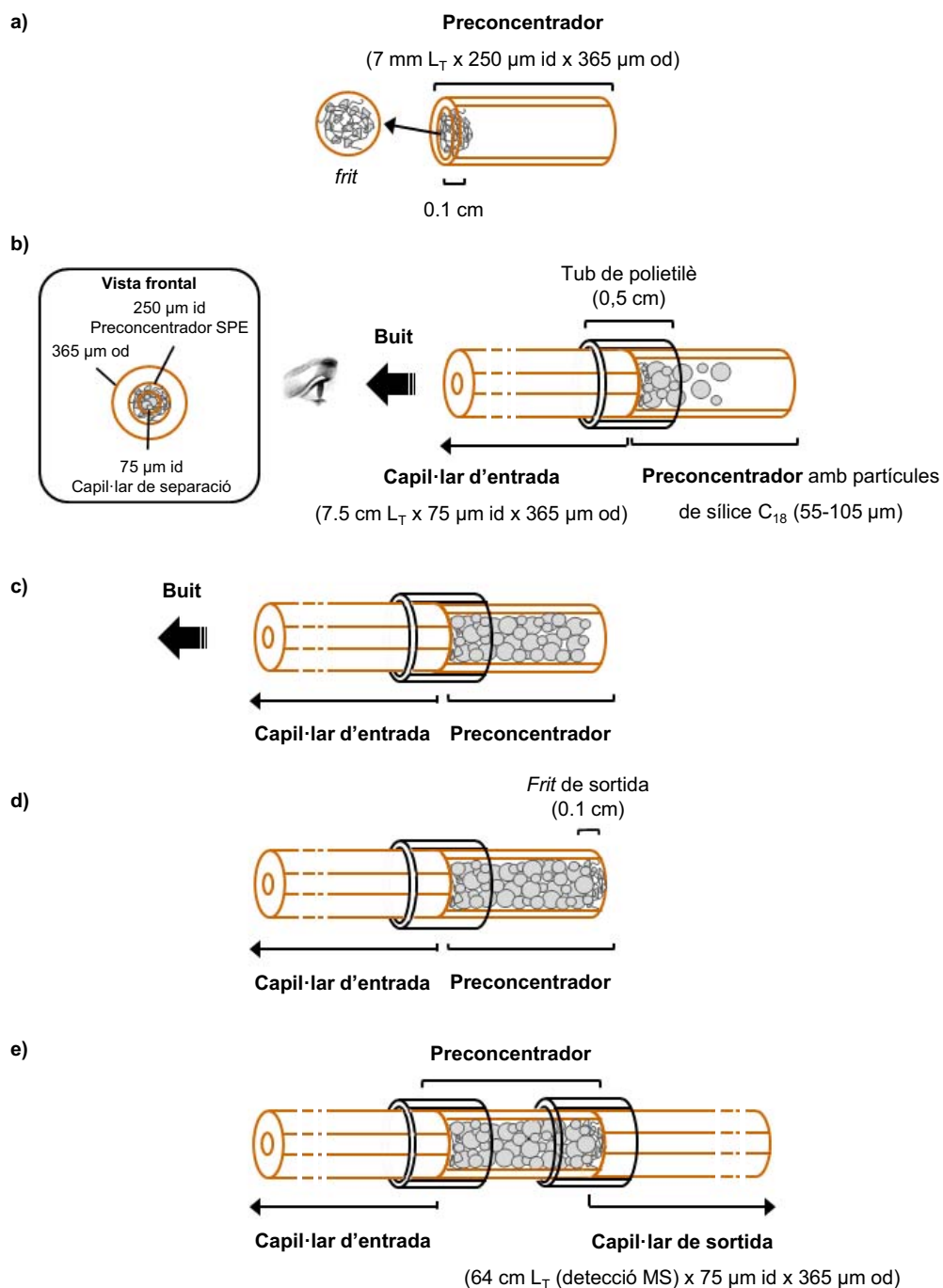


Figura 4.1. Esquema del procés de construcció d'un preconcentrador empaquetat amb *frits*. Longitud total (L_T), diàmetre intern (id) i diàmetre extern (od).

El preconcentrador amb *frits* descrit anteriorment (figura 4.1 i 4.2 a) no provoca aquests inconvenients, sempre i quan el procés de fabricació sigui acurat.

Alguns investigadors han estudiat dissenys alternatius de preconcentradors en els que els *frits* no són necessaris (fases estacionàries enllaçades a les parets del capil·lar, partícules magnètiques, membranes o discs d'extracció, etc.) [56, 110, 128, 166, 167]. En el cas dels preconcentradors empaquetats, una de les millors alternatives consisteix en prescindir dels *frits* i utilitzar fases estacionàries amb partícules de mida lleugerament superior al diàmetre intern del capil·lar de separació per a prevenir el despeniment de partícules durant les anàlisis [171-174, 176, 217].

A l'article 2.3 d'aquesta tesi doctoral s'ha avaluat el comportament d'un preconcentrador sense *frits* (figura 4.2 b) i s'ha comparat amb el preconcentrador amb *frits* (figura 4.2 a). La principal diferència entre els dos dissenys emprats és el diàmetre intern del capil·lar de separació, que en el cas del preconcentrador sense *frits* és inferior a la mida de les partícules de la fase estacionària (50 μm vs. 55-105 μm) [171, 173, 174, 176, 217]. Per aconseguir una mida de partícula apropiada, la fase estacionària es tamisa abans de l'empaquetat. Això no és necessari en els preconcentradors amb *frits*, en els que es poden emprar capil·lars de separació de 75 μm de diàmetre intern. Ambdós dissenys també difereixen en el diàmetre intern i la longitud del preconcentrador, que són menors en el preconcentrador sense *frits* (150 μm vs. 250 μm i 4 mm vs. 7 mm), de manera que la quantitat de fase estacionària que conté també és inferior. Així, els volums dels preconcentradors amb i sense *frits* són 0.34 i 0.07 mm^3 , respectivament. El procés de construcció dels dos preconcentradors és similar, a excepció dels tubs de plàstic utilitzats en les connexions. En el preconcentrador sense *frits*, en comptes d'utilitzar dos tubs de polietilè, s'empra un únic tub de politetrafluoroetilè (PTFE) lleugerament més llarg per tal de que pugui contenir tot el preconcentrador i les dues connexions. La construcció d'aquest preconcentrador requereix menys temps i resulta lleugerament més senzilla perquè no s'han de preparar ni introduir *frits*.

El disseny del preconcentrador sense *frits* s'ha adaptat per a l'ús dels capil·lars necessaris per a una interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar (HSPS), que presenten dimensions més reduïdes (30 μm id i 150 μm od) (article 2.4). El diàmetre

extern d'aquests capil·lars ha suposat un gran inconvenient, ja que no hi ha tubs de plàstic amb diàmetre intern apropiat per a realitzar les connexions necessàries. A més, pel que fa al cos del preconcentrador, els capil·lars de 150 µm de diàmetre extern més amples presenten un diàmetre intern de 75 µm, de manera que el volum intern no és suficient per a contenir una quantitat de fase estacionària apropiada. Per aquest motiu, s'ha proposat una alternativa innovadora per a la construcció del preconcentrador (figura 4.2 c).

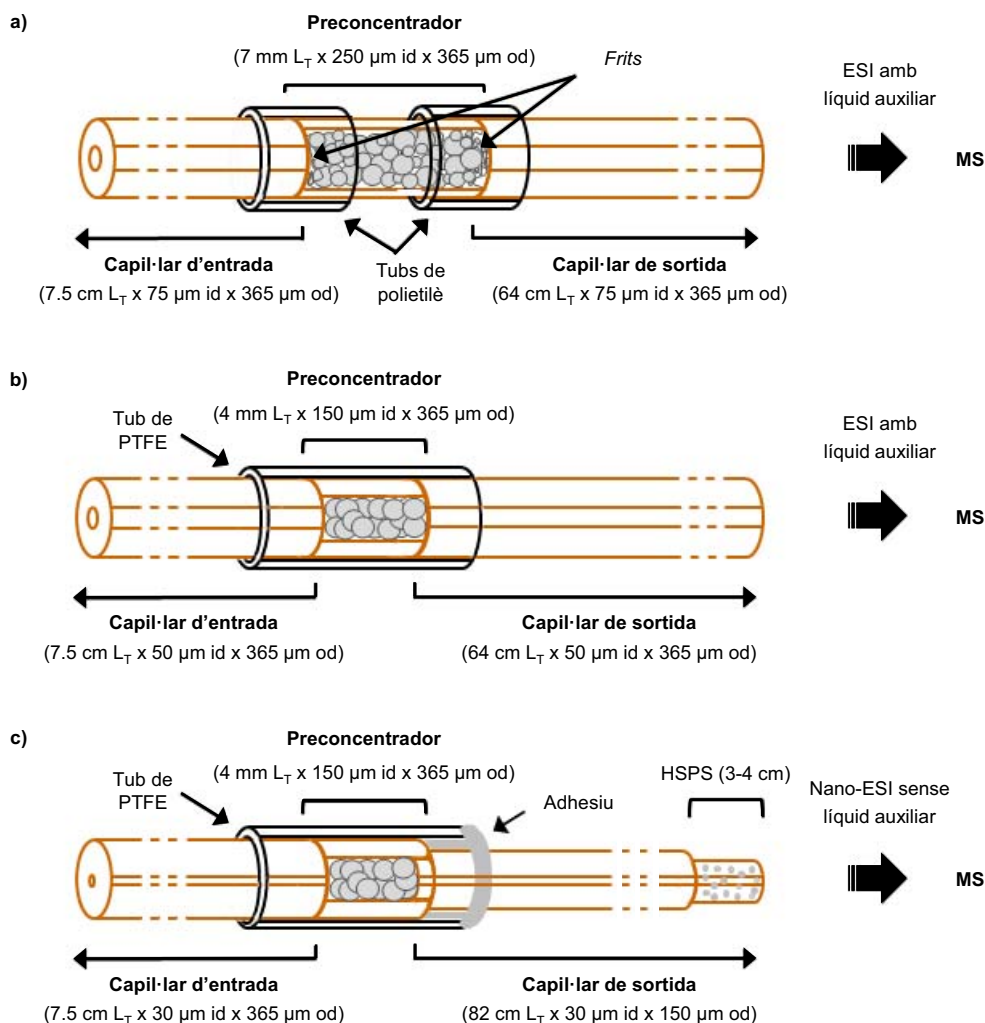


Figura 4.2. Esquema del preconcentrador amb i sense *frits* per a SPE-CE-MS amb interfase d'ESI amb líquid auxiliar (a i b, respectivament) i preconcentrador sense *frits* per a SPE-CE-MS amb interfase nano-ESI sense líquid auxiliar (c).

En el disseny adaptat a nano-ESI (figura 4.2 c), el cos del preconcentrador és un fragment de capil·lar de 4 mm, 150 µm id i 365 µm od, reblert de partícules tamisades de fase estacionària. El preconcentrador s'introdueix dins d'un tub de PTFE de diàmetre adequat i es connecta al fragment de capil·lar de separació d'entrada (30 µm id i 365 µm od), ja que ambdós capil·lars presenten el mateix diàmetre extern. El fragment de capil·lar de separació de sortida presenta el mateix diàmetre extern que el diàmetre intern del preconcentrador (150 µm), de manera que s'ha de retirar la poliamida d'aproximadament 1 mm d'un dels seus extrems per tal de poder introduir acuradament aquest fragment dins del preconcentrador. Com que el tub de PTFE és més ample que el diàmetre extern del capil·lar de sortida, aquesta unió s'ha de segellar amb adhesiu per assegurar una bona connexió. Aquest procés de construcció és més difícil que qualsevol dels anteriors i requereix més temps, ja que l'adhesiu s'ha de deixar assecat durant 14 hores aproximadament.

A continuació, es discutiran els resultats obtinguts amb aquests preconcentradors. A excepció que s'indiqui el contrari, s'ha emprat el preconcentrador amb *frits*.

4.1.2. Selecció de fases estacionàries per SPE-CE-IT-MS. Tractament de mostres de plasma humà

L'èxit del procés d'extracció en fase sòlida en línia depèn principalment de la utilització d'una fase estacionària adequada per a la retenció selectiva dels anàlits d'interès. En SPE-CE, la magnitud de la interacció amb l'anàlit, la selectivitat i la capacitat de la fase estacionària són especialment importants a causa de les reduïdes dimensions dels preconcentradors. Els grups funcionals del material emprat, així com la seva porositat i mida de partícula, a més de proporcionar una bona interacció amb l'anàlit i la màxima superfície activa, ha de garantir l'estabilitat del corrent elèctric durant les separacions electroforètiques.

En el primer treball d'aquesta tesi doctoral (article 2.1) s'han emprat fases estacionàries cromatogràfiques convencionals. S'han provat diverses fases estacionàries hidrocarbonades de base sílice (C_{18} , tC_{18} , C_8 i tC_2), polimèriques (HLB, ENV+ i Strata-X) i d'intercanvi de cations amb base polimèrica (MCX) per a l'anàlisi

de pèptids opiacis per SPE-CE-UV i SPE-CE-IT-MS. Les fases estacionàries hidrocarbonades de base sílice, seguides de les polimèriques, han proporcionat els millors factors de preconcentració, mentre que la fase estacionària d'intercanvi de cations MCX no ha permès preconcentrar els pèptids opiacis. A la figura 4.3 es mostren els electroferogrames obtinguts per SPE-CE-UV emprant les fases estacionàries C_{18} , C_8 i tC_2 . Mentre que els perfils electroforètics de les mescles de patrons són similars en els tres casos (figura 4.3 a), la intensitat dels pics obtinguts en mostres de plasma difereix considerablement segons la fase estacionària que s'empra (figura 4.3 b). La fase estacionària C_{18} , que s'obté del cartutx de SPE de *Waters Sep-Pak (Milford, MA, USA)*, que presenta partícules amb diàmetres d'entre 55 i 105 μm i mida de porus, 125 Å, és la que ha proporcionat els pics més intensos (figura 4.3 b-i). Aquests resultats són coherents amb el fet de que els LOD dels pèptids opiacis en mescles de patrons són similars per a les tres fases estacionàries estudiades ($0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). En canvi, els pèptids opiacis s'han pogut detectar en mostres de plasma a concentracions 10 vegades més diluïdes amb C_{18} que amb la resta de fases estacionàries hidrocarbonades de base sílice ($0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Aquesta ha estat la fase estacionària seleccionada per a preparar la resta de preconcentradors emprats en els articles del capítol 2 d'aquesta tesi doctoral.

L'anàlisi de mostres complexes, com el plasma humà, per SPE-CE, especialment emprant fases estacionàries cromatogràfiques de selectivitat limitada, com el C_{18} , requereix el tractament previ de les mostres per tal de prevenir la saturació del preconcentrador. Aquest tractament s'ha d'optimitzar adequadament per evitar la pèrdua dels anàlits. Una alternativa per tal d'eliminar les sals i els compostos d'elevat pes molecular de les mostres de plasma humà, abans de l'anàlisi dels pèptids opiacis, consisteix en una primera etapa de precipitació amb acetonitril seguida d'una etapa de filtració amb filtres de tall molecular. En estudis anteriors en el nostre grup de recerca, es va estimar la recuperació dels pèptids opiacis en l'etapa de precipitació per CE-IT-MS, sent 49, 102 i 91% per a la DynA, l'End1 i la Met, respectivament [55]. En canvi, les recuperacions obtingudes en el tractament complet eren de l'ordre del 16% per a la DynA i del 60% per a l'End1 i per a la Met, emprant els filtres de tall molecular de 3 kDa (*Microcon Ultracel, YM-3*) en l'etapa de filtració [55].

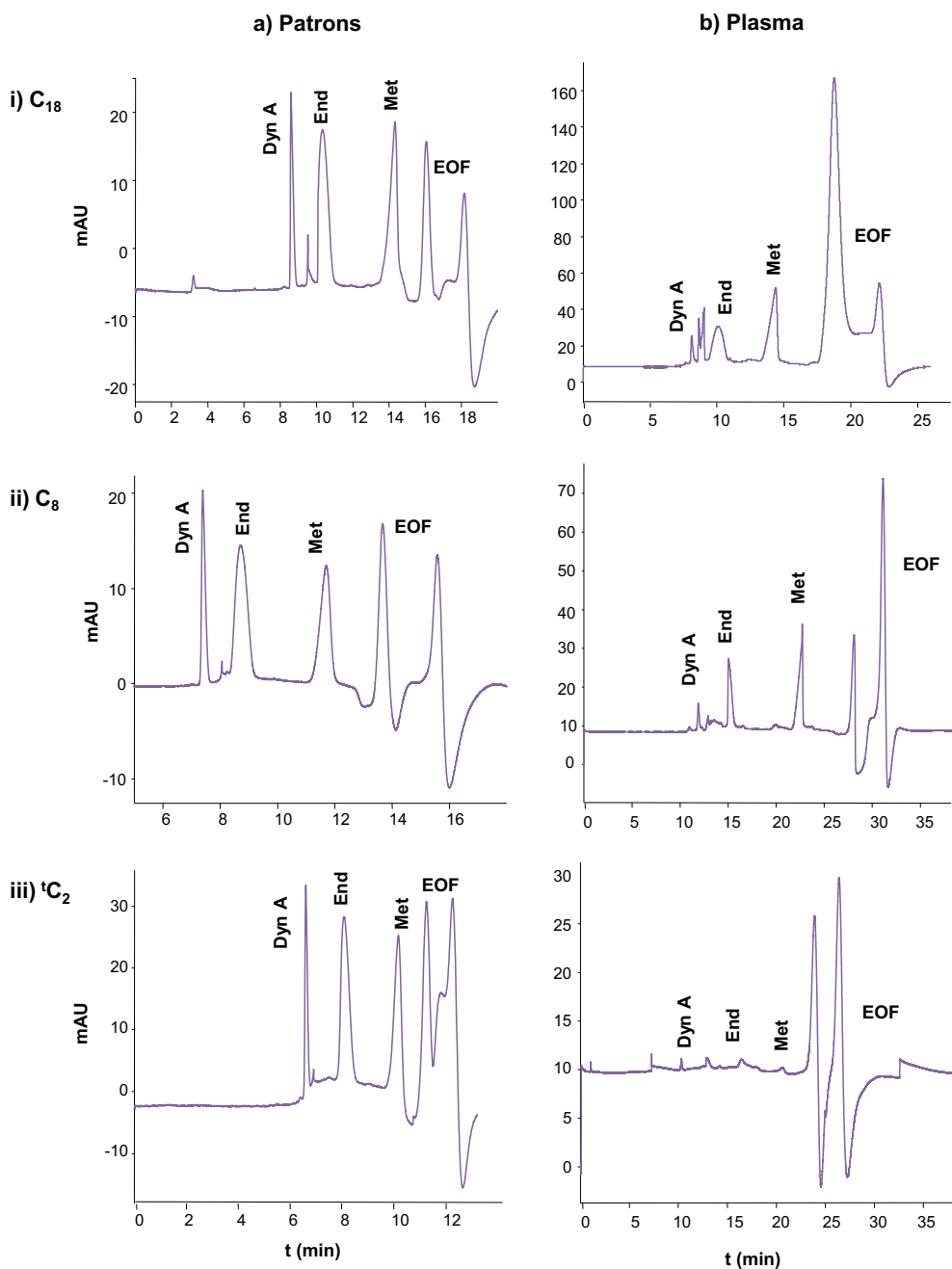


Figura 4.3. Electroferogrames de mesclades de patrons de DynA, End1 i Met de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a) i de mostres de plasma humà fortificades amb $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada peptid (b), obtinguts emprant les estacionàries de base sílice C₁₈, C₈ i C₂ (i-iii, respectivament) per SPE-CE-UV.

L'optimització de l'etapa de filtració del tractament de les mostres de plasma i concretament, l'efecte del diàmetre de porus dels filtres i les condicions de filtració, han estat objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral per tal d'augmentar les recuperacions dels pèptids opiacis (article 2.1). Les interaccions electrostàtiques o hidrofòbiques entre els pèptids i la membrana o el material del filtre, o bé, la mida del pèptid són factors que podrien afectar a la seva recuperació. Per aquest motiu, s'han estudiat filtres d'acetat de cel·lulosa de tall molecular de 3, 10 i 30 kDa (YM-3, YM-10 i YM-30), s'ha filtrat a diferents temperatures i s'ha estudiat l'efecte de la passivació del material del filtre i la composició de la solució a filtrar. El percentatge de recuperació dels pèptids opiacis s'ha calculat a partir dels valors d'àrea dels pics obtinguts en l'anàlisi per CE-IT-MS de mostres de plasma fortificades amb $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DynA, End1 i Met, abans i després del tractament de mostra.

Tal i com s'observa a la figura 4.4, el factor més influent en la recuperació dels pèptids és la mida dels porus del filtre de tall molecular. L'ús dels filtres YM-10 i YM-30 ha permès incrementar notablement la recuperació dels pèptids opiacis, fins a valors de l'orde del 25% per a la DynA i del 70% per a l'End1 i la Met. En canvi, la passivació dels filtres amb diverses solucions, que té la finalitat de bloquejar els possibles llocs actius per a prevenir l'adsorció dels anàlits en la superfície del recipient del filtre, no ha proporcionat una millora significativa dels resultats obtinguts. La utilització de solvents àcids i bàsics en la reconstitució del residu sòlid obtingut després de la precipitació, per tal d'evitar les possibles interaccions entre els pèptids i la membrana d'acetat de cel·lulosa del filtre, únicament ha provocat lleugeres modificacions en el percentatge de recuperació dels pèptids. La filtració dels pèptids a temperatures inferiors afecta negativament a la seva recuperació. Tampoc és recomanable emprar condicions extremes, com per exemple l'ús del detergent *Tween-20* per a la passivació dels filtres o l'ús de solucions hidroorgàniques per a reconstituir el residu sòlid després de la filtració, ja que sovint provoquen el trencament de la membrana del filtre.

Respecte a la reproductibilitat de les diferents metodologies de filtració, la major reproductibilitat s'obté quan es filtren mostres aquoses en filtres sense passivar YM-3 i YM-10, que es troba entre un 6% i un 12% RSD. En tots els experiments el percentatge de recuperació més petit correspon a la DynA, que ja presentava recuperacions significativament inferiors en la precipitació amb acetonitril. Com que

la DynA presenta un pes molecular superior a la resta dels pèptids, podria quedar més retinguda en l'entramat dels filtres durant la filtració. Cal destacar que aquests filtres no estan dissenyats per a obtenir filtrats de compostos de baix pes molecular, sinó per a purificar i preconcentrar proteïnes d'elevat pes molecular, que no passarien a través del filtre.

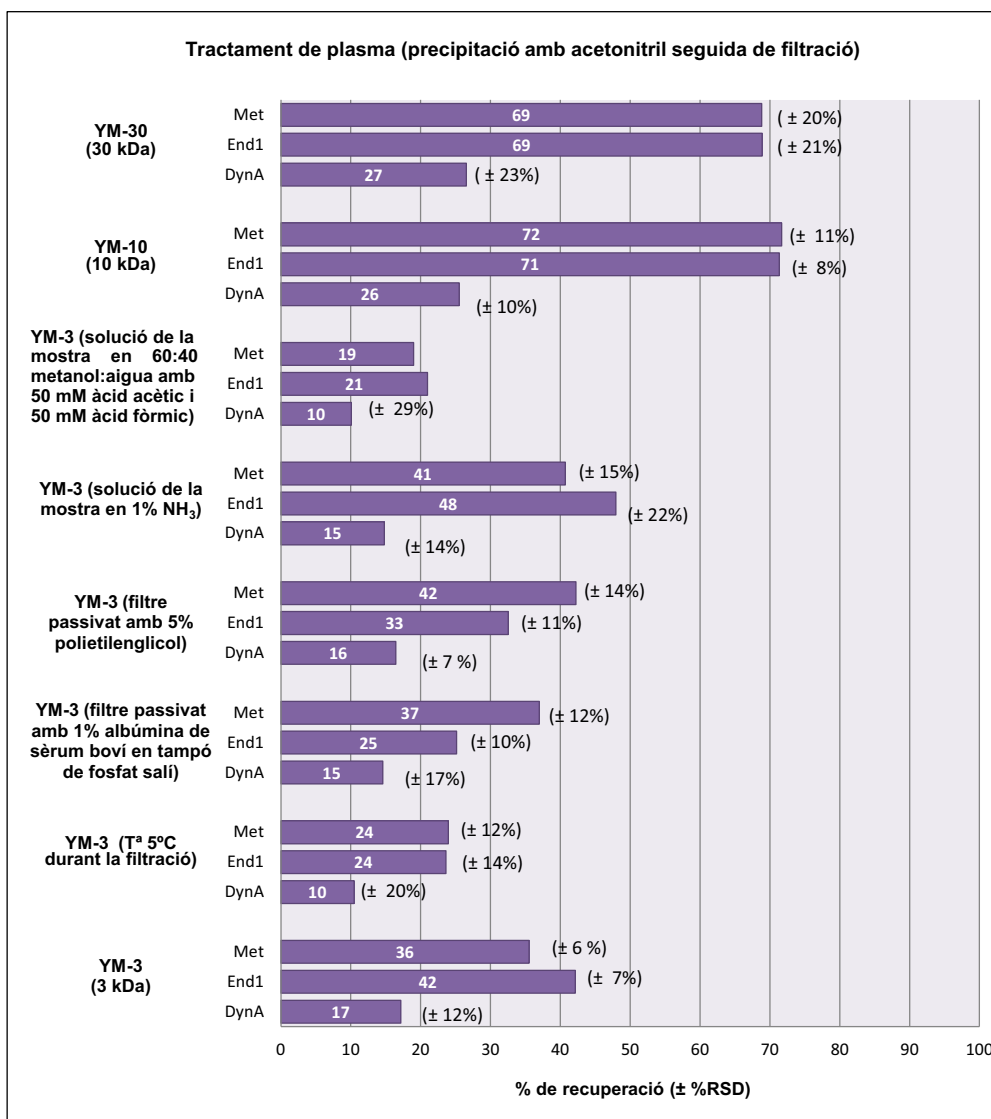


Figura 4.4. Recuperacions dels pèptids opiàcics en mostres de plasma fortificades amb 10 µg·mL⁻¹ de DynA, End1 i Met (CE-IT-MS).

A la figura 4.5 a es mostra la suma dels electroferogrames d'ions extrets (EIE) dels pèptids opiàcics de mostres de plasma fortificades amb $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DynA, End1 i Met després de ser tractades amb els filtres YM-3, YM-10 i YM-30. S'observa que les separacions electroforètiques són similars en els tres casos. A les figures 4.5 b i c es mostren, respectivament, els EIE i els electroferogrames de pic base (BPE) entre 250 i 1250 m/z de l'anàlisi de mostres de plasma que no han estat fortificades amb els pèptids. Com es pot observar, els electroferogrames dels filtres YM-10 i YM-30 mostren diversos pics electroforètics corresponents a components de la matriu. No obstant, els perfils dels electroferogrames no mostren diferències significatives que justifiquin la menor repetibilitat dels filtres YM-30 (figura 4.4). S'ha decidit descartar l'ús dels filtres YM-30 en presentar més variabilitat dels resultats. En canvi, els filtres YM-3 permeten una millor neteja de la matriu de la mostra (figura 4.5 c-i).

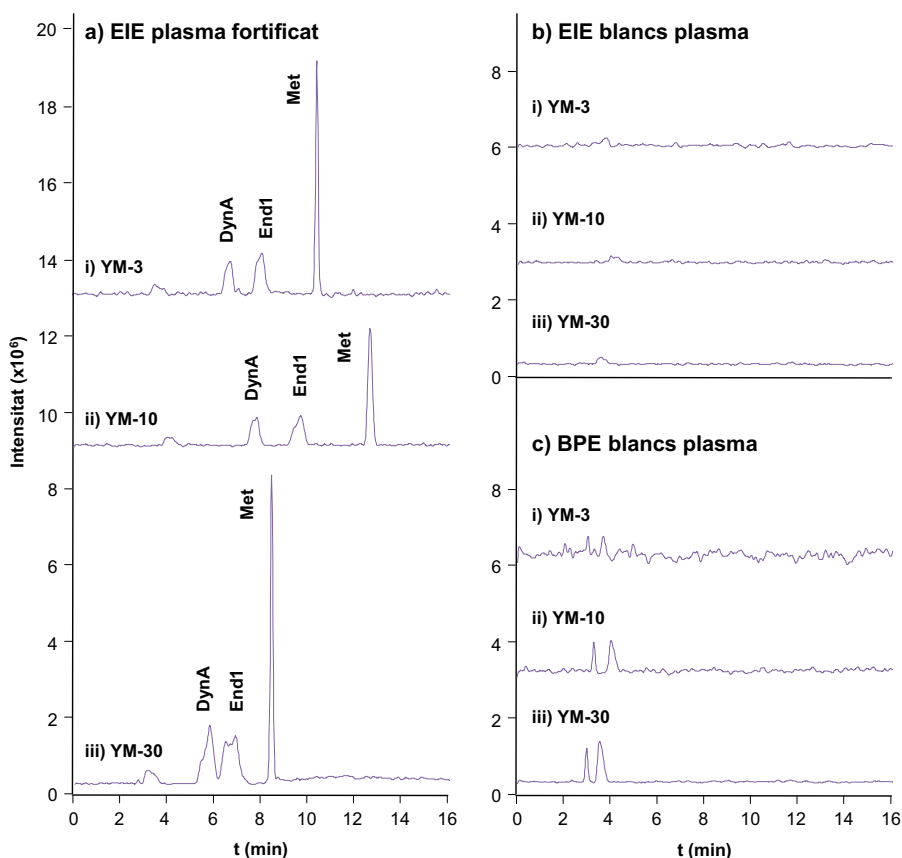


Figura 4.5. EIE de mostres de plasma fortificades amb $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DynA, End1 i Met després del tractament de mostra (a) i EIE i BPE entre 250-1250 m/z dels blancs (b i c, respectivament), emprant els filtres (i) YM-3, (ii) YM-10 i (iii) YM-30, per CE-IT-MS.

Tot i que les recuperacions dels pèptids són superiors emprant els filtres YM-10, quan s'analitzen les mostres fortificades de plasma per C₁₈-SPE-CE-IT-MS, els LOD són els mateixos que si s'utilitzen els filtres YM-3 (10 ng·mL⁻¹ per a la DynA i 1 ng·mL⁻¹ per a la Met i l'End1). Malgrat que es recupera més anàlit, els filtrats contenen més interferències que poden dificultar la seva retenció en el preconcentrador amb C₁₈. Per tant, ambdós filtres poden considerar-se efectius per a realitzar el tractament de les mostres de plasma previ a la seva anàlisi.

Recentment, la casa comercial ha canviat el disseny dels filtres i la recuperació dels pèptids opiacis emprant aquests nous filtres sense passivar és significativament inferior als valors indicats a l'article 2.1 d'aquesta tesi doctoral. En treballs realitzats en el nostre grup de recerca, s'ha comprovat que per tal d'obtenir percentatges de recuperació i LOD similars als anteriors, és necessari passivar els filtres amb una solució aquosa de polietilenglicol al 5% (article 3.3). Aquest fet posa de manifest la necessitat d'estar alerta i adaptar contínuament les metodologies pel tractament de mostres biològiques als dispositius que es troben disponibles comercialment.

Malgrat que els LOD obtinguts són millors que en CE-IT-MS, aquests valors són superiors als nivells en que es troben els pèptids opiacis en els fluids biològics, de manera que s'ha de continuar treballant en la recerca d'alternatives com l'ús d'espectròmetres de masses i interfases d'ESI per a una detecció més sensible, la combinació de tècniques de preconcentració en línia i altres dissenys de preconcentradors.

