# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ALEX DOMINGUES BATISTA

Estratégias para aumento de sensibilidade e seletividade de separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo

Piracicaba 2014

# ALEX DOMINGUES BATISTA

# Estratégias para aumento de sensibilidade e seletividade de separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio R. P. Rocha

Piracicaba 2014 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

### Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

### Batista, Alex Domingues

Estratégias para aumento de sensibilidade e seletividade de separações cromatográficas em sistemas de análise em fluxo / Alex Domingues Batista; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.

142 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Adulteração de alimentos 2. Análise por injeção em fluxo 3. Análise por injeção sequencial 4. Antibióticos 5. Conservantes 6. Cromatografia líquida 7. Química analítica instrumental I. Título

CDU 54.08 : (543.068.3 + 543.544.5)

## Dedico

Às minhas amadas, mãe Maria e avó Idelina, mulheres batalhadoras que me deram incentivo, apoio e grandes valores os quais levarei por toda minha vida.

"Não pode ter grandes dificuldades quando abunda a boa vontade."

Nicolau Maquiavel

### AGRADECIMENTOS

Ao professor Fábio Rocha, pelo conhecimento transmitido, pelas conversas e discussões que muito contribuíram para o meu crescimento, e pelo ensinamento de valores éticos que levarei pelo resto de minha vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento do projeto (proc. FAPESP nº: 2011/06437-6).

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica pelos momentos de descontração e também de troca de experiências. Em especial a meus amigos Andréia e Diogo Rocha que tornaram esta etapa muito mais agradável.

As técnicas de Laboratório Sheila e Fátima por todo o suporte dado neste período.

Ao professor Valdemar Luiz Tornisielo e ao Laboratório de Química da Esalq por disponibilizarem os equipamentos de HPLC para os procedimentos de referência.

Aos professores Boaventura, Zagatto e Wanessa por todas as críticas construtivas que enriqueceram as discussões deste trabalho.

Ao professor Petr Solich por me receber prontamente em seu laboratório e pelas oportunidades de vivenciar novas experiências científicas e culturais. Ao pesquisador Petr Chocholous por todo o suporte e ensinamentos proporcionados no período de estágio no exterior. Um agradecimento especial aos amigos conquistados neste período: Burkhard Horstkotte, Ivana Šrámková, Jitka Široká e Klára Petrů, o quais tornaram o tempo longe do Brasil muito mais agradável.

As pessoas especiais que me incentivam e sempre estão do meu lado: Julio Cesar Torelli e Elaine Carvalho Fernandes.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse possível.

### RESUMO

BATISTA, A. D. Estratégias para aumento de sensibilidade e seletividade de separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo. 2014. 142 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A introdução de separações cromatográficas expandiu a aplicabilidade de sistemas de análises em fluxo. No entanto, a seletividade e sensibilidade de procedimentos são restritos devido à escassa disponibilidade de fases estacionárias que operam a baixas pressões. Sendo assim, foram desenvolvidos quatro procedimentos analíticos visando a melhoria destes aspectos. A primeira proposta explorou pioneiramente colunas de núcleo fundido em sistemas de análises por injeção em fluxo. A separação de metil, etil e propil parabenos foi selecionada com aplicação. As eficiências cromatográficas de guatro colunas (C18, RPamida, F5 e fenil-hexil) foram avaliadas criticamente. Acetonitrila e uma solução de ácido fosfórico pH 2,5 foram utilizadas como fase móvel. A fase RP-amida apresentou melhor desempenho com a separação dos três analitos em 8,0 min, com resoluções > 1,72, simetrias de pico < 1,66, LOD entre 0,12 e 0,39 mg L<sup>-1</sup>, resposta linear até 5,0 mg L<sup>-1</sup> (r > 0,996) e CV para altura dos picos < 3,5 % (n=10). O procedimento foi aplicado à determinação de parabenos em produtos de cuidados pessoais e os resultados concordaram com o procedimento de referência a 95% de confiança. Um procedimento envolvendo o acoplamento de extração em fase sólida (SPE) a um sistema de cromatografia por injeção sequencial (SIC) foi proposto para pré-concentração e separação de oito sulfonamidas. A fase estacionária pentafluorofenilpropil foi selecionada após comparação crítica da eficiência apresentada por três colunas de núcleo fundido e duas colunas de fases monolíticas. Acetonitrila e tampão fosfato (pH 5.0) foram utilizados como fase. Fatores de enriquecimento de até 39,2 foram alcançados com volume de amostra de 500 µL. O procedimento apresentou tempo de análise < 10,5 min, resoluções > 1,83 com simetrias de pico  $\leq$  1,52, LOD entre 4,9 e 27 µg L<sup>-1</sup>, faixa de resposta linear entre 30,0 e 1000,0 µg L<sup>-1</sup> (r > 0,997) e CV da altura dos picos, 2,9% (n=6). Um procedimento empregando fase estacionária micelar foi desenvolvido para determinação de melamina em leite. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 1-propanol (92,5:7,5 v/v). O procedimento de preparo de amostra foi implementado em linha pela diluição da amostra com SDS. Resposta linear foi observada entre 2,0 e 6,0 mg L-1 de melamina com LOD estimado em 0,6 mg  $L^{-1}$  e CV da altura dos picos de 2,9% (n=6). Os resultados para diferentes amostras de leite foram concordantes com aqueles obtidos pelo procedimento cromatográfico de referência em um nível de 95% de confiança. Uma estratégia envolvendo pré-concentração on-column de parabenos em um sistema SIC foi proposta. Resposta linear foi observada entre 0,25 e 1,00 µg mL<sup>-1</sup> (r  $\ge$  0,999) e LODs estimados entre 40 e 60 ng mL<sup>-1</sup>. Tempos de retenção e altura dos picos apresentaram CV < 2,1%. Fatores de enriquecimento entre 30,0 e 34,8 foram alcançados. As estratégias propostas são viáveis para melhoria de seletividade e sensibilidade de separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo, além de apresentarem vantagens frente a procedimentos análogos na literatura.

**Palavras chaves**: Cromatografia por injeção sequencial. Sensibilidade. Seletividade. Análise por injeção em fluxo. Colunas de núcleo fundido. Colunas monolíticas.

#### ABSTRACT

BATISTA, A. D. Strategies to improve sensitivity and selectivity of chromatographic separations in flow analysis systems. 2014. 142 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

The introduction of chromatographic separations expanded the applicability of flow systems. However, selectivity and sensitivity of the procedures are limited due the poor options of stationary phases available for low-pressure. Therefore, four procedures were developed aiming the improvement of these aspects. The first proposal exploited pioneered fused-core columns in a flow injection analysis system. The separation of methyl, ethyl and propil parabens was selected as an application. The chromatographic efficiency of four columns (C18, RP-amide, F5 and fenyl-hexyl) were critically evaluated. Acetonitrile and a phosphoric acid solution at pH 2.5 were used as mobile phase at different proportions for each column. The RP-amide phase presented the best performance by separating the analytes in 8.0 min with resolution > 1.72, peak symmetry < 1.66, LOD between 0.12-0.39 mg  $L^{-1}$ , linear response range up to 5.0 mg  $L^{-1}$  (r > 0.996) and coefficients of variation of peak heights < 3.5% (n=10). The procedure was applied to parabens determination in personal care products and the results agreed with the HPLC reference procedure at the 95% confidence level. A procedure coupling solid phase extraction (SPE) to a sequential injection chromatography (SIC) was proposed for preconcentration and separation of eight sulfonamides. The pentafluorophenylpropyl (F5) phase was selected after a critical comparison of the performance achieved by three fused-core columns and two monolithic columns. Acetonitrile and acetate buffer pH 5.0 were used as mobile phase. Enrichment factors up to 39.2 were achieved with a 500 µL sample volume. The developed procedure showed analysis time < 10.5 min, resolutions > 1.83 with peak symmetry  $\leq$  1.52, LODs between 4.9 and 27  $\mu$ g L<sup>-1</sup>, linear response ranges from 30.0 to 1000.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup> (r > 0.997) and CV of peak heights < 2.9% (n=6). Micelar chromatography was for the first time exploited in SIC and the performance was demonstrated by determination of melamine in milk. Mobile phase was composed by a sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and propanol (92.5:7.5). The sample pretreatment procedure was on-line implemented by dilution of the sample with SDS. A linear response was observed within 2.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> of melamine with a LOD estimated at 0.6 mg L<sup>-1</sup> and coefficients of variation at 2.9% (n=6). Results for different milk samples agreed with those obtained by high performance liquid chromatography at the 95% confidence level. A procedure involved on-column preconcentration of parabens in a SIC system was based on the injection of relatively high volume of an aqueous sample in a reversed-phase column. After preconcentration, a suitable mobile phase was inserted to perform chromatographic separation (acetonitrile/phosphoric acid pH 2.5 (75:25, v/v)). A linear response was achieved from 0.25 to 1.00  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (r > 0.999) and LOD estimated within 40 and 80 ng mL<sup>-1</sup>. Coefficients of variation for retention time and peak heights were below 2.1%. Enrichment factors within 30.0 and 34.8 were achieved. The proposed strategies are feasible for improving selectivity and sensitivity of chromatographic separations in flow analysis systems, besides having advantages compared to similar procedures in the literature.

**Key words**: Sequential injection chromatography. Sensitivity. Selectivity. Flow injection analysis. Fused-core columns. Monolithic columns.