4.1.3. Anàlisi dels pèptids opiacis per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS

Una de les possibles estratègies a investigar per a millorar els resultats obtinguts amb IT-MS consisteix en l'ús d'espectròmetres de masses amb millor sensibilitat, exactitud i resolució, com l'espectròmetre de masses amb analitzador TOF. En estudis anteriors, el nostre grup de recerca va establir les metodologies adequades per a l'anàlisi de pèptids opiacis per CE-IT-MS [44] i CE-TOF-MS [218]. Els paràmetres de qualitat d'ambdues metodologies són molt similars a excepció dels LOD, que són 20 vegades inferiors en el cas del TOF (0.05 i 1 µg·mL⁻¹ amb TOF-MS i IT-MS, respectivament). Els espectres de masses corresponents als

pèptids opiacis confirmen que el poder de resolució i l'exactitud de masses són superiors quan s'utilitza l'analitzador TOF, ja que l'amplada dels pics és menor i els valors de m/z presenten més xifres significatives (figura 4.6). En el cas de la DynA, la resolució que s'obté amb l'analitzador IT no és suficient per separar els ions moleculars corresponents a la distribució isotòpica característica d'un ió doblement carregat.

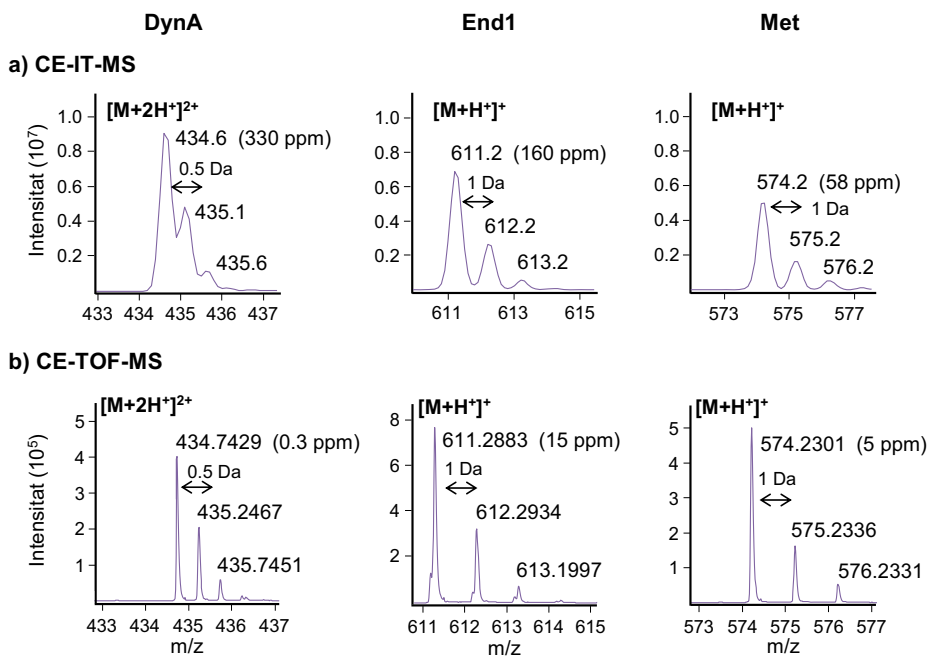


Figura 4.6. Espectres de masses dels pèptids DynA, End1 i Met en una mescla de patrons de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-IT-MS (a) i en una mescla de patrons de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS (b). En cada cas s'indica l'exactitud de massa en ppm.

A l'article 2.2 d'aquesta tesi, s'ha estudiat l'anàlisi de pèptids opiacis per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS amb preconcentradors empaquetats amb *frits* (figura 4.1). A la taula 4.1 es mostren els valors obtinguts de repetibilitat en l'àrea de pic (A_{pic}) i en el temps de migració (t_m), la linealitat i els LOD, i l'exactitud i precisió en els valors de massa molecular monoisotòpica (M) mesurats quan s'analitzen mescles de patrons de pèptids opiacis. També, s'inclouen els LOD quan s'analitzen mostres de plasma fortificades amb els pèptids opiacis. Si es comparen aquests resultats amb els obtinguts en treballs previs del nostre grup de recerca emprant IT-MS (taula 4.2) [54, 55], s'observa que les repetibilitats en l'àrea de pic són similars i en el temps de migració són lleugerament inferiors emprant TOF-MS.

Taula 4.1. Paràmetres de qualitat per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mescles de patrons per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (article 2.4).

C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS							
PATRONS						PLASMA	
	Repetibilitat (%RSD) (c=1ng·mL ⁻¹ , n=10)		M (c=1ng·mL ⁻¹ , n=15)		Linealitat (c=0.1-10ng·mL ⁻¹) ^a	LOD (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)
	A _{pic}	t _m	Precisió (*10 ⁻⁴ %RSD)	Exactitud (ppm)	Recta de regressió (R ² >0.99)		
DynA	13	10	1	1	A = 2x10 ⁵ C - 7x10 ⁴	0.1	1
Met-NH ₂	12	7	1	1	A = 1x10 ⁶ C - 2x10 ⁵	0.1	1
Meap	18	8	3	2	A = 7x10 ⁵ C - 2x10 ⁶	1	10
End1	11	7	1	1	A = 2x10 ⁶ C - 3x10 ⁵	0.1	1
Des	6	8	1	1	A = 1x10 ⁶ C - 2x10 ⁵	0.1	0.5
Met	11	9	1	1	A = 2x10 ⁶ C - 6x10 ⁵	0.1	0.5
Ala-Met	9	9	1	1	A = 8x10 ⁵ C - 1x10 ⁵	0.1	1

^a Linealitat del pèptid Meap de c=1-10ng·mL⁻¹

Taula 4.2. Paràmetres de qualitat per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mescles de patrons per C₁₈-SPE-CE-IT-MS [54, 55].

C ₁₈ -SPE-CE-IT-MS						
PATRONS					PLASMA	
	Repetibilitat (%RSD) (c=10ng·mL ⁻¹ , n=8)		Linealitat		LOD (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)
	A _{pic}	t _m	c (ng·mL ⁻¹)	Recta de regressió (R ² >0.99)		
DynA	10	2	100 - 0.1	A = 5x10 ⁹ C - 7x10 ³	0.1	10
Met-NH ₂	15	2	100 - 0.1	A = 5x10 ⁹ C - 1x10 ⁶	0.1	1
End1	11	2	100 - 0.1	A = 3x10 ⁹ C + 4x10 ⁴	0.1	1
Des	7	2	100 - 1	A = 2x10 ⁹ C - 2x10 ⁵	0.1	10
Met	12	2	100 - 1	A = 8x10 ⁸ C + 4x10 ⁶	1	1
Ala-Met	12	2	100 - 10	A = 4x10 ⁷ C + 2x10 ⁶	10	10

Cal tenir en compte que amb IT-MS s'ha estudiat la repetibilitat a $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ mentre que amb TOF-MS, a $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, i generalment, a baixes concentracions la repetibilitat en els resultats disminueix. Respecte a la linealitat, els coeficients de correlació de les rectes de regressió són bons pels dos analitzadors ($R^2 > 0.99$), però l'interval de linealitat és més ampli amb IT-MS, arribant fins a quatre ordres de concentració en la majoria dels casos.

Amb l'analitzador TOF s'obtenen excel·lents valors de precisió i d'exactitud de masses, que permeten una gran fiabilitat en la identificació dels pèptids estudiats. Per tal d'obtenir aquests valors, cal realitzar a diari un ajust dels paràmetres de la detecció (*tune*) i un calibratge de l'eix de m/z en el mode de treball seleccionat. A més a més, es realitza un calibratge intern de les masses moleculars en continu amb compostos de referència durant l'adquisició de dades per a millorar la fiabilitat de la M experimental. Una de les millors alternatives en CE-TOF-MS consisteix en addicionar compostos de referència en el líquid auxiliar o bé, seleccionar ions moleculars de substàncies detectades en el soroll de fons. Altres autors recomanen utilitzar com a referència ions de substàncies detectades a l'inici de l'electroferograma i realitzar el calibratge amb posterioritat a les mesures. Tot i els bons resultats obtinguts per CE-TOF-MS en el nostre grup de recerca mitjançant el calibratge intern amb compostos de referència en el líquid auxiliar [218], la presència d'aquests compostos en C_{18} -SPE-CE-TOF-MS provoca inestabilitat de corrent i els LOD dels pèptids opiacis estudiats són un ordre de magnitud més elevats. En canvi, el calibratge intern amb ions moleculars de substàncies presents en el soroll de fons permet disminuir aproximadament en un 50% l'error en el càlcul de la M per a la majoria dels pèptids estudiats (taula 4.1).

Pel que fa als LOD en l'anàlisi de patrons, emprant la metodologia C_{18} -SPE-CE-TOF-MS (taula 4.1) s'aconsegueixen millorar pels pèptids Met i Ala-Met en un i dos ordres de magnitud respecte IT-MS (taula 4.2), mentre que no s'aconsegueix una millora significativa per a la resta de pèptids opiacis. Això contrasta amb els valors dels LOD dels pèptids opiacis per CE-MS sense preconcentració en línia, que són 20 vegades inferiors quan s'utilitza l'analitzador TOF ($0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ vs. $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El fet de no poder aconseguir la millora dels LOD que s'esperava, hauria d'estar directament relacionat amb el procés de preconcentració en línia i podria ser degut a que durant la introducció de la mostra s'elueixin els anàlits retinguts, sent aquest

efecte més important per a solucions diluïdes. En el cas de les mostres de plasma, els LOD dels pèptids opiacis són superiors als que s'obtenen pels patrons. Probablement, la complexitat de la matriu, les recuperacions durant el pretractament de mostra i la selectivitat limitada de la fase estacionària C_{18} en són la causa. Així, alguns dels compostos de la matriu també es preconcentren amb els pèptids opiacis, evitant la detecció de les mateixes concentracions que amb patrons. Si es comparen els LOD que s'obtenen amb els dos analitzadors, mitjançant C_{18} -SPE-CE-TOF-MS, s'aconsegueixen millores significatives per a la majoria dels pèptids, probablement perquè en mostres complexes l'exactitud i la resolució juguen un paper fonamental a l'hora d'aconseguir millors S/N per a un ió molecular concret.

A les figures 4.7 a-i i b-i es mostren els electroferogrames d'una mescla de patrons de set pèptids opiacis ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), una mostra de plasma fortificada ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) i els blancs corresponents. Com es pot comprovar, en l'electroferograma de la mostra de plasma s'observen altres pics corresponents a components de la matriu. En el cas de la mostra de plasma, no apareix el pèptid Meap ja que el seu LOD és superior a $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. A les figures 4.7 ii-iv es poden observar els EIE de tres dels pèptids estudiats i els seus espectres de masses. En els EIE obtinguts pels patrons, s'observa un únic pic corresponent al pèptid estudiat i els espectres de masses són de molt bona qualitat perquè s'analitzen patrons a concentracions per sobre del LOD. En canvi, en els EIE de la mostra de plasma amb concentracions dels pèptids molt properes als LOD, apareixen diversos pics i de vegades el pic més intens no correspon al pèptid d'interès. Per exemple, la distribució característica de l'ió $[M+H]^+$ de la Met s'observa clarament tan en l'espectre de masses corresponent a la solució de patrons (figura 4.7 a-iv) com en la mostra de plasma fortificada (figura 4.7 b-iv). En canvi, la distribució característica de l'ió $[M+2H]^{2+}$ de la DynA es diferencia clarament en la solució de patrons (figura 4.7 a-ii), però en la mostra de plasma fortificada a aquesta concentració propera al LOD és més difícil d'apreciar perquè presenta una intensitat similar a altres senyals del soroll de fons (figura 4.7 b-ii).

Això confirma que quan s'analitzen mostres complexes, on l'anàlit es troba a concentracions baixes, l'ús d'un espectròmetre de masses d'elevada exactitud i resolució, que permeten una gran selectivitat, com el TOF-MS, resulta de gran utilitat. Per a la resta de treballs d'aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat el TOF-MS.

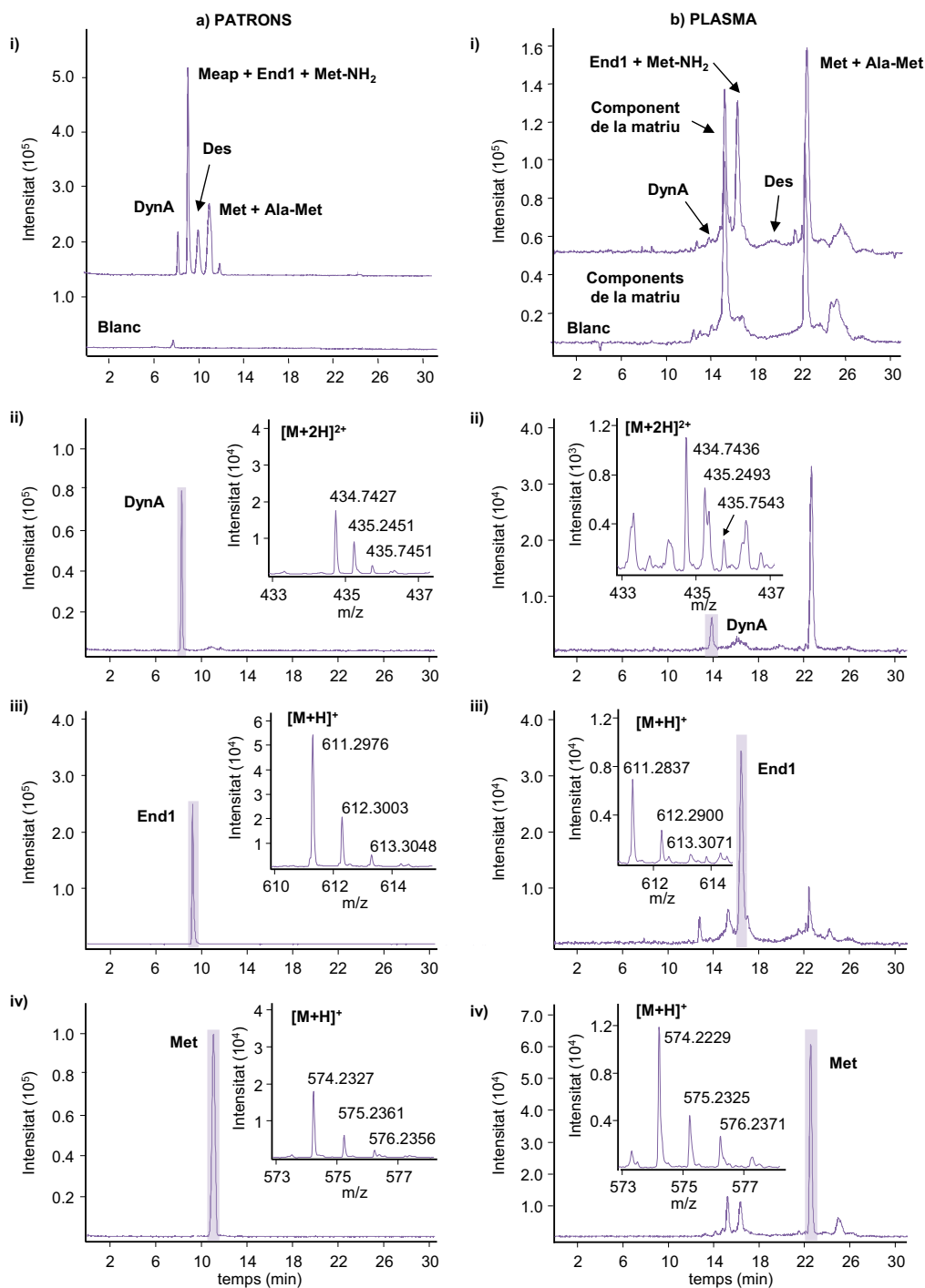


Figura 4.7. Suma dels EIE dels pèptids opiacis DynA, Met-NH₂, Meap, End1, Des, Met i Ala-Met d'una mescla de patrons d'1 ng·mL⁻¹ (a-i) i d'una mostra de plasma fortificada amb 1 ng·mL⁻¹ de cada pèptid (b-i) i els blancs corresponents, per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS. EIE dels pèptids opiacis DynA, End1 i Met dels patrons (a ii-iv) i de les mostres anteriors (b ii-iv) amb els espectres de masses corresponents.

4.1.4. Anàlisi dels pèptids opiàcis per C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS

Tot i haver optimitzat el tractament de les mostres de plasma humà i emprar la metodologia C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb el preconcentrador amb *frits* i la interfase de CE-MS amb líquid auxiliar, les concentracions dels pèptids opiàcis en fluids biològics encara són massa baixes per detectar-les. Per tal de disminuir els LOD, s'ha explorat la combinació de la SPE-CE amb una tècnica de preconcentració electroforètica anomenada isotacoforesi transitòria (tITP) (article 2.2).

Primerament, s'han establert les condicions de separació per a tITP-CE-UV compatibles amb l'espectrometria de masses. S'han optimitzat la composició i els volums d'injecció dels electròlits inicial i terminal tenint en compte els requeriments de mobilitat electroforètica per a una preconcentració i separació adequades i la seva volatilitat per poder emprar la detecció en línia per MS. Generalment, la millor alternativa consisteix en emprar solucions aquoses d'amoníac i d'àcid acètic com a electròlits inicial i terminal, respectivament, entre els quals s'injecta la mostra.

En aquest estudi, s'han provat diverses solucions aquoses amb un contingut d'amoníac i d'àcid acètic comprés entre el 0.1% i el 0.5% (v/v), les quals s'han introduït a 50 mbar durant 10, 15, 25 i 50 s, en el cas de l'electròlit inicial d'amoníac, i 10 i 15 s, en el cas de l'electròlit terminal d'àcid acètic. La mostra s'ha dissolt en la solució hidroorgànica que més tard s'utilitzarà per eluir els pèptids retinguts en SPE-CE (60:40 (v/v) metanol/aigua amb 50 mM d'àcid acètic i 50 mM d'àcid fòrmic). Els millors resultats s'han obtingut emprant solucions amb un 0.25% d'amoníac i un 0.1% d'àcid acètic introduïdes a 50 mbar durant 15 s.

A les figures 4.8 a i b es mostren els electroferogrames obtinguts en l'anàlisi d'una mescla de patrons de 10 µg·mL⁻¹ per CE-UV i tITP-CE-UV en les condicions òptimes. Com es pot observar, la isotacoforesi provoca que l'End1 i la Met comigrin en un pic extremadament estret i alt, segurament perquè les diferències entre les seves mobilitats electroforètiques no són suficients per a permetre la separació quan té lloc la tITP. En canvi, la DynA gairebé no es veu afectada per la tITP, probablement perquè la DynA conté dos grups ionitzables bàsics que en aquestes condicions de pH podrien estar carregats positivament, de manera que la seva

mobilitat electroforètica és superior a la dels altres dos pèptids i similar a la de l'ió amoni de l'electròlit inicial. Únicament els pèptids amb mobilitats electroforètiques compreses entre les mobilitats electroforètiques dels ions dels electròlits inicials i terminals (NH_4^+ i H_3O^+ , respectivament) són temporalment enfocats. La intensitat dels pics augmenta lleugerament quan disminueix el volum d'electròlit terminal, però la resolució disminueix encara més (article 2.2). Per aquest motiu, s'han escollit les condicions que ofereixen el millor compromís entre alçada de pic i resolució.

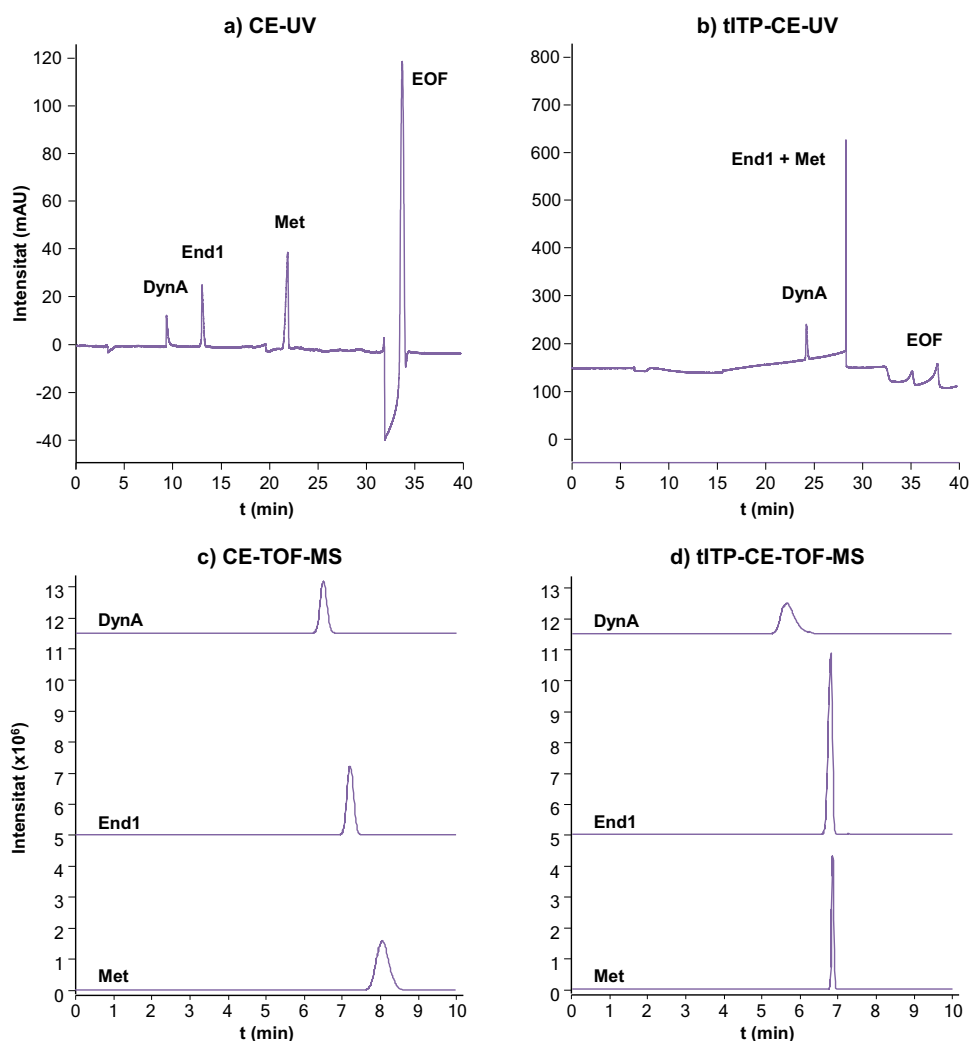


Figura 4.8. Electroferogrames d'una mescla de patrons de DynA, End1 i Met de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-UV (a) i tITP-CE-UV (b), en les condicions òptimes. EIE dels pèptids de la mescla anterior per CE-TOF-MS (c) i tITP-CE-TOF-MS (d), en les condicions òptimes.

La metodologia anterior s'ha adaptat lleugerament per analitzar els pèptids opiàcis per tITP-CE-TOF-MS. S'han introduït els electròlits inicial i terminal amb un contingut d'amoniàc i d'àcid acètic del 0.1, 0.25 i 0.5% (v/v) a 50 mbar durant 10 i 15 s. El millor compromís entre alçada de pic i resolució s'ha obtingut en condicions lleugerament diferents a les òptimes en tITP-CE-UV, concretament injectant les solucions amb un 0.1% d'amoniàc i un 0.1% d'àcid acètic a 50 mbar durant 15 s. L'augment del contingut d'amoniàc en l'electròlit inicial fins el percentatge òptim amb detecció UV (0.25%), empitjora els resultats obtinguts per a la Met i la DynA, mentre que la End1 manté la mateixa alçada de pic. Quan s'augmenta la concentració d'àcid acètic, l'esprai és inestable i com a conseqüència es produeixen caigudes de corrent.

A les figures 4.8 c i d es mostren els EIE de cadascun dels pèptids opiàcis d'una mescla de patrons de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS i tITP-CE-TOF-MS en les condicions òptimes. Els temps d'anàlisi són inferiors que amb la detecció UV per l'efecte d'aspiració provocat pel gas nebulitzador que fa disminuir els temps de migració i la resolució. De la mateixa manera que passava amb detecció UV, la tITP provoca que l'End1 i la Met comigrin mentre que la DynA pràcticament no es veu afectada. Tot i així, amb aquest detector es pot obtenir un EIE per avaluar per separat cadascun dels pèptids estudiats gràcies a les diferències en les masses moleculars.

Quan es combina la tITP amb la SPE-CE, és necessari aplicar una pressió adequada durant un temps determinat, després de la introducció de l'electròlit terminal, perquè la isotacoforesi tingui lloc just després de l'elució dels anàlits del preconcentrador. Aquesta pressió no pot ser molt elevada per evitar la barreja de l'electròlit inicial, l'eluent i l'electròlit terminal abans de travessar el preconcentrador. Amb aquesta finalitat, després de l'electròlit terminal, s'ha introduït BGE emprant diverses combinacions de pressió i temps d'introducció equivalents a 350 nL, volum que aproximadament equival a 8 cm del capil·lar de separació i supera els 7.5 cm on es localitza el preconcentrador. Les condicions que proporcionen els millors resultats són 5 mbar i 660 s. A la figura 4.9 es mostren els EIE de cadascun dels pèptids opiàcis d'una mescla de patrons de $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzada per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS i C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS en les condicions òptimes. Tal i com hem observat anteriorment, l'ús de la tITP permet obtenir pics considerablement més alts

i estrets per a l'End1 i la Met, tot i que es perd la seva separació, mentre que el pic corresponent a la DynA es manté inalterat.

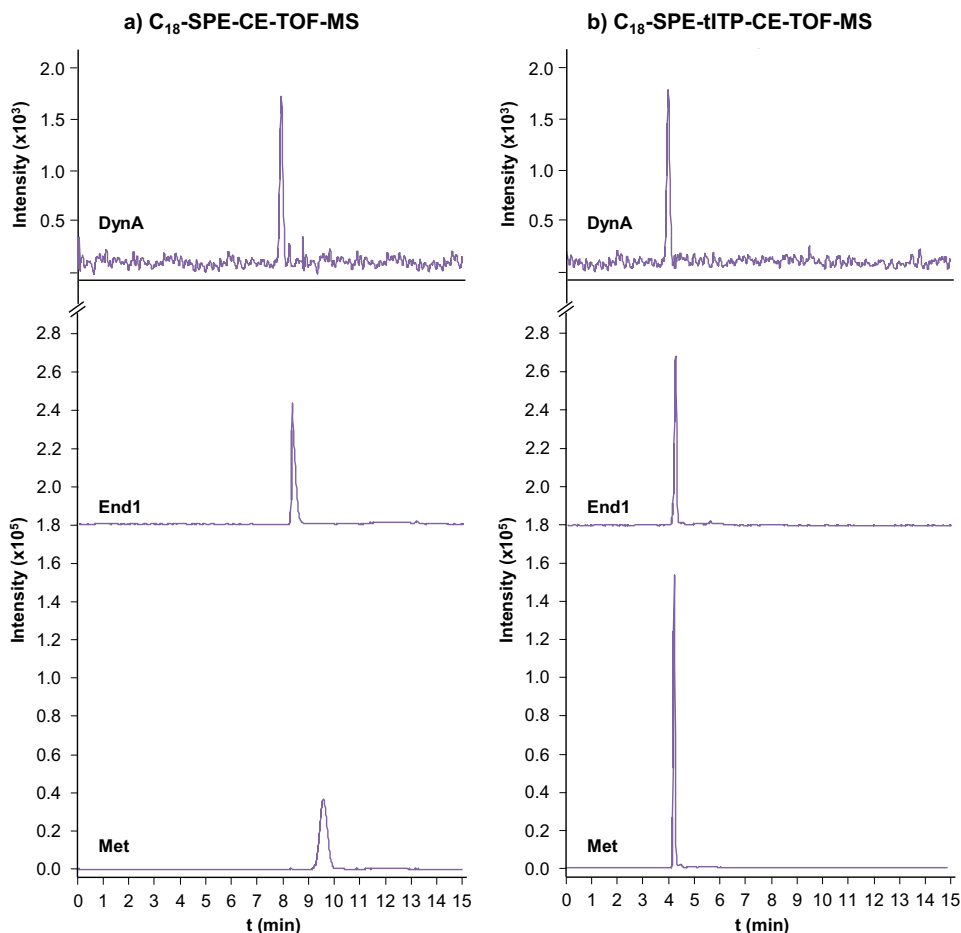


Figura 4.9. EIE dels pèptids opiàcis DynA, End1 i Met d'una mescla de patrons d'1 ng·mL⁻¹ per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (a) i C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS (b) en les condicions òptimes.

A les taules 4.3 i 4.4 s'indiquen els principals paràmetres de qualitat obtinguts quan s'analitzen mescles de patrons de pèptids opiàcis emprant les metodologies anteriors. Les repetibilitats en l'àrea de pic són significativament inferiors en C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS, probablement perquè la concentració estudiada és menor. El valor de %RSD més elevat correspon a la DynA que presenta el pic menys intens. Pel que fa als LOD, la tITP permet detectar l'End1 i la Met a concentracions un ordre de magnitud inferiors respecte el mateix mètode sense tITP i com era de preveure, no s'aconsegueixen millorar els LOD de la DynA, ja que no

es veu afectada per la isotacoforesi. Mitjançant la combinació de la tITP amb la SPE-CE, s'assoleixen LOD de $0.01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per a l'End1 i la Met i de $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per a la DynA, que suposen una millora de 10 i 5000 vegades els LOD obtinguts per a l'End1 i la Met per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS i CE-TOF-MS, respectivament.

Taula 4.3. Paràmetres de qualitat per a l'anàlisi de pèptids opiàcics en mescles de patrons per tITP-CE-TOF-MS

	tITP-CE-TOF-MS				CE-TOF-MS	
	Repetibilitat (%RSD) ($c=1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=10$)		M ($c=1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=10$)		LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
	A_{pic}	t_m	Precisió (* 10^{-5} %RSD)	Exactitud (ppm)		
DynA	3	1	2	4	0.05	0.05
End1	12	0.4	3	5	0.005	0.05
Met	9	0.4	5	1	0.005	0.05

Taula 4.4. Paràmetres de qualitat per a l'anàlisi de pèptids opiàcics en mescles de patrons per C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS

	C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS					C_{18} -SPE-CE-TOF-MS	
	Repetibilitat (%RSD) ($c=0.1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=10$)		M ($c=0.1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $n=10$)		Linealitat ^a ($c=0.01\text{-}1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
	A_{pic}	t_m	Precisió (* 10^{-4} %RSD)	Exactitud (ppm)	Recta de regressió ($R^2>0.99$)		
DynA	38	7	3	0.1	$A = 8 \times 10^6 C - 2 \times 10^5$	0.1	0.1
End1	24	5	3	0.01	$A = 3 \times 10^6 C - 1 \times 10^5$	0.01	0.1
Met	21	5	3	0.01	$A = 8 \times 10^6 C + 4 \times 10^3$	0.01	0.1

^a Linealitat del pèptid DynA de $c=0.1\text{-}1\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Finalment, s'han analitzat mostres de plasma fortificades amb els pèptids mitjançant la metodologia desenvolupada (figura 4.10).