### **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 - Diagrama genérico de um sistema de cromatografia por injeção	
sequencial	23
Figura 1.2 - Representação esquemática de colunas empacotadas e monolíticas	28
Figura 1.3 - Comparação da constituição física de partículas de núcleo fundido e	
porosas de sílica	30
Figura 3.1 - Estruturas moleculares dos parabenos mais utilizados	
industrialmente.	35
Figura 3.2 - Diagrama do sistema de análises em fluxo utilizado para	
separações cromatográficas a baixa pressão	37
Figura 3.3 - Estruturas químicas das fases estacionárias das colunas de núcleo	
fundido avaliadas	39
Figura 3.4 - Separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos por	
coluna monolítica C18	40
Figura 3.5 - Separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos por	
coluna de núcleo fundido C18	41
Figura 3.6 - Separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos por	
coluna de núcleo fundido fenil-hexil	42
Figura 3.7 - Separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos por	
coluna núcleo fundido F5	44
Figura 3.8 - Separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos por	
coluna de núcleo fundido RP-Amida	46
Figura 3.9 - Efeito da variação da vazão de fase móvel na separação de	
parabenos por pré-coluna RP-amida	48
Figura 3.10 Efeito da variação do volume de amostra na separação de	
parabenos por pré-coluna RP-amida	49
Figura 4.1 - Estrutura geral das sulfonamidas	56
Figura 4.2 - Esquema do sistema SIC com SPE em linha para a determinação	
de sulfonamidas	60
Figura 4.3 - Cromatogramas obtidos na separação de SAD, SCT e STZ por	
colunas monolíticas e de núcleo fundido	63
Figura 4.4 - Cromatograma obtido na separação de oito sulfonamidas por coluna	
de núcleo fundido F5	65
Figura 4.5 - Representação dos equilíbrios de dissociação da sulfadimetoxina	66
Figura 4.6 - Estrutura química do grupo funcional aminopropil	68

Figura 4.7 - Influência do pH da amostra na extração de sulfonamidas pela	
resina de troca aniônica com grupos funcionais aminopropil	68
Figura 4.8 - Influência do pH da fase móvel na extração de sulfonamidas pela	
resina de troca aniônica com grupos funcionais aminopropil	69
Figura 4.9 - Estrutura química do grupo funcional 2-dietilamino-etil	70
Figura 4.10 - Influência do pH da amostra na extração de sulfonamidas pela	
resina de troca aniônica com grupos 2-dietilamino-etil	70
Figura 4.11 - Influência do pH da fase móvel na eluição de sulfonamidas da	
resina com grupos funcionais 2-dietilamino-etil	71
Figura 4.12 - Estrutura química do grupo funcional 3-trimetilamino-2hidroxipropil	72
Figura 4.13 - Influência do pH da amostra na extração de sulfonamidas pela	
resina de troca aniônica com grupo 3-trimetilamino-2-hidroxipropil	72
Figura 4.14 - Influência do pH da fase móvel na extração de sulfonamidas pela	
resina de troca aniônica com grupos 3-trimetilamino-2-hidroxipropil	73
Figura 4.15 - Comparação do desempenho das três resinas de troca aniônica	
avaliadas para a extração e separação de sulfonamidas	74
Figura 4.16 - Cromatograma de amostra de rio adicionada de 100 $\mu$ g L <sup>-1</sup> de	
sulfonamidas obtido após extração e pré-concentração em linha	78
Figura 4.17 - Recuperações de sulfonamidas adicionadas em amostras de	
águas de rio	79
Figura 5.1 - Estrutura química da melamina	82
Figura 5.2- Diagrama do sistema SIC para a determinação de melamina	85
Figura 5.3 - Representação dos equilíbrios envolvendo a melamina em meio	
micelar usando coluna monolítica de fase C18	88
Figura 5.4- Influência da concentração de SDS na fase móvel na separação de	
melamina em leite	89
Figura 5.5 - Influência da proporção de 1-propanol na fase móvel na separação	
de melamina em leite	91
Figura 5.6 - Estratégias avaliadas para implementação do preparo de amostra	
em linha	92
Figura 6.1 - Diagrama do sistema SIC para pré-concentração on-column de	
parabenos	100
Figura 6.2- Representação esquemática do processo de pré-concentração on-	
column	103
Figura 6.3 - Influência do volume de amostra injetado mantendo a massa de	
parabenos constante	104

### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Aplicações de cromatografia por injeção sequencial	24
Tabela 3.1 - Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos	
com coluna de núcleo fundido com fase estacionária C18	41
Tabela 3.2 - Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos	
com coluna de núcleo fundido com fase estacionária fenil-hexil	43
Tabela 3.3 - Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos	
com coluna de núcleo fundido com fase estacionária F5	45
Tabela 3.4 - Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos	
com coluna de núcleo fundido com fase estacionária RP-amida	46
Tabela 3.5 - Características analíticas do procedimento de separação	
cromatográfica de parabenos em sistema FIA de baixa pressão	50
Tabela 3.6 - Características analíticas de procedimentos que realizam	
separação e detecção de parabenos em produtos cosméticos	51
Tabela 3.7 - Concentrações (% m/m) e desvios padrão referentes à	
determinação de parabenos em amostras de produtos de cuidados pessoais	
pelo procedimento proposto e por HPLC	52
Tabela 4.1 - Rotina de operação do sistema SIC para extração em fase sólida	
em linha e separação cromatográfica de sulfonamidas	60
Tabela 4.2 - Parâmetros cromatográficos para a separação de sulfonamidas	
por colunas monolíticas e de núcleo fundido	62
Tabela 4.3 - Estruturas moleculares e constantes de dissociação das	
sulfonamidas estudadas	67
Tabela 4.4 - Características analíticas do procedimento desenvolvido com	
coluna de núcleo fundido F5	75
Tabela 4.5 - Características analíticas de alguns procedimentos para	
determinação de sulfonamidas em amostras de água	76
Tabela 5.1 -Rotina de operação do sistema SIC para preparo de amostra em	
linha e separação cromatográfica de melamina em leite	86
Tabela 5.2 -Composição nutricional do leite integral e em pó	92
Tabela 5.3 Curvas de calibração para melamina em diferentes matrizes	94
Tabela 5.4 - Características analíticas de procedimentos cromatográficos para	
a determinação de melamina em leite	95
Tabela 5.5 - Determinação de melamina em amostras de leite adicionadas pelo	
procedimento proposto e por HPLC	96

Tabela 6.1 - Rotina de operação do sistema SIC para pré-concentração	
on-column de parabenos	101
Tabela 6.2 - Influência do volume de amostra no tempo de retenção e na	
largura dos picos na separação cromatográfica de parabenos após pré-	
concentração <i>on-column</i>	103
Tabela 6.3 Características analíticas do procedimento de pré-concentração on-	
column de parabenos	105

# LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BS	Bomba tipo seringa
CC	Coluna cromatográfica
CLM	Cromatografia líquida micelar
CMC	Concentração micelar crítica
CPNF	Coluna de partículas de núcleo fundido
CV	Coeficiente de variação
D	Detector
d.i.	Diâmetro interno
EP	Etilparabeno
F5	pentafluorofenilpropil
FDA	Agência Americana de Administração de Drogas e Alimentos
FIA	Análise por injeção em fluxo
FIC	Cromatografia por injeção em fluxo
FM	Fase móvel
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LC-MS	Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
MP	Metilparabeno
MS	Espectrometria de massas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEEK	polieteretercetona
PP	Propilparabeno
RP-CM	Coluna monolítica de fase reversa
Rs	Resolução de pico
SAD	Sulfanilamida
SCT	Sulfacetamida
SDM	Sulfadimetoxina
SDM	Sulfadimidina
SDZ	Sulfadiazina
SIA	Análise por injeção sequencial
SIC	Cromatografia por injeção sequencial

SMR	Sulfamerazina
SMX	Sulfametoxazol
SPE	Extração em fase sólida
STZ	Sulfatiazol
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta e visível
Vi	Válvulas solenoide de três vias
VC	Válvula seletora
х	Confluência
W	Recipiente de descarte

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	Análises por injeção em fluxo e cromatografia líquida	21
1.2.	Cromatografia por injeção sequencial	22
1.3.	Colunas cromatográficas em sistemas de cromatografia por injeção sequencial	. 27
2.	OBJETIVOS	. 32
3. EXP	SISTEMA DE CROMATOGRAFIA A BAIXA PRESSÃO POR INJEÇÃO EM FLUXO PLORANDO COLUNAS DE NÚCLEO FUNDIDO	. 33
3.1.	Introdução	. 33
3.1. <sup>-</sup> em f	<ol> <li>Separações cromatográficas a baixa pressão em sistemas de análises por injeçã fluxo</li> </ol>	io .33
3.1.2	2. Parabenos	. 34
3.2.	Parte experimental	36
3.2.	1. Equipamentos e acessórios	. 36
3.2.2	2. Reagentes e soluções	36
3.2.3	3. Procedimentos	37
3.2.4	4. Procedimento de referência	38
3.3.	Resultados e discussão	38
3.3.	1. Considerações gerais	38
3.3.2	2. Desempenho cromatográfico	39
3.3.2	2.1. Fase monolítica C18	39
3.3.2	2.2. Fase de núcleo fundido C18	40
3.3.2	2.3. Fase de núcleo fundido fenil-hexil	42
3.3.2	2.4. Fase de núcleo fundido F5	43
3.3.2	2.5. Fase de núcleo fundido RP-amida	45
3.3.3	3. Efeito de parâmetros operacionais	47
3.3.4	4. Características analíticas	50
3.4.	Conclusões	. 53
4. POR	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA E SEPARAÇÃO DE SULFONAMIDAS & CROMATOGRAFIA POR INJEÇÃO SEQUENCIAL	. 54
4.1.	Introdução	. 54
4.1.	1. Extração em fase sólida em linha	54
4.1.2	2. Sulfonamidas	55
4.2.	Experimental	57
4.2.	1. Equipamentos	57

4.2.2. Reagentes e soluções	58
4.2.3. Procedimento	59
4.3. Resultados e discussões	61
4.3.1. Características cromatográficas	61
4.3.2. Extração em fase sólida em linha	65
4.3.3. Características analíticas e aplicação	74
4.4. Conclusões	
5. AUMENTO DA CAPACIDADE ANALÍTICA DE SISTEMA SIC EXPLORANDO SEPARAÇÃO EM MEIO MICELAR E PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRA EM LINH DETERMINAÇÃO DE MELAMINA EM LEITE	<b>A:</b> 81
5.1. Introdução	
5.1.1. Cromatografia líquida micelar	81
5.1.2. Determinação de melamina em leite	82
5.2. Experimental	83
5.2.1. Equipamentos	83
5.2.2. Reagentes e soluções	84
5.2.3. Procedimento	85
5.2.4. Procedimento de referência	86
5.3. Resultados e discussão	87
5.3.1. Condições cromatográficas	87
5.3.2. Tratamento de amostra em linha	91
5.3.3. Características analíticas e aplicações	93
5.4. Conclusões	96
6. PRÉ-CONCENTRAÇÃO ON-COLUMN EM CROMATOGRAFIA POR INJEÇÃO SEQUENCIAL	97
6.1. Introducão	
6.2. Experimental	
6.2.1. Equipamentos	
6.2.2. Reagentes e soluções	
6.2.3. Procedimento	100
6.3. Resultados e discussões	101
6.4. Conclusões	106
6.4. Conclusões 7. CONCLUSÕES GERAIS	106 107

### 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Análises por injeção em fluxo e cromatografia líquida

A introdução das análises por injeção em fluxo (FIA) na década de 1970, mudou o modo como as soluções podem ser manipuladas [1]. Esse processo se baseia na injeção de amostra (e eventualmente de reagentes) em um fluxo transportador. Durante o percurso até o ponto de detecção, a zona de amostra sofre dispersão causando a mistura das porções de amostra e reagente para formação de um produto detectável. O formato e a magnitude do sinal analítico fornecem informações cinéticas sobre a reação química envolvida, assim como a concentração da espécie de interesse. A configuração básica de um sistema FIA consiste em bomba propulsora, um dispositivo para injeção da amostra; reator para mistura e definição do tempo para a formação do produto e sistema de detecção.