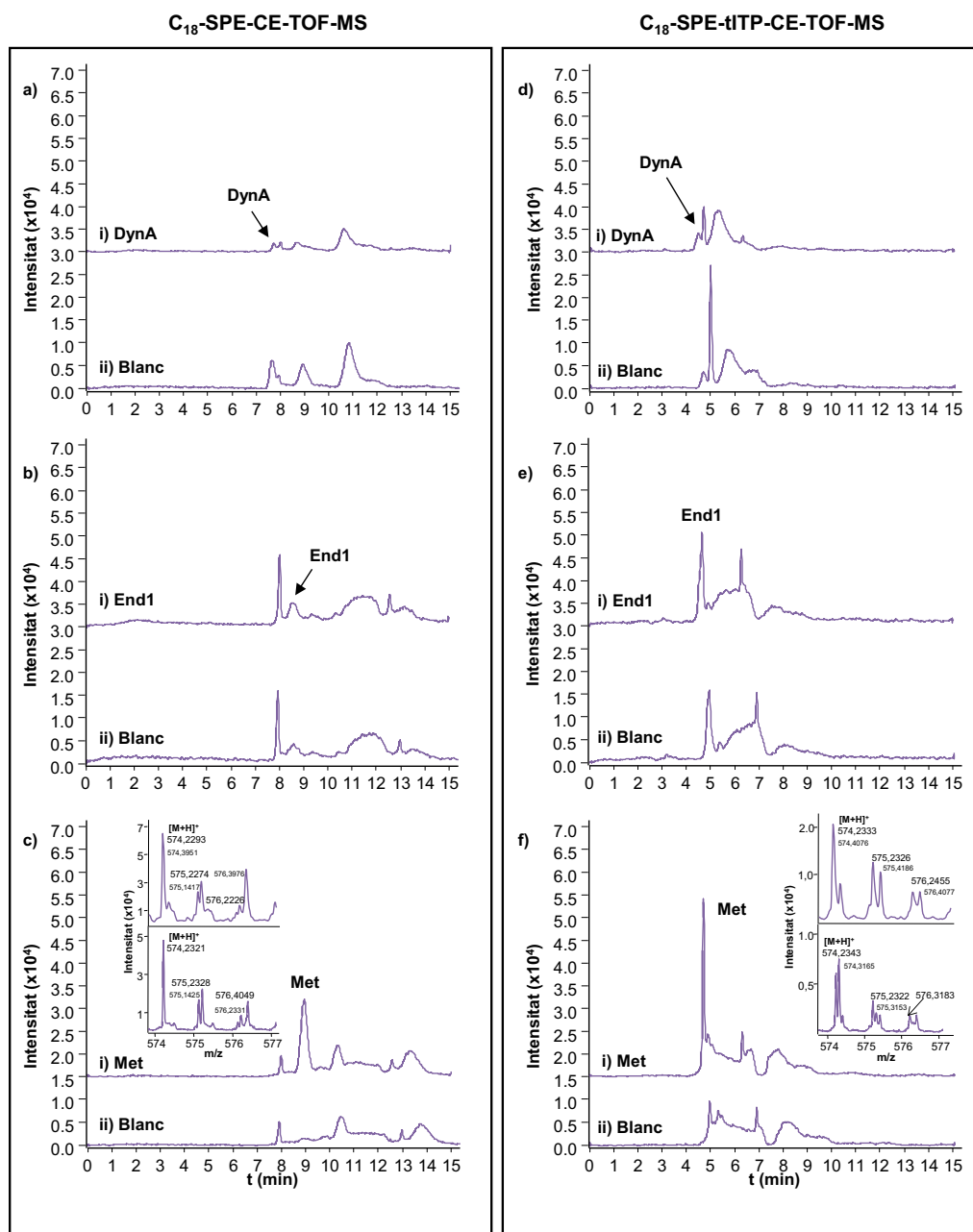


Figura 4.10. EIE dels peptidis opiacis DynA, End1 i Met d'una mostra de plasma fortificada amb $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cadascun dels peptidis (i) i un blanc de plasma (ii) per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (a) i C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS (b) en les condicions òptimes. En els electroferogrames c) i f) s'ha inserit l'espectre de masses de la Met a 2 i 4 GHz.

La tITP provoca la preconcentració dels pèptids opiacis juntament amb els components de la matriu i una disminució important de la separació electroforètica que dóna lloc a la comigració de diversos components. L'elevada exactitud i resolució de l'espectròmetre de masses amb TOF han permès identificar els pics corresponents a cadascun dels pèptids opiacis d'acord als valors de les relacions m/z dels ions moleculars. No obstant, per aconseguir millors resultats s'ha de treballar a la màxima resolució que permet l'analitzador, com es pot observar a l'espectre de masses de la Met (figures 4.10 c i f).

Els pèptids opiacis en plasma s'han pogut detectar a $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Novament, aquests LOD impliquen una lleugera millora dels LOD obtinguts per a l'End1 i la Met en mostres de plasma per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS (1 i $0.5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament) (taula 4.1). Aquests valors de concentració són propers als que es troben en mostres biològiques. No obstant, la disminució de la separació electroforètica és un gran inconvenient en l'anàlisi de mostres complexes. Caldria utilitzar una fase estacionària més selectiva que la fase estacionària C_{18} , com són les fases estacionàries d'immunoafinitat, per evitar preconcentrar també interferències.

4.1.5. Anàlisi de pèptids opiacis per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS amb un preconcentrador sense *frits*

A l'article 2.3 d'aquesta tesi doctoral, s'ha avaluat l'ús d'un preconcentrador empaquetat sense *frits* (figura 4.2 b, pàg. 170). Primerament, s'ha optimitzat l'anàlisi dels pèptids opiacis per C_{18} -SPE-CE-UV i aquesta metodologia s'ha adaptat a la detecció per TOF-MS. En aquest cas, l'optimització ha estat més detallada perquè no es disposava d'experiència prèvia. Aquests resultats s'han comparat amb els obtinguts amb el preconcentrador amb *frits* (figura 4.2 a).

4.1.5.1. C_{18} -SPE-CE-UV

Durant el procés d'optimització, una de les etapes estudiades ha estat la introducció de la mostra, que s'ha avaluat a 930 mbar a diversos temps emprant preconcentradors de 2, 4 i 7 mm de longitud. S'ha mesurat el cabal de líquid a

través del capil·lar en els tres casos i s'ha observat que el preconcentrador de 7 mm, a diferència dels altres dos, provoca una certa contrapressió. Això fa que en el mateix temps s'introdueixi un volum de mostra menor, donant lloc a àrees de pic més petites. Per aquest motiu, s'ha descartat el seu ús. A la figura 4.11 es mostren els resultats obtinguts amb els preconcentradors de 2 i 4 mm pels pèptids estudiats. Com es pot observar, l'àrea dels pics eluïts augmenta a mesura que s'incrementa el temps d'introducció de mostra i aquesta tendència és similar per ambdós preconcentradors. Per a la resta d'experiments s'han utilitzat preconcentradors de 4 mm, ja que la repetibilitat és superior a la que s'observa amb els preconcentradors de 2 mm i a més, són més senzills de manipular i preparar. Tot i que les àrees dels pics són més grans quan el temps d'introducció de mostra augmenta, s'ha seleccionat 10 min perquè el temps total d'anàlisi és considerablement més curt i perquè, com s'explicarà posteriorment, s'ha comprovat que els LOD no milloren introduint la mostra durant més temps. També, s'ha estudiat l'elució a 50 mbar durant 30, 40, 50 i 60 s, i s'ha observat que les àrees dels pics eluïts són lleugerament més grans injectant l'eluent durant 50 s.

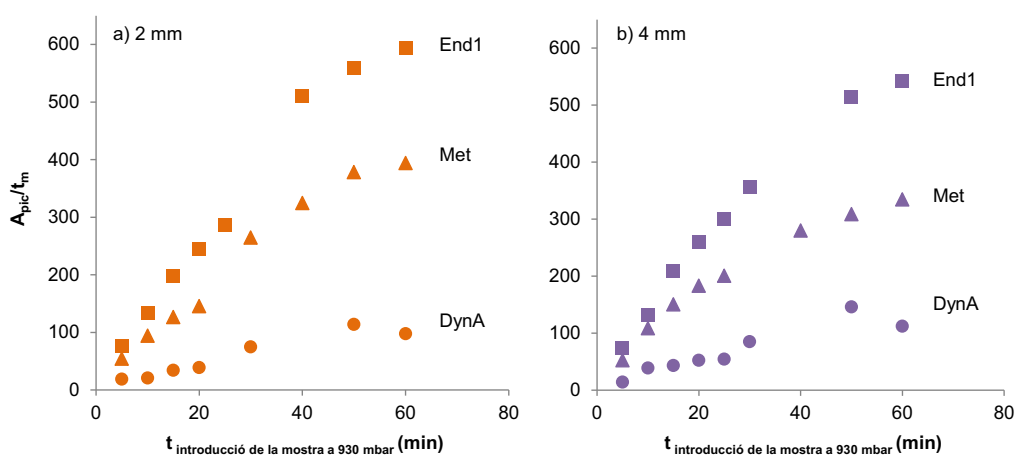


Figura 4.11. Efecte del temps d'introducció de la mostra a 930 mbar (elució a 50 mbar durant 40 s) en l'àrea dels pics eluïts de la DynA (●), l'End1 (■) i la Met (▲) d'una mescla de patrons d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C_{18} -SPE-CE-UV amb preconcentrador sense *frits* de longituds: a) 2 mm i b) 4 mm.

La recuperació dels pèptids opiacis en la preconcentració en línia s'ha estimat en valors de 22, 66 i 78% per a la DynA, l'End1 i la Met, respectivament, mitjançant la comparació de les àrees dels pics dels pèptids obtinguts amb i sense preconcentració, tenint en compte la concentració i el volum de la mescla de patrons introduïda. Els resultats indiquen que el procés d'extracció és més eficient per a l'End1 i la Met que per a la DynA. Això podria ser degut a que la DynA és el pèptid més gran i més polar, especialment perquè les arginines de la seva cadena peptídica contenen un grup ionitzable bàsic.

A la figura 4.12 es mostra un electroferograma d'una mescla de pèptids opiacis analitzada per C_{18} -SPE-CE-UV amb el preconcentrador sense *frits* de 4 mm de longitud en les condicions òptimes. La separació electroforètica obtinguda és molt similar a la que s'ha observat prèviament per a preconcentradors amb *frits* (figura 4.3 a-i, pàg. 173).

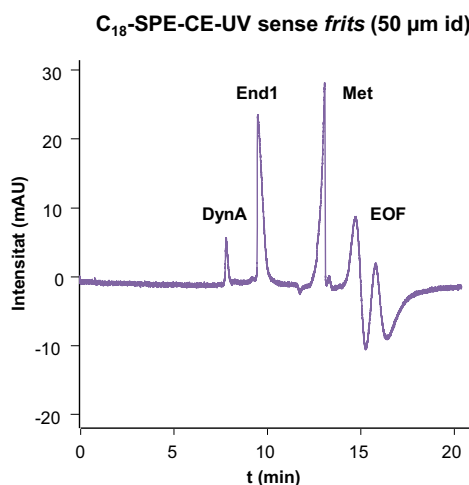


Figura 4.12. Electroferograma d'una mescla de patrons de DynA, End1 i Met de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C_{18} -SPE-CE-UV amb preconcentrador sense *frits*.

A la taula 4.5 s'indiquen els valors obtinguts de repetibilitat en l'àrea de pic (A_{pic}) i temps de migració (t_m), la linealitat i els LOD quan s'analitzen mescules patrons per C_{18} -SPE-CE-UV amb el preconcentrador sense *frits*. Com es pot observar, la repetibilitat obtinguda presenta valors acceptables tan en l'àrea de pic com en temps de migració per als tres pèptids. Respecte a la linealitat, els coeficients de

correlació de les rectes de regressió són bons ($R^2 > 0.99$), però l'interval de linealitat no és gaire ampli. Els LOD estan limitats pel reduït volum de mostra introduït a causa del propi disseny del preconcentrador. Per tal de millorar els LOD s'ha intentat incrementar el temps d'introducció, però s'ha comprovat que aquest augment no proporciona una millora significativa dels LOD. Quan s'introdueix la mostra a 930 mbars durant 60 min, únicament s'aconsegueix millorar la detecció de l'End1 en un ordre de magnitud ($0.01 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quan el temps d'introducció de mostra és elevat, la probabilitat d'eluir quantitativament els pèptids retinguts és més elevada, especialment si la solució introduïda és molt diluïda i la quantitat retinguda, molt petita.

4.1.5.2. C₁₈-SPE-CE-TOF-MS

Abans d'adaptar la metodologia establerta per a la detecció amb MS, s'han optimitzat els paràmetres de l'espectròmetre de masses, ja que aquest pertany a una casa comercial diferent (*Bruker Daltonics, Bremen, Germany*) al que s'havia utilitzat en els estudis discutits prèviament (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya*). Tot seguit s'han analitzat pèptids opiacis per CE-TOF-MS emprant capil·lars de separació de diàmetre intern $50 \mu\text{m}$ i també $75 \mu\text{m}$ per posteriorment poder comparar els resultats obtinguts amb els preconcentradors amb i sense *frits*.

A la figura 4.13 a es mostra un electroferograma dels tres pèptids estudiats en les condicions òptimes amb un capil·lar de $50 \mu\text{m}$ id i a la taula 4.5 b es resumeixen els principals paràmetres de qualitat. Els valors de repetibilitat en l'àrea de pic (A_{pic}) i en el temps de migració (t_m) són similars als obtinguts en treballs previs [218]. Els tres pèptids presenten intervals de linealitat i coeficients de correlació ($R^2 > 0.99$) bons. Els LOD són 50 vegades millors emprant l'espectròmetre de masses com a detector respecte la detecció UV ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Si s'utilitza el capil·lar de separació amb $75 \mu\text{m}$ id, s'aconsegueixen millorar lleugerament els LOD ($0.05 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) i aquests valors són iguals als que s'obtenen amb l'altre analitzador TOF (pàg. 177) [218].

Taula 4.5. Paràmetres de qualitat per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mescles de patrons per C₁₈-SPE-CE-UV, CE-TOF-MS i C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant el preconcentrador sense *frits* (capil·lars de separació de 50 µm id) i els LOD corresponents amb capil·lars de separació de 75 µm id, en les condicions òptimes.

		50 µm				75 µm	
		Sense frits					Amb frits
a) C ₁₈ -SPE-CE-UV	Repetibilitat (%RSD) (c=0.5µg·mL ⁻¹ , n=15)		Linealitat		LOD (µg·mL ⁻¹)	LOD (µg·mL ⁻¹)	
	A _{pic}	t _m	c (µg·mL ⁻¹)	Recta de regressió (R ² >0.99)			
DynA	17	7	0.5 – 10	A = 335.1 C – 142.9	0.5	0.01	
End1	10	7	0.1 – 4	A = 783.5 C – 105.6	0.1	0.01	
Met	12	7	0.1 – 2	A = 1073.6 C – 78.7	0.1	0.01	
		Sense SPE					Sense SPE
b) CE-TOF-MS	Repetibilitat (%RSD) (c=1µg·mL ⁻¹ , n=15)		Linealitat		LOD (µg·mL ⁻¹)	LOD (µg·mL ⁻¹)	
	A _{pic}	t _m	c (µg·mL ⁻¹)	Recta de regressió (R ² >0.99)			
DynA	10	1	0.1 - 100	A = 7x10 ⁴ C + 5x10 ⁴	0.1	0.05	
End1	11	1	0.1 - 100	A = 7x10 ⁴ C + 6x10 ⁴	0.1	0.05	
Met	9	2	0.1 - 100	A = 7x10 ⁴ C - 4x10 ⁴	0.1	0.05	
		Sense frits					Amb frits
c) C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	Repetibilitat (%RSD) (c=25ng·mL ⁻¹ , n=15)		Linealitat		LOD (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)	
	A _{pic}	t _m	c (ng·mL ⁻¹)	Recta de regressió (R ² >0.99)			
DynA	12	4	5 - 60	A = 3x10 ² C + 2x10 ³	1	0.1	
End1	15	5	5 - 60	A = 1x10 ³ C + 4x10 ³	1	0.1	
Met	27	5	5 - 60	A = 4x10 ³ C + 6x10 ⁴	1	0.1	

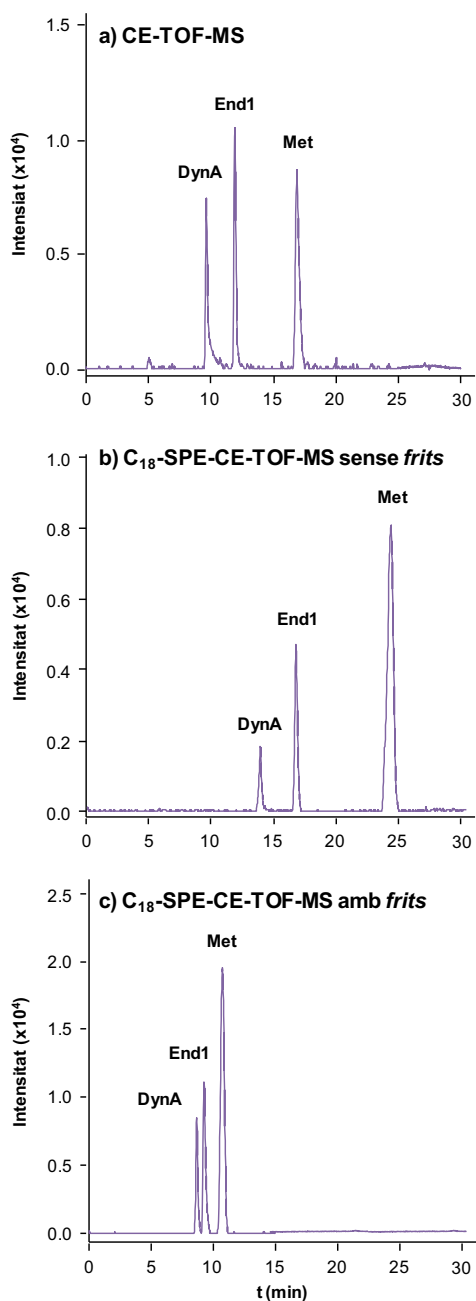


Figura 4.13. Suma dels EIE dels pèptids DynA, End1 i Met de mesclades de patrons d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS (a) i $60 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb preconcentradors sense (b) i amb frits (c), respectivament, en les condicions òptimes.

La metodologia establerta per C_{18} -SPE-CE-UV s'ha transferit a C_{18} -SPE-CE-TOF-MS amb preconcentradors sense *frits*. Com es pot observar a la figura 4.13 b, els temps de migració dels pèptids opiacis augmenten considerablement respecte a CE-TOF-MS (figura 4.13 a) quan s'insereix el preconcentrador sense *frits* en el capil·lar de separació (50 μm id). Es podria pensar que això és degut a la presència d'una contrapressió induïda pel preconcentrador que restringeix el cabal de líquid. No obstant, els estudis realitzats sobre el cabal de líquid a través del capil·lar han demostrat que no existeixen diferències entre els sistemes amb i sense preconcentrador. La presència de l'eluent, que és una solució menys conductora que l'electròlit de separació, disminueix el corrent elèctric a l'inici de la separació electroforètica i probablement, aquesta és la causa principal de l'augment dels temps d'anàlisi.

Els paràmetres de qualitat corresponents es resumeixen a taula 4.5 c. Els valors de %RSD en àrees de pic (A_{pic}) i temps de migració (t_m) són similars als dels treballs previs (taula 4.1, pàg. 179). Els pèptids es poden detectar a $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (taula 4.5 c), el que implica una millora de 100 vegades respecte als LOD obtinguts sense preconcentració (taula 4.5 b).

Si comparem els electroferogrames obtinguts utilitzant preconcentradors amb i sense *frits* (figures 4.13 c i b, respectivament), s'observa que els temps d'anàlisi amb *frits* són considerablement més petits i l'alçada dels pics és superior, tot i que la concentració és inferior. Aquestes diferències en els temps de migració podrien ser degudes a que el volum d'eluent injectat en el preconcentrador sense *frits* (50 mbars, 50 s equivalent a 54 nL) ocupa una longitud de capil·lar de separació més gran que en el cas del preconcentrador amb *frits* (34 mm vs. 12 mm), i possiblement això fa que la disminució del corrent elèctric a l'inici de la separació electroforètica sigui més important.

Per tal de comparar els LOD obtinguts amb els dos preconcentradors, s'ha de tenir en compte que s'utilitzen capil·lars de separació de diàmetre intern diferent. S'ha comprovat que els LOD dels pèptids opiacis analitzats per CE-TOF-MS són pràcticament els mateixos emprant capil·lars de separació de 50 i 75 μm id (taula 4.5 b). En canvi, quan s'incorporen els preconcentradors, amb el disseny amb *frits* és possible disminuir un ordre de magnitud els LOD respecte l'altre disseny

(taula 4.5 c). Per tant, aquesta diferència de concentracions ha d'estar relacionada amb el sistema de preconcentració en línia. En el preconcentrador amb *frits*, es pot introduir un volum de mostra més gran en el mateix temps (76 μL vs. 15 μL) perquè el diàmetre intern del capil·lar de separació és major (75 μm vs. 50 μm). Aquest preconcentrador també conté més quantitat de fase estacionària (0.34 mm^3 vs. 0.07 mm^3) i aquesta no ha estat tamisada, de manera que les partícules que la componen presenten un ampli rang de diàmetres i l'àrea de superfície activa és major. A més, els pics que s'obtenen presenten una elevada eficàcia, que també podria afavorir la disminució dels LOD.

Per avaluar l'aplicabilitat dels preconcentradors sense *frits* per a l'anàlisi de mostres biològiques, s'han analitzat els pèptids opiacis en mostres de líquid cerebroespinal (CSF) mitjançant C_{18} -SPE-CE-TOF-MS en condicions òptimes. El CSF s'ha fortificat amb una mescla de DynA, End1 i Met i s'ha sotmès a un tractament previ a l'anàlisi. Com que la matriu del CSF és menys complexa que la del plasma, únicament ha estat necessària una precipitació amb acetonitril. Els valors de repetibilitat en l'àrea de pic (8-11%) i en el temps de migració (6-9%) són similars als obtinguts amb mescles de patrons i els pèptids opiacis s'han pogut detectar fins a 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aquests LOD només són cinc vegades més petits que els obtingut pels patrons (1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). La durabilitat dels preconcentradors sense *frits* amb mostres de CSF és inferior a la dels preconcentradors amb *frits* amb mostres de plasma (8 anàlisis vs. 20 anàlisis aproximadament).

Considerant els resultats anteriors, avui en dia és més recomanable utilitzar preconcentradors amb *frits* perquè a més de permetre emprar fases estacionàries amb partícules de qualsevol mida i capil·lars de separació de qualsevol diàmetre intern, permeten introduir volums elevats de mostra en poc temps, minimitzant el possible rentat dels anàlisis retinguts i afavorint la seva preconcentració. D'altra banda, els preconcentradors sense *frits* presenten dos grans avantatges, són més fàcils de construir i la resolució de les separacions electroforètiques és millor.

4.1.6. Anàlisi dels pèptids opiacis per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb una interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar

Les interfases d'ESI més habituals per a l'acoblament CE-MS són les de líquid auxiliar (*sheathflow interface*). Aquesta interfase està comercialment disponible des de fa anys (*Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanya*), és fàcil d'utilitzar, permet l'ús de capil·lars de sílice fosa amb dimensions convencionals (50 o 75 µm id i 365 µm od), és robusta i proporciona una bona repetibilitat en les anàlisis. No obstant, el líquid auxiliar dilueix els anàlits a la sortida del capil·lar de separació. Les interfases d'ESI sense líquid auxiliar (*sheathless interface*) permeten superar aquest inconvenient i poden oferir una major sensibilitat. Algunes d'elles únicament permeten treballar amb microESI a causa dels cabals de líquid que proporcionen els capil·lars de separació emprats (50 o 75 µm id) i també presenten l'inconvenient de que el BGE ha de contenir solvent orgànic per a facilitar la ionització [219]. En aquesta tesi doctoral s'ha avaluat una nova interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar per a l'anàlisi de pèptids opiacis per CE-TOF-MS i C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant un nou disseny de preconcentrador compatible amb les dimensions dels capil·lars necessaris per a aquesta interfase.

A l'article 2.4, s'ha utilitzat un prototip d'interfase nano-ESI sense líquid auxiliar desenvolupat per *Beckman Coulter (Brea, CA, USA)*, basat en un disseny introduït originalment per M. Moini (figura 4.14 a) [147]. La interfase de nano-ESI està especialment dissenyada per a manipular cabals de líquid petits, típics en CE, de manera que la ionització és més eficaç i s'aconsegueix millorar la sensibilitat. No s'utilitza gas de nebulització i no requereix de líquid auxiliar. En aquest innovador disseny, la sílice fosa dels últims 3 o 4 cm de la sortida del capil·lar de separació es tracta amb àcid fluorhídric, el qual provoca la formació d'un gran nombre de petits porus (d'aproximadament 5 µm de diàmetre) a la paret del capil·lar permetent el contacte elèctric entre l'interior i l'exterior, sense diluir els anàlits. La punta porosa es col·loca en un capil·lar d'acer inoxidable (figura 4.14 b). El contacte elèctric s'estableix omplint el capil·lar metàl·lic amb una solució conductora, en general el mateix electròlit de separació, mitjançant un altre capil·lar de sílice fosa, abans de començar cada anàlisi. El capil·lar de separació ha de tenir 30 µm id i 150 µm od per tal de que el tractament amb àcid fluorhídric per a la formació de la punta

porosa HSPS sigui eficaç i per a permetre la formació d'un bon esprai. El capil·lar metàl·lic amb la punta porosa es col·loca en una plataforma-XYZ per orientar-la adequadament cap a l'orifici d'entrada de l'espectròmetre de masses (figura 4.14 c) [149, 150, 152, 153]. La distància de la punta porosa respecte l'entrada de l'espectròmetre de masses s'ha d'optimitzar per infusió directa, a velocitat similar a la del flux electroosmòtic, d'una mescla de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dels pèptids opiacis per tal d'aconseguir un esprai estable i la màxima senyal dels nostres anàlits. La distància que ha proporcionat millor senyal és 3 mm aproximadament. Això suposa una gran diferència respecte a la interfase amb líquid auxiliar emprada a la resta de la tesi doctoral, en la que la interfase s'instal·la en un suport que la manté fixa en la posició ortogonal òptima respecte a l'entrada de l'espectròmetre de masses (figura 1.7, pàg. 44).

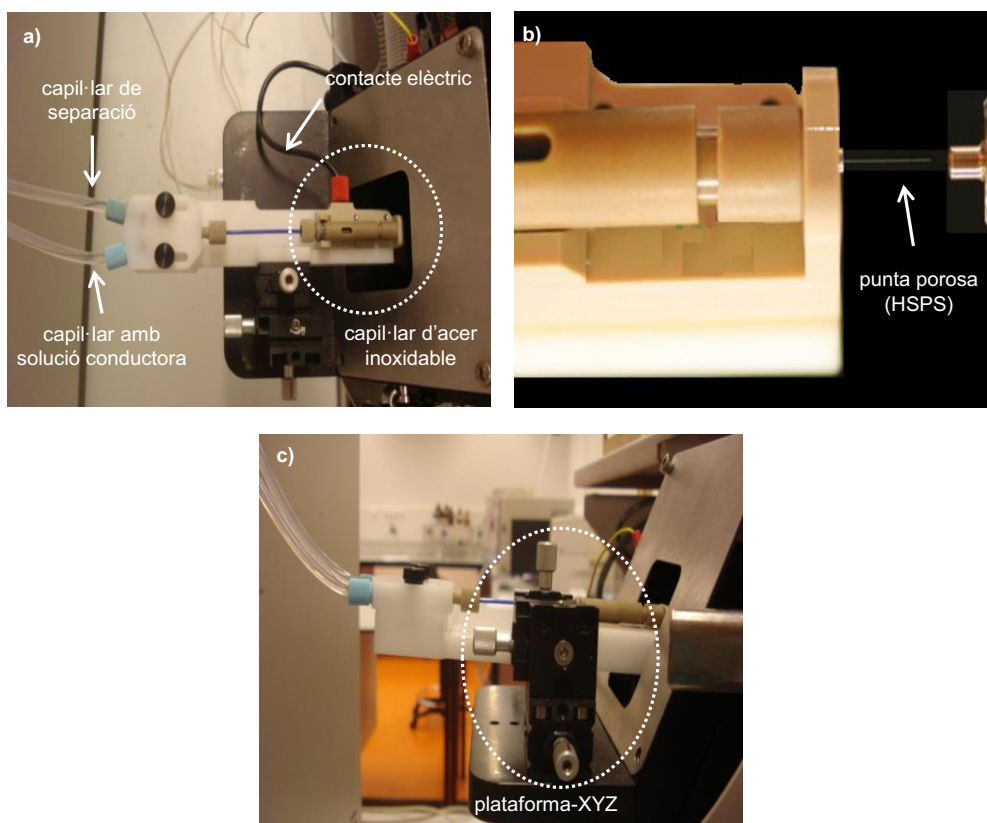


Figura 4.14. Prototip d'interfase nano-ESI sense líquid auxiliar desenvolupat per *Beckman Coulter* (Brea, CA, USA) (a), punta porosa (HSPS) del capil·lar de separació (s'ha ressaltat amb un rectangle gris) (b) i plataforma-XYZ (c).

Un altre dels inconvenients de la interfase nano-ESI sense líquid auxiliar és que quan el flux electroosmòtic del sistema no és suficient per a mantenir un esprai estable, s'ha d'aplicar pressió durant la separació electroforètica. En els experiments de l'article 2.4, l'aplicació d'aproximadament 15 mbar ha proporcionat el millor compromís entre estabilitat d'esprai, intensitat de pic i separació electroforètica.

En aquest treball, s'han variat les mínimes condicions possibles per a poder comparar amb exactitud ambdues interfases (articles 2.3 i 2.4). Els paràmetres de l'espectròmetre de masses amb TOF són els mateixos en ambdós casos, a excepció del potencial del capil·lar i el cabal del gas de d'assecat. Com que en el cas de la interfase sense líquid auxiliar els cabals de líquid a ionitzar són inferiors, s'aconsegueix un esprai estable quan el potencial de capil·lar és molt baix, entre 1200 i 1500 V (4000 V amb líquid auxiliar i el mateix instrument, article 2.3), i el cabal de gas d'assecat de $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ és el que proporciona el millor compromís entre estabilitat d'esprai i intensitat de pic.

A la figura 4.15 es mostren els electroferogrames de dues mesclades de patrons de DynA, End1 i Met d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzades per CE-TOF-MS amb les interfases amb i sense líquid auxiliar, respectivament, emprant capil·lars de separació de $30 \mu\text{m}$ id i diàmetre extern adequat per a cada interfase ($150 \mu\text{m}$ i $365 \mu\text{m}$ od, respectivament). Si es comparen aquests electroferogrames, s'observa que la resolució i forma dels pics són similars. No obstant, els pics dels pèptids són aproximadament 10 vegades més intensos emprant la interfase sense líquid auxiliar (figura 4.15 b), tot i que la mostra és 10 vegades més diluïda, fet que posa de manifest la millora de sensibilitat. Els LOD obtinguts amb aquesta interfase són $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ pels pèptids opiacis estudiats (taula 4.6).

Per a millorar els LOD i apropar-se més a les concentracions biològiques, la combinació de la preconcentració en línia amb CE-TOF-MS emprant la interfase nano-ESI sense líquid auxiliar podria ser una bona alternativa. Només alguns autors s'han interessat en aquesta combinació per la dificultat de l'acoblament del sistema de preconcentració amb els capil·lars de separació de diàmetres intern i extern petits adequats per a la interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar (30 i $150 \mu\text{m}$) [177-182]. Únicament Wang et al han demostrat que és possible acoblar un

microcartutx (1 mm longitud total, 100 μm id i 360 μm od) amb partícules empaquetades de fase estacionària C_8 i només un *frit* amb un capil·lar de separació amb HSPS per a l'anàlisi de proteïnes [183]. El disseny desenvolupat a l'article 2.4 consta d'un preconcentrador sense *frits* més gran i que conté més fase estacionària (figura 4.2 c, pàg. 170).

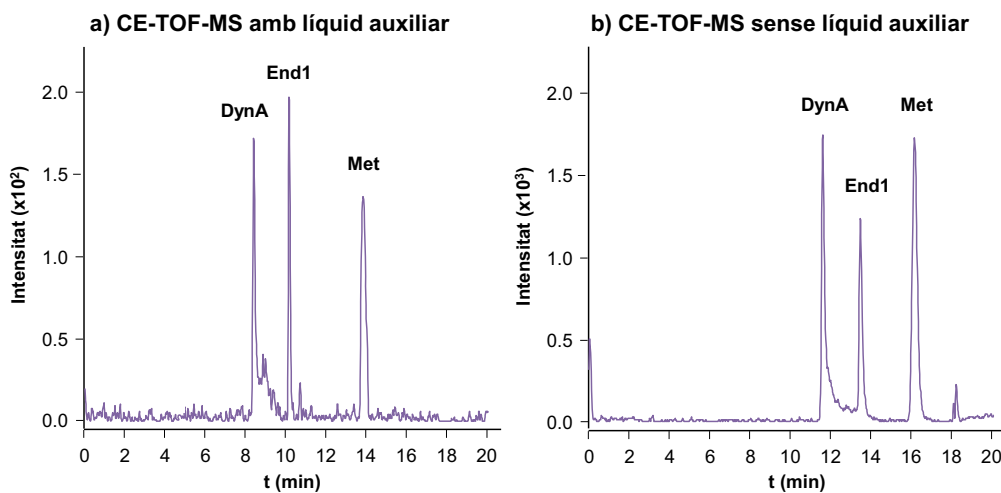


Figura 4.15. Suma dels EIE de mesclades de patrons de DynA, End1 i Met d' $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS emprant les interfases d'ESI amb líquid auxiliar (a) i nano-ESI sense líquid auxiliar (b).

Com que la disponibilitat dels capil·lars de separació amb punta porosa és limitada, primerament s'ha provat el nou disseny de preconcentrador emprant la interfase amb líquid auxiliar. En aquest cas, el fragment del capil·lar de sortida no presenta la punta porosa i els diàmetres d'aquest capil·lar són 30 μm id i 150 μm od, tot i que aquest diàmetre extern no és el més adequat per a aquesta interfase. S'ha optimitzat el potencial de separació, la introducció de mostra i el temps d'elució. S'han aplicat 15 KV durant la separació perquè el capil·lar es trenca quan s'apliquen potencials superiors durant períodes llargs, malgrat que es compleix la llei d'Ohm. Aquest fet podria ser degut a un gradient de temperatura generat pel potencial aplicat com a conseqüència d'utilitzar un capil·lar de separació amb diàmetre extern inferior a l'òptim per a la interfase amb líquid auxiliar (365 μm od). De fet, en les anàlisis posteriors per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS emprant la interfase sense líquid auxiliar, es poden aplicar 30 KV sense provocar el trencament del capil·lar de separació.

Taula 4.6. LOD experimentals dels pèptids opiàcics estudiats per CE-TOF-MS i C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant les interfases de CE-MS amb i sense líquid auxiliar, en condicions òptimes. En cada cas s'indica el diàmetre intern (id, μm) i extern (od, μm) del capil·lar de separació.

Metodologia / Pèptid opiàcic		Capil·lar de separació		LOD ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
		id (μm)	od (μm)	DynA	End1	Met
ESI amb líquid auxiliar	CE-TOF-MS	30	365	500	500	500
		50	365	100	100	100
	C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	30	150	10	10	5
nano-ESI sense líquid auxiliar	CE-TOF-MS	30	150	10	10	10
	C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	30	150	0.002	0.002	0.002

Respecte a la introducció de mostra i el temps d'elució, 750 s (1.5 μL) i 200 s (22 nL), respectivament, proporcionen les àrees de pic més grans. El factor més determinant és el temps d'elució, perquè a temps inferiors a 100 s no s'observen pics i a temps superiors a 300 s el corrent elèctric durant la separació no és estable. A la figura 4.16 a es mostra la suma dels EIE de la DynA, l'End1 i la Met en una mescla de patrons de $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzada en les condicions òptimes. Mitjançant aquesta metodologia les mínimes concentracions de pèptids opiàcics que es detecten són $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DynA i End1 i $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Met, les quals són 10 i 20 vegades més baixes que les concentracions detectades per CE-TOF-MS amb la interfase de CE-MS amb líquid auxiliar i un capil·lar de 50 μm id i 365 μm od (taula 4.6).

Una vegada demostrat que el nou disseny de preconcentrador funciona correctament, s'ha avaluat el seu ús emprant la interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar. Tal i com s'observa a la figura 4.16 b, la resolució dels pics és similar a la obtinguda amb la interfase amb líquid auxiliar, però els pics són més estrets i el soroll de fons és molt menor. A diferència de Wang et al que observen una disminució de la resolució en C₁₈-SPE-CE-MS respecte sense preconcentració amb interfases sense líquid auxiliar [180, 183], emprant el disseny de preconcentrador desenvolupat, s'obté una bona separació dels pèptids opiàcics (figures 4.16 a i 4.16 b). En C₁₈-SPE-CE-TOF-MS, el temps d'anàlisi és molt superior al de

CE-TOF-MS per la presència del preconcentrador, que provoca un augment de la pressió del sistema. Aquest temps es pot reduir a la meitat aproximadament aplicant una pressió de 50 mbar durant la separació, que permet mantenir la mateixa resolució (article 2.4). Per tal d'obtenir aquests resultats és important construir un preconcentrador en el que les connexions entre aquest i els capil·lars de separació evitin la presència de volums morts que poden donar lloc a la pèrdua de separació.

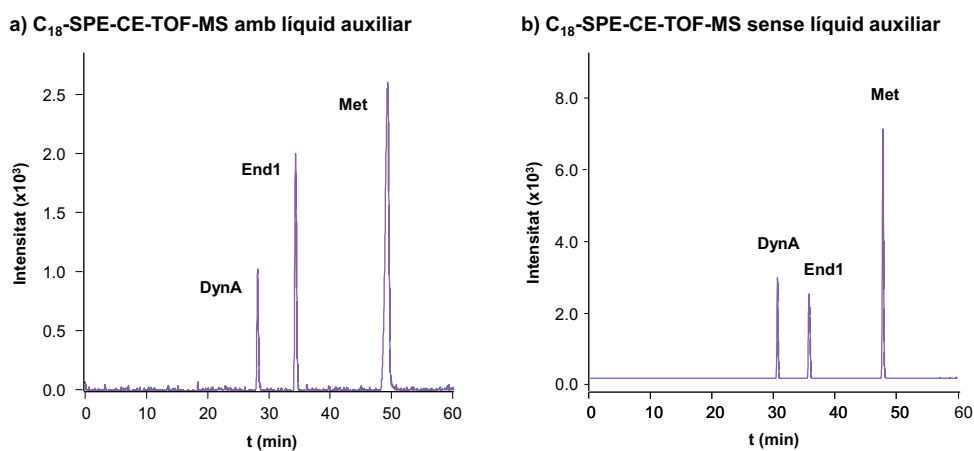


Figura 4.16. Suma dels EIE de mesclades de patrons de DynA, End1 i Met de $80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant les interfases d'ESI amb líquid auxiliar (a) i nano-ESI sense líquid auxiliar (b). Capil·lar de separació de $30 \mu\text{m}$ id i $150 \mu\text{m}$ od amb el nou disseny de preconcentrador

Els valors de repetibilitat en l'àrea (A_{pic}) i el temps de migració (t_m) i la linealitat que s'obtenen per a l'anàlisi de pèptids opiacis mitjançant la metodologia establerta són satisfactoris (taula 4.7). Pel que fa als LOD, quan la mostra s'introdueix a 930 mbars durant 12.5 min ($1.5 \mu\text{L}$), els pèptids opiacis es detecten a $10 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Aquests LOD es poden disminuir fins a $2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ introduint la mostra a 930 mbar durant 60.5 min ($8 \mu\text{L}$) sense pèrdua d'eficàcia de les separacions (article 2.4), la qual cosa implica una millora de 5000 vegades respecte als LOD obtinguts sense preconcentració ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, taula 4.6). Aquestes millores dels LOD són superiors a les obtingudes per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb el preconcentrador amb frits i amb la interfase amb líquid auxiliar ($0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, taula 4.1, pàg. 179). Aquests LOD són difícils de comparar amb els de la bibliografia, perquè Wang et al, que utilitzen la mateixa interfase sense líquid auxiliar, no determinen els LOD [183].

Taula 4.7. Paràmetres de qualitat per l'anàlisi de pèptids opiacis en mescles de patrons per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb la interfase de CE-MS sense líquid auxiliar. Introducció de mostra a 930 mbar durant 12.5 min (1.5 µL).

C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS				
	Repetibilitat (%RSD) (c=5ng·mL ⁻¹ , n=5)		Linealitat (c=0.1-5ng·mL ⁻¹)	LOD (pg·mL ⁻¹)
	A _{pic}	t _m	Recta de regressió (R ² >0.99)	
DynA	8	4	A = 23x10 ⁴ C + 0.7 x10 ⁴	10
End1	7	4	A = 94x10 ⁴ C + 23x10 ⁴	10
Met	6	2	A = 300x10 ⁴ C - 5x10 ⁴	10

Els resultats obtinguts posen de manifest la major sensibilitat que ofereix la interfase de nano-ESI sense líquid auxiliar i especialment, quan es combina amb la preconcentració en línia. En un futur, caldria dedicar més esforços a la millora de la configuració del preconcentrador perquè la seva construcció sigui més ràpida i senzilla. A l'espera de la comercialització d'interfases d'aquest tipus robustes i amb un cost raonable, cal continuar explorant altres metodologies per a millorar la sensibilitat de les anàlisis per SPE-CE-MS amb la interfase de CE-MS amb líquid auxiliar comercialment disponible.

4.2. Anàlisi de pèptids opiacis per SPE-CE amb fases estacionàries d'immunoafinitat

Les baixes concentracions en que es troben els pèptids opiacis en fluids biològics i la complexitat d'aquestes matrius fan recomanable l'ús de fases estacionàries d'immunoafinitat en l'anàlisi per SPE-CE-TOF-MS, per tal d'augmentar la selectivitat del procés de neteja (*clean-up*) i intentar millorar l'eficàcia de la preconcentració. No obstant, el seu ús no és generalitzat perquè no és possible trobar fases estacionàries comercials adequades. En aquesta tesi doctoral s'han estudiat els procediments per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat (articles 3.1, 3.2 i 3.3).

4.2.1. Preconcentració amb fases estacionàries amb anticòs intacte

4.2.1.1. Preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte

A l'article 3.1 es descriu la preparació d'una fase estacionària d'immunoafinitat utilitzant com a lligand una IgG intacta de baixa puresa i cost raonable, i com a suport partícules de sílice amb grups diol derivatitzats convenientment per a obtenir grups hidrazida. L'acoblament de la IgG a les partícules activades amb grups hidrazida es produeix a través dels carbohidrats, prèviament oxidats a grups aldehid. Els carbohidrats només es troben al fragment constant (Fc) de la IgG, de manera que els llocs actius queden lliures a la superfície del suport (figura 4.17).

Per tal de monitoritzar i optimitzar les diverses etapes del procés, s'han establert procediments per a quantificar els grups diol de les partícules de sílice inicials mitjançant una iodometria, els grups hidrazida activats mitjançant una espectrofotometria amb 2,4,6-trinitrobenzensulfonat (TNBS) i la IgG oxidada del suport activat mitjançant una altra espectrofotometria UV-Vis.

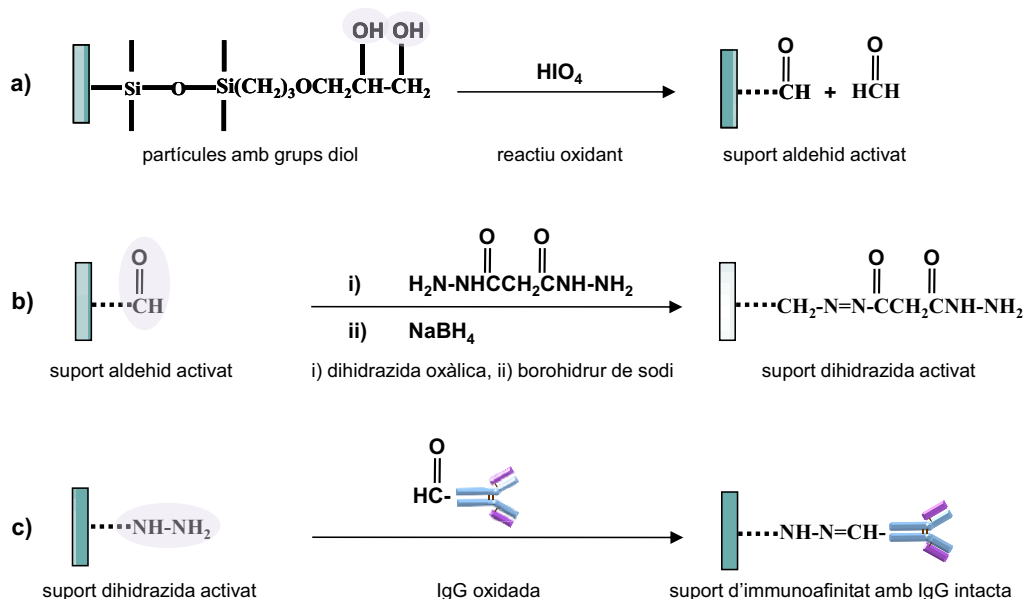


Figura 4.17 Reaccions del procés de preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte.

Abans de procedir a l'activació del suport, és recomanable determinar la quantitat de diols per tal d'ajustar les quantitats dels reactius necessaris en les diverses etapes del procés de preparació de la fase estacionària. La quantitat de diols s'ha determinat mitjançant una iodometria després de la seva oxidació amb àcid periòdic [220, 221]. El resultat obtingut són $274 \pm 5 \mu\text{mol}$ de diol per gram de partícula. Aquesta quantitat, que és lleugerament superior a la indicada pel fabricant ($53\text{-}220 \mu\text{mol}$ de diol per gram de partícula), és adequada per a preparar la fase estacionària d'immunoafinitat d'acord a les recomanacions d'estudis similars [222].

Per tal d'activar les partícules de sílice inicials, els grups diols s'oxiden primer a grups aldehyd i aquests es fan reaccionar amb dihidrazida oxàlica per donar lloc a grups hidrazida. Posteriorment, es redueixen els grups aldehyds que no hagin reaccionat amb borohidrur de sodi (figures 4.17 a i b) [195, 222, 223]. Segons Ruhn et al [222], un dels problemes més freqüents en aquest procediment és la immobilització de les molècules de dihidrazida al suport a través dels dos extrems, impeding l'acoblament posterior de l'anticòs (figura 4.18 a), mentre que en condicions òptimes les molècules d'hidrazida s'haurien d'unir a través d'un dels extrems i deixar l'altre disponible per a reaccionar amb la IgG oxidada (figura 4.18 b).

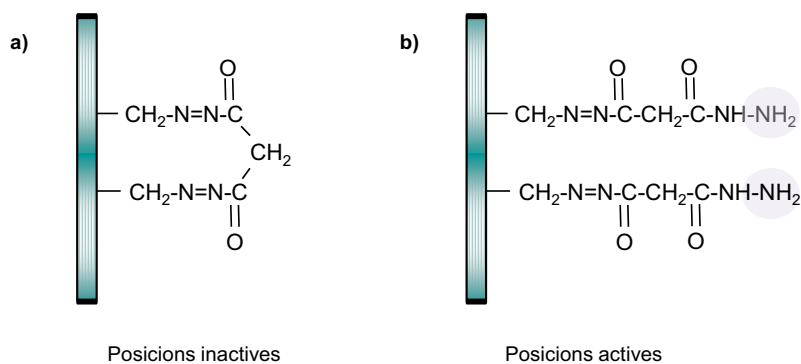


Figura 4.18. Suport amb posicions inactives (a) i actives (b).

Una manera de minimitzar aquest atac bifuncional consisteix en disminuir el grau d'oxidació dels grups diol de les partícules de sílice. Així, la distància entre els grups aldehid de la superfície augmenta i les dihidrazides no es poden unir pels dos extrems. Per aquest motiu, s'ha estudiat l'efecte del grau d'oxidació dels grups diol en la fracció de grups hidrazida activats en el suport de sílice (figura 4.19).

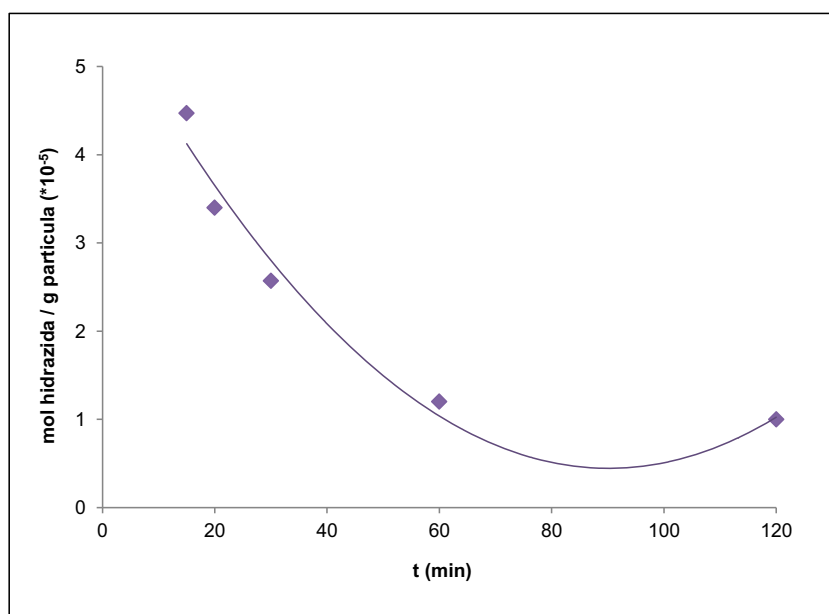


Figura 4.19. Efecte del temps d'oxidació dels grups diols de les partícules de sílice en la fracció de grups hidrazida activats.

Les mescles de reacció de les partícules inicials amb grups diol amb àcid periòdic s'han deixat reaccionar durant diversos temps de reacció. La quantitat de grups hidrazida del suport derivatitzat s'ha determinat espectrofotomètricament [222, 224-227]. Tal i com s'observa a la figura 4.19, la màxima quantitat de grups hidrazida actius, és a dir, disponibles per a l'enllaç amb l'anticòs correspon a 45 μmols d'hidrazida per gram de partícula, que s'obtenen en el menor temps de reacció d'oxidació (15 min). A partir dels mols de grups diol en el suport, es pot calcular el nombre màxim de grups hidrazida que estarien disponibles (274 μmols hidrazida/g de partícula). Per tant, únicament s'hauria activat el 16% dels possibles llocs actius del suport, valors que són similars als indicats per altres autors [222].

La IgG s'ha d'oxidar abans de ser immobilitzada sobre les partícules de sílice activades amb grups hidrazida. Els diols localitzats a les cadenes de carbohidrats del Fc s'oxiden amb àcid periòdic per donar lloc a grups aldehid [228, 229]. Com que el Fc està distant als llocs actius antígen-anticòs, l'activitat immunoreactiva de l'anticòs no es veu afectada [222, 228, 229]. A la bibliografia s'especifiquen les condicions de reacció adequades per a l'obtenció de grups aldehid minimitzant la seva sobreoxidació a grups àcid carboxílic i preservant la reactivitat de l'anticòs [222, 228, 229].

La IgG oxidada s'immobilitza sobre les partícules de sílice activades amb grups hidrazida (figura 4.17 c) [195, 222, 223, 230]. Per tal d'estimar la proporció d'IgG que s'ha unit al suport activat és necessari emprar un mètode adequat que permeti determinar la quantitat d'IgG abans i després de la reacció d'acoblament. Inicialment, es va establir un mètode de CE-UV per a l'anàlisi d'IgG intacta a pH neutre emprant un capil·lar amb un recobriment de capes successives (SMIL) de polibrè (PB) i sulfat de dextrà (DS) per a prevenir l'adsorció de la IgG sobre la paret del capil·lar [98], però les concentracions mínimes d'IgG que es podien determinar eren bastant elevades (aproximadament 75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Per aquesta raó s'ha emprat un mètode d'anàlisi alternatiu, concretament una espectrofotometria a 214 nm amb un instrument que permet mesurar microvolums de mostra i LOD lleugerament inferiors (< 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Les mesures de l'absorbància de les solucions d'IgG abans i després de la reacció d'acoblament, demostren que la immobilització ha tingut lloc correctament. El

rendiment de la reacció ha estat del 74%, expressat en mg d'IgG per mg d'hidrazida activa. La quantitat relativa d'IgG immobilitzada és bastant elevada perquè els grups hidrazida estan en gran excés (45 μmol d'hidrazida/g de partícula) respecte la quantitat d'IgG oxidada ($1.23 \cdot 10^{-4}$ μmol d'IgG). Aquests resultats fan pensar que augmentant la quantitat d'anticòs es podria augmentar la superfície immunoreactiva.

Seguint la metodologia optimitzada amb la IgG intacta de baixa puresa, s'ha preparat una fase estacionària d'immunoafinitat emprant anticossos policlonals altament purificats contra els pèptids opiacis End1 i End2. S'ha escollit un anticòs altament purificat per assegurar la màxima immunoreactivitat contra els pèptids opiacis d'interès i policlonal perquè aquest tipus d'anticòs reconeix diferents epítops d'un antigen, la qual cosa pot resultar d'utilitat per analitzar famílies d'anàlits, que estan relacionats estructuralment.

4.2.1.2. Anàlisi de pèptids opiacis per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte

En IA-SPE-CE-TOF-MS, les condicions d'anàlisi han de ser les adequades per tal de mantenir l'estabilitat de l'anticòs i facilitar la seva interacció amb l'anàlit, i a l'hora les solucions utilitzades han de ser volàtils per a garantir una bona ionització si s'utilitza la detecció en línia per MS. Per aquest motiu, com a BGE s'ha seleccionat una solució 20 mM d'acetat d'amoni ajustada a pH 7.00 amb amoníac, tot i que no és el pH més adient per a la ionització i la detecció per espectrometria de masses amb ionització per electroesprai en mode positiu. Aquesta és una gran diferència respecte les anàlisis per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS en les que s'utilitzen BGE volàtils àcids (articles 2.1 - 2.4). Com que la capacitat amortidora d'aquest BGE és reduïda i podria afectar negativament a la repetibilitat de les anàlisis, és molt recomanable canviar la solució després de cada anàlisi per a minimitzar aquest inconvenient, tal i com s'ha demostrat en treballs previs del nostre grup de recerca [58]. La metodologia s'ha optimitzat mitjançant l'anàlisi de mescleres patrons d'End1 i End2.

A la figura 4.20 es mostra l'àrea dels pics d'End1 i End2 en funció del temps d'introducció de mostra. S'observa que l'àrea de pic de l'End1 augmenta a mesura que s'incrementa el temps d'introducció de mostra fins que als 20 min comença a disminuir, probablement perquè es supera el volum de ruptura de la fase

estacionària del preconcentrador i s'elueixen els pèptids retinguts mentre es carrega la mostra [175, 231]. Aquest efecte sembla menys significatiu en el cas de l'End2 i el pendent del gràfic també és menor, probablement perquè l'anticòs immobilitzat és menys immunoreactiu contra l'End2 d'acord a les indicacions del fabricant. Tot i que 20-30 min proporciona la màxima àrea de pic, s'ha seleccionat 10 min perquè el consum de mostra és inferior i podria ser un avantatge per a la anàlisi de mostres biològiques quan el volum disponible és limitat, com per exemple el líquid cerebroespinal. També, s'ha introduït la mostra a 930 mbar durant 10 min en cinc etapes de 2 min separades per un temps d'espera d'1 min per afavorir el contacte entre l'anàlit i l'anticòs immobilitzat [232, 233], però no s'han observat millores significatives.

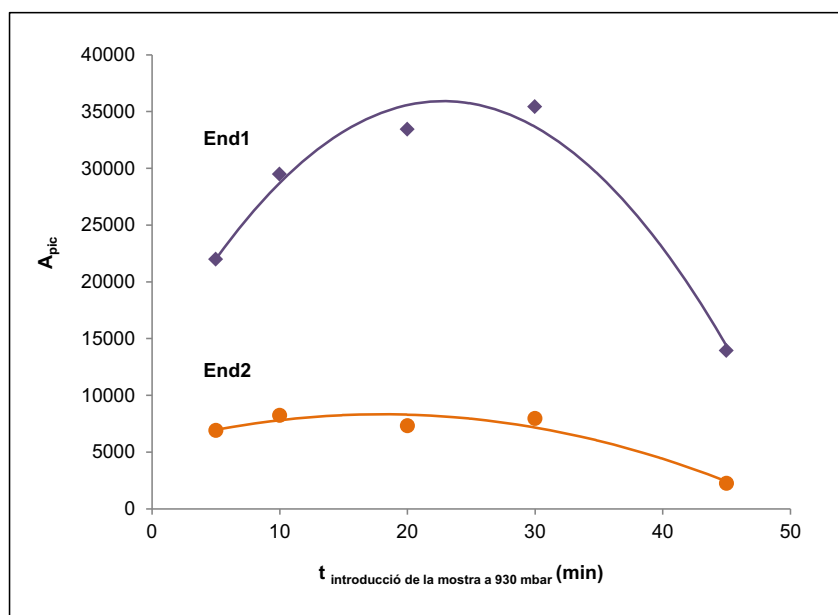


Figura 4.20. Efecte del temps d'introducció de mostra a 930 mbar (elució a 50 mbar durant 10 s) en l'àrea dels pics d'End1 i End2 d'una mescla de patrons de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per IA-SPE-CE-TOF-MS amb una fase estacionària amb anticòs intacte.

La tendència en l'àrea dels pics dels pèptids estudiats en funció del temps d'introducció de mostra quan s'utilitza aquesta fase estacionària d'immunoafinitat és lleugerament diferent a la que s'ha observat anteriorment per a una fase estacionària C_{18} i els preconcentradors sense *frits* (article 2.3) (figures 4.20 i 4.11, pàg. 190). En el cas de la fase estacionària C_{18} , no s'arriba a observar aquesta

disminució de l'àrea de l'End1 quan la mostra s'introdueix durant un llarg període de temps sinó que l'àrea del pic augmenta fins a mantenir-se constant, indicant probablement la saturació del preconcentrador. Aquesta diferència de comportament podria ser deguda al nombre de llocs actius disponibles per a la retenció dels anàlits en cadascuna de les fases estacionàries, així com a la diferent naturalesa de les interaccions que s'estableixen entre la fase estacionària i els anàlits durant la retenció.

Pel que fa a l'eluent, ha de ser una solució apropiada per a trencar la interacció antigen-anticòs i que contingui components volàtils per a poder utilitzar l'espectrometria de masses com a detecció. Generalment, s'empren solucions àcides aquoses o amb un baix contingut de solvent orgànic [57, 58, 189]. S'han provat diverses solucions aquoses amb 50 o 100 mM d'àcid acètic i àcid fòrmic, i aquestes mateixes solucions amb un baix contingut d'acetonitril o metanol. Els millors resultats s'han obtingut amb una solució aquosa amb 50 mM d'àcid acètic i 50 mM d'àcid fòrmic, la qual ja havia proporcionat bons resultats per a l'anàlisi de digestos d'eritropoetina per IA-SPE-CE-MS en treballs previs [58]. L'addició de solvent orgànic provoca la disminució de les àrees dels pics, especialment pels d'End2 que presenten àrees considerablement inferiors als d'End1. Per exemple, quan s'afegeix un 10% de metanol l'End2 no es detecta. El temps d'injecció de l'eluent hauria de ser el mínim possible que garanteixi l'elució quantitativa dels pèptids retinguts per evitar que un contacte prolongat de l'anticòs immobilitzat amb la solució àcida provoqui la seva desnaturalització. L'eluent s'ha injectat a 50 mbar durant 10 i 15 s, i s'ha seleccionat 10 s ja que no s'observen diferències significatives entre els dos casos.

A la figura 4.21 a es mostren els EIE de l'End1 i l'End2 d'una mescla de $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzada per IA-SPE-CE-TOF-MS en les condicions òptimes. Els dos pèptids comigren en un únic pic perquè només es diferencien en el tercer aminoàcid de la seva seqüència peptídica. A més, aquests aminoàcids, triptòfan (Trp) per a l'End1 i fenilalanina (Phe) per a l'End2, no presenten cap grup ionitzable en la cadena lateral. No obstant, ambdós pèptids es poden detectar per separat gràcies a la diferència en les seves masses moleculars. Com es pot observar a la figura 4.21 b, la intensitat dels pics és similar a la que s'obté per a una mescla de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzada per CE-TOF-MS, fet que posa de manifest el potencial de la

preconcentració en línia. El pic corresponent a l'End1 és cinc vegades més gran que el de l'End2 per la major immunoreactivitat de l'anticòs contra aquest pèptid. Aquesta diferència d'alçades és menys significativa en CE-TOF-MS (figura 4.21).

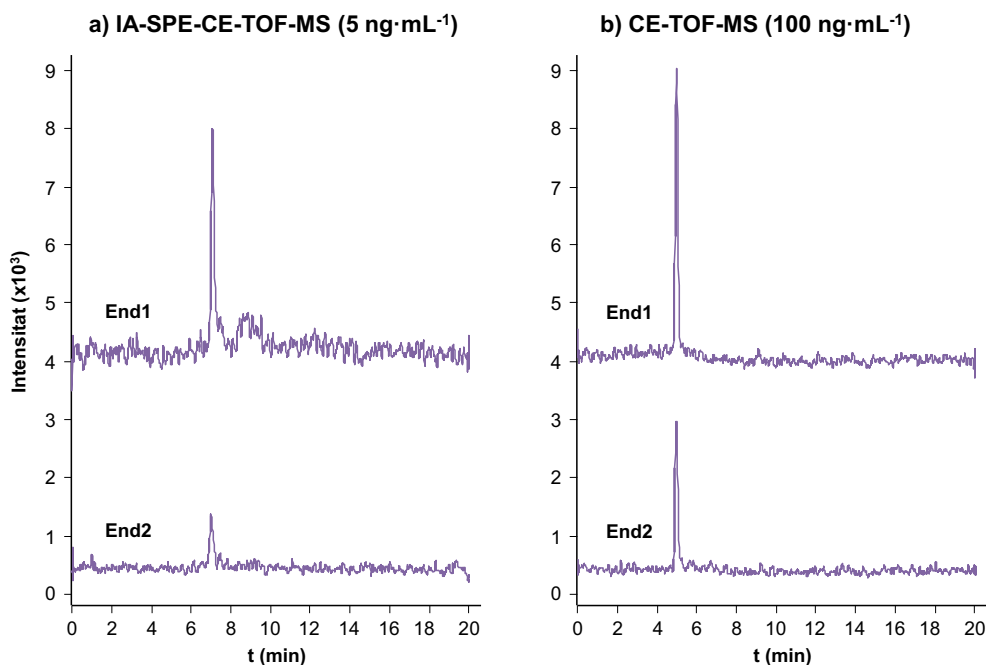


Figura 4.21. EIE dels pèptids opiacis End1 i End2 en una mescla de patrons de 5 ng·mL⁻¹ i 100 ng·mL⁻¹ per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte (a) i CE-TOF-MS (b), respectivament, emprant un BGE neutre (20 mM d'acetat d'amoni a pH 7.00).

La selectivitat de la fase estacionària d'immunoafinitat s'ha avaluat analitzant una mescla de vuit pèptids opiacis (DynA, Met-NH₂, Meap, End1, End2, Des, Met i Ala-Met). En principi, únicament s'haurien de detectar l'End1 i l'End2, però també s'ha detectat la DynA. Aquest pèptid no presenta cap similitud amb la seqüència peptídica de les endomorfines que justifiqui la seva interacció amb l'anticòs policlonal emprat. Ara bé, la DynA és l'únic pèptid estudiat que presenta dues arginines, les quals tenen un grup ionitzable bàsic cadascuna i podrien ser susceptibles a interaccions no específiques amb la fase estacionària d'immunoafinitat.