A cromatografia líquida, assim como FIA, se baseia na injeção de uma amostra em um fluxo transportador de fase móvel, sendo os analitos separados por afinidade diferencial na coluna cromatográfica [2]. Com vários pontos em comum, a comparação entre as duas técnicas se torna inevitável. Apesar de serem consideradas técnicas em fluxo, apresentam propósitos diferentes: FIA usualmente busca a determinação de um único analito (ou de poucos analitos) através de sua conversão química a uma espécie detectável em uma zona única de amostra; cromatografia líquida tem como objetivo a determinação de vários analitos em uma mesma injeção através da migração diferencial destas espécies em uma coluna e posterior detecção. O transportador nos sistemas FIA tem a finalidade de levar a zona de amostra até o sistema de detecção e, em alguns casos, participar do processo de derivação química do analito, enquanto em cromatografia líquida ele participa do processo de separação dos analitos. As técnicas também diferem quanto ao tempo de residência dos analitos em cada sistema. Enquanto em sistemas FIA o tempo de residência pode ser de alguns segundos, em cromatografia líquida podem ser necessárias horas para a completa separação dos componentes da amostra, prejudicando a frequência de amostragem. No entanto, vários analitos podem ser determinados em uma única injeção.

Durante a evolução das separações cromatográficas, os sistemas ganharam sistemas de detecção cada vez mais poderosos, como espectrometria de massas, além do desenvolvimento de fases estacionárias mais eficientes, proporcionando a separação rápida de vários analitos [3]. Várias propostas na área de análises em fluxo também foram feitas, como os sistemas de análises por injeção sequencial (SIA) [4] e sistemas com multicomutação [5], que aumentaram a versatilidade. Com isso, as duas técnicas evoluíram para direções diferentes; enquanto sistemas cromatográficos buscavam separações rápidas e eficientes, sistemas de análises em fluxo buscavam a implementação das mais diversas ferramentas, como extrações e pré-concentração em linha, com o intuito de automação, melhora de eficiência e minimização da geração de resíduos [6], os procedimentos de pré-tratamento de amostra são raramente acoplados a sistemas de cromatografia líquida.

Sistemas de análises em fluxo, apresentam alta versatilidade, sendo possível a implementação das mais diversas estratégias de pré-tratamento de amostra. No entanto, os procedimentos usualmente se restringem à determinação de um ou dois analitos, surgindo a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para a determinação multielementar.

### 1.2. Cromatografia por injeção sequencial

Sistemas de análises em fluxo apresentam características atrativas como simplicidade, versatilidade, baixo custo, alta frequência de amostragem e usualmente boas características analíticas. Entretanto, usualmente não são capazes de realizar separações de misturas complexas de analitos, tal como ocorre nas técnicas de separação, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) [7]. Estas técnicas são bem estabelecidas e apresentam alto desempenho e seletividade, mas necessitam de instrumentação de custo mais elevado do que as técnicas de análises em fluxo. A fim de explorar os atrativos de cada técnica, foi proposta a utilização de colunas cromatográficas monolíticas em sistemas de análises por injeção sequencial, introduzindo a cromatografia por injeção sequencial (SIC, do inglês *sequential injection chromatography*) [8].

A proposta pioneira foi a aplicação à separação e determinação de diclofenaco e parabenos em pomadas [8]. Quatro compostos foram quantitativamente separados em oito minutos utilizando fase estacionária C18 e uma mistura de acetonitrila e água (40:70 v/v) como fase móvel. No início de seu desenvolvimento, problemas com vazamentos eram recorrentes devido ao sistema não ser projetado para suportar as contra-pressões atingidas pelo uso de colunas monolíticas. A introdução de um sistema especialmente desenvolvido para operar em pressões maiores resolveu estes problemas. O sistema comercialmente disponível é composto por uma bomba tipo seringa, com reservatório de 4,0 mL, e uma válvula seletora de oito vias, ambas projetadas para suportar pressões de até 1000 psi. O esquema básico de um sistema SIC é apresentado na Figura 1.1.



Figura 1.1 - Diagrama genérico de um sistema de cromatografia por injeção sequencial. BS: bomba tipo seringa; VS: válvula seletora; CC: coluna cromatográfica; D: sistema de detecção

No início de seu desenvolvimento, SIC foi predominantemente aplicado à separação e determinação de espécies de interesse farmacêutico e alguns poucos trabalhos focaram aplicações ambientais. Os procedimentos desenvolvidos e suas aplicações são apresentados na Tabela 1.1.

Analitos	Amostra	Coluna	Eace móvel	Detercão	Ref
20 aminoácidos	Alga marinha	RP- CM C18 (50 × 4,6 mm)	Metanol:THF-foste 10 mmol L <sup>-1</sup> (8:1:91, v/v/v) em pH 7,2 + metanol:fostato 10 mmol L <sup>-1</sup> nas razões de 17,5:82,5,25:75, 35:65, 50:50 e 65:35 (v/v)	Fluorescência (excitação em 340 nm e emissão em 450 nm)	[9,10]
Norflaxina e ciprofloxacina	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	Agua:ACN:trietilamina (90:10:0,3) em pH 3.0	UV em 580 nm	[11]
7 fenóis	Soluções padrão	CPNF (Ascentis Express RP-Amida, 30 × 4,6 mm)	ACN:0,065% Ác. fosfórico (22:78, v/v) pH 2,4	UV em 250, 280 e 325 nm	[12]
Clorpromazina	Urina humana e formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	30 mmol L <sup>-1</sup> fosfato:ACN:metanol (55,0:31,5:13,5, v/v/v) pH 3.0	UV em 250 nm	[13]
Atenolol e hidroclorotiazida	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	Fosfato 40 mmol L <sup>-1</sup> :metanol:ACN (85:7,5, v/v/v) em pH 3,0	UV em 220 nm	[14]
Acetaminifeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno	Formulações farmacêuticas	Sílica magnética sintetizada	Metanol:água (60:40,v/v) em pH 2,5	UV em 225 nm	[15]
Dexametasona e cinchocaína	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm e 10 x 4,6 mm)	ACN:água (30:70, v/v) + ACN:água (60:40, v/v)	UV em 240 nm	[16]
Amilorida e furosemida	Urina humana e formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (50 x 4,6 mm)	Fosfato 25 mmol L-1:ACN (35:65, v/v) em pH 4,0	Fluorescência (excitação em 270 nm e emissão em 413 e 470 nm)	[17]
Ácido salicílico e rosuvastina	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	Fosfato 10 mmol L-1:ACN:metanol (50:30:20, v/v/v) em pH 3,0	UV em 240 nm	[18]
Prometazina	Urina humana e soro	RP-CM C18 (50 x 4,6 mm)	30 mmol L <sup>-1</sup> fosfato:ACN (50:50, v/v) em pH 4,0	UV em 250 nm	[19]
Ácidos benzóico, sórbico e salicílico	Maionese, geléia, suco, refrigerante e frutas	RP-CM C18 (5 x 4,6 mm)	1% ACN: NH4AC pH 4,5	UV em 235 nm	[20]
Lisinopril e hidroclorotiazida	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	Fosfato 20 mmol L-1:ACN (85:15, v/v) em pH 5,0	UV em 215 nm	[21]
Indometacina e dois produtos de degradação	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	Gradiente ACN:0,2% Ácido fosfórico	UV em 224 e 305 nm	[22]
Vitaminas, retinol, ergocalciferol, colecalciferol	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	ACN:metanol:água (40:40:10, v/v/v)	UV em 265, 290 e 325 nm	[23]
Sildenafil	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	Acetato de amônio:ACN (65:35, v/v) em pH 6,8	UV em 240 nm	[24]
Diclofenaco	Formulações farmacêuticas	RP-MC (25 x 4,6 mm)	Metanol:água (50:50, v/v)	UV em 284 nm	[25]
Amoxilcilina e ácido clavulânico	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	25 mmol L <sup>-1</sup> fosfato:metanol (85:15, v/v) em pH 3,0	UV em 228 nm	[26]
Propanolol e hidroxiclorotiazida	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (50 x 4,6 mm)	72 mmol L <sup>-1</sup> fosfato:ACN (70:30, v/v) em pH 3,0	UV em 270 e 290nm	[27]

Tabela 1.1 - Aplicações de cromatografia por injeção sequencial

Analitos	Amostra	Coluna	Fase móvel	Detecção	Ref.
α e β estradiol, etinilestradiol e estrona	Soluções padrão	CPNF (30 x 4,6 mm)	ACN:água (40:60, v/v)	UV em 254 nm	[28]
Lasalocida e toltrazuril	Água subterrânea, formulações farmacêuticas e alimentos	RP- CM C18 (25 x 4,6mm)	ACN:água (40:60, v/v)	UV em 280 e 305 nm	[29]
Simazina, atrazina e propazina	Água	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	Acetato de amônio 1,25 mmol L <sup>-1</sup> metanol (44:56, v/v) em pH 4.7	UV em 223 nm	[30]
Picloram	Água de rio adicionada	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	5,0 mmol L <sup>-1</sup> ácido fosfórico.ACN (80:20, v/v)	UV em 223 nm	[31]
Paracetamol, cafeína e ácido salicílico	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm e 100 x 4,5 mm)	Gradiente ACN:água (10:90, v/v) em pH 3,5 para coluna curta e ACN:água (30:70, v/v) em pH 3,5 para coluna longa	UV em 210 nm	[32]
Aciclovir	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (50 x 4,6 mm)	Ácido acético 0,2% (v/v) em pH 3,0	UV em 254 nm	[33]
Herbicidas: simazina, atrazina e propazina	Água adicionada	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	Acetato de amônio 1,25 mmol L <sup>-1</sup> :ACN (65:35, v/v) em pH 4,5	UV em 223 nm	[34]
Fenoxicarbe e permetrina	Espumas de uso veterinário	RP- CM C18 (10 x 4,6 mm)	ACN: água (60:40, v/v)	UV em 225 nm	[35]
Vitaminas: B1, B6 e B12	Formulações farmacêuticas	RP- CM C18 (25 x 4,6 mm)	Duas eluições isocráticas: 50 mmol L <sup>-</sup> <sup>1-</sup> acetato de amônio em pH 7,0 seguido de 50 mmol L <sup>-1-</sup> de acetato de amônio:metanol (80:20)	UV em 280, 235 e 360 nm	[36]
17 aminoácidos intracelulares livres	Microalgas Tetraselmisgracilis	RP- CM C18 (50 x 4,6 mm)	Gradiente: Metanol: THF:fosfato 10 mmol L <sup>-1</sup> (8:1:91, v/v/v) em pH 7,2 seguido de metanol:fosfato 10 mmol L <sup>-1</sup> (20:80, 35:65, 50:50 e 65:35) em pH 7,2	Fluorescência (excitação em 340 nm e emissão em 450 nm)	[37]
5 derivados fenólicos	Agua	RP-CM C18 (25 x 4,6 mm)	ACN:água (60:40, v/v) em pH 2,5	N	[38]
Triancinolona acetonida e ácido salicílico,	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x 4,6 mm e 5 x 4,6 mm)	ACN:água (35:65, v/v) em pH 3,2 ajustado com ácido acético	UV em 240 nm	[39]
Ambroxol, metilparabeno e ácido benzóico	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (50 x 4,6 mm e 100 x 4,6 mm)	ACN:THF:água (10:10:90, v/v/v) pH 3,0 ajustado com ácido acético	UV em 245 nm	[40]
Nafazolina e metilparabeno	Formulações farmacêuticas	RP-CM (50 x 4,6 mm e 5 x 4,6 mm)	Metanol:água (40:60, v/v) em pH 5,2 ajustado com ácido acético	UV em 220 e 256 nm	[41]
Betametasona e cloranfenicol	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x 4,6 mm e 5 x 4,6 mm)	ACN:água (30:80, v/v)	UV em 241 e 271 nm	[41]
Lindocaína e priilocaína	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x 4,6 mm)	ACN:água (20:80, v/v) em pH 7,1 ajustado ácido fosfórico	UV em 212 nm	[42]

Tabela 1.1. Aplicações de cromatografia por injeção sequencial (continuação)

0
ě Ř
ШЦ
Ę
ğ
DOI 8
Φ
Seq
Q
Ö.
Ē
E
ŏ
ā
ŋ
ğ
ē
CLOID
Ð
0 D
١Ō.
Ō
ā
4
1
-
a a
0
Ē

Arnallitos	Aum ositra	Columa	Fase móvel	Detecção	Ref.
Ambroxol e doxiciclina	Formulações farmatoêuticais	RP-CM (25 x 4,6 mm)	ACN:água (10:90, v/v) em pH 2,5 aiustado com ácido fostónico	UV em 213 nm	[43]
Paracetamol, cafeína e ácido acetilsalicílico	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x4,6 mm)	ACN:água (10:90, v/v) em pH 4,05 ajustado com ácido fosfórico	UV em 210 nm	[44]
Triancinolona acetonida, metilparabeno e propilparabeno	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x 4,6 mm e 10 x 4,6 mm)	ACN:metanol:água (35:5:65, v/v/v) em pH 2,5 ajustado com 0,05% de nonilamina e ácido fosfórico	UV em 243 nm	[45]
Ácido salicílico e metilsalicilato	Formulações farmacêuticas	RP-CM C18 (50 x 4,6 mm)	ACN:água (35:60, v/v), pH 2,4 ajustado com ácido fosfórico	UV em 240 nm	[45]
Diclofenaco, Metilparabeno e propilparabeno	Formulações farmacêuticas	RP-CM (25 x 4,6 mm)	ACN:água (40:70, v/v) em pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico	UV em 275 nm	8
RPCM' coluna monolítica de t	fase reversa: ACN: acetor	itrila: CPNE- colunas de c	partículas de núcleo fundido: THE-	tetrahidrofurano.	

.

### 1.3. Colunas cromatográficas em sistemas de cromatografia por injeção sequencial

A busca por meios de separação mais eficientes em cromatografia resultou em colunas de partículas de dimensões cada vez mais reduzidas (< 3,0 µm) e consequentemente foi necessário o uso de bombas de melhor desempenho, devido ao aumento da resistência a passagem do fluído. Com esta limitação ao avanço da capacidade de separação de colunas cromatográficas, deu-se início ao desenvolvimento de novos meios que apresentassem alta eficiência de separação a pressões menores do que as necessárias para colunas de partículas porosas. Neste contexto, foram introduzidas as colunas monolíticas, que consistem em uma peça única de sílica polimérica de alta pureza, usualmente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura altamente porosa (porosidade excede 80%) com pequenos domínios e grandes canais que conferem à coluna alta eficiência e permeabilidade (Figura 1.2). Os domínios estão presentes em diversos formatos como micro, mesoporosos ou não porosos [46]. Os canais do monolito de dimensões nominais de 2 µm de diâmetro são os caminhos preferenciais da fase móvel e devido à sua geometria e estrutura apresentam menor resistência à passagem de fase móvel do que os meios particulados, isso faz com que seja possível trabalhar a vazões altas (> 5 mL min<sup>-1</sup>) sem perda de eficiência. [47,48]. A maioria dos procedimentos em SIC utiliza uma coluna monolítica como meio de separação, por operar a pressões menores do que as colunas empacotadas, como pode ser observado na Tabela 1.1.



Figura 1.2 - Representação esquemática de (a) colunas empacotadas e (b) monolíticas. (adaptado da ref. [49])

Com relação ao desempenho cromatográfico, colunas monolíticas e de partículas de mesma área superficial e diâmetro de poro apresentam propriedades similares com respeito à seletividade e retenção [50].

Atualmente, duas empresas disponibilizam comercialmente colunas monolíticas que podem ser empregadas em sistemas SIC - Merck<sup>®</sup> Chromolith<sup>TM</sup> e Phenomenex<sup>®</sup> Onyx<sup>TM</sup>. Somente colunas de 25 e 50 mm de comprimento são compatíveis com o sistema, o que restringe as opções de fases estacionárias, uma vez que somente fases C18, C8, CN, NH<sub>2</sub> e sílica estão disponíveis. Isto faz com que a seletividade dos procedimentos desenvolvidos em SIC seja limitada, o que é agravado pela relativa dificuldade de realizar eluições por gradiente.

A capacidade de separação de sistemas SIC dependia exclusivamente de colunas monolíticas, o que restringia suas aplicações. O avanço no poder de separação desses sistemas estava condicionado, então, ao surgimento de novas tecnologias na produção de colunas que operassem a baixas pressões, mas que apresentassem diferentes fases estacionárias.

Nos últimos anos, colunas de núcleo fundido (do inglês, *fused-core columns*) têm se destacado por sua alta eficiência de separação a pressões inferiores que as requeridas com colunas recheadas com partículas de sílica porosa [51]. Estas colunas são constituídas por partículas com um núcleo de sílica fundida (*e.g.* 1,7 µm de diâmetro) revestido por uma camada porosa de fase estacionária (*e.g.* 0,5 µm de espessura). Essa combinação resulta em partículas com alta área superficial e colunas capazes de operar em pressões menores. Por exemplo, colunas de núcleo fundido com partículas de 2,7 µm apresentam eficiência de separação comparável a uma coluna de partículas de sub-2 µm e operam em pressões próximas a de partículas de 3 µm [52]. Devido à sua peculiar constituição física, estas colunas apresentam várias características que contribuem para melhores separações cromatográficas. Estas características afetam diretamente os termos da equação de van Deemter [51]:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_m u + C_s u$$

Onde H é a altura equivalente a um prato; A: termo dos caminhos múltiplos (difusão de Eddy); B: termo de difusão longitudinal; C: termos de transferência de massa entre fases móvel e estacionária; u: velocidade linear média da fase móvel. A altura equivalente a um prato é a constante de proporcionalidade entre a variância da banda cromatográfica ( $\sigma^2$ ) e o comprimento da coluna (L), podendo ser uma medida indireta de alargamento de banda:  $\sigma^2$ = H\*L.

Por apresentar poros de volumes bastante reduzidos, as colunas de núcleo fundido apresentam redução do alargamento de bandas por difusão longitudinal (termo B da equação de van Deemter). O menor caminho de difusão aumenta a velocidade de transferência de massa entre as fases móvel e estacionária, reduzindo a contribuição do termo C da equação de van Deemter, o que faz com

que a coluna promova separações eficientes em curtos períodos de tempo [53,54]. Estas colunas também apresentam tamanhos de partículas mais uniformes, como mostrado na Figura 1.3, que resulta em um empacotamento mais efetivo, diminuindo a contribuição do termo A da equação de van Deemter, relacionado aos caminhos múltiplos do analito. A combinação destes fatores faz com que se obtenham picos menos alargados e viabiliza separações eficientes em curtos períodos de tempo. Além destas vantagens, as colunas de núcleo fundido estão disponíveis em diversas fases estacionárias como C18, fenil-hexil, amida e F5. Elas são comercializadas por diversas empresas, como a Poroshell (Agilent), Halo (Advanced Materials Technology), Cortecs (Waters), Kinetex( Phenomenex), Ascentis Express (Sigma Aldrich) e Accucore (Thermo Fisher Scientific).