A la taula 4.8 s'indiquen els valors obtinguts de repetibilitat i reproductibilitat en l'àrea de pic (A_{pic}) i el temps de migració (t_m), la linealitat i els LOD quan s'analitzen mescles de patrons d'End1 i End2 per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte. Els paràmetres obtinguts són similars per ambdós pèptids, a excepció del pendent de la recta de regressió que com era d'esperar és el doble per a l'End1. Els valors de reproductibilitat en l'àrea de pic són lleugerament superiors als de repetibilitat, mentre que en temps de migració són gairebé el doble. Aquestes diferències podrien ser conseqüència de les petites diferències en la construcció dels preconcentradors, ja que s'ha utilitzat un preconcentrador nou cada dia per avaluar la reproductibilitat. Aquests resultats són consistents amb els obtinguts prèviament per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS (taula 4.1 i 4.2, pàg. 179) [54, 55, 175]. No obstant, els preconcentradors amb fase estacionària d'immunoafinitat únicament permeten realitzar 8 anàlisis de mescles de patrons sense problemes en l'extracció o en el corrent elèctric enfront les 20 anàlisis que permet dur a terme la fase estacionària C_{18} . S'ha comprovat que quan la fase estacionària es conserva en una solució aquosa 0.1 M de KH_2PO_4 amb un 0.1% d'azida sòdica a 4°C és estable almenys fins a cinc mesos.

Taula 4.8. Paràmetres de qualitat establerts per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mescles de patrons per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte i LOD per CE-TOF-MS, emprant un BGE neutre.

	IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte					CE-TOF-MS	
	Repetibilitat (%RSD) (c=10ng·mL ⁻¹ , n=8)		Reproductibilitat (%RSD) (c=10ng·mL ⁻¹ , n=16)		Linealitat (c=1-10ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)
	A_{pic}	t_m	A_{pic}	t_m	Recta de regressió ($R^2 > 0.99$)		
End1	6	9	8	17	A = 6733 C - 3111	1	100
End2	2	9	10	17	A = 3081 C - 1775	1	100

Els pèptids opiacis s'han pogut detectar a concentracions d' $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, mentre que els LOD per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS són de $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. S'ha de tenir en compte que el BGE emprat en aquest últim cas és una solució que conté 50 mM d'àcid acètic i 50 mM d'àcid fòrmic ajustada a pH 3.5 amb amoníac, mentre que en IA-SPE-CE-TOF-MS s'utilitza una solució 20 mM d'acetat d'amoni ajustada a pH 7.00 amb amoníac. La volatilitat i eficiència de la ionització de la solució neutra és pitjor [58] i dona lloc a LOD superiors en ESI positiu [218]. No obstant, el seu ús és necessari quan s'utilitzen fases estacionàries d'immunoafinitat que no suporten condicions extremes durant els llargs períodes de temps de la separació electroforètica. Tot i així, els resultats obtinguts són acceptables tenint en compte la limitada quantitat de fase estacionària que conté el preconcentrador i la petita extensió d'àrea superficial immunoreactiva disponible.

Amb la metodologia establerta, s'han analitzat mostres de plasma fortificades amb End1 i End2. Generalment, en cromatografia d'immunoafinitat, les mostres biològiques s'analitzen sense realitzar cap tractament previ o bé, una mera dilució o filtració a causa de l'excel·lent selectivitat dels anticossos [57, 169, 198, 234]. No obstant, no s'ha aconseguit detectar els pèptids opiacis en mostres de plasma filtrades a través de filtres de $0.45 \mu\text{m}$ i diluïdes, o bé sotmetent-les a una precipitació amb acetonitril. Per a detectar els pèptids d'interès, ha estat necessari realitzar el tractament de mostra de plasma complet optimitzat anteriorment (article 2.1), el qual consta d'una etapa de precipitació amb acetonitril seguida d'una filtració (la recuperació de l'End1 és del 70% aproximadament). En aquestes condicions, els pèptids opiacis en plasma s'han pogut detectar a concentracions de $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (figura 4.22 a). Aquests valors són molt superiors als LOD obtinguts pels patrons ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, taula 4.8) i en C_{18} -SPE-CE-TOF-MS ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per a l'End1 en plasma, taula 4.1, pàg. 179). Ara bé, si es comparen les sumes dels EIE de l'End1 i l'End2 obtingudes per a una mostra de plasma no fortificada amb els pèptids opiacis analitzada per IA-SPE-CE-TOF-MS i C_{18} -SPE-CE-TOF-MS (figura 4.22 b), s'observa que la selectivitat de la fase estacionària d'immunoafinitat és considerablement superior, ja que aquesta no reté altres compostos que sí reté la fase estacionària C_{18} comercial.

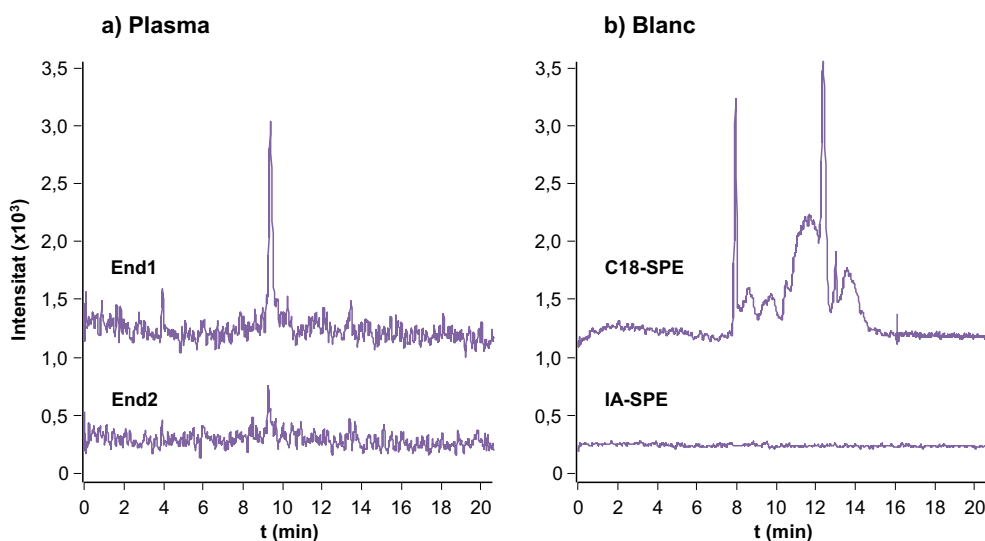


Figura 4.22. EIE l'End1 i End2 en una mostra de plasma humà fortificada amb $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte (a) i suma dels EIE de l'End1 i l'End2 del blanc d'un mostra de plasma humà per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS i IA-SPE-CE-TOF-MS, emprant els BGE àcid i neutre, respectivament (b).

Per tant, tot sembla indicar que caldria millorar la capacitat i l'eficàcia de la fase estacionària d'immunoafinitat i incrementar l'àrea superficial immunoreactiva utilitzant un gran excés d'anticòs purificat o bé, explorant altres procediments per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat mitjançant l'acoblament d'anticossos intactes o fragments d'anticòs, per afavorir la detecció de pèptids opiacis a concentracions baixes en mostres biològiques reals. Tanmateix, caldria millorar el procediment de preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat per tal de minimitzar la presència de grups residuals que puguin establir interaccions no específiques.

4.2.1.3. Anàlisi de transferrina humana per IA-SPE-CE-TOF-MS amb anticòs intacte

Per tal d'avaluar l'aplicabilitat de la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte per a l'anàlisi de compostos d'elevat pes molecular com les proteïnes, s'ha preparat una fase estacionària d'immunoafinitat contra la transferrina humana i s'han establert metodologies d'IA-SPE-CE amb deteccions UV i TOF-MS per a l'anàlisi de transferrina en sèrum humà (article 3.2).

En l'anàlisi de proteïnes per IA-SPE-CE-MS, a més d'haver de compatibilitzar les condicions experimentals d'extracció i separació per a l'ús d'anticòs i la detecció per espectrometria de masses, és necessari utilitzar recobriments estables a les parets internes dels capil·lars per a prevenir l'adsorció [27, 29, 90, 96-98, 113, 235-239]. A més, en el cas de la transferrina, el recobriment emprat generalment ha de permetre treballar a pH superior a 6, que afavoreix la separació de les diferents sialoformes [73, 83, 90, 97]. A l'article 3.2, s'ha avaluat per primera vegada un recobriment permanent per adsorció derivat de la poliàcrilàmida amb substituents aniònics (*UltraTrol™ Dynamic Pre-Coat*, HN).

Primerament, s'ha establert una metodologia de CE-UV basada en l'ús d'un capil·lar de sílice fosa recobert amb el polímer HN. El procediment de partida és similar al que va proporcionar bons resultats per a l'anàlisi de la transferrina emprant capil·lars recoberts amb una doble capa aniònica de polibrè i dextrà (PB-DS) [90]. Com a BGE s'han provat diverses solucions d'acetat d'amoni 25 mM ajustades amb amoníac a pH compresos entre 8 i 9.5 aplicant diferents potencials de separació, i únicament s'ha observat una lleugera separació de les sialoformes de la transferrina a pH 8.5 i 5 KV (figura 4.23 a). En aquestes condicions, es detecten les sialoformes S3, S4, S5 i S6 després del flux electroosmòtic amb una resolució menor a la que s'obté quan s'utilitza un capil·lar recobert amb PB-DS [90]. Aquests resultats no s'han aconseguit millorar disminuint la quantitat de mostra injectada o saturant la transferrina amb ferro per assegurar un contingut metàl·lic constant abans de la seva injecció. Probablement, la presència del recobriment HN juntament amb el flux electroosmòtic catòdic elevat influeixen negativament en la separació electroforètica donant lloc a una limitada resolució de les sialoformes. D'altra banda, el capil·lar

recobert pot ser utilitzat durant llargs períodes sense necessitat de regenerar-se. La repetibilitat de la metodologia establerta amb una solució patró de $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ és d'un 5% en l'àrea de pic i d'un 2% en el temps de migració. Aquests valors indiquen que el recobriment és estable i que per tant, és adequat per ser utilitzat en MS sense perill de contaminació del detector, el que el diferencia del recobriment PB-DS.

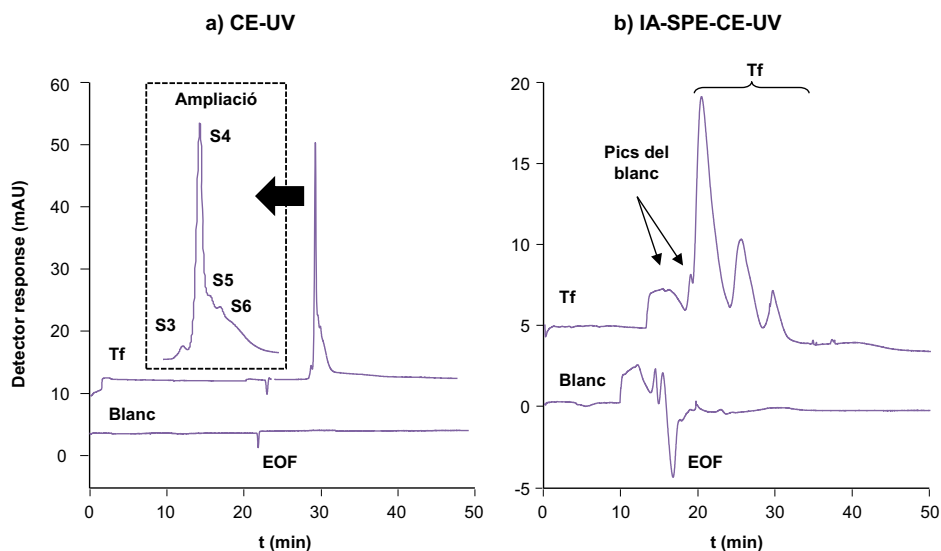


Figura 4.23. Electroferogrames a 200 nm de solucions patró de transferrina a $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-UV (a) i IA-SPE-CE-UV (b), respectivament, en condicions òptimes.

La fase estacionària d'immunoafinitat contra la transferrina s'ha preparat seguint la metodologia establerta anteriorment amb anticòs intacte amb lleugeres modificacions (article 3.2). Algunes d'aquestes modificacions pretenen solucionar els inconvenients trobats en el treball anterior (article 3.1). Així, s'han preparat dues fases estacionàries d'immunoafinitat utilitzant solucions de 200 i $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ d'anticòs per tal d'avaluar si l'augment de la quantitat d'anticòs oxidat permet incrementar l'àrea de superfície immunoreactiva i obtenir millors LOD. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives entre les dues fases estacionàries i per tant, sembla ser que utilitzar un gran excés d'anticòs no és una bona estratègia per a millorar la capacitat d'extracció de la fase estacionària. També, s'ha estudiat la desactivació dels grups hidrazida residuals de la fase estacionària d'immunoafinitat, que probablement donaven lloc a les interaccions no específiques assenyalades en l'anàlisi de pèptids opiacis, mitjançant rentats amb gliceraldehid i acetaldehid [222,

240, 241]. No obstant, aquests procediments de desactivació han estat descartats perquè les partícules tractades d'aquesta manera retenen la transferrina amb interaccions no específiques, la qual cosa indica que també retindran altres proteïnes quan s'analitzin mostres biològiques.

Una vegada preparada la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte contra la transferrina, s'ha optimitzat una metodologia d'IA-SPE-CE-UV. És important destacar que el capil·lar de separació es recobreix amb HN abans de construir el preconcentrador per a prevenir la desnaturalització de l'anticòs immobilitzat en la fase estacionària d'immunoafinitat.

Una de les diferències més importants respecte a la metodologia emprada amb els pèptids opiacis està relacionada amb l'elució. Com ja s'ha esmentat anteriorment, els millors eluents volàtils per a IA-SPE solen ser solucions aquoses amb àcid acètic o àcid fòrmic, de vegades amb un baix contingut de solvent orgànic [57, 58, 189, 198]. També, s'ha demostrat que les solucions aquoses bàsiques d'amines poden proporcionar bons resultats [242, 243], però sovint no s'utilitzen perquè es considera que un valor elevat de pH pot fer malbé la proteïna o el suport de sílice [244]. En aquest treball, s'han provat diversos eluents, entre ells la solució àcida utilitzada per eluir els pèptids opiacis en treballs anteriors (50 mM d'àcid acètic i 50 mM d'àcid fòrmic), una solució d'acetat d'amoni 25 mM amb 0.3 M de glicina ajustada a pH 2.5 amb àcid clorhídric, solucions bàsiques de dietilamina i amoníac i algunes d'aquestes solucions amb un 20% de 2-propanol o acetonitril (article 3.2). Les solucions bàsiques han permès obtenir millors resultats pel que fa a l'elució de la transferrina i concretament, un contingut 0.1 M d'amoniac és el que ha proporcionat les millors àrees de pic i resolucions. Tal i com s'observa a la figura 4.23 b, quan s'analitza una solució patró de transferrina en aquestes condicions es detecten tres pics, els quals apareixen després de l'EOF en menys de 30 min i presenten una intensitat relativa similar a l'esperada per a les sialoformes S4, S5 i S6. Aquesta millora de la resolució respecte a CE-UV (figura 4.23 a) podria ser deguda al gradient de pH que es genera durant l'elució com a conseqüència de la diferència de pH entre l'eluent (pH 11.2) i el BGE (pH 8.5). El primer pic es superposa amb altres pics corresponents a l'eluent, i que també apareixen en el blanc. Aquesta superposició no s'aconsegueix evitar adquirint els electroferogrames a d'altres longituds d'ona. A concentracions de transferrina inferiors a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

únicament es detecta el primer pic. Respecte a la durabilitat dels preconcentradors, l'àrea dels pics detectats en UV disminueix després de cinc anàlisis consecutives de solució patró. Aquest fet podria ser degut a la desnaturalització de l'anticòs en presència de l'eluent bàsic. La transferrina no sembla degradar-se a aquests valors de pH perquè s'ha comprovat que la repetibilitat de les anàlisis de transferrina dissolta en eluent per CE-UV és bona, tot i que únicament s'observa un pic sense resolució de les diferents sialoformes.

S'ha estudiat l'efecte de la introducció de la mostra en l'àrea dels pics de transferrina introduint la mostra a 930 mbar durant diversos temps i això s'ha realitzat a dos temps d'elució diferents per tal d'avaluar també l'efecte del temps d'elució (figura 4.24). Els resultats mostren una tendència similar a la que s'obté per als pèptids opiàcics End1 i End2. L'àrea de pic augmenta fins a un temps d'introducció de mostra de 20 min, a partir del qual comença a disminuir, probablement perquè s'excedeix el volum de ruptura de la fase estacionària [175, 231]. Novament, s'ha escollit un temps d'introducció de mostra de 10 min perquè tot i que 20 min proporciona un senyal superior, únicament es detecta un pic ample i el consum de mostra podria ser un inconvenient per a l'anàlisi de mostres biològiques.

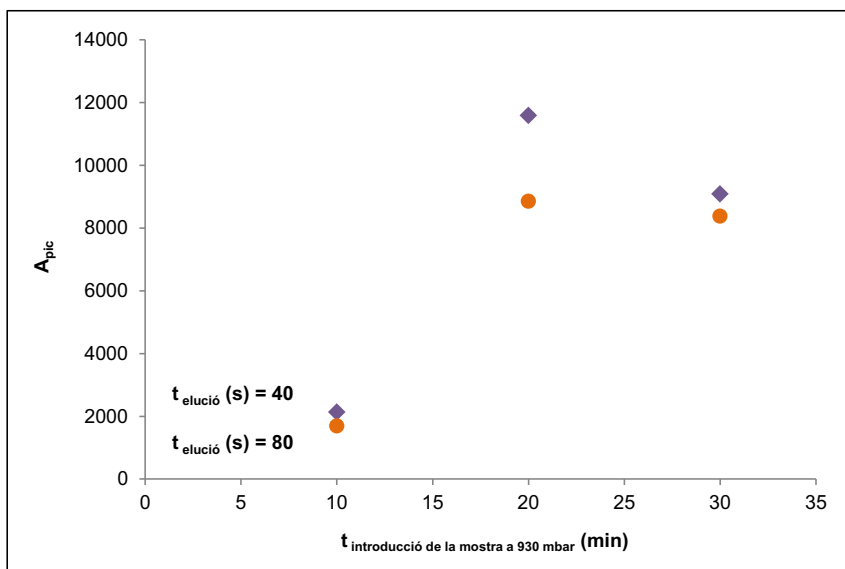


Figura 4.24. Efecte del temps d'introducció de mostra a 930 mbar en l'àrea dels pics d'una solució patró de transferrina de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per IA-SPE-CE-UV eluint amb una solució 0.1 M d'amoniàc a 50 mbar durant 40 i 80 s. L'àrea del pic s'ha calculat sumant l'àrea dels tres pics detectats.

Respecte al temps d'elució, 40 s proporciona àrees més grans que 80 s, segurament perquè la mostra s'elueix en un volum inferior i suficient per eluir la majoria de la transferrina retinguda. En aquestes condicions, la mínima concentració de transferrina que es detecta és de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. S'ha comprovat que aquest LOD no millora si la mostra s'introdueix durant 20 min, fet que justifica de nou l'elecció del temps d'introducció de mostra.

Amb l'objectiu de minimitzar les interaccions no específiques amb grups residuals presents a la fase estacionària d'immunoafinitat i millorar els LOD, s'ha estudiat el rentat que es realitza abans de l'elució de l'anàlit per eliminar possibles interferències retingudes no específicament en la fase estacionària. Generalment, s'utilitza el propi BGE perquè d'aquesta manera també es condiciona i s'omple el capil·lar per a la posterior separació electroforètica. A vegades, s'afegeix clorur de sodi o solvents orgànics per a realitzar un rentat més eficient, però cal anar amb compte perquè, a més de que el clorur de sodi no és volàtil, aquestes condicions també poden provocar l'elució de l'anàlit. S'ha provat una solució de BGE amb clorur de sodi i la mateixa solució amb un baix contingut en acetonitril o metanol seguida d'un rentat amb BGE per omplir el capil·lar abans de la separació electroforètica. L'ús d'aquestes solucions s'ha descartat perquè originen resultats poc reproduïbles deguts a l'elució de part de la transferrina retinguda. En canvi, rentant només amb BGE els resultats són reproduïbles. S'ha escollit un temps de rentat de 2 min, ja que a temps inferiors no s'han observat diferències significatives i així s'assegura l'equilibrat del capil·lar de separació.

La metodologia establerta per UV s'ha avaluat per a l'anàlisi de la transferrina emprant la detecció per espectrometria de masses. A la figura 4.25 a es mostra el BPE d'una solució patró de transferrina de $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS. A diferència dels resultats obtinguts per CE-UV (figura 4.23 a), quan s'utilitza l'espectròmetre de masses com a detector es perd la petita resolució de les diferents sialoformes de la transferrina perquè el temps d'anàlisi és menor com a conseqüència de l'efecte de succió del gas nebulitzador. La diferència entre les composicions del líquid auxiliar àcid (60:40 (v/v) metanol/aigua amb 50 mM d'àcid acètic i 50 mM d'àcid fòrmic) i el BGE bàsic (acetat d'amoni 25 mM) també pot influir en aquesta pèrdua de resolució.

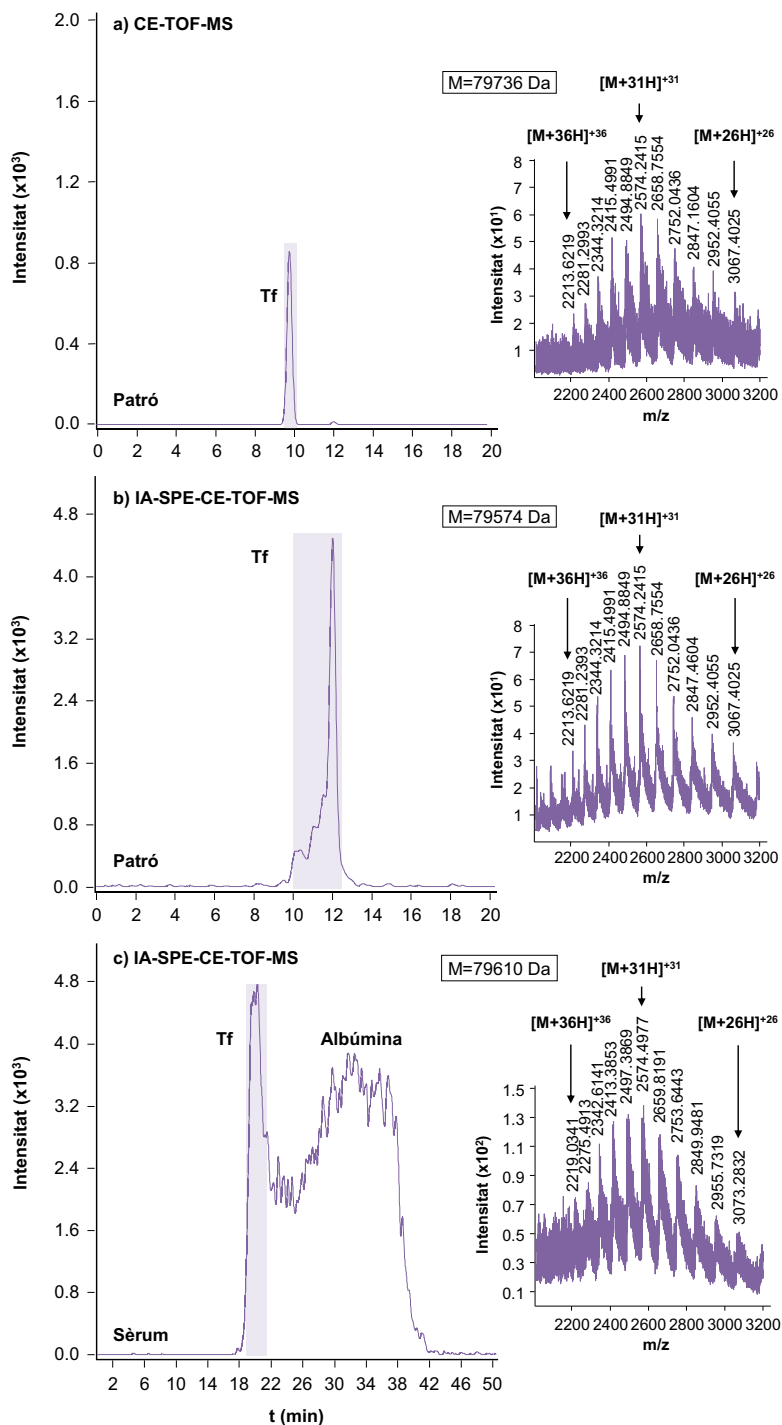


Figura 4.25. Suma dels EIE dels ions $[M+30H]^{30+}$, $[M+31H]^{31+}$ i $[M+31H]^{32+}$ de les sialoformes de la transferrina S3-S6 d'una solució de transferrina de $1500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ i $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ per CE-TOF-MS (a) i IA-SPE-CE-TOF-MS (b), respectivament i d'una mostra de sèrum per IA-SPE-CE-TOF-MS (c) en condicions òptimes. Es mostren els espectres de masses de les regions destacades en els electroferogrames.

L'aplicació de potencials de separació inferiors i la disminució de la pressió del gas nebulitzador no permeten separar les sialoformes de la transferrina. Tal i com s'observa en l'espectre de masses corresponent al pic de la transferrina detectat, l'exactitud i resolució de les masses no són suficients per a identificar les sialoformes de la transferrina quan aquestes comigren. A partir del clúster d'ions multicarregats es pot calcular una massa molecular de 79736 Da. Aquest valor s'acosta al valor corresponent a la massa molecular mitjana de la sialoforma més abundant de la transferrina (S4, 79600 Da aproximadament [96]). Per tal de millorar aquests resultats, seria necessari millorar la resolució de la separació de les sialoformes, desplaçar el clúster d'ions multicarregats cap a un rang de m/z inferior i millorar la sensibilitat de la detecció en ESI positiu. L'ús d'un BGE àcid podria ajudar a millorar la detecció, però probablement empitjoraria la resolució de les diferents sialoformes de la transferrina i faria perillar la integritat de l'anticòs.

Quan s'utilitza un preconcentrador amb fase estacionària d'immunoafinitat per a l'anàlisi d'una solució patró de transferrina, s'observa un efecte similar pel que fa a la resolució. Els espectres de masses de diverses zones del pic electroforètic són pràcticament idèntics i les masses moleculars calculades a partir dels clústers observats també estan al voltant de 79600 Da en tots els casos. Novament, el detector no permet diferenciar les diferents sialoformes de la transferrina quan aquestes comigren. D'altra banda, sí que s'observa una lleugera preconcentració de la transferrina, ja que una solució patró de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ analitzada per IA-SPE-CE-TOF-MS presenta una intensitat similar a una solució sis vegades més concentrada analitzada per CE-TOF-MS.

L'anàlisi de transferrina en mostres de sèrum humà també presenta moltes dificultats. En CE-TOF-MS, no ha estat possible detectar la transferrina per la presència majoritària d'altres components del sèrum, especialment d'albumina i immunoglobulines. En IA-SPE-CE-TOF-MS, la retenció no específica d'aquests components majoritaris del sèrum fa necessari un tractament de mostra previ a l'anàlisi, com ja havia passat amb l'End1 i l'End2 en mostres de plasma (article 3.1). La filtració amb filtres de $0.45 \mu\text{m}$ i la posterior dilució de les mostres no ha estat suficient per a minimitzar aquestes interferències. Únicament ha estat possible detectar la transferrina en mostres de sèrum humà després de tractar-les amb filtres de 10 kDa de tall molecular (YM-10) (figura 4.25 c).

A la figura 4.25 c s'observa que la transferrina es detecta just davant d'una banda molt ampla corresponent a l'albumina del sèrum. Aquesta es retindria a través d'interaccions no específiques amb els grups residuals presents a la fase estacionària d'immunoafinitat, tal i com passava en l'anàlisi d'endomorfines. No obstant, en aquest cas el contingut de compostos d'elevat pes molecular en el sèrum és més elevat perquè el tractament de mostra no inclou l'etapa de precipitació d'aquests compostos per evitar la pèrdua de transferrina. La presència d'una gran quantitat d'interferències dificulta la interacció entre l'anticòs i la transferrina. A més, com que la separació electroforètica no és completa, disminueix la sensibilitat de la detecció a causa de la supressió de la ionització. Els diversos intents per eliminar els compostos retinguts no específicament, alguns dels quals ja s'havien provat amb solucions patró, no han resultat ser d'utilitat. Per exemple, rentar la fase estacionària amb BGE amb NaCl després de la introducció de la mostra, eliminar les immunoglobulines mitjançant la filtració de les mostres a través de filtres amb porus de 100 kDa de tall molecular (YM-100) abans del procés de filtració amb els filtres YM-10 i desactivar els grups hidrazida residuals de la fase estacionària amb gliceraldehid o acetaldehid.

Els resultats obtinguts posen de manifest les dificultats que comporta l'anàlisi de glicoproteïnes d'elevat pes molecular en mostres biològiques per IA-SPE-CE-MS, així com la importància de la separació electroforètica de les glicofomes per aprofitar l'exactitud, resolució i sensibilitat de l'espectròmetre de masses. Encara més evident que en el cas dels pèptids opiacis, també és necessari millorar la selectivitat, capacitat d'extracció i eficiència de les fases estacionàries d'immunoafinitat. Per tant, cal aprofundir en l'estudi d'altres metodologies que permetin preparar fases estacionàries d'immunoafinitat amb millors prestacions per a la detecció de pèptids i proteïnes en fluids biològics.

4.2.2. Preconcentració amb fases estacionàries amb fragments d'anticòs

4.2.2.1. Preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb fragments d'anticòs

D'acord amb la idea d'avaluar altres procediments per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat, a l'article 3.3 s'ha estudiat la preparació d'una nova fase estacionària d'immunoafinitat contra l'End1 i l'End2 a partir de fragments d'unió a l'antigen (Fab') del mateix anticòs que a l'article 3.1 i com a suport, partícules de sílice amb grups aminopropil derivatitzats convenientment per a obtenir grups succinimidil. La metodologia escollida consisteix en l'enllaç covalent dels Fab' de l'anticòs a través dels grups sulfhidril (figura 4.26). Prèviament, es generen els Fab' mitjançant fragmentacions controlades i successives de l'anticòs intacte [47, 59-61, 233, 245]. Com que els grups sulfhidril estan distants als llocs actius antigen-anticòs, l'orientació dels Fab' immobilitzats és l'adequada per a la captura dels anàlits [198, 230, 246].

Les condicions de les reaccions de fragmentació de l'anticòs (figura 4.26 b), especialment el tipus de reactiu emprat i la seva concentració, el temps i la temperatura de reacció i l'agitació de la mescla de reacció, s'han de seleccionar i controlar amb cura per a que les reaccions siguin quantitatives i al mateix temps, evitar la sobrefragmentació de l'anticòs. Per tal de determinar les condicions òptimes, s'han avaluat diverses condicions de reacció emprant novament una IgG intacta de baixa puresa, que és més econòmica que l'anticòs altament purificat contra l'End1 i l'End2.

Les diferents etapes del procés de fragmentació s'han monitoritzat per MALDI-TOF-MS. La matriu i la metodologia per a preparar la mostra per a les anàlisis s'han seleccionat tenint en compte estudis realitzats anteriorment pel nostre grup de recerca [159, 160]. A més, s'han avaluat diverses metodologies per eliminar les sals de les solucions d'IgG i així millorar la sensibilitat del detector, i els millors resultats s'han obtingut dessalant les mostres amb filtres de 50 kDa de tall molecular (YM-50). En aquestes condicions, el LOD per a la IgG és bastant elevat,

250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Per tant, s'ha de digerir una solució d'IgG de concentració prou elevada per a que es puguin detectar els fragments generats i realitzar un seguiment de la fragmentació de l'anticòs.