Figura 1.3 - Comparação da constituição física de partículas de núcleo fundido e porosas de sílica

Tendo em vista o alto poder de separação provido pelas colunas de núcleo fundido e a possibilidade de operação a pressão mais baixa, foi proposto o seu acoplamento aos sistemas SIC. O trabalho pioneiro apresentou uma comparação crítica da eficiência com a obtida em colunas monolíticas na separação de quatro estrogênios de estrutura similar [28]. As duas colunas com fase estacionária C18 apresentaram separações satisfatórias para todos os componentes da mistura com

valores de resolução e simetria de picos comparáveis. Devido as colunas avaliadas apresentarem comprimentos diferentes (monolítica: 10 cm; núcleo fundido: 3 cm), a fase monolítica apresentou maior número de pratos. Entretanto, maiores valores de altura equivalente a um prato teórico foram obtidos, indicando menor eficiência da coluna de núcleo fundido. Mesmo apresentando melhor desempenho, a seletividade estava limitada a separações por fase C18 e a introdução de colunas com diferentes fases estacionárias aumentou a capacidade de separação dos sistemas SIC. Neste sentido, a eficiência de separação de compostos fenólicos por três colunas de núcleo fundido diferentes (C18, fenil-hexil e RP-amida) foi avaliada [12]. Somente a fase RP-amida apresentou resolução satisfatória entre todos os compostos (R<sub>s</sub>> 1,5) com simetria de pico abaixo de 1,33 e alturas equivalentes a um prato abaixo de 10 µm, demostrando a importância da seleção da fase estacionária adequada.

### 2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais desta tese incluem o desenvolvimento de novas estratégias de extração em fase sólida e melhoria de seletividade e sensibilidade de separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo. Objetivos específicos incluem:

- Uso de colunas de núcleo fundido para ampliar a seletividade e aplicabilidade de separações cromatográficas em sistemas de análises por injeção em fluxo. Aplicação à separação e determinação de parabenos em produtos de cuidado pessoal;
- Uso de fase micelar em sistema SIC para a modificação de seletividade da fase estacionária para a separação e determinação de melamina em leite;
- Acoplamento de extração em fase sólida em sistema SIC para a extração pré-concentração, separação e determinação de sulfonamidas em águas de rio;
- Desenvolvimento de procedimento de pré-concentração e separação na coluna cromatográfica.

# 3. SISTEMA DE CROMATOGRAFIA A BAIXA PRESSÃO POR INJEÇÃO EM FLUXO EXPLORANDO COLUNAS DE NÚCLEO FUNDIDO<sup>1</sup>

### 3.1. Introdução

# 3.1.1. Separações cromatográficas a baixa pressão em sistemas de análises por injeção em fluxo

O principal fator que viabilizou a implementação da cromatografia por injeção sequencial foi o emprego de colunas monolíticas que podem ser operadas a pressões muito menores do que as colunas convencionais. Apesar disto, os sistemas de propulsão usualmente utilizados em sistemas de análises em fluxo, como bombas peristálticas (< 80 psi) e microbombas solenoide, não são capazes de proporcionar pressões adequadas para a utilização destas colunas. Desta forma, sistemas SIC fazem o uso de uma bomba tipo seringa projetada especialmente para este tipo de aplicação, a qual é capaz de atingir pressões de até 1000 psi.

A fim de contornar este inconveniente e permitir separações a pressões menores, alguns procedimentos apresentados na literatura fazem o uso de colunas monolíticas curtas (0,5 cm), empregadas como colunas de guarda em HPLC, para realizar separações em sistemas FIA, sendo esta técnica chamada de cromatografia por injeção em fluxo (FIC, do inglês Flow injection chromatography). Neste contexto, um procedimento para a separação e determinação de teobromina, teofilina e cafeína em café foi desenvolvido pelo acoplamento de uma coluna monolítica comercial de 0,5 cm com fase estacionária C18 a um sistema FIA [55]. O sistema era também constituído por uma bomba peristáltica, uma válvula de injeção e de detecção espectrofotométrica no ultravioleta. O procedimento possibilitou a separação dos analitos com resolução superior a 1,83. O sistema apresenta vantagens frente a SIC e a HPLC, como o baixo custo, devido à desnecessária utilização de sistemas de bombeamento de alta pressão e instrumentação mais simples. A principal desvantagem é o uso de colunas curtas (0,5 cm) que limitam a capacidade de separação. A seletividade destes sistemas também era limitada devido às poucas opções de fases estacionárias das fases monolíticas.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Anexo A – Batista, A. D., Rocha, F. R. P. Analytical Methods, v. 6, p. 9299-9304, 2014.

Como apresentado no Capitulo 1, as colunas de núcleo fundido são capazes de realizar separações cromatográficas eficientes a pressões menores do que as de colunas convencionais e, além disto, são disponíveis em uma variedade de fases estacionárias. O uso de colunas de núcleo fundido em sistemas FIC pode aumentar a seletividade dos procedimentos desenvolvidos pelo uso de fase estacionária adequada, amenizando o efeito da baixa capacidade de separação provida pela curta dimensão da coluna.

### 3.1.2. Parabenos

Parabenos são substâncias amplamente utilizadas na indústria cosmética como conservantes por possuírem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, baixa toxicidade, baixa reatividade (são resistentes à hidrólise sob aquecimento e estáveis em diferentes condições de acidez), baixa volatilidade e baixa tendência de adsorção em embalagens. Os parabenos não afetam as características das formulações (são incolores e inodoros), são biodegradáveis e têm custo reduzido [56].

Os parabenos mais utilizados são metilparabeno (MP), etilparabeno (EP) e propilparabeno (PP), os quais têm estruturas moleculares apresentadas na Figura 3.1. Nos produtos cosméticos, podem ser encontrados em anti-transpirantes, protetores solares, xampus, entre outros; nos fármacos, desde pomadas antifúngicas a comprimidos que regulam a pressão arterial e, nos alimentos, são encontrados em refrescos, enlatados de frutas e vegetais, geléias, frutas secas, molhos e outros. Em 1984, foi estimado que os parabenos eram usados em 13200 formulações cosméticas e, em 1995, em um estudo com 215 produtos, 99 % continham parabenos em sua formulação [57].


Figura 3.1 - Estruturas moleculares dos parabenos mais utilizados industrialmente

O uso em larga escala destes conservantes em cosméticos pode resultar em potencial risco à saúde. A maioria destas substâncias pode induzir dermatites alérgicas e estudos baseados em ensaios *in vitro* e *in vivo* têm relatado que todos os parabenos comumente usados apresentaram atividade estrogênica [58]. Para garantir a segurança dos consumidores, níveis de tolerância têm sido estabelecidos quanto à presença de antimicrobianos em diversas matrizes, tais como cosméticos, alimentos e fármacos. Assim, para proteger a saúde humana dos efeitos adversos, agências reguladoras têm estabelecido limites para as substâncias de uso autorizado nas matrizes em questão. No Brasil, o uso de conservantes em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes é regulado pela ANVISA, que estabelece uma concentração máxima permitida de 0,4 % (m/m) de parabenos totais. Essa resolução é baseada na diretiva 76/768/EEC da Comunidade Europeia [59]. O cumprimento das normas dessa resolução é de grande importância, já que se sabe que os conservantes são substâncias biologicamente reativas [60].

Procedimentos empregando FIC para a separação e determinação de parabenos foram apresentados anteriormente [61]. No entanto, a baixa seletividade da fase estacionária C18 para este grupo de analitos, fez necessário o uso de eluições por etapas, *i.e.* o uso de duas fases móveis diferentes para separações satisfatórias. A implementação destas etapas resultou em instrumentação mais complexa e maior consumo de solventes orgânicos [62]. Uma estratégia similar foi

posteriormente utilizada para a determinação espectrofotométrica [61] e quimiluminétrica [63] de parabenos. Neste capítulo da Tese foram exploradas colunas de núcleo fundido curtas para aumento da seletividade de separações cromatográficas realizadas em sistemas de análise por injeção em fluxo.

# 3.2. Parte experimental

#### 3.2.1. Equipamentos e acessórios

Foi utilizado um sistema de análises em fluxo constituído de uma bomba peristáltica de oito canais (Ismatec), tubos de Tygon<sup>®</sup>, tubos PEEK (0,25 mm d.i.), confluências de Teflon<sup>®</sup>, válvulas solenoide de três vias (NResearch<sup>®</sup>), cela de fluxo com 10 mm de caminho óptico e 8  $\mu$ L de volume interno (Ultem<sup>®</sup>), espectrofotômetro USB2000 UV-vis (Ocean Optics<sup>®</sup>), lâmpada de deutério D-2000 (Ocean Optics<sup>®</sup>) e cabos de fibra óptica com diâmetro interno de 600  $\mu$ m (CeramOptec<sup>®</sup>), pré-colunas de núcleo fundido (Ascentis Express<sup>®</sup> 5 x 4,6 mm; 2,7  $\mu$ m) com fases estacionárias C18, RP-amida, F5 e fenil-hexil e pré-coluna monolítica (Onyx<sup>®</sup> Phenomenex, 0,5 x 4,7 mm). A injeção da amostra e a inserção de fase móvel na coluna cromatográfica foi controlada por programa de computador desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 e a aquisição dos dados foi feita por software (OOIBase 32) fornecido pelo fabricante do espectrofotômetro.

### 3.2.2. Reagentes e soluções

No preparo de todas as soluções foram utilizados reagentes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ) Soluções estoque de metil, etil e propilparabeno (Sigma Aldrich) 1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas em metanol (Merck). As soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções estoque na fase móvel, a qual foi constituída de uma mistura de acetonitrila e água a pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico. Diferentes proporções de acetonitrila/água foram utilizadas para as diferentes fases estacionárias. Amostras de lenços umedecidos,

lubrificantes íntimos, pomada e repelente de insetos foram utilizadas para a avaliação da aplicabilidade do procedimento. Todos os produtos foram adquiridos no mercado local.

#### 3.2.3. Procedimentos

Inicialmente foi avaliado o desempenho cromatográfico de diferentes fases estacionárias na separação dos três parabenos, utilizando o sistema apresentado na Figura 3.2. O volume de amostra injetado na coluna cromatográfica foi definido pelo tempo de acionamento da válvula V<sub>1</sub> e pela vazão conferida pela bomba peristáltica. Após a válvula V<sub>1</sub> ser desativada, a fase móvel foi propelida pela coluna. Os analitos foram eluídos da coluna e posteriormente detectados por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta (250 nm).

A avaliação dos cromatogramas foi feita por meio do software gráfico (OriginLab<sup>®</sup>) e a altura dos picos foi utilizada como parâmetro analítico. A fase estacionária RP-amida foi utilizada para a avaliação da influência do volume de amostra (entre 5 e 24  $\mu$ L) e vazão da fase móvel (entre 0,3 e 0,6 mL min<sup>-1</sup>). Tempos de retenção, resolução, fator de simetria de pico, número de pratos e altura equivalente a um prato teórico foram calculados com os dados experimentais, com base nas recomendações da FDA (*Food and drug admistration*) [64].



Figura 3.2 - Diagrama do sistema de análises em fluxo utilizado para separações cromatográficas a baixa pressão. A: amostra; FM: fase móvel; V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub>: válvulas solenoide de três vias; CC: coluna cromatográfica; X: confluência;

D: cela de fluxos acoplada ao detector espectrofotométrico; W: recipiente de descarte

#### 3.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência foi baseado em cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma coluna C18 (MetaChem Inertsil, ODS-3, 250 mm x 4,0 mm com partículas de 5  $\mu$ m) e fase móvel composta por uma mistura de água e acetonitrila (45:55, v/v) para eluição isocrática a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetado foi 10  $\mu$ L.

As amostras foram preparadas conforme procedimento apresentado anteriormente na literatura [65]. Os lenços foram secos em estufa a 50 °C por 12 h. A extração dos parabenos foi feita utilizando *ca.* 1,0 g da amostra e 30 mL de metanol, sob sonicação por 15 minutos. O extrato final foi diluído com fase móvel a fim de se obter em concentrações dentro da faixa linear de resposta.

# 3.3. Resultados e discussão

# 3.3.1. Considerações gerais

Alta eficiência de separação e baixas pressões operacionais são os quesitos desejáveis em sistemas de cromatografia por injeção em fluxo. As colunas de núcleo fundido preenchem estes requisitos e ainda apresentam uma variedade de fases estacionárias. Nos experimentos realizados, a pressão aplicada pelo sistema de propulsão, foi aferida por um manômetro e não excedeu 80 psi. Resolução satisfatória ( $R_s > 1,5$ ) foi obtida mesmo utilizando uma coluna de dimensões reduzidas (5 mm de comprimento).

A unidade de propulsão deve ser capaz de manter a vazão da fase móvel constante para se obterem resultados reprodutíveis, tanto nas alturas de pico como nos tempos de retenção. No sistema proposto, o bombeamento foi efetuado por uma bomba peristáltica equipada com tubos de propulsão de Tygon<sup>®</sup>, os quais tiveram seu desempenho avaliado frente ao uso de soluções de acetonitrila. Durante todos

os experimentos, não foram observadas variações significativas na vazão de fase móvel.

Os mesmos tubos foram utilizados em todos os experimentos sem perda de eficiência, indicando a robustez do bombeamento peristáltico. As estruturas químicas das fases estacionárias avaliadas são apresentadas na Figura 3.3



Figura 3.3 – Estruturas químicas das fases estacionárias das colunas de núcleo fundido avaliadas.

# 3.3.2. Desempenho cromatográfico

# 3.3.2.1. Fase monolítica C18

Experimentos iniciais foram realizados utilizando o sistema apresentado na Figura 3.2 acoplado a uma coluna monolítica de fase C18 para a separação de uma mistura de metil, etil e propil parabenos. Várias composições de fase móvel foram avaliadas e em nenhuma condição foi observada separação satisfatória dos analitos, como exemplificado na Figura 3.4.



Figura 3.4 - Cromatograma obtido na separação de metil, etil e propil parabenos 5 mg L<sup>-1</sup> por coluna monolítica C18 (5 mm x 4,6 mm). Fase móvel: água:acetonitrila (80:20); vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 10 μL.

A baixa resolução observada com o uso de fase monolítica C18 deve-se ao mecanismo de separação envolvendo a fase C18 (apolar) e os parabenos (polares) e ao baixo número de pratos da coluna devido ao seu curto comprimento (0,5 cm). Apesar das modificações de composição da fase móvel, os analitos apresentam baixa afinidade pela fase C18. Este fato, aliado às características físicas da coluna, resultaram em um baixo desempenho cromatográfico.

## 3.3.2.2. Fase de núcleo fundido C18

Foram avaliadas várias proporções de água (pH 2,5 ajustado com ácido fosfórico) e acetonitrila como fase móvel para cada uma das fases estacionárias. A Figura 3.5 apresenta os cromatogramas obtidos com a fase C18 para as duas composições de fase móvel que resultaram em melhor separação. Os parâmetros cromatográficos correspondentes estão listados na Tabela 3.1.



Figura 3.5 – Cromatogramas obtidos nas separações de metil, etil e propil parabenos 5 mg L<sup>-1</sup> em coluna de núcleo fundido C18 (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 10 μL. (a) água (pH 2,5)/ACN (80:20, v/v), (b) água (pH 2,5)/ACN (85:15, v/v)

Parâmetro	H <sub>2</sub> O/a	cetonitrila (8	35:15)	H <sub>2</sub> O/a	cetonitrila (	80:20)
i alametto	MP	EP	PP	MP	EP	PP
Tempo de retenção (min)	1,58	3,78	11,6	1,18	2,20	5,47
Largura do pico (min)	0,92	1,41	3,47	0,47	0,59	0,91
Simetria do pico	1,36	1,28	1,01	2,22	1,59	1,34
Número de pratos	47,6	116	179	103	222	574
Resolução	1,89ª	3,21 <sup>b</sup>		1,93ª	4,35 <sup>b</sup>	—
Altura equivalente a um prato (μm)	105	43,1	27,9	48,5	22,5	8,71

**Tabela 3.1 -** Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos comcoluna de núcleo fundido com fase estacionária C18

Resoluções entre <sup>a</sup> MP/EP e <sup>b</sup> EP/PP

Conforme esperado para separações em fase reversa, o aumento do componente menos polar (acetonitrila) na fase móvel diminuiu o tempo de retenção dos analitos, mas também afetou a resolução e a largura dos picos. Na tentativa de melhorar a resolução, o aumento da proporção de fase aquosa resultou em tempos de retenção muito altos, além de picos muito alargados por aumento de tempo de residência dos analitos na coluna, o que aumenta a dispersão. Entretanto, apesar de apresentar as mesmas dimensões e fase estacionária da coluna de fase monolítica, a coluna de núcleo fundido C18 resultou em melhores resoluções, devido à sua maior capacidade de separação, de acordo com o observado anteriormente [28].

#### 3.3.2.3. Fase de núcleo fundido fenil-hexil

Os cromatogramas obtidos em duas diferentes condições de fase móvel para a fase estacionária fenil-hexil são apresentados na Figura 3.6. Os parâmetros cromatográficos correspondentes estão listados na Tabela 3.2.



Figura 3.6 – Cromatogramas obtidos na separação cromatográfica de metil, etil e propil parabenos 5 mg L<sup>-1</sup> por coluna de núcleo fundido fenil-hexil (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 10 μL. (a) água (pH 2,5)/ACN (80:20, v/v), (b) água (pH 2,5)/ACN (85:15, v/v)

Parâmatro	H <sub>2</sub> O/A	cetonitrila (8	35:15)	H <sub>2</sub> O/A	H <sub>2</sub> O/Acetonitrila (80:20)			
Farametto	MP	EP	PP	MP	EP	PP		
Tempo de retenção (min)	2,13	4,58	12,2	1,42	2,57	5,70		
Largura do pico (min)	0,78	1,25	3,27	0,47	0,63	1,35		
Simetria do pico	1,48	1,28	1,10	2,05	1,56	1,27		
Número de pratos	119	214	222	140	260	281		
Resolução	2,40	3,36 <sup>b</sup>		2,06	3,14 <sup>b</sup>	—		
Altura equivalente a prato (μm)	4,22	2,34	2,26	3,56	1,92	1,78		

**Tabela 3.2** - Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos em coluna de núcleo fundido com fase estacionária fenil-hexil

Resoluções entre <sup>a</sup> MP/EP e <sup>b</sup> EP/PP

A fase estacionária fenil-hexil permite interações  $\pi$ - $\pi$  através de seu anel aromático e elétrons deslocalizados, conferindo uma seletividade única, com aplicações complementares às fases C18 e amida. O anel aromático não substituído atua como doador  $\pi$  (ou base de Lewis) que interage fortemente com receptores  $\pi$  e alguns ácidos de Lewis eletro-deficientes. Esta fase apresenta boa seletividade para moléculas aromáticas com grupos eletronegativos, como é o caso dos parabenos. Foi observado maior resolução dos picos e número de prato maiores do que obtidos pela coluna de fase C18, indicando melhor seletividade da coluna fenil-hexil. Na condição com melhor resolução (H<sub>2</sub>O/acetonitrila 85:15), obteve-se longos tempos de separação e picos alargados, o que compromete a detectabilidade do procedimento e a frequência de amostragem.