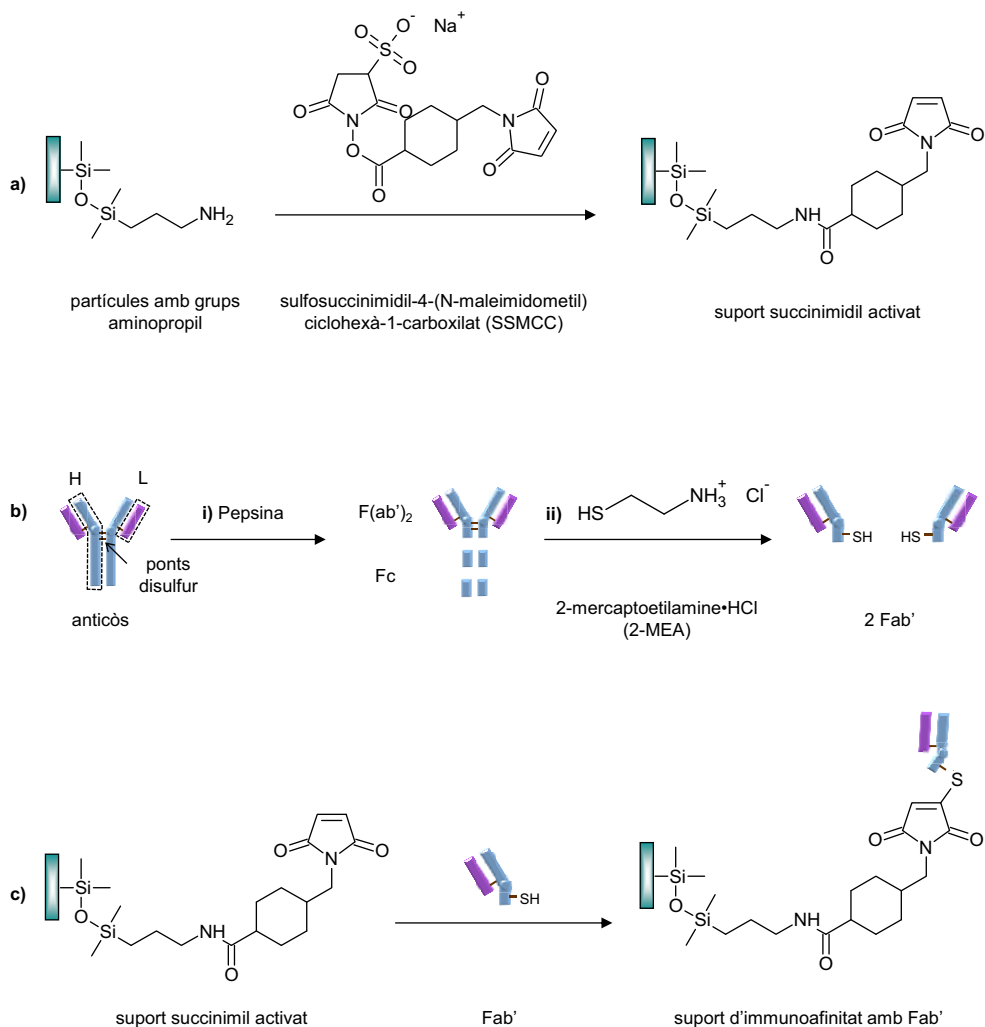


Figura 4.26. Reaccions del procés de preparació de la fase estacionària d'immunoafinitat amb Fab' d'un anticòs intacte (IgG).

A la figura 4.27, es mostren els espectres de masses de MALDI-TOF-MS obtinguts a les diferents etapes de fragmentació quan es digereix una solució d'IgG de 1500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

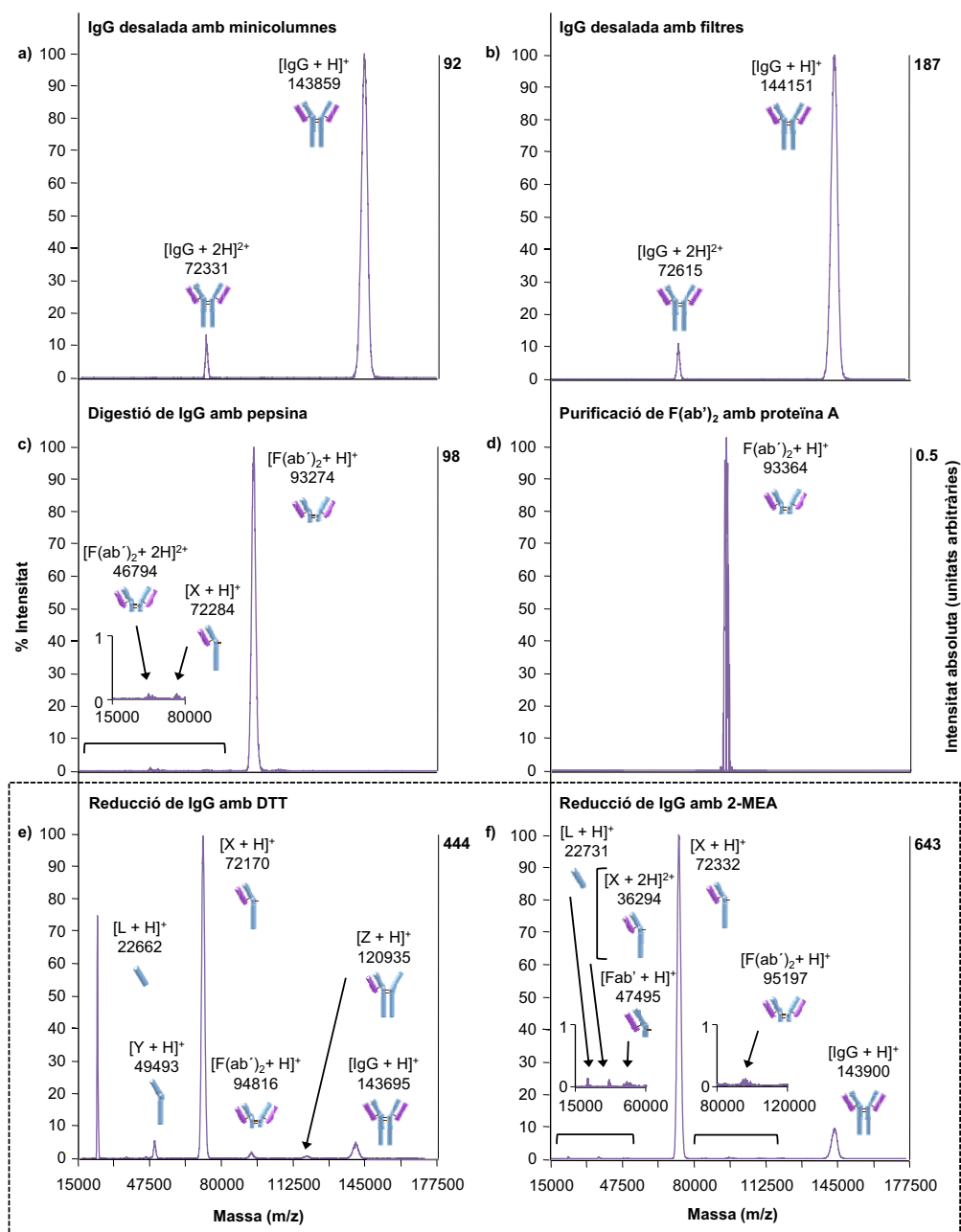


Figura 4.27. Espectres de masses de MALDI-TOF-MS d'una solució d'IgG policlonal dessalada amb microcolumnes d'exclusió per mida i filtres YM-50 (a i b, respectivament), del digest obtingut amb una columna de pepsina immobilitzada (c) i d'aquest digest purificat amb una columna de proteïna A (d) i de la IgG intacta reduïda amb 10 mM de DTT i 100 mM de 2-MEA (e i f, respectivament).

Primerament, s'han eliminat les sals de la solució d'IgG mitjançant unes minicolumnes d'exclusió per mida, les quals proporcionen resultats similars als que s'obtenen amb els filtres YM-50 (figura 4.27 a i b). A continuació, s'ha digerit la IgG emprant una columna de pepsina immobilitzada donant lloc als $F(ab')_2$ i a traces d'altres fragments (figura 4.27 c). La digestió dels $F(ab')_2$ amb pepsina és el mètode més comú per a obtenir aquests fragments [198, 247-251]. L'ús d'un enzim immobilitzat en comptes d'una solució permet aturar la digestió immediatament separant la resina del digest obtingut i així s'evita la sobredigestió de l'anticòs i l'autodigestió de l'enzim [250]. Aquest digest s'ha purificat mitjançant una columna amb proteïna A immobilitzada, la qual reté els Fc i la IgG no digerida (figura 4.27 d) [230, 252]. Els factors que més influeixen en la recuperació dels $F(ab')_2$ durant la purificació són la manera en que s'agita la mescla de reacció i el temps d'incubació. Únicament s'ha detectat el pic corresponent al $F(ab')_2$ agitant la columna de proteïna A verticalment en un agitador rotacional durant 10 min, mentre que no s'han detectat pics quan el temps d'incubació ha estat superior a 10 min o quan s'ha utilitzat un agitador tipus vòrtex. Si es comparen les intensitats absolutes (eix d'ordenades dret) dels pics de les figures 4.27 c i d, s'observa que després de la purificació la quantitat de $F(ab')_2$ ha disminuït significativament. No obstant, és més recomanable continuar el procediment d'obtenció dels fragments Fab' amb una solució purificada que amb una mescla heterogènia de fragments d'anticòs desconeguts.

Generalment, els Fab' es generen a partir dels $F(ab')_2$ mitjançant la reducció dels ponts disulfur [47, 57, 59-61, 233, 245, 249-251, 253]. Per tal de seleccionar el millor agent reductor, s'ha estudiat la digestió de la IgG intacta amb ditiotreitòl (DTT) i 2-mercaptoetilamina (2-MEA). A les figures 4.27 e i f es mostren els espectres de masses obtinguts per MALDI-TOF-MS mitjançant els dos reactius. En ambdós casos, el pic majoritari correspon al fragment desitjat (X), que seria l'equivalent al Fab' si es realitzés el procés descrit anteriorment, però aquest és més intens quan s'utilitza 2-MEA. Aquest agent reductor, a diferència del DTT, a més de provocar l'efecte desitjat reduint els ponts disulfur que uneixen les cadenes pesades, preserva els ponts disulfur que uneixen les cadenes pesades i lleugeres (H i L, respectivament) [250]. No obstant, en ambdós casos s'observa una certa quantitat d'IgG romanent. Emprant diverses concentracions de DTT i diversos temps de reacció amb 2-MEA s'obtenen resultats similars. Per tant, s'ha escollit el reactiu

2-MEA i el temps de reacció més curt (30 min) per a reduir els fragments $F(ab')_2$ purificats.

Seguint aquesta metodologia, s'han generat els Fab' de l'anticòs policlonal purificat contra els pèptids opiacis End1 i End2, el mateix que s'ha utilitzat anteriorment per a preparar la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte (article 3.1). La fragmentació d'aquest anticòs no s'ha pogut avaluar per MALDI-TOF-MS perquè únicament s'han digerit 125 μL d'una solució d'anticòs de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, és a dir, una concentració inferior a la que es pot detectar.

Els Fab' s'han d'unir a un suport convenientment derivatitzat amb els grups funcionals adequats. Per tal de generar els grups actius necessaris, s'han de derivatitzar les partícules de sílice inicials (figura 4.26 a), ja que no hi ha partícules de sílice amb grups succinimidil disponibles comercialment, tal i com passava amb les partícules amb grups hidrazida utilitzades per acoblar l'anticòs intacte (article 3.1). La derivatització s'ha dut a terme a dos temps de reacció diferents, 1 i 5 h. Com que en les anàlisis posteriors per IA-SPE-CE-TOF-MS emprant les dues fases estacionàries no s'han observat diferències significatives en l'àrea dels pics obtinguts, s'ha escollit 1 h com a temps de reacció. És important destacar que l'agitació de la mescla de reacció ha de ser suficientment enèrgica per a permetre el contacte de les partícules amb el reactiu, sinó el procés de derivatització no té lloc adequadament.

Els grups residuals aminopropil s'han intentat desactivar amb anhídrid acètic per donar lloc a grups acetamida i així prevenir les interaccions no específiques [254]. No obstant, quan s'analitzen mostres de plasma fortificades amb End1 i End2 per SPE-CE-TOF-MS emprant el suport desactivat i sense fragments d'anticòs, els pèptids opiacis queden retinguts i es poden detectar. Per tant, s'ha descartat la desactivació dels grups residuals de la fase estacionària mitjançant les metodologies investigades després de preparar la fase estacionària amb els fragments Fab'.

4.2.2.2. Anàlisi de pèptids opiacis per IA-SPE-CE-TOF-MS amb fragments d'anticòs

A l'hora d'establir la metodologia d'IA-SPE-CE-TOF-MS, s'ha pres com a punt de partida les condicions optimitzades per a la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte (article 3.1). S'ha estudiat l'efecte del temps d'introducció de mostra a 930 mbar i l'efecte del temps d'elució a 50 mbar en l'àrea dels pics de l'End1 i l'End2. A la figura 4.28 a s'observa que les àrees dels pics obtinguts per a l'End1 són considerablement superiors als de l'End2 perquè, com ja s'ha esmentat, segons el fabricant, l'anticòs original és més immunoreactiu contra aquest pèptid. Els valors més elevats d'àrea de pic d'End1 i d'End2 s'han detectat introduint la mostra durant 15 i 20 min, respectivament (figura 4.28 a). Pel que fa al temps d'injecció de l'eluent, s'han observat inestabilitats de corrent quan el temps d'elució és superior a 40 s, probablement perquè la ionització d'un gran volum d'eluent dificulta el tancament del circuit elèctric de l'electroforesi i de la interfase de CE-MS. L'àrea del pic de l'End1 augmenta amb el temps d'elució fins aproximadament 20 s i a partir d'aquest moment disminueix lleugerament (figura 4.28 b). En canvi, no s'observen diferències significatives per a l'End2. Les condicions seleccionades per a la resta d'experiments són 930 mbars durant 15 min i 50 mbar durant 20 s per a la introducció de la mostra i l'elució dels pèptids retinguts, respectivament. Aquestes condicions difereixen de les optimitzades anteriorment per a la fase estacionària amb anticòs intacte (figura 4.20, pàg. 209), la qual cosa demostra que el procés d'extracció de la fase estacionària és diferent segons si s'empra un anticòs intacte o els seus fragments.

També, s'han provat diverses condicions de rentat amb BGE, després de la introducció de la mostra, per eliminar les molècules no retingudes i equilibrar el capil·lar abans de l'elució i la separació electroforètica. Els millors resultats pel que fa a l'àrea dels pèptids s'han obtingut rentant amb BGE a 50 mbar durant 15 min, que és el temps mínim per a omplir el capil·lar de separació. Quan el rentat es realitza a pressió elevada (930 mbar), les àrees dels pics són considerablement menors, segurament perquè l'eliminació dels pèptids és més significativa que a baixa pressió. Aquest fet no succeïa amb l'anticòs intacte.

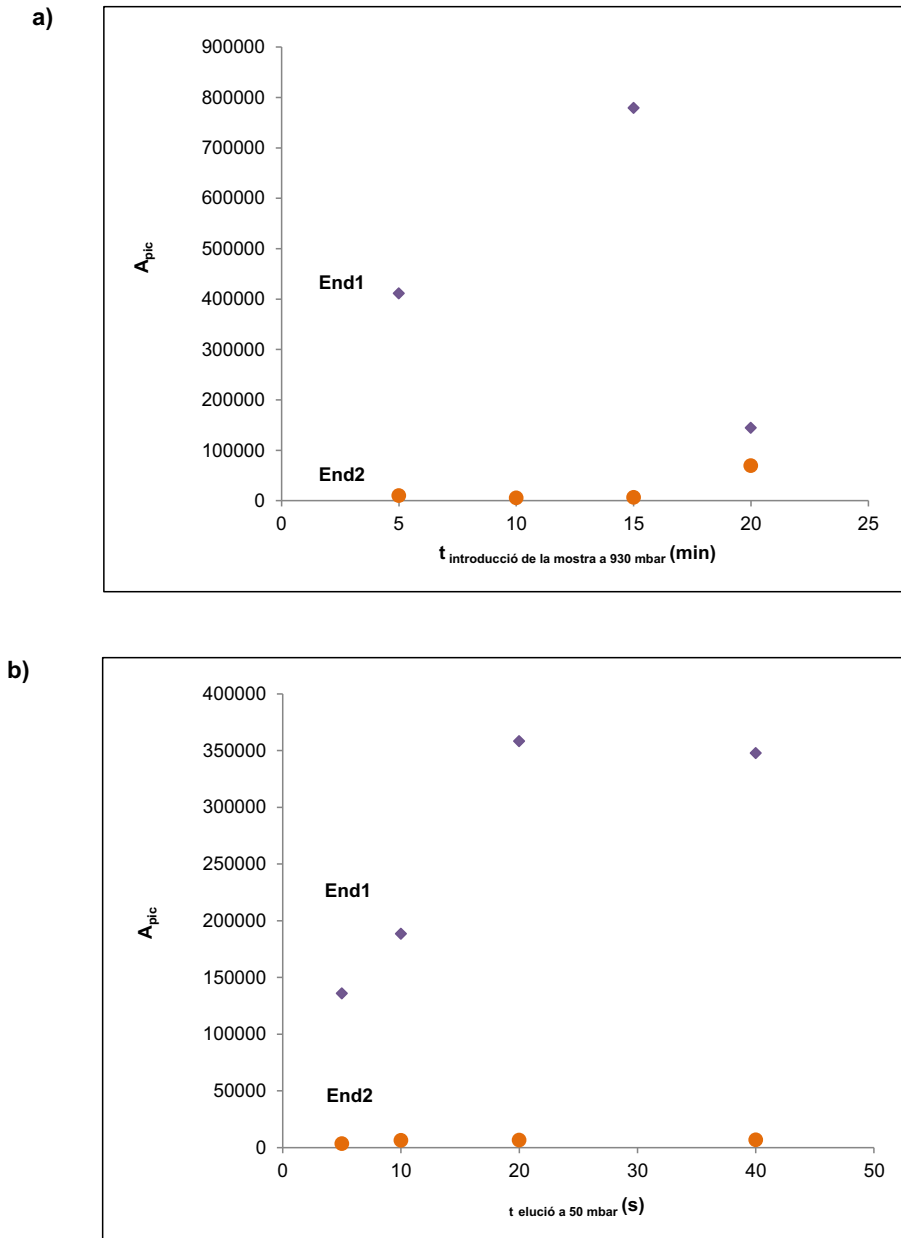


Figura 4.28. Efecte del temps d'introducció de mostra a 930 mbar (a) i del temps d'elució a 50 mbar (b) en l'àrea dels pics eluïts d'End1 i End2 d'una mescla de patrons de $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per IA-SPE-CE-TOF-MS amb una fase estacionària amb Fab'. Elució a 50 mbar durant 20 s (a) i introducció de mostra a 930 mbar durant 15 min (b).

A la figura 4.29 a es mostren els EIE de l'End1 i l'End2 obtinguts en l'anàlisi de mescles de patrons de 10 i 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament. S'observa que el pic de l'End1 és considerablement més intens que el de l'End2, tot i que la concentració de l'End1 és cinc vegades més petita que la de l'End2. Això demostra que els Fab' immobilitzats són més immunoreactius contra l'End1 que contra l'End2, tal i com passava amb la fase estacionària amb el mateix anticòs intacte (figura 4.21 a, pàg. 211). De la mateixa manera, els dos pèptids no es poden separar perquè les seves diferències estructurals són molt petites (article 3.1).

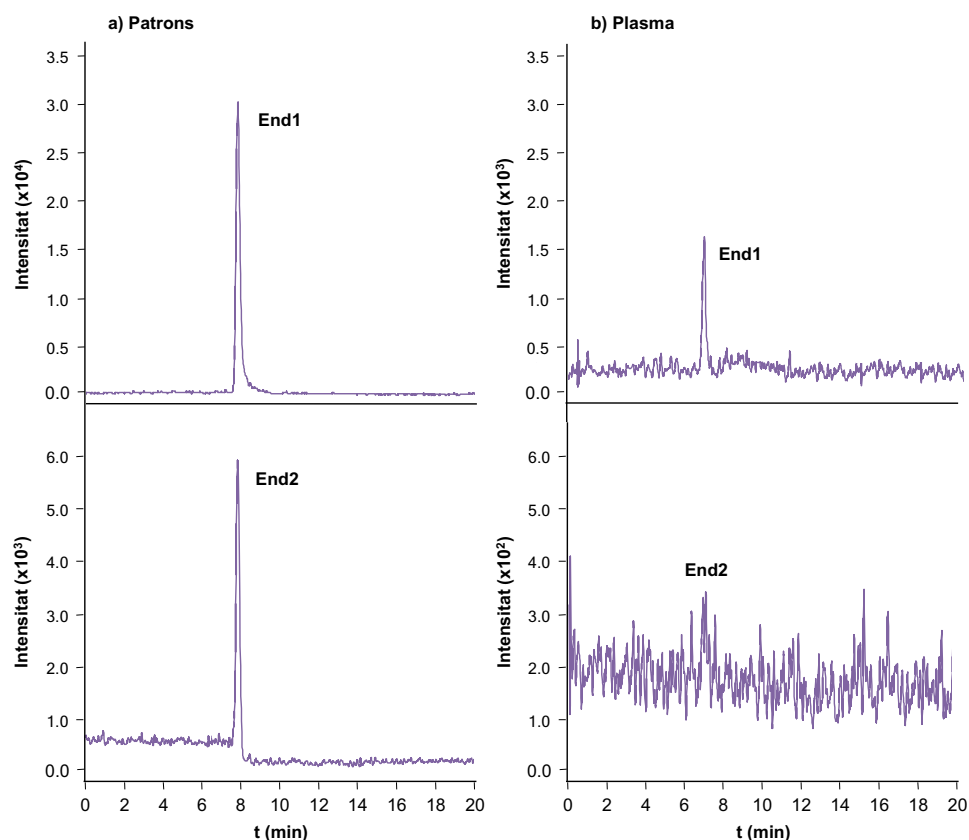


Figura 4.29. EIE dels pèptids opiàcics End1 i End2 en una mescla de patrons de 10 i 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament (a) i en mostres de plasma fortificades amb 10 i 50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivament (b), per IA-SPE-CE-TOF-MS amb una fase estacionària de Fab'.

A la taula 4.9 es resumeixen els valors obtinguts amb patrons per a la repetibilitat i reproductibilitat en l'àrea de pic (A_{pic}) i el temps de migració (t_m), la linealitat i els LOD. Com es pot observar, la repetibilitat i la reproductibilitat en el temps de

migració són similars pels dos pèptids, mentre que els valors de %RSD en l'àrea de pic són superiors per a l'End2 que presenta àrees més petites. Aquests resultats són acceptables, tot i que són lleugerament superiors als obtinguts emprant la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte (taula 4.8, pàg. 212). Pel que fa a la durabilitat, la fase estacionària amb anticòs intacte només es podia utilitzar vuit vegades sense problemes en l'extracció i la fase estacionària amb fragments Fab', es pot utilitzar fins a dotze vegades. Tot i així, la durabilitat d'ambdues fases estacionàries d'immunoafinitat és inferior a la de les fases estacionàries C₁₈ comercials (més de 20 vegades) [54, 55]. Pel que fa a la linealitat, els pendents de les rectes de calibratge són notablement superiors a les obtingudes amb l'altra fase estacionària. A més, el rang de linealitat és cinc vegades més ample. Respecte els LOD, l'End1 s'ha pogut detectar a concentracions de 0.5 ng·mL⁻¹, el que implica una lleugera millora dels LOD obtinguts amb la fase estacionària amb anticòs intacte (1 ng·mL⁻¹). El LOD obtingut per a l'End1 és 200 vegades millor que el valor obtingut per CE-TOF-MS emprant el BGE neutre (100 ng·mL⁻¹). Aquest LOD és proper al valor obtingut emprant el preconcentradora amb C₁₈ i el BGE àcid, que afavoreix la ionització dels pèptids en ESI positiu (0.1 ng·mL⁻¹). En canvi, el LOD de l'End2 amb la fase estacionària Fab' és 5 vegades superior que l'obtingut amb la fase estacionària amb anticòs intacte (1 ng·mL⁻¹), probablement perquè les condicions seleccionades d'introducció de mostra i elució són més favorables per a la immunoextracció de l'End1.

Taula 4.9. Paràmetres de qualitat establerts per l'anàlisi de pèptids opiacis en mesclades de patrons per IA-SPE-CE-TOF-MS amb Fab' i CE-TOF-MS, emprant BGE neutre.

	IA-SPE-CE-TOF-MS amb Fab'						CE-TOF-MS	
	Repetibilitat (%RSD) (c=10ng·mL ⁻¹ , n=8)		Reproductibilitat (%RSD) (c=10ng·mL ⁻¹ , n=16)		Linealitat		LOD (ng·mL ⁻¹)	LOD (ng·mL ⁻¹)
	A _{pic}	t _m	A _{pic}	t _m	Rang de c (ng·mL ⁻¹)	Recta de regressió (R ² >0.99)		
End1	11	12	16	13	1-50	A = 54458 C - 11783	0.5	100
End2	16	15	24	14	5-50	A = 14174 C + 6896	5	100

La selectivitat de la fase estacionària d'immunoafinitat amb Fab' s'ha avaluat analitzant una mescla de vuit pèptids opiacis (DynA, Met-NH₂, Meap, End1, End2, Des, Met i Ala-Met). A diferència del que s'ha observat amb la fase estacionària amb anticòs intacte, a més de l'End1, l'End2 i la DynA, també s'ha detectat la Meap. Com ja s'ha explicat anteriorment, la retenció d'aquests dos últims pèptids seria deguda a interaccions no específiques, ja que no presenten similituds estructurals amb l'End1 i l'End2, però tenen l'aminoàcid bàsic arginina que podria afavorir l'establiment d'interaccions no específiques. El fet de que els grups residuals romanents a les fases estacionàries amb anticòs intacte i fragments Fab' siguin diferents podria explicar perquè ara també es detecta la Meap.

Amb la metodologia establerta, s'ha avaluat el comportament d'aquesta fase estacionària quan s'analitzen mostres de plasma. S'ha emprat el tractament de mostra habitual, que consisteix en una precipitació seguida d'una filtració (la recuperació de l'End1 és del 70% aproximadament). A la figura 4.29 b es mostren els EIE de l'End1 i l'End2 obtinguts en l'anàlisi de mostres de plasma fortificades amb 10 i 50 ng·mL⁻¹, respectivament. Com es pot observar, les intensitats de l'End1 i de l'End2 són 20 i 60 vegades menors que les que s'obtenen quan s'analitzen mescles de patrons a les mateixes concentracions (figura 4.29 a). Probablement, la disminució de l'alçada de pic és més significativa per a l'End2 perquè l'anticòs és menys immunoreactiu contra aquest pèptid. Les diferències en les intensitats obtingudes amb les mescles de patrons i les mostres de plasma és deguda a la pèrdua de pèptids durant el procés del tractament de plasma humà i a la presència de components de la matriu. A la figura 4.30 es mostren els BPE a diversos rangs de masses per a una mostra de plasma sense fortificar emprant les fases estacionàries amb fragments Fab' i anticòs intacte. La detecció d'una menor quantitat de substàncies prova que, quan s'analitzen mostres de plasma, la selectivitat de la fase estacionària amb Fab' és millor que amb anticòs intacte, el que permetria una millor sensibilitat per a la detecció dels anàlits. No obstant, tal i com succeeix amb la DynA i la Meap, alguns components del plasma encara es retindrien mitjançant interaccions no específiques amb grups residuals presents en el suport i dificultarien la interacció de les endomorfines amb els Fab'. Per això, no s'aconsegueixen els mateixos LOD que amb patrons. A més, cal tenir en compte que un 30% dels pèptids es perden durant el tractament de la mostra.

Així, l'End1 i l'End2 en mostres de plasma s'han pogut detectar a 1 i 50 ng·mL⁻¹, respectivament. Aquests valors són 100 i 2 vegades millors que els LOD obtinguts emprant la fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte (100 ng·mL⁻¹) (article 3.1). El LOD de l'End1 és similar al que s'aconsegueix per a l'anàlisi de mostres de plasma per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant el BGE àcid (l'End2 no s'ha estudiat, articles 2.2 i 3.1).

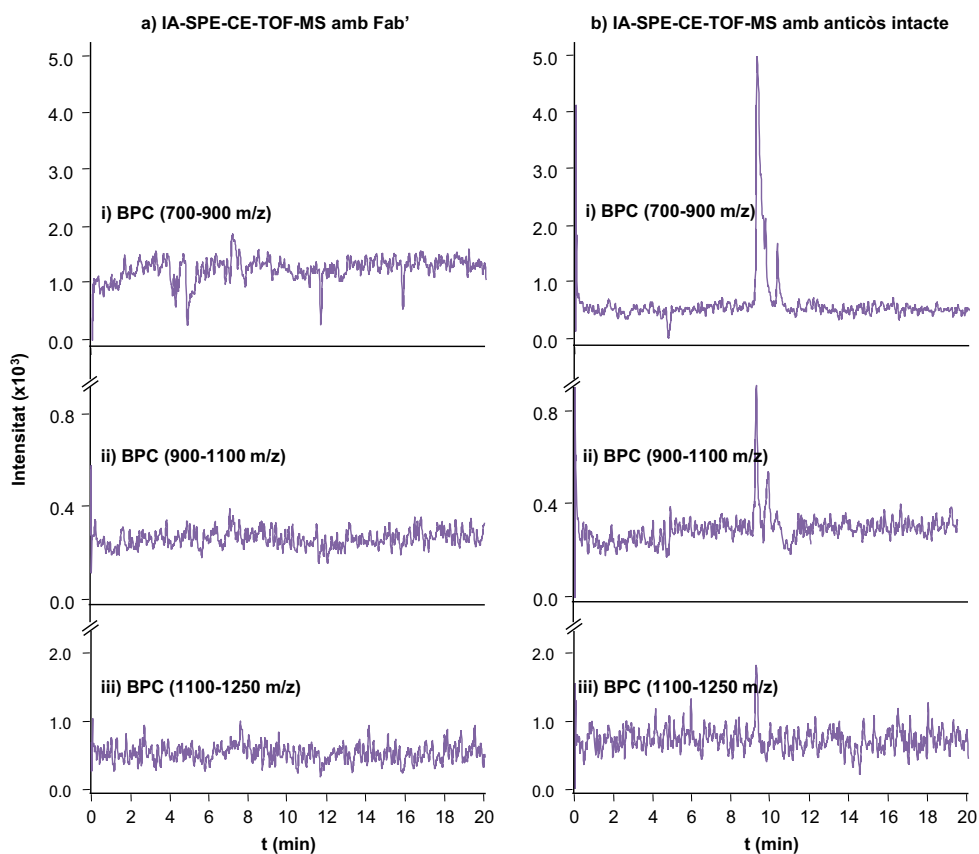


Figura 4.30. BPE per IA-SPE-CE-TOF-MS amb Fab' (a) i amb anticòs intacte (b) entre 700-900 m/z (i), 900-1100 m/z (ii) i 1100-1250 m/z (iii) d'un blanc de mostra de plasma.

A manera de resum, a la taula 4.10 es recullen els LOD que s'han aconseguit per a l'End1, com exemple de pèptid opiàci, mitjançant les diverses metodologies de SPE-CE-TOF-MS establertes emprant la fase estacionària cromatogràfica convencional C₁₈ i les fases estacionàries d'immunoafinitat amb anticòs intacte i amb Fab'.

Taula 4.10. LOD obtinguts per a l'End1 en mescleres de patrons i en mostres de plasma humà (excepte si s'indica el contrari) mitjançant les diverses metodologies de SPE-CE-TOF-MS establertes en aquesta tesi doctoral.