# 3.3.2.4. Fase de núcleo fundido F5

Fases estacionárias F5 (pentafluorofenilpropil) são compostas por anéis fenílicos deficientes de elétrons devido aos substituintes flúor, formando uma fase

reversa estável. Além da formação de interações  $\pi$ - $\pi$ , a fase F5 também retém compostos por interações polares, apresentando dois modos de retenção diferentes. Isto melhora a retenção de compostos polares, que geralmente é difícil de se obter em fases C18. A Figura 3.7 apresenta os cromatogramas obtidos com composições de fase móvel que resultaram nos melhores parâmetros cromatográficos, mostrados na Tabela 3.3.



Figura 3.7 – Cromatogramas obtidos nas separações cromatográficas de metil, etil e propil parabenos 5 mg L<sup>-1</sup> em coluna núcleo fundido F5 (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 10 μL. (a) água (pH 2,5)/ACN (80:20, v/v), (b) água (pH 2,5)/ACN (85:15, v/v)

Parâmetro	H <sub>2</sub> O/A	cetonitrila (8	85:15)	H <sub>2</sub> O/A	cetonitrila (	80:20)
	MP	EP	PP	MP	EP	PP
Tempo de retenção (min)	2,98	5,93	13,7	1,88	3,15	6,12
Largura do pico (min)	1,28	1,89	3,92	0,75	0,96	1,72
Simetria do pico	1,20	1,18	1,16	1,51	1,33	1,28
Número de pratos	87,2	158	197	102	173	202
Resolução de pico	1,87ª	2,69 <sup>b</sup>		1,49 <sup>a</sup>	2,22 <sup>b</sup>	
Altura equivalente a prato (µm)	5,73	3,16	2,54	4,91	2,89	2,47

**Tabela 3.3 -** Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos emcoluna de núcleo fundido com fase estacionária F5

Resoluções entre <sup>a</sup> MP/EP e <sup>b</sup> EP/PP

No caso da separação dos parabenos por fase F5, em condições que foram obtidas melhores resoluções, foi necessário um longo tempo de análise (> 800 s), demonstrando a forte interação entre os analitos e a fase estacionária. Devido ao alto tempo de retenção dos parabenos na coluna, foram obtidos picos alargados e, consequentemente, baixo número de pratos.

# 3.3.2.5. Fase de núcleo fundido RP-amida

A fase estacionária RP-amida é uma alternativa à fase C18, principalmente para a separação de compostos polares que formam ligações de hidrogênio, que é o caso dos parabenos. Os cromatogramas obtidos com esta fase estacionária em duas diferentes condições de fase móvel são apresentados na Figura 3.8. Esta fase apresentou resolução satisfatória (> 1,5) para metil e etilparabenos que possuem estruturas moleculares muito próximas, além de tempos de retenção e largura de picos menores do que aqueles obtidos com a fase C18, o que indica melhor seletividade (Tabela 3.4). Picos menos alargados apresentam maior altura, o que aumenta a detectabilidade do procedimento, uma vez que as medidas são baseadas na altura dos picos.



Figura 3.8 – Cromatogramas obtidos nas separações cromatográficas de metil, etil e propil parabenos 5 mg L<sup>-1</sup> em coluna de núcleo fundido RP-Amida (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra: 10 μL. (a) água (pH 2,5)/ACN (75:25, v/v), (b) água (pH 2,5)/ACN (80:20. v/v)

**Tabela 3.4 -** Parâmetros cromatográficos referentes à separação de parabenos comcoluna de núcleo fundido com fase estacionária RP-amida

Darâmetro	H <sub>2</sub> O/A	cetonitrila (	75:25)	H <sub>2</sub> O/A	cetonitrila (	80:20)
i arametro	MP	EP	PP	MP	EP	PP
Tempo de retenção (min)	1,68	3,17	7,18	2,23	4,87	12,7
Largura do pico (min)	0,42	0,60	1,30	0,55	0,93	2,47
Simetria do pico	1,50	1,66	1,28	1,82	1,23	1,04
Número de pratos	261	446	489	264	435	426
Resolução de pico	2,89ª	4,21 <sup>b</sup>		3,54ª	4,62 <sup>b</sup>	—
Altura equivalente a prato (µm)	1,91	1,12	1,02	1,90	1,15	1,17

Resoluções entre <sup>a</sup> MP/EP e <sup>b</sup> EP/PP

Outro fato importante observado nas separações com fase RP-amida foi a alta suscetibilidade a variações da composição de fase móvel. Uma alteração de 5% na proporção do componente orgânico diminuiu aproximadamente pela metade o tempo de retenção e a largura de pico do composto mais retido (PP), sem prejudicar a

resolução dos dois outros compostos (MP e EP). Este comportamento pode auxiliar na separação de compostos polares de estrutura e propriedades muito próximas, já que pequenas alterações de composição de fase móvel resultam em mudanças significativas no desempenho cromatográfico. Por outro lado, a robustez do procedimento pode se tornar crítica.

O número de pratos calculado também foi maior do que os observados para a fase C18 devido à menor largura dos picos, apresentando assim uma maior eficiência de separação. Simetrias de pico entre 1,04 e 1,82 foram observadas. Este parâmetro, que deve se aproximar da unidade em separações ideais é prejudicado por altos volumes de amostra; neste caso, mesmo 10 µL de amostra foi suficiente para afetar a simetria de pico devido ao curto comprimento da coluna.

Dentre as fases avaliadas, RP-amida foi a que apresentou melhor desempenho, apresentando melhores resoluções (Rs > 1,5) para todas as espécies, com baixo tempo de análise (< 10 min), menor alargamento de banda e maior número de pratos. A análise comparativa da eficiência de separação dos parabenos em sistema de baixa pressão demonstra a importância da natureza da fase estacionária na separação, uma vez que o comprimento da coluna cromatográfica que pode ser utilizada nestes sistemas é limitado (0,5 cm). Sendo assim, o aumento de seletividade deve ser atingido por outros fatores, principalmente pelo uso de fase estacionária apropriada.

Os procedimentos em fluxo que envolvem separações cromatográficas em baixas pressões até então apresentados na literatura fazem uso de colunas monolíticas curtas, que estão disponíveis somente por fase estacionária C18, o que limita a aplicação destes sistemas. A introdução de colunas núcleo fundido amplia as possibilidades de aplicações destes sistemas.

### 3.3.3. Efeito de parâmetros operacionais

A influência de outros fatores como vazão e volume de amostra foi avaliada no sistema de cromatografia por injeção em fluxo, a fim de se obter melhor resolução e detectabilidade. O comportamento cromatográfico observado com a variação da vazão é apresentado na Figura 3.9.



Figura 3.9 – Cromatogramas mostrando o efeito da variação da vazão de fase móvel na separação de parabenos (5 mg L<sup>-1</sup>) por pré-coluna RP-amida (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Volume de amostra: 10 μL; Fase móvel: água (pH 2,5) /ACN (85:25, v/v)

Com a diminuição da vazão, como esperado, foi observado o aumento no tempo de retenção dos analitos, além do alargamento dos picos causado pelo longo tempo de residência dos analitos na coluna, o que acarreta maior dispersão. Em vazões baixas, a eficiência da coluna foi comprometida, apresentando baixo número de pratos devido ao alargamento dos picos. A maior vazão avaliada (0,6 mL min<sup>-1</sup>) apresentou os melhores resultados (menor tempo de análise e resolução aceitável entre os analitos). Vazões maiores não foram avaliadas devido à limitação de torque proporcionado pela bomba peristáltica e pela contra-pressão gerada pela coluna cromatográfica. Entretanto, a altura equivalente a um prato teórico é dependente da vazão de fase móvel. Com o aumento da vazão, há uma diminuição deste parâmetro até um valor mínimo, o qual volta a aumentar novamente acima da vazão ótima para a coluna, segundo a equação de van Deemter [51].

A influência do volume de amostra no comportamento cromatográfico é mostrada na Figura 3.10.



Figura 3.10 – Cromatograma mostrando o efeito do volume de amostra na separação de parabenos (5 mg L<sup>-1</sup>) por pré-coluna RP-amida (5 mm x 4,6 mm, 2,7 μm). Vazão: 0,6 mL min<sup>-1</sup>; Fase móvel: água (pH 2,5) /ACN (85:25, v/v)

Em cromatografia é desejável que o volume de amostra seja o menor possível, visando obter uma zona de amostra estreita, que resultará em picos menos alargados e, consequentemente, em melhor desempenho cromatográfico. Volumes maiores podem ser utilizados quando se deseja aumento de detectabilidade, desde que a resolução não seja comprometida. No caso da separação dos parabenos, o aumento do volume de amostra causou alargamento dos picos, como esperado, mas mesmo nos maiores volumes avaliados, a resolução entre os dois analitos mais críticos (MP e EP) não foi comprometida. Entretanto, como os analitos estão em altas concentrações nas amostras em estudo, não é necessário maximizar a detectabilidade podendo ser utilizados menores volumes de amostra.

Após os estudos de otimização, selecionou-se a vazão de 0,6 mL min <sup>-1</sup> e volume de amostra de 10 μL para estimativa das características analíticas.

# 3.3.4. Características analíticas

As principais características analíticas do procedimento de cromatografia por injeção em fluxo são apresentadas na Tabela 3.5.