Metodologia	Preconcentrador	Fase estacionària	Interfase CE-MS	LOD (ng·mL ⁻¹)	
				Patró	Mostra biològica
C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	Amb frits	C ₁₈	Amb líquid auxiliar	0.1	1
C ₁₈ -SPE-tITP-CE-TOF-MS	Amb frits	C ₁₈	Amb líquid auxiliar	0.01	0.1
C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	Sense frits	C ₁₈	Amb líquid auxiliar	1	5 ^a
C ₁₈ -SPE-CE-TOF-MS	Sense frits	C ₁₈	Sense líquid auxiliar	0.002	-
IA-SPE-CE-TOF-MS	Amb frits	Anticòs intacte	Amb líquid auxiliar	1	100
IA-SPE-CE-TOF-MS	Amb frits	Fab'	Amb líquid auxiliar	0.5	1

^a Mostra de líquid cerebrospinal

La concentració dels pèptids opiàcis en individus sans són de l'ordre dels pg·mL⁻¹ (0.02-0.07 ng·mL⁻¹ [41, 255]). Segons la patologia desenvolupada, les concentracions dels pèptids opiàcis pot ser superior o inferior. Per exemple, el contingut total de pèptids opiàcis en líquid cerebrospinal de malalts d'Alzheimer és significativament superior al que es troba en individus sense desordres neurològics [42] i els nivells d'End1 en plasma de pacients diabètics són considerablement inferiors als d'individus sans [41]. En els millor dels casos, les metodologies establertes en aquesta tesi doctoral permeten detectar pèptids opiàcis en mostres de plasma humà a concentracions d'1 ng·mL⁻¹ mitjançant C₁₈-SPE-CE-TOF-MS i

IA-SPE-CE-MS, i fins i tot a $0.1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per C_{18} -SPE-tITP-CE-TOF-MS. Aquestes concentracions encara són lleugerament superiors als valors trobats en fluids biològics d'individus sans. Únicament s'han aconseguit assolir concentracions de l'ordre de $2 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en l'anàlisi de mesclades de patrons per C_{18} -SPE-CE-TOF-MS amb una interfase nano-ESI sense líquid auxiliar. Tot i que els LOD per a patrons acostumen a ser inferiors que per a mostres de plasma i líquid cerebrospinal, aquests resultats podrien ser prometedors per a l'anàlisi de fluids biològics, però caldrà comprovar-ho experimentalment. Pel que fa a les fases estacionàries d'immunoafinitat, caldria establir metodologies efectives per a la desactivació dels grups residuals del suport per tal de millorar encara més la selectivitat i així, poder emprar les fases estacionàries amb Fab' en la detecció d'anàlits en mostres biològiques. També, caldria millorar l'eficiència de l'extracció immobilitzant un anticòs o fragments d'anticòs amb una elevada immunoreactivitat contra els anàlits i incrementar la capacitat de la fase estacionària maximitzant el nombre dels llocs actius disponibles en el suport. Tot i que les possibles millores de la fase estacionària d'immunoafinitat podrien evitar en un futur els tractaments previs de mostra, també seria recomanable explorar altres tractaments de mostres biològiques que garanteixin la màxima recuperació dels anàlits d'interès i permetin eliminar interferències abans de la seva anàlisi per IA-SPE-CE-MS.

Capítol 5. Conclusions

Chapter 5. Conclusions

- S'ha millorat el tractament de les mostres de plasma per a l'anàlisi de pèptids opiàcis mitjançant C₁₈-SPE-CE-MS i s'ha demostrat que les millors recuperacions s'obtenen realitzant una precipitació amb acetonitril seguida d'una filtració amb els filtres *Microcon Ultracel* YM-10 (10 kDa de tall molecular) sense passar a 25°C. Mitjançant aquest tractament optimitzat és possible recuperar un 26, 71 i 72% de DynA, End1 i Met, respectivament; valors que gairebé dupliquen els percentatges de recuperació emprant els filtres YM-3 (3 kDa de tall molecular). Tot i així, els LOD per a aquests pèptids opiàcis en C₁₈-SPE-CE-IT-MS són els mateixos emprant ambdós tractaments, probablement perquè les interferències degudes a la matriu amb els filtres YM-10 dificulten la millora dels LOD.

- S'han desenvolupat, optimitzat i validat metodologies C₁₈-SPE-CE-TOF-MS per a l'anàlisi de pèptids opiàcis en mostres de plasma humà i líquid cerebrospinal (CSF) emprant preconcentradors amb i sense *frits*.
 - L'ús de l'espectròmetre de masses amb analitzador TOF facilita la identificació inequívoca dels pèptids estudiats gràcies a la seva elevada exactitud i resolució de masses, i ofereix una sensibilitat superior a la d'un espectròmetre de masses amb analitzador IT.
 - En general, el preconcentrador amb *frits* permet assolir un LOD de l'ordre de 0.1 ng·mL⁻¹ en patrons i entre 0.5 i 1 ng·mL⁻¹, depenent del pèptid opiàci, en mostres de plasma.
 - El preconcentrador sense *frits* permet arribar a un LOD de l'ordre d'1 ng·mL⁻¹ en patrons i 5 ng·mL⁻¹ en mostres de CSF.
 - Els LOD dels pèptids opiàcis amb els preconcentradors amb i sense *frits* són, respectivament, 500 i 100 vegades millors que per CE-TOF-MS. Per tant, el disseny amb *frits* proporciona factors de preconcentració superiors i és el més recomanable, tot i els avantatges de la construcció del preconcentrador sense *frits*. Els valors de concentració que s'assoleixen són propers als que es troben en fluids biològics.
 - S'ha de continuar investigant altres dissenys de preconcentradors en línia que permetin contenir més quantitat de fase estacionària, més selectiva i

amb més superfície activa (menor mida de partícula, major porositat, grups actius amb elevada afinitat, menys interaccions no específiques, etc.) i introduir elevats volum de mostra en un temps reduït. Les configuracions escalonades, en zig-zag o cruciformes podrien ser alternatives a avaluar. A més, com que en aquests dissenys la introducció de la mostra es realitza en la direcció perpendicular a la separació, es minimitzen les interaccions dels components de la matriu de la mostra amb la superfície interna del capil·lar de separació.

- S'ha estudiat la combinació del mètode de preconcentració electroforètic tITP amb la C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb el preconcentrador amb *frits* per a millorar la sensibilitat, i s'ha optimitzat i validat una metodologia de C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS per a l'anàlisi de pèptids opiacis.
 - S'ha demostrat que l'esmentada metodologia permet millorar aproximadament 10 vegades els LOD obtinguts per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS per a l'End1 i la Met tan en patrons com en mostres de plasma humà, mentre que per a la DynA no s'aconsegueixen millores. En patrons, els LOD de l'End1 i la Met són 0.01 ng·mL⁻¹, i en mostres de plasma humà, 0.1 ng·mL⁻¹.
 - El major inconvenient de la tITP és la pèrdua de resolució en la separació, especialment per a mostres de plasma, ja que els anàlits es preconcentren juntament amb altres compostos de la matriu.
 - S'ha d'explorar el potencial de la metodologia emprant fases estacionàries més selectives que el C₁₈, com les d'immunoafinitat, i millorar la separació electroforètica.

- S'ha avaluat l'ús d'un prototip d'interfase nano-ESI sense líquid auxiliar per a l'anàlisi de pèptids opiacis per CE-TOF-MS i C₁₈-SPE-CE-TOF-MS.
 - S'ha demostrat que aquesta interfase ofereix una major sensibilitat que la interfase de CE-MS amb líquid auxiliar. En CE-TOF-MS amb aquesta interfase, els LOD dels pèptids opiacis són 10 ng·mL⁻¹, mentre que amb la interfase amb líquid auxiliar (i capil·lars de 75 µm id), 50 ng·mL⁻¹.

- S'ha dissenyat una nova configuració de preconcentrador sense *frits* compatible amb els capil·lars amb HSPS, i s'ha optimitzat i avaluat una metodologia C₁₈-SPE-CE-TOF-MS emprant aquesta nova configuració. Els pèptids opiacis s'han pogut detectar a 2 pg·mL⁻¹, el que significa una millora d'aproximadament 5000 vegades respecte els LOD obtinguts per CE-TOF-MS amb aquesta interfase. Aquests valors són 50 vegades inferiors als obtinguts per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (0.1 ng·mL⁻¹ en patrons).
 - S'ha d'aprofundir en la millora del disseny d'aquest nou preconcentrador per a obtenir una configuració més fàcil de fabricar i més robusta. També, s'han de considerar els reptes relacionats amb la fase estacionària i les configuracions escalonades, en zig-zag o cruciformes indicats anteriorment.
 - S'ha d'estar alerta als nous avenços en interfases de nano-ESI sense líquid auxiliar, ja que ofereixen una millor sensibilitat que la interfase de CE-MS amb líquid auxiliar comercial més àmpliament utilitzada.
- S'han desenvolupat metodologies per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat amb anticossos policlonals intactes i amb fragments d'anticossos. S'han optimitzat i validat metodologies d'IA-SPE-CE-TOF-MS per a l'anàlisi de pèptids opiacis en mostres de plasma. També, s'ha estudiat l'aplicabilitat a biomolècules d'elevat pes molecular emprant la transferrina humana com a model en mostres de sèrum.
- D'una banda, s'ha estudiat la immobilització covalent d'una IgG oxidada a partícules de sílice derivatitzades amb grups hidrazida. D'altra banda, s'ha estudiat la fragmentació i purificació d'una IgG per a l'obtenció selectiva de fragments Fab', i la posterior immobilització covalent dels Fab' a partícules de sílice derivatitzades amb grups succinimidil.
 - S'ha demostrat que els procediments establerts són adequats per a la preparació de fases estacionàries d'immunoafinitat contra els pèptids opiacis End1 i End2. Ambdues fases estacionàries han proporcionat LOD similars en l'anàlisi de patrons per IA-SPE-CE-TOF-MS (1 ng·mL⁻¹ per ambdós pèptids amb anticòs intacte i 0.5 i 5 ng·mL⁻¹ per a l'End1 i l'End2, respectivament, amb fragments Fab'). En mostres de plasma humà, la fase estacionària amb Fab' ha proporcionat LOD inferiors (1 i 50 ng·mL⁻¹ per a

l'End1 i l'End2, respectivament, front els $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ per ambdós pèptids amb l'anticòs intacte).

- L'End1 s'ha detectat en mostres de plasma a la mateixa concentració ($1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) per C₁₈-SPE-CE-TOF-MS amb BGE àcid i IA-SPE-CE-TOF-MS amb Fab' i BGE neutre, probablement per la millor selectivitat de la fase estacionària, tot i no ser possible utilitzar les millors condicions per ESI positiu.
- S'ha demostrat l'aplicabilitat del procediment de preparació d'una fase estacionària d'immunoafinitat amb anticòs intacte per a l'anàlisi de la transferrina humana. L'ús del recobriment permanent per adsorció HN permet minimitzar l'adsorció de la proteïna a les parets internes del capil·lar de separació i la seva elevada estabilitat el fa adequat per a IA-SPE-CE-TOF-MS. La metodologia establerta permet la detecció de la transferrina en mostres de sèrum. No obstant, la millora dels LOD no és molt significativa i la limitada resolució en la separació no permet la identificació de les sialoformes de la transferrina.
- Tot i l'excel·lent selectivitat de les fases estacionàries d'immunoafinitat amb fragments Fab' quan s'analitzen mostres de plasma, s'hauria de continuar millorant per a prevenir les interaccions no específiques amb els components de la matriu. S'han de continuar explorant procediments de desactivació dels grups residuals de la fase estacionària o l'ús d'anticossos altament purificats més selectius o fins i tot, anticossos monoclonals.
- La combinació de la IA-SPE-CE-MS i interfases de nano-ESI sense líquid auxiliar pot ser una excel·lent eina per a millorar la selectivitat i sensibilitat per a la detecció de biomarcadors peptídics de malalties humanes.

- The plasma sample treatment for the analysis of opioid peptides by C₁₈-SPE-CE-MS has been improved and the best recoveries are obtained applying a precipitation with acetonitrile followed by a filtration with non-passivated *Microcon Ultracel* YM-10 filters (10 kDa cut-off) at 25°C. Under the optimized conditions, the recoveries for DynA, End1 and Met are 26, 71 and 72%, respectively. These recovery values almost double those obtained using the YM-3 filters (3 kDa cut-off). Nevertheless, both treatments provide the same LODs for the analysis of opioid peptides by C₁₈-SPE-CE-IT-MS, probably because the interferences due to matrix with the YM-10 filters hinder the improvement of LOD.

- Several C₁₈-SPE-CE-TOF-MS methodologies have been developed, optimized and validated for the analysis of opioid peptides in plasma samples and cerebrospinal fluid (CSF) samples using microcartridges with and without frits.
 - A TOF mass spectrometer facilitates the unequivocal identification of the studied opioid peptides due to the high mass accuracy and resolution. Furthermore, it provides a higher sensitivity than an IT mass spectrometer.
 - In general, the microcartridge with frits allows achieving LODs around 0.1 ng·mL⁻¹ in standards and between 0.5 and 1 ng·mL⁻¹, depending on the opioid peptide, in plasma samples.
 - The fritless microcartridge allows achieving LODs around 1 ng·mL⁻¹ in standards and 5 ng·mL⁻¹ in CSF samples.
 - The LOD of the opioid peptides using the microcartridges with and without frits are 500 and 100-fold better than the LODs obtained by CE-TOF-MS. Thereby, the microcartridge with frits provides higher preconcentration factors and it is the most recommended configuration in despite of the advantages of construction of the fritless microcartridge. The reached concentration levels are close to those found in biological fluids.
 - Research may continue on novel on-line microcartridge designs that allow to contain an increased amount of sorbent with an improved selectivity and a higher active surface area (lower particle size, higher porosity, high affinity active groups, less non-specific binding, etc.) as well as to load large

volumes of sample in short times. Staggered, zigzag or cruciform configurations may be alternatives to be investigated. In addition, in such designs, as sample is loaded in an orthogonal direction with respect to separation, interaction of sample matrix components on the inner capillary walls is minimized.

- The combination of tITP with C₁₈-SPE-CE-TOF-MS using the microcartridge with frits has been studied to improve sensitivity and a C₁₈-SPE-tITP-CE-TOF-MS methodology has been optimized and validated for the analyses of opioid peptides.
 - The LODs of End1 and Met in standards and human plasma samples have been improved 10-fold approximately by this methodology with regard to C₁₈-SPE-CE-TOF-MS, while no improvements have been achieved for DynA. LODs for End1 and Met in standards and plasma samples are 0.01 ng·mL⁻¹ and 0.1 ng·mL⁻¹, respectively.
 - The major drawback of using tITP is the loss of separation resolution, which becomes crucial plasma samples because the analytes are preconcentrated together with the opioid peptides.
 - The potential of SPE-tITP-CE-TOF-MS may be explored using sorbents with higher selectivity than C₁₈, such as immunoaffinity sorbents. Electrophoretic separation may be also improved.
- A prototype of a sheathless nano-ESI interface has been evaluated for the analysis of opioid peptides by CE-TOF-MS and C₁₈-SPE-CE-TOF-MS.
 - This interface allows a higher sensitivity than the sheathflow CE-MS interface. While peptides are detected at 50 ng·mL⁻¹ by sheathflow CE-TOF-MS (and separation capillary of 75 μm id), LODs are 10 ng·mL⁻¹ by sheathless CE-TOF-MS.
 - A novel fritless microcartridge has been designed to be compatible with the separation capillary with HSPS, and a C₁₈-SPE-CE-TOF-MS methodology has been optimized and evaluated using this novel configuration. Opioid peptides have been detected at 2 pg·mL⁻¹, which means an improvement of 5000-fold with regard to the LODs obtained by sheathless CE-TOF-MS.

These values are 50-fold lower than those obtained by C₁₈-SPE-CE-TOF-MS (0.1 ng·mL⁻¹ in standards).

- The novel microcartridge may be further improved in order to obtain a configuration easier to manufacture and more robust. The challenges related to the sorbent and the staggered, zigzag or cruciform designs indicated above may be also considered.
 - Advances in sheathless nano-ESI interfaces must be followed because they provide a higher sensitivity than the widely used commercial sheathflow CE-MS interface.
- Two procedures for the preparation of immunoaffinity sorbents with intact polyclonal antibodies and Fab' fragments have been developed. IA-SPE-CE-TOF-MS methodologies have been optimized and validated for the analysis of opioid peptides in plasma samples. The applicability for the analysis of large biomolecules has been studied using transferrin as a model compound in serum samples.
- On the one hand, the covalent attachment of oxidized IgG to hydrazide silica particles has been studied. On the other hand, the fragmentation and purification of an IgG have been studied to selectively obtain Fab' fragments, as well as the covalent immobilization of the Fab' fragments to succinimidyl silica particles.
 - The established procedures are suitable for the preparation of immunoaffinity sorbents against the opioid peptides End1 and End2. Both immunoaffinity sorbents have provided similar LODs for the analysis of standards by IA-SPE-CE-TOF-MS (1 ng·mL⁻¹ for both peptides with intact antibody and 0.5 and 5 ng·mL⁻¹ for End1 and End2, respectively, with Fab'). In plasma samples, the Fab' sorbent has provided lower LODs (1 and 50 ng·mL⁻¹ for End1 and End2, respectively vs. 100 ng·mL⁻¹ for both peptides with intact antibody).
 - End1 has been detected in plasma samples at the same concentration (1 ng·mL⁻¹) by C₁₈-SPE-CE-TOF-MS with acidic BGE and IA-SPE-CE-TOF-MS with the Fab' sorbent and neutral BGE due to the best selectivity of the sorbent, although the best conditions for positive ESI cannot be applied.

- The applicability of the preparation procedure of an immunoaffinity sorbent with intact antibody for the analysis of human transferrin has been demonstrated. The permanently adsorbed HN coating prevents protein adsorption to the inner walls of the separation capillary and its high stability makes it compatible with IA-SPE-CE-TOF-MS. The established methodology allows to detect transferrin in human serum samples. However, the LOD improvement is not significant and the limited separation resolution does not allow the identification of transferrin sialoforms.
- Despite the excellent selectivity of the immunoaffinity sorbents with Fab' when plasma samples are analysed, results may be further improved preventing non-specific binding of matrix compounds. New end-capping procedures of the residual groups on the IA sorbent or the use of highly purified and selective antibodies, including monoclonal antibodies, may be explored.
- The combination of IA-SPE-CE-MS and sheathless nano-ESI interfaces may be an excellent tool to improve the selectivity and sensitivity for the detection of peptide biomarkers of human diseases.

Capítol 6. Referències

Chapter 6. References

- [1] L. del Giacco, C. Cattaneo. *Introduction to genomics*. Methods in Molecular Biology 2012, 823, 79-88.
- [2] F.E. Ahmed. *The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery*. Journal of Chromatography B 2009, 877, 1963-1981.
- [3] J.C. Venter, M.D. Adams, E.W. Myers, P.W. Li, R.J. Mural, G.G. Sutton, H.O. Smith, et al. *The sequence of the human genome*. Science 2001, 291, 1304-1351.
- [4] C. Desiderio, D.V. Rossetti, F. Iavarone, I. Messina, M. Castagnola. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry: recent trends in clinical proteomics*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010, 53, 1161-1169.
- [5] X. Fang, B.M. Balgley, C.S. Lee. *Recent advances in capillary electrophoresis-based proteomic techniques for biomarker discovery*. Electrophoresis 2009, 30, 3998-4007.
- [6] B.R. Fonslow, J.R. Yates III. *Capillary electrophoresis applied to proteomic analysis*. Journal of Separation Science 2009, 32, 1175-1188.
- [7] R. Ramautar, A.A.M. Heemskerk, P.J. Hensbergen, A.M. Deelder, J.M. Busnel, O.A. Mayboroda. *CE-MS for proteomics: advances in interface development and application*. Journal of Proteomics 2012, 75, 3814-3828.
- [8] M. Herrero, E. Ibañez, A. Cifuentes. *Capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry in peptide analysis and peptidomics*. Electrophoresis 2008, 29, 2148-2160.
- [9] E. Schiffer, H. Mischak, J. Novak. *High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS*. Proteomics 2006, 6, 5615-5627.
- [10] C. Simo, A. Cifuentes, V. Kasicka. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for Peptide analysis: target-based approaches and proteomics/peptidomics strategies*. Methods in Molecular Biology 2013, 984, 139-151.
- [11] V. Kasicka. *Recent advances in CE and CEC of peptides (2007-2009)*. Electrophoresis 2010, 31, 122-146.
- [12] C. Barbas, E.P. Moraes, A. Villaseñor. *Capillary electrophoresis as a metabolomics tool for non-targeted fingerprinting of biological samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011, 55, 823-831.
- [13] S.P. Putri, Y. Nakayama, F. Matsuda, T. Uchikata, S. Kobayashi, A. Matsubara, E. Fukusaki. *Current metabolomics: practical applications*. Journal of Bioscience and Bioengineering 2013, 115, 579-589.
- [14] R. Ramautar, O.A. Mayboroda, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2008-2010*. Electrophoresis 2011, 32, 52-65.
- [15] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *CE-MS in metabolomics*. Electrophoresis 2009, 30, 276-291.
- [16] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *CE-MS for metabolomics: developments and applications in the period 2010-2012*. Electrophoresis 2013, 34, 86-98.

- [17] A.J. Atkinson, W.A. Colburn, V.G. DeGruttola, D.L. DeMets, G.J. Downing, D.F. Hoth, J.A. Oates, et al. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clinical Pharmacology and Therapeutics 2001, 69, 89-95.
- [18] K. Mesbah, R. Verpillot, F. de l'Escaille, J.B. Falmagne, M. Taverna. *Contribution of CE to the analysis of protein or peptide biomarkers*. Methods in Molecular Biology 2013, 984, 167-190.
- [19] C.M. Laborde, I. Zubiri, S. Alonso-Orgaz, L. Mourino-Alvarez, G. Álvarez-Llamas, M.G. Barderas. *Aportaciones de la proteómica al laboratorio clínico*. Revista del Laboratorio Clínico 2011, 4, 214-224.
- [20] A.P. Ayre, D. Soni, S. Shimpi. *Biomarkers in drug discovery and development: from target identification to drug marketing*. International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research 2011, 1, 28-34.
- [21] H. Mischak, J.P. Schanstra. *CE-MS in biomarker discovery, validation, and clinical application*. Proteomics Clinical Applications 2011, 5, 9-23.
- [22] N.L. Anderson. *The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum*. Clinical Chemistry 2010, 56, 177-185.
- [23] N.L. Anderson, N.G. Anderson. *The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects*. Molecular & Cellular Proteomics 2002, 1, 845-867.
- [24] D. Baechle, K. Sparbier, H. Dihazi, S. Blaschke, G.A. Mueller, M. Kostrzewa, T. Flad. *Towards stable diagnostic setups in clinical proteomics: absolute quantitation of peptide biomarkers using MALDI-TOF-MS*. Proteomics Clinical Applications 2007, 1, 1280-1284.
- [25] C.K. Mathews, K.E. Van Hole, K.G. Ahern. *Bioquímica*. Pearson Educación S.A., Madrid 2002.
- [26] A. Staub, D. Guillarme, J. Schappler, J.L. Veuthey, S. Rudaz. *Intact protein analysis in the biopharmaceutical field*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2011, 55, 810-822.
- [27] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins 2007-2010*. Electrophoresis 2011, 32, 66-82.
- [28] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *CE-MS for the analysis of intact proteins 2010-2012*. Electrophoresis 2013, 34, 99-112.
- [29] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins*. Journal of Chromatography A 2007, 1159, 81-109.
- [30] D. Andreu, L. Rivas. *Péptidos en biología y biomedicina*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 1997.
- [31] M. Perry, Q. Li, R.T. Kennedy. *Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters*. Analytica Chimica Acta 2009, 653, 1-22.
- [32] C. Chavkin. *Dynorphin - still an extraordinarily potent opioid peptide*. Molecular Pharmacology 2013, 83, 729-736.
- [33] J.C. Froehlich. *Opioid peptides*. Alcohol Health & Research World 1997, 21, 132-136.

- [34] K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, C. Nemeroff. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. American College of Neuropsychopharmacology. Lippincott Williams & Wilkins 2002.
- [35] A. Lesniak, A.W. Lipkowski. *Opioid peptides in peripheral pain control*. Acta Neurobiologiae Experimentalis 2011, 71, 129–138.
- [36] R.J. Bodnar. *Endogenous opiates and behavior: 2011*. Peptides 2012, 38, 463-522.
- [37] M. Wollemann, S. Benyhe. *Non-opioid actions of opioid peptides*. Life Sciences 2004, 75, 257-270.
- [38] J.N. Baraniuk, G. Whalen, J. Cunningham, D.J. Clauw. *Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain*. BMC Musculoskeletal Disorders 2004, 5, 48-54.
- [39] A. Rosen, T. Lundeberg, B. Bytner, I. Nylander. *Central changes in nociceptin dynorphin B and Met-enkephalin-Arg-Phe in different models of nociception*. Brain Research 2000, 857, 212-218.
- [40] D.S. Jessop, A. Fassold, C. Wolff, R. Hofbauer, A. Chover-Gonzalez, L.J. Richards, R.H. Straub. *Endomorphins in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and experimental arthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences 2010, 1193, 117-122.
- [41] F.Z. Xia, Y.L. Lu, Y. Chen, T. Gu, H.X. Zhang, J. Yu, L.J. Zhao. *Peripheral endomorphin-1 levels are suppressed in diabetic patients*. Diabetes Research and Clinical Practice 2010, 87, 200-203.
- [42] D.M. Desiderio. *Mass spectrometric analysis of neuropeptidergic systems in the human pituitary and cerebrospinal fluid*. Journal of Chromatography B 1999, 731, 3-22.
- [43] H.G. Lee, J.L. Tseng, R.R. Becklin, D.M. Desiderio. *Preparative and analytical capillary zone electrophoresis analysis of native endorphins and enkephalins extracted from the bovine pituitary: mass spectrometric confirmation of the molecular mass of leucine enkephalin*. Analytical Biochemistry 1995, 229, 188-197.
- [44] V. Sanz-Nebot, F. Benavente, E. Hernández, J. Barbosa. *Evaluation of the electrophoretic behaviour of opioid peptides Separation by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 2006, 577, 68-76.
- [45] T. Lapainis, J.V. Sweedler. *Contributions of capillary electrophoresis to neuroscience*. Journal of Chromatography A 2008, 1184, 144-158.
- [46] Q. Li, J.K. Zubieta, R.T. Kennedy. *Practical aspects of in vivo detection of neuropeptides by microdialysis coupled off-line to capillary LC with multistage MS*. Analytical Chemistry 2009, 81, 2242-2250.
- [47] T.M. Phillips, E. Wellner. *Measurement of neuropeptides in clinical samples using chip-based immunoaffinity capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 2006, 1111, 106-111.
- [48] T.L. Lisi, K.A. Sluka. *A new electrochemical HPLC method for analysis of enkephalins and endomorphins*. Journal of Neuroscience Methods 2006, 150, 74-79.

- [49] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A. Brinkman. *Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 1999, 856, 483-514.
- [50] J. Hernández-Borges, C. Neuss, A. Cifuentes, M. Pelzing. *On-line capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of biomolecules*. Electrophoresis 2004, 25, 2257-2281.
- [51] C.H. Lin, T. Kaneta. *On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules*. Electrophoresis 2004, 25, 4058-4073.
- [52] A.J. Tomlinson, S. Naylor. *Enhanced performance membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry (mPC-CE-MS) in conjunction with transient isotachopheresis for analysis of peptide mixtures*. Journal of High Resolution Chromatography 1995, 18, 384-386.
- [53] Q. Yang, A.J. Tomlinson, S. Naylor. *Membrane preconcentration CE*. Analytical Chemistry 1999, 71, 183A-189A.
- [54] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa. *Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS*. Electrophoresis 2007, 28, 3957-3965.
- [55] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa. *Evaluation of on-line solid phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of neuropeptides in human plasma*. Electrophoresis 2008, 29, 3366-3376.
- [56] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *Recent developments in coupled SPE-CE*. Electrophoresis 2010, 31, 44-54.
- [57] N.A. Guzman. *Determination of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in serum and urine by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry*. Journal of Chromatography B 2000, 749, 197-213.
- [58] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. *Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein digests by immunoaffinity capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2009, 1216, 2574-2582.
- [59] H. Kalish, T.M. Phillips. *Application of immunoaffinity capillary electrophoresis to the measurements of secreted cytokines by cultured astrocytes*. Journal of Separation Science 2009, 32, 1605-1612.
- [60] H. Kalish, T.M. Phillips. *Analysis of neurotrophins in human serum by immunoaffinity capillary electrophoresis (ICE) following traumatic head injury*. Journal of Chromatography B 2010, 878, 194-200.
- [61] H. Kalish, T.M. Phillips. *Assessment of chemokine profiles in human skin biopsies by an immunoaffinity capillary electrophoresis chip*. Methods 2012, 56, 198-203.
- [62] B.J. de Kort, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Native fluorescence detection of biomolecular and pharmaceutical compounds in capillary electrophoresis: detector designs, performance and applications: a review*. Analytica Chimica Acta 2013, 766, 13-33.
- [63] R.C. Hughes. *Glycoproteins*. Chapman and Hall, New York 1983.

- [64] A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, R. Cummings, J. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, et al. *Essentials of glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2009.
- [65] S.S. Zhao, X. Zhong, C. Tie, D.D. Chen. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for analysis of complex samples*. *Proteomics* 2012, 12, 2991-3012.
- [66] A. Ylonen, N. Kalkkinen, J. Saarinen, J. Bogwald, J. Helin. *Glycosylation analysis of two cysteine proteinase inhibitors from Atlantic salmon skin: di-O-acetylated sialic acids are the major sialic acid species on N-glycans*. *Glycobiology* 2001, 11, 523-531.
- [67] R.A. Dwek. *Glycobiology: "towards understanding the function of sugars"*. Biochemical Society Transactions 1995, 23, 1-25.
- [68] A. Varki. *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. *Glycobiology* 1993, 3, 97-130.
- [69] R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. *Harper's Biochemistry*. Appleton & Lange, Stamford 1996.
- [70] D.J. Harvey. *Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry*. *Proteomics* 2001, 1, 311-328.
- [71] K. Rikova, A. Guo, Q. Zeng, A. Possemato, J. Yu, H. Haack, J. Nardone, et al. *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. *Cell* 2007, 131, 1190-1203.
- [72] R.T. MacGillivray, E. Mendez, S.K. Sinha, M.R. Sutton, J. Lineback-Zins, K. Brew. *The complete amino acid sequence of human serum transferrin*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, 79, 2504-2508.
- [73] F. Bortolotti, G. De Paoli, F. Tagliaro. *Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005*. *Journal of Chromatography B* 2006, 841, 96-109.
- [74] V. Crespi, U. Andreotta, E. Tettamanzi, M.M. Ferrario. *CDT: a biological marker of alcohol abuse*. *La Medicina del Lavoro* 2007, 98, 466-474.
- [75] M. Ridinger, P. Kohl, E. Gabele, N. Wodarz, G. Schmitz, P. Kiefer, C. Hellerbrand. *Analysis of carbohydrate deficient transferrin serum levels during abstinence*. *Experimental and Molecular Pathology* 2012, 92, 50-53.
- [76] W. Oberrauch, A.C. Bergman, A. Helander. *HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT)*. *Clinica Chimica Acta* 2008, 395, 142-145.
- [77] B. Wuyts, J.R. Delanghe. *The analysis of carbohydrate-deficient transferrin, marker of chronic alcoholism, using capillary electrophoresis*. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2003, 41, 739-746.
- [78] T. Arndt. *Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation*. *Clinical Chemistry* 2001, 47, 13-27.
- [79] J.O. Jeppsson, T. Arndt, F. Schellenberg, J.P. Wielders, R.F. Anton, J.B. Whitfield, A. Helander. *Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements*:

- I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2007, 45, 558-562.
- [80] E. Quintana, R. Montero, M. Casado, A. Navarro-Sastre, M.A. Vilaseca, P. Briones, R. Artuch. *Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation.* Journal of Chromatography B 2009, 877, 2513-2518.
- [81] J. Jaeken, H. Stibler, B. Hagberg. *The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement.* Acta Paediatrica Scandinavica Supplement 1991, 375, 1-71.
- [82] S. Arizaga Rodríguez, E. Blanco González, G. Alvarez Llamas, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel. *Detection of transferrin isoforms in human serum: comparison of UV and ICP-MS detection after CZE and HPLC separations.* Analytical and Bioanalytical Chemistry 2005, 383, 390-397.
- [83] C. Lanz, J.B. Falmagne, F. de l'Escaille, U. Marti, W. Thormann. *Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum with capillary zone electrophoresis. Sample preparation strategies for the removal of interferences caused by increased levels of immunoglobulins.* Journal of Chromatography A 2008, 1206, 33-40.
- [84] C. Lanz, M. Kuhn, V. Deiss, W. Thormann. *Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera.* Electrophoresis 2004, 25, 2309-2318.
- [85] C. Lanz, U. Marti, W. Thormann. *Capillary zone electrophoresis with a dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum.* Journal of Chromatography A 2003, 1013, 131-147.
- [86] J. Caslavská, J. Joneli, U. Wanzenried, J. Schiess, W. Thormann. *Transferrin immunoextraction for determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum by capillary zone electrophoresis.* Journal of Separation Science 2012, 35, 3521-3528.
- [87] J.O. Jeppsson, H. Kristensson, C. Fimiani. *Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol.* Clinical Chemistry 1993, 39, 2115-2120.
- [88] R. Jabeen, D. Payne, J. Wiktorowicz, A. Mohammad, J. Petersen. *Capillary electrophoresis and the clinical laboratory.* Electrophoresis 2006, 27, 2413-2438.
- [89] A. Helander, A. Husa, J.O. Jeppsson. *Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum.* Clinical Chemistry 2003, 49, 1881-1890.
- [90] V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, C. Neususs, J. Barbosa. *Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS.* Electrophoresis 2007, 28, 1949-1957.
- [91] E. Landberg, E. Astrom, B. Kagedal, P. Pahlsson. *Disialo-trisialo bridging of transferrin is due to increased branching and fucosylation of the carbohydrate moiety.* Clinica Chimica Acta 2012, 414, 58-64.
- [92] B. Pérez, C. Medrano, M.J. Ecay, P. Ruiz-Sala, M. Martínez-Pardo, M. Ugarte, C. Pérez-Cerdá. *A novel congenital disorder of glycosylation type without central nervous system involvement caused by mutations in the phosphoglucomutase 1 gene.* Journal of Inherited Metabolic Disease 2012.

- [93] M.E. Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel. *Accurate determination of human serum transferrin isoforms: exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool*. Analytical Chemistry 2006, 78, 8218-8226.
- [94] P. Kleinert, T. Kuster, S. Durka, D. Ballhausen, N.U. Bosshard, B. Steinmann, E. Hanseler, et al. *Mass spectrometric analysis of human transferrin in different body fluids*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2003, 41, 1580-1588.
- [95] C. Neususs, U. Demelbauer, M. Pelzing. *Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis 2005, 26, 1442-1450.
- [96] E. Giménez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. *Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis-electrospray-ion trap mass spectrometry*. Electrophoresis 2008, 29, 2161-2170.
- [97] V. Sanz-Nebot, P. González, I. Toro, A. Ribes, J. Barbosa. *Characterization of human transferrin glycoforms by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography B 2003, 798, 1-7.
- [98] F. Benavente, E. Hernandez, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa. *Determination of human erythropoietin by on-line immunoaffinity capillary electrophoresis: a preliminary report*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2007, 387, 2633-2639.
- [99] G.A. Marko-Varga. *Proteomics and peptidomics: new technology platforms elucidating biology*. Elsevier, Amsterdam; Boston 2005.
- [100] J.E. van Eyk, M.J. Dunn. *Clinical Proteomics: from diagnosis to therapy*. Wiley-VCH, Weinheim 2008.
- [101] A. Staub, J. Schappler, S. Rudaz, J.L. Veuthey. *CE-TOF/MS: fundamental concepts, instrumental considerations and applications*. Electrophoresis 2009, 30, 1610-1623.
- [102] D. Heiger. *High Performance Capillary Electrophoresis. An introduction*. Agilent Technologies, Waldbronn, Germany 2000.
- [103] R. Mukhopadhyay. *DNA sequencers: the next generation*. Analytical Chemistry 2009, 81, 1736-1740.
- [104] C.W. Klampfl. *CE with MS detection: a rapidly developing hyphenated technique*. Electrophoresis 2009, 30 S83-S91.
- [105] W. Mullen, A. Albalat, J. Gonzalez, P. Zerefos, J. Siwy, J. Franke, H. Mischak. *Performance of different separation methods interfaced in the same MS-reflection TOF detector: a comparison of performance between CE versus HPLC for biomarker analysis*. Electrophoresis 2012, 33, 567-574.
- [106] P. Schmitt-Kopplin, A. Fekete. *The CE way of thinking: "all is relative!"*. Methods in Molecular Biology 2008, 384, 611-629.
- [107] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger. *Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications*. Electrophoresis 2003, 24, 3837-3867.
- [108] H. Stutz. *Protein attachment onto silica surfaces - a survey of molecular fundamentals, resulting effects and novel preventive strategies in CE*. Electrophoresis 2009, 30, 2032-2061.

- [109] G. Aptisa, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, E. Chirila, J. Barbosa. *Evaluation of migration behaviour of therapeutic peptide hormones in capillary electrophoresis using polybrene-coated capillaries*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010, 396, 1571-1579.
- [110] C.Y. Liu. *Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography*. Electrophoresis 2001, 22, 612-628.
- [111] M. Pattky, C. Huhn. *Advantages and limitations of a new cationic coating inducing a slow electroosmotic flow for CE-MS peptide analysis: a comparative study with commercial coatings*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2013, 405, 225-237.
- [112] L. Sola, M. Chiari. *Modulation of electroosmotic flow in capillary electrophoresis using functional polymer coatings*. Journal of Chromatography A 2012, 1270, 324-329.
- [113] C. Huhn, R. Ramautar, M. Wuhler, G.W. Somsen. *Relevance and use of capillary coatings in capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010, 396, 297-314.
- [114] V. Dolník. *Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007*. Electrophoresis 2008, 29, 143-156.
- [115] V. Dolník. *Capillary electrophoresis of proteins 2003-2005*. Electrophoresis 2006, 27, 126-141.
- [116] D. Corradini. *Buffer additives other than the surfactant sodium dodecyl sulfate for protein separations by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography B 1997, 699, 221-256.
- [117] J. Horvath, V. Dolník. *Polymer wall coatings for capillary electrophoresis*. Electrophoresis 2001, 22, 644-655.
- [118] R. Nehmé, C. Perrin. *Highly charged polyelectrolyte coatings to prevent adsorption during protein and Peptide analysis in capillary electrophoresis*. Methods in Molecular Biology 2013, 984, 191-206.
- [119] E. Szoko, T. Tabi. *Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2010, 53, 1180-1192.
- [120] J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, A. Cifuentes. *Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2007, 1153, 214-226.
- [121] D.K. Lloyd. *Capillary electrophoretic analyses of drugs in body fluids: sample pretreatment and methods for direct injection of biofluids*. Journal of Chromatography A 1996, 735, 29-42.
- [122] L. Saavedra, C. Barbas. *Chromatography-based on- and in-line pre-concentration methods in capillary electrophoresis*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2007, 70, 289-297.
- [123] M.C. Breadmore, M. Dawod, J.P. Quirino. *Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips (2008-2010)*. Electrophoresis 2011, 32, 127-148.

- [124] C.A. Nesbitt, H. Zhang, K.K. Yeung. *Recent applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS): CE performing functions beyond separation*. Analytica Chimica Acta 2008, 627, 3-24.
- [125] S.L.J. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe. *On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications*. Journal of Chromatography A 2008, 1184, 504-541.
- [126] Y. Wen, J. Li, J. Ma, L. Chen. *Recent advances in enrichment techniques for trace analysis in capillary electrophoresis*. Electrophoresis 2012, 33, 2933-2952.
- [127] T. Stroink, E. Paarlberg, J.C. Waterval, A. Bult, W.J. Underberg. *On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis, focused on the determination of proteins and peptides*. Electrophoresis 2001, 22, 2375-2383.
- [128] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar. *Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE)*. Trends in Analytical Chemistry 2007, 26, 664-678.
- [129] D.M. Osbourn, D.J. Weiss, C.E. Lunte. *On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis*. Electrophoresis 2000, 21, 2768-2779.
- [130] L.A. Currie. *Detection and quantification limits: origins and historical overview*. Analytica Chimica Acta 1999, 391, 127-134.
- [131] D.A. Armbruster, T. Pry. *Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation*. Clinical Biochemist Reviews 2008, 29 Suppl 1, S49-52.
- [132] A. Shrivastava, V. Gupta. *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods*. Chronicles of Young Scientists 2011, 2, 21-25.
- [133] F.J. del Río Bocio, J. Riu, R. Boqué, F.X. Rius. *Limits of detection in linear regression with errors in the concentration*. Journal of Chemometrics 2003, 17, 413-421.
- [134] P.J. Ogren, A. Meetze, W.C. Duer. *The limit of detection in generalized least-squares calibrations: an example using alprazolam liquid chromatography-tandem mass spectrometry data*. Journal of Analytical Toxicology 2009, 33, 129-142.
- [135] R. Aebersold, M. Mann. *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature 2003, 422, 198-207.
- [136] J.R. Yates III. *Mass spectrometry and the age of the proteome*. Journal of Mass Spectrometry 1998, 33, 1-19.
- [137] H. Stutz. *Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection*. Electrophoresis 2005, 26, 1254-1290.
- [138] P. Hommerson, A.M. Khan, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Ionization techniques in capillary electrophoresis-mass spectrometry: principles, design, and application*. Mass Spectrometry Reviews 2011, 30, 1096-1120.
- [139] J.B. Fenn. *Electrospray ionization mass spectrometry: how it all began*. Journal of Biomolecular Techniques 2002, 13, 101-118.

- [140] G.T. Gibson, S.M. Mugo, R.D. Oleschuk. *Nanoelectrospray emitters: trends and perspective*. Mass Spectrometry Reviews 2009, 28, 918-936.
- [141] IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*. 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata.
- [142] G.R. Hilton, J.L. Benesch. *Two decades of studying non-covalent biomolecular assemblies by means of electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of the Royal Society Interface 2012, 9, 801-816.
- [143] R.D. Smith, C.J. Barinaga, H.R. Udseth. *Improved electrospray ionization interface for capillary zone electrophoresis-mass spectrometry*. Analytical Chemistry 1988, 60, 1948-1952.
- [144] H.J. Issaq, G.M. Janini, K.C. Chan, T.D. Veenstra. *Sheathless electrospray ionization interfaces for capillary electrophoresis-mass spectrometric detection*. Journal of Chromatography A 2004, 1053, 37-42.
- [145] A.D. Zamfir. *Recent advances in sheathless interfacing of capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2007, 1159, 2-13.
- [146] F. Benavente, R. van der Heijden, U.R. Tjaden, J. van der Greef, T. Hankemeier. *Metabolite profiling of human urine by CE-ESI-MS using separation electrolytes at low pH*. Electrophoresis 2006, 27, 4570-4584.
- [147] M. Moini. *Simplifying CE-MS operation. 2. Interfacing low-flow separation techniques to mass spectrometry using a porous tip*. Analytical Chemistry 2007, 79, 4241-4246.
- [148] M. Moini. *High-throughput capillary electrophoresis-mass spectrometry: from analysis of amino acids to analysis of protein complexes*. Methods in Molecular Biology 2013, 984, 79-119.
- [149] G. Bonvin, J.L. Veuthey, S. Rudaz, J. Schappler. *Evaluation of a sheathless nanospray interface based on a porous tip sprayer for CE-ESI-MS coupling*. Electrophoresis 2012, 33, 552-562.
- [150] K. Faserl, B. Sarg, L. Kremser, H. Lindner. *Optimization and evaluation of a sheathless capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry platform for peptide analysis: comparison to liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical Chemistry 2011, 83, 7297-7305.
- [151] R. Haselberg, S. Harmsen, M.E. Dolman, G.J. de Jong, R.J. Kok, G.W. Somsen. *Characterization of drug-lysozyme conjugates by sheathless capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta 2011, 698, 77-83.
- [152] R. Haselberg, C.K. Ratnayake, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Performance of a sheathless porous tip sprayer for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry of intact proteins*. Journal of Chromatography A 2010, 1217, 7605-7611.
- [153] A. Hirayama, M. Tomita, T. Soga. *Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis*. Analyst 2012, 137, 5026-5033.
- [154] M. Kawai, Y. Iwamuro, R. Iio-Ishimaru, S. Chinaka, N. Takayama, K. Hayakawa. *Analysis of phosphorus-containing amino acid-type herbicides by sheathless capillary*

electrophoresis/electrospray ionization-mass spectrometry using a high sensitivity porous sprayer. Analytical Sciences 2011, 27, 857-860.

[155] R. Haselberg, G.J. de Jong, G.W. Somsen. *Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins*. Analytical Chemistry 2013, 85, 2289-2296.

[156] R. Ramautar, R. Shyti, B. Schoenmaker, L. de Groote, R.J. Derks, M.D. Ferrari, A.M. van den Maagdenberg, et al. *Metabolic profiling of mouse cerebrospinal fluid by sheathless CE-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012, 404, 2895-2900.

[157] L.F. Marvin, M.A. Roberts, L.B. Fay. *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta 2003, 337, 11-21.

[158] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida, T. Matsuo. *Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry 1988, 2, 151-153.

[159] S.L. Cohen, B.T. Chait. *Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins*. Analytical Chemistry 1996, 68, 31-37.

[160] E. Giménez, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. *Ionic liquid matrices for MALDI-TOF-MS analysis of intact glycoproteins*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010, 398, 357-365.

[161] D.H. Russell, R.D. Edmondson. *High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the characterization of peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry 1997, 32, 263-276.

[162] M.P. Balogh. *Debating Resolution and Mass Accuracy in Mass Spectrometry*. LC GC Europe 2004, 17, 152-159.

[163] D.C. Simpson, R.D. Smith. *Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics*. Electrophoresis 2005, 26, 1291-1305.

[164] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson. *High-resolution mass spectrometers*. Annual Review of Analytical Chemistry 2008, 1, 579-599.

[165] M. Himmelsbach. *10 years of MS instrumental developments-impact on LC-MS/MS in clinical chemistry*. Journal of Chromatography B 2012, 883-884, 3-17.

[166] F.W. Tempels, W.J. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *Design and applications of coupled SPE-CE*. Electrophoresis 2008, 29, 108-128.

[167] R. Ramautar, G.J. Jong, G.W. Somsen. *Developments in coupled solid-phase extraction-capillary electrophoresis 2009-2011*. Electrophoresis 2012, 33, 243-250.

[168] F.W. Tempels, W.J. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *On-line coupling of SPE and CE-MS for peptide analysis*. Electrophoresis 2007, 28, 1319-1326.

[169] N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips. *Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices*. Electrophoresis 2008, 29, 3259-3278.

- [170] N.A. Guzman, M.A. Trebilcock, J.P. Advis. *The use of a concentration step to collect urinary components separated by capillary electrophoresis and further characterization of collected analytes by mass spectrometry*. Journal of Liquid Chromatography 1991, 14, 997-1015.
- [171] I. Botello, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull. *Investigation of in-line solid-phase extraction capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse and their metabolites in water samples*. Electrophoresis 2012, 33, 528-535.
- [172] N.A. Guzman, T.M. Phillips. *Immunoaffinity capillary electrophoresis: a new versatile tool for determining protein biomarkers in inflammatory processes*. Electrophoresis 2011, 32, 1565-1578.
- [173] F.J. Lara, A.M. Garcia-Campaña, F. Ales-Barrero, J.M. Bosque-Sendra. *In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction*. Electrophoresis 2008, 29, 2117-2125.
- [174] I. Maijo, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar. *An in-line SPE strategy to enhance sensitivity in CE for the determination of pharmaceutical compounds in river water samples*. Electrophoresis 2011, 32, 2114-2122
- [175] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman. *Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2007, 1140, 205-212.
- [176] Y.H. Tak, J.S. Toraño, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *Optimization of in-line fritless solid-phase extraction for capillary electrophoresis-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A 2012, 1267, 138-143.
- [177] W. Tong, A. Link, J.K. Eng, J.R. Yates III. *Identification of proteins in complexes by solid-phase microextraction/multistep elution/capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry 1999, 71, 2270-2278.
- [178] J.C.M. Waterval, P. Bestebreurtje, H. Lingeman, C. Versluis, A.J.R. Heck, A. Bult, W.J.M. Underberg. *Robust and cost-effective capillary electrophoresis-mass spectrometry interfaces suitable for combination with on-line analyte preconcentration*. Electrophoresis 2001, 22, 2701-2708.
- [179] J.C.M. Waterval, G. Hommels, P. Bestebreurtje, C. Versluis, A.J.R. Heck, A. Bult, H. Lingeman, et al. *Capillary electrophoretic bioanalysis of therapeutically active peptides with UV and mass spectrometric detection after on-capillary preconcentration*. Electrophoresis 2001, 22, 2709-2716.
- [180] G.M. Janini, M. Zhou, L.R. Yu, J. Blonder, M. Gignac, T.P. Conrads, H.J. Issaq, et al. *On-column sample enrichment for capillary electrophoresis sheathless electrospray ionization mass spectrometry: evaluation for peptide analysis and protein identification*. Analytical Chemistry 2003, 75, 5984-5993.
- [181] A.P. Dahlin, S.K. Bergström, P.E. Andrén, K.E. Markides, J. Bergquist. *Poly(dimethylsiloxane)-based microchip for two-dimensional solid-phase extraction-capillary electrophoresis with an integrated electrospray emitter tip*. Analytical Chemistry 2005, 77, 5356-5363.

- [182] A.P. Dahlin, M. Wetterhall, G. Liljegren, S.K. Bergstrom, P. Andren, L. Nyholm, K.E. Markides, et al. *Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry from a polymer modified poly(dimethylsiloxane) microchip with an integrated graphite electrospray tip*. *Analyst* 2005, 130, 193-199.
- [183] Y. Wang, B.R. Fonslow, C.C. Wong, A. Nakorchevsky, J.R. Yates III. *Improving the comprehensiveness and sensitivity of sheathless capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for proteomic analysis*. *Analytical Chemistry* 2012, 84, 8505-8513.
- [184] N.A. Guzman. *An Immunoaffinity Capillary Electrophoresis Biomarker Analyzer for Use in Toxicoproteomics Research*. American Laboratory 2008, 40, 18-29.
- [185] N.A. Guzman. *Improved solid-phase microextraction device for use in on-line immunoaffinity capillary electrophoresis*. *Electrophoresis* 2003, 24, 3718-3727.
- [186] A. Macià, F. Borrull, M. Calull, F. Benavente, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, et al. *Sensitivity enhancement for the analysis of naproxen in tap water by solid-phase extraction coupled in-line to capillary electrophoresis*. *Journal of Separation Science* 2008, 31, 872-880.
- [187] I.M. Roitt, J. Brostoff, D.K. Male. *Inmunología*. Harcourt, Madrid 2000.
- [188] J. Klein. *Immunology*. BlackWell Scientific publications Londres 1997.
- [189] W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek. *Immunology*. Academic Press Elsevier 2006.
- [190] K. Omidfar, F. Khorsand, M. Darziani Azizi. *New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors*. *Biosensors and Bioelectronics* 2013, 43, 336-347.
- [191] P. Holliger, P.J. Hudson. *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. *Nature Biotechnology* 2005, 23, 1126-1136.
- [192] R.J. Flanagan, A.L. Jones. *Fab antibody fragments: some applications in clinical toxicology*. *Drug Safety* 2004, 27, 1115-1133.
- [193] J.M. González de Buitrago, E. Arilla Ferreiro, M. Rodríguez-Segade, A. Sánchez Pozo. *Bioquímica Clínica*. McGraw-hill Interamericana, Madrid 1998.
- [194] L. Stryer. *Bioquímica*. Reverté, S.A, Barcelona 1995.
- [195] J.E. Schiel, R. Mallik, S. Soman, K.S. Joseph, D.S. Hage. *Applications of silica supports in affinity chromatography*. *Journal of Separation Science* 2006, 29, 719-737.
- [196] H.S. Kim, D.S. Hage. *Immobilization methods for affinity chromatography*. Edited by D. S. Hage. Chromatographic Science Series, USA 2006.
- [197] N.A. Guzman, R.J. Stubbs. *The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: a powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications*. *Electrophoresis* 2001, 22, 3602-3628.
- [198] L.K. Amundsen, H. Siren. *Immunoaffinity CE in clinical analysis of body fluids and tissues*. *Electrophoresis* 2007, 28, 99-113.

- [199] N.A. Guzman, T.M. Phillips. *Immunoaffinity CE for proteomics studies*. Analytical Chemistry 2005, 77, 61A-67A.
- [200] N.A. Guzman, R.J. Stubbs, T.M. Phillips. *Determination of inflammatory biomarkers by immunoaffinity capillary electrophoresis*. Drug Discovery Today: Technologies. Analytical Chemistry 2006, 3, 29-37.
- [201] M. Mendonca, H. Kalish. *Cytokine analysis by immunoaffinity capillary electrophoresis*. Methods in Molecular Biology 2013, 919, 259-271.
- [202] N. Gasilova, A.L. Gassner, H.H. Girault. *Analysis of major milk whey proteins by immunoaffinity capillary electrophoresis coupled with MALDI-MS*. Electrophoresis 2012, 33, 2390-2398.
- [203] Z. Malá, L. Krivankova, P. Gebauer, P. Bocek. *Contemporary sample stacking in CE: a sophisticated tool based on simple principles*. Electrophoresis 2007, 28, 243-253.
- [204] M.C. Breadmore, A.S. Palmer, M. Curran, M. Macka, N. Avdalovic, P.R. Haddad. *On-column ion-exchange preconcentration of inorganic anions in open tubular capillary electrochromatography with elution using transient-isotachophoretic gradients. 3. Implementation and method development*. Analytical Chemistry 2002, 74, 2112-2118.
- [205] M. Larsson, E.S. Lutz. *Transient isotachophoresis for sensitivity enhancement in capillary electrophoresis-mass spectrometry for peptide analysis*. Electrophoresis 2000, 21, 2859-2865.
- [206] A.R. Timerbaev, T. Hirokawa. *Recent advances of transient isotachophoresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices*. Electrophoresis 2006, 27, 323-340.
- [207] M. Urbanek, L. Krivankova, P. Bocek. *Stacking phenomena in electromigration: from basic principles to practical procedures*. Electrophoresis 2003, 24, 466-485.
- [208] Z. Malá, P. Gebauer, P. Bocek. *Recent progress in analytical capillary isotachophoresis*. Electrophoresis 2013, 34, 19-28.
- [209] J.C. Waterval, G. Hommels, J. Teeuwssen, A. Bult, H. Lingeman, W.J. Underberg. *Quantitative analysis of pharmaceutically active peptides using on-capillary analyte preconcentration transient isotachophoresis*. Electrophoresis 2000, 21, 2851-2858.
- [210] J.P. Quirino, S. Terabe. *Approaching a million-fold sensitivity increase in capillary electrophoresis with direct ultraviolet detection: cation-selective exhaustive injection and sweeping*. Analytical Chemistry 2000, 72, 1023-1030.
- [211] J.B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe. *Anion selective exhaustive injection-sweep-micellar electrokinetic chromatography*. Journal of Chromatography A 2001, 932, 129-137.
- [212] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gas. *High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: electrokinetic supercharging*. Electrophoresis 2003, 24, 498-504.
- [213] V. Kasicka, Z. Prusik. *Isotachophoretic electrodesorption of proteins from an affinity adsorbent on a microscale*. Journal of Chromatography B 1983, 273, 117-128.

- [214] T.M. Phillips, E. Wellner. *Detection of cerebral spinal fluid-associated chemokines in birth traumatized premature babies by chip-based immunoaffinity CE*. Electrophoresis 2013.
- [215] A.A. Apori, A.E. Herr. *Chip-based immunoassays*. Methods in Molecular Biology 2013, 919, 233-248.
- [216] S. Ohla, D. Belder. *Chip-based separation devices coupled to mass spectrometry*. Current Opinion in Chemical Biology 2012, 16, 453-459.
- [217] I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, G.W. Somsen, G.J. de Jong. *In-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for determination of drugs of abuse in human urine*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2012, 403, 777-784.
- [218] M. Borges-Alvarez, F. Benavente, E. Giménez, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot. *Assessment of capillary electrophoresis TOF MS for a confident identification of peptides*. Journal of Separation Science 2010, 33, 2489-2498.
- [219] V. Sanz-Nebot, E. Balaguer, F. Benavente, J. Barbosa. *Comparison of sheathless and sheath-flow electrospray interfaces for the capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of peptides*. Electrophoresis 2005, 26, 1457-1465.
- [220] A. Chattopadhyay, D.S. Hage. *Determination of the diol content of chromatographic supports by capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 1997, 758, 255-261.
- [221] S. Siggia, J.G. Hanna. *Quantitative organic analysis via functional groups*. Wiley, New York 1979.
- [222] P.F. Ruhn, S. Garver, D.S. Hage. *Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography*. Journal of Chromatography A 1994, 669, 9-19.
- [223] D.J. O'Shannessy, W.L. Hoffman. *Site-directed immobilization of glycoproteins on hydrazide-containing solid supports*. Biotechnology and Applied Biochemistry 1987, 9, 488-496.
- [224] J. Adler-Nissen. *Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1979, 27, 1256-1262.
- [225] P.M. Nielsen, D. Petersen, C. Dambmann. *Improved method for determining food protein degree of hydrolysis*. Journal of Food Science 2001, 66, 642-646.
- [226] J.K. Inman, H.M. Dintzis. *The derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Controlled introduction of functional groups for the preparation of special-purpose, biochemical adsorbents*. Biochemistry 1969, 8, 4074-4082.
- [227] P.O. Larsson. *High-performance liquid affinity chromatography*. Methods in Enzymology 1984, 104, 212-223.
- [228] D.S. Hage, C.A. Wolfe, M.R. Oates. *Development of a kinetic model to describe the effective rate of antibody oxidation by periodate*. Bioconjugate Chemistry 1997, 8, 914-920.
- [229] C.A.C. Wolfe, D.S. Hage. *Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate*. Analytical Biochemistry 1995, 231, 123-130.

- [230] J. Turková. *Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function*. Journal of Chromatography B 1999, 722, 11-31.
- [231] M. Petersson, K.G. Wahlund, S. Nilsson. *Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis*. Journal of Chromatography A 1999, 841, 249-261.
- [232] T.M. Phillips, J.J. Chmielinska. *Immunoaffinity capillary electrophoretic analysis of cyclosporin in tears*. Biomedical Chromatography 1994, 8, 242-246.
- [233] T.M. Phillips, L.M. Kennedy, E.C. De Fabo. *Microdialysis-immunoaffinity capillary electrophoresis studies on neuropeptide-induced lymphocyte secretion*. Journal of Chromatography B 1997, 697, 101-109.
- [234] A.C. Moser, D.S. Hage. *Capillary electrophoresis-based immunoassays: principles and quantitative applications*. Electrophoresis 2008, 29, 3279-3295.
- [235] X. Fu, L. Huang, F. Gao, W. Li, N. Pang, M. Zhai, H. Liu, et al. *Carboxymethyl chitosan-coated capillary and its application in CE of proteins*. Electrophoresis 2007, 28, 1958-1963.
- [236] R.J. Meagher, J. Seong, P.E. Laibinis, A.E. Barron. *A very thin coating for capillary zone electrophoresis of proteins based on a tri(ethylene glycol)-terminated alkyltrichlorosilane*. Electrophoresis 2004, 25, 405-414.
- [237] A. Elhamili, M. Wetterhall, B. Arvidsson, R. Sebastiano, P.G. Righetti, J. Bergquist. *Rapid capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry separations of peptides and proteins using a monoquaternalized piperazine compound (M7C4I) for capillary coatings*. Electrophoresis 2008, 29, 1619-1625.
- [238] W.W. Chang, C. Hobson, D.C. Bomberger, L.V. Schneider. *Rapid separation of protein isoforms by capillary zone electrophoresis with new dynamic coatings*. Electrophoresis 2005, 26, 2179-2186.
- [239] W.W.P. Chang, D.C. Bomberger, L.V. Schneider. *Rapid separation of native BSA isoforms with small pI differences*. Target Discovery from omics to knowmics, Application Note 2003.
- [240] D.S. Hage. *Periodate oxidation of antibodies for site-selective immobilization in immunoaffinity chromatography*. Methods in Molecular Biology 2000, 147, 69-82.
- [241] H. Xuan, D.S. Hage. *Immobilization of α 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug-protein binding*. Analytical Biochemistry 2005, 346, 300-310.
- [242] D.S. Hage, J. Cazes. *Handbook of Affinity Chromatography*. Second edition (Chromatographic Science Series), Taylor & Francis 2006.
- [243] N. Ibarra, A. Caballero, E. González, R. Valdés. *Comparison of different elution conditions for the immunopurification of recombinant hepatitis B surface antigen*. Journal of Chromatography B 1999, 735, 271-277.
- [244] D.S. Hage. *Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography*. Journal of Chromatography B 1998, 715, 3-28.
- [245] T.M. Phillips. *Determination of in situ tissue neuropeptides by capillary immunoelectrophoresis*. Analytica Chimica Acta 1998, 372, 209-218.

- [246] M. Nisnevitch, M.A. Firer. *The solid phase in affinity chromatography: strategies for antibody attachment*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 2001, 49, 467-480.
- [247] W.S.B. Yeung, G.A. Luo, Q.G. Wang, J.P. Ou. *Capillary electrophoresis-based immunoassay*. Journal of Chromatography B 2003, 797, 217-228.
- [248] D.E. Klaus. *Immunology: understanding the immune system*. John Wiley & Sons, Inc. 2009.
- [249] B.S. DeSilva, G.S. Wilson. *Solid phase synthesis of bifunctional antibodies*. Journal of Immunological Methods 1995, 188, 9-19.
- [250] B.S. DeSilva, G.S. Wilson. *Synthesis of bifunctional antibodies for immunoassays*. Methods 2000, 22, 33-43.
- [251] P.J. Gauci, M.R. Alderton. *Pepsin digestion of antibodies to produce functional antigen-binding fragments (Fab): a scientific fantasy?* DTSO Aeronautical and Maritime Research Laboratory, Australia, July 2001.
- [252] W. Clarke, J.D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E.M. Karle, D.S. Hage. *Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports. Characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments*. Journal of Chromatography A 2000, 888, 13-22.
- [253] M. Scigelova, P.S. Green, A.E. Giannakopoulos, A. Rodger, D.H.G. Crout, P.J. Derrick. *A practical protocol for the reduction of disulfide bonds in proteins prior to analysis by mass spectrometry*. European Journal of Mass Spectrometry 2001, 7, 29-34.
- [254] R. Mallik, C. Wa, D.S. Hage. *Development of sulfhydryl-reactive silica for protein immobilization in high-performance affinity chromatography*. Analytical Chemistry 2007, 79, 1411-1424.
- [255] M. Balchen, H. Lund, L. Reubsaet, S. Pedersen-Bjergaard. *Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction*. Analytica Chimica Acta 2012, 716, 16-23.