	Metilparabeno	Etilparabeno	Propilparabeno
Equação	A = 0,048C <sub>MP</sub> + 0,008	A = 0,029C <sub>EP</sub> + 0,017	$A = 0,015C_{pp} + 0,008$
R	0,999	0,995	0,997
LOD (mg L <sup>-1</sup> )	0,12	0,21	0,39
CV tempo de retenção (%)	3,4	3,9	4,1
CV altura do pico (%)	2,9	3,3	3,5
Consumo de solvente (mL)		1,37	
Tempo de análise (min)		9,1	

Tabela 3.5 - Características analíticas do procedimento de separaçãocromatográfica de parabenos em sistema FIA de baixa pressão

A: absorbância (altura do pico); C: concentração em mg L-1

Ο procedimento apresentou resposta linear entre 1,00 е 5,00 mg L<sup>-1</sup> para os analitos com boa correlação linear (R > 0,995). Os coeficientes de variação dos tempos de retenção entre 3,4 e 4,1% e das alturas de pico entre 2,9 e 3,5% indicam boa reprodutibilidade de separação dos componentes e, consequentemente, estabilidade da vazão de fase móvel entre as análises. Quando comparado a procedimentos apresentados na literatura que realizam a separação e detecção de parabenos em produtos cosméticos, o procedimento proposto apresentou o menor consumo de solvente orgânico por determinação e coeficientes de variação comparáveis aos obtidos em HPLC (Tabela 3.6). Apesar dos outros procedimentos em FIC apresentarem menores tempos de análise comparado à estratégia proposta, naqueles é necessário o uso de eluição por gradiente para se obter separação satisfatória dos analitos devido à limitada opção de fase estacionária, o que torna a configuração do sistema mais complexa. Baixo consumo de solvente orgânico, baixo custo de instrumentação (comparado a sistemas SIC e HPLC) e maior seletividade (comparado aos sistemas FIC anteriores) são vantagens do procedimento proposto a serem destacadas.

Procedimento	Coluna	Consumo de solvente orgânico (mL)	Tempo de análise (min)	CV (%)	Ref.
FIC	C18 monolítica (5 x 4,6 mm)	1,87	3,3	0,65 -1,80	[61]
FIC	C18 monolítica (5 x 4,6 mm)	1,6	2,8	3,5-6,2	[63]
Eletroforese capilar	Capilar de sílica fundida		16,0	0,86 - 2,48	[66]
HPLC	C18 (125 x 4 mm d. i., 5 μm)	20,9	40,0	1,53 – 3,23	[67]
FIA (sem separação)	—	—	0,5	1,10 -1,70	[68]
HPLC	C8 (150 x 4,6 mm d. i., 5 μm)	6,0	10,0	2,0-3,1	[69]
FIC	Núcleo fundido RP- amida (5 x 4,6 mm, 2,7 μm)	1,37	9,1	2,9 - 3,5	Este trabalho

Tabela 3.6 - Características analíticas de procedimentos que realizam separação edetecção de parabenos em produtos cosméticos

Amostras de produtos de cuidados pessoais foram analisadas pelo procedimento proposto e por um procedimento de referência baseado em HPLC [70]. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.7.

Amostra Procedimento proposto Procedimento de referência [70] MP EP PP MP EP PP Lubrificante 0,34 ±  $0,39 \pm 0,02^*$  $0,32 \pm 0,01$  $0,40 \pm 0,02^*$  $0,40 \pm 0,01^*$  $0,41 \pm 0,03^*$ íntimo 1 0,01 Lubrificante 0,32 ±  $0,41 \pm 0,03^*$   $0,40 \pm 0,01^*$  $0,30 \pm 0,01$ 0,40 ± 0,01\*  $0,39 \pm 0,02^*$ íntimo 2 0,01 Lubrificante 0,43 ±  $0,40 \pm 0,01^*$   $0,39 \pm 0,03^*$  $0,44 \pm 0,01$ 0,41 ± 0,01\*  $0,40 \pm 0,02^*$ íntimo 3 0,02 Repelente de 0,45 ±  $0,44 \pm 0,01$ insetos 0,02 0,52 ± Pomada  $0,38 \pm 0,02^*$   $0,37 \pm 0,01^*$ 0,51 ±0,01  $0,39 \pm 0,01^*$   $0,38 \pm 0,01^*$ 0,02 Lenço 0,70 ±  $0,70 \pm 0,01$ umedecido 1 0,04 0,45 ± Lenço  $0,44 \pm 0,01$ umedecido 2 0,02 Lenço 0,58 ±  $0,57 \pm 0,01$ umedecido 3 0,01 0,39 ± Lenço  $0,40 \pm 0,01^*$   $0,39 \pm 0,02^*$  $0,40 \pm 0,01^*$   $0,41 \pm 0,02^*$   $0,40 \pm 0,02^*$ umedecido 4 0.02\*

Tabela 3.7 - Concentrações (% m/m) e desvios padrão referentes à determinação de parabenos em amostras de produtos de cuidados pessoais pelo procedimento proposto e por HPLC

\*Amostras adicionadas de 0,40 % m/m de cada parabeno

Como informado nos rótulos, a maioria das amostras somente apresentou metilparabeno em sua formulação, etil e propil parabenos foram então adicionados a algumas amostras para demonstrar a viabilidade do procedimento para a separação dos três analitos em amostras reais. Os resultados obtidos pelo procedimento proposto concordam com o procedimento de referência com 95% de confiança, demonstrando a exatidão do procedimento proposto.

Dentre as técnicas apresentadas na literatura que são classificadas como cromatografia à baixa pressão, FIC é a técnica que opera a menores pressões e não necessita de sistemas propulsores de fase móvel especialmente projetados, como requerido em SIC. Além disso, FIC apresenta grande potencial quando comparado a outras técnicas de separação à baixa pressão, como fácil implementação de eluição por gradiente e de reações de derivatização pré e pós coluna explorando-se a versatilidade dos sistemas com multicomutação [5].

### 3.4. Conclusões

O uso de colunas curtas com partículas de núcleo fundido foi pioneiramente demonstrado em sistemas cromatográficos de baixa pressão. Um procedimento analítico para a determinação de parabenos em produtos de cuidados pessoais foi desenvolvido para demostrar a aplicabilidade do sistema. Os resultados obtidos destacam a importância do uso de fase estacionária apropriada em sistemas FIC, que até então só dispunham de fase apolar C18 (monolítica). A introdução do uso de colunas de núcleo fundido ampliou a aplicabilidade destes sistemas, como pôde ser observado pelo desempenho de diferentes fases estacionárias na separação dos parabenos. Para o procedimento desenvolvido não foi necessário o uso de eluição por gradiente como apresentado por trabalhos anteriores, o que simplifica a configuração do sistema. Concluiu-se que estes sistemas podem ser utilizados para separação e detecção de misturas simples, além de apresentar grande potencial de implementação de etapas de preparo de amostra e derivatização explorando a versatilidade de sistemas com multicomutação.

# 4. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA EM LINHA E SEPARAÇÃO DE SULFONAMIDAS POR CROMATOGRAFIA POR INJEÇÃO SEQUENCIAL<sup>2</sup>

# 4.1. Introdução

#### 4.1.1. Extração em fase sólida em linha

As baixas concentrações de compostos orgânicos em amostras ambientais e a alta complexidade dessas matrizes requerem a limpeza da amostra para a eliminação de interferentes, e a pré-concentracão para melhoria de detectabilidade [71]. Atualmente, sistemas de separação cromatográfica e detecção são altamente sofisticados e apresentam alto desempenho [72]. No entanto, estas técnicas ainda são utilizadas em conjunto com procedimentos de preparo de amostra que são demorados e complexos o que, entre outros inconvenientes, prejudica a frequência de amostragem, aumenta o risco de contaminações e perdas de analito e aumenta a quantidade de resíduos gerados [73]. Neste contexto, o preparo de amostra é considerado a etapa crítica das análises química e esta situação tem motivado a busca por novas estratégias e o aprimoramento de técnicas já existentes [74].

As técnicas mais utilizadas no preparo de amostras para análises cromatográficas são as extrações líquido-líquido (LLE) e em fase sólida (SPE), sendo a SPE preferida para o preparo de amostras ambientais, como águas naturais [75]. Neste caso, a SPE é baseada na transferência dos analitos de uma fase aquosa para uma fase sólida que deve apresentar alta afinidade pelos analitos. Pelo uso de adsorvente apropriado, os analitos são retidos na fase sólida, sendo posteriormente eluídos por um solvente orgânico ou uma mistura de solventes, cuja composição deve também ser adequada para a análise. A aplicação de SPE em batelada para análises de rotina se torna muito trabalhosa e demorada devido às inúmeras etapas manuais envolvidas. O uso de cartuchos descartáveis também eleva os custos e aumenta a quantidade de resíduos gerados.

A extração em fase sólida em linha contorna alguns dos inconvenientes mencionados anteriormente [76]. A principal diferença em relação ao procedimento em batelada é a transferência direta dos analitos da coluna de extração para a

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Anexo B - Batista, A. D.; Chocholous , P.; Satinsk, D.; Solich, P.; Rocha, F. R. P., Talanta , no prelo, 2014.

coluna cromatográfica. A eliminação de perdas e a introdução quantitativa dos analitos extraídos no sistema cromatográfico melhora a detectabilidade e reprodutibilidade das medidas. Além destas vantagens, a frequência de amostragem é usualmente aumentada.

O acoplamento de SPE à HPLC consiste em dois sistemas conectados por uma válvula comutadora. Usualmente, a amostra é introduzida na coluna de préconcentração e posteriormente a válvula é comutada, sendo os analitos eluídos pela fase móvel diretamente para a coluna cromatográfica [77]. Apesar da necessidade de instrumentação mais complexa, esta estratégia vem sendo empregada em cromatografia líquida para a pré-concentração e separação de diversas classes de compostos, especialmente para biomoléculas [77] e contaminantes ambientais [78].

As técnicas de análises em fluxo estão consolidadas devido às características como baixo custo e versatilidade, o que as torna compatíveis com quase todos os princípios de detecção [79]. Isto faz com que a implementação de procedimentos de SPE em sistemas de análises em fluxo seja atrativa [80]. Microcolunas preenchidas por um sorvente apropriado são utilizadas com a finalidade de melhorar a seletividade e a detectabilidade do procedimento pela eliminação de espécies potencialmente interferentes e pré-concentração dos analitos.

Apesar de ser amplamente empregada em sistemas de análises em fluxo, a SPE em linha ainda não foi explorada em sistema de cromatografia por injeção sequencial. O acoplamento de SPE a SIC permite conciliar as vantagens inerentes às duas técnicas e amplia a aplicabilidade destes sistemas devido aos ganhos em detectabilidade e seletividade, conforme discutido anteriormente.

## 4.1.2. Sulfonamidas

Antibióticos são amplamente utilizados para o tratamento de infecções bacterianas em humanos e animais. Uma pequena porção destas substâncias é absorvida pelo organismo humano, sendo a maioria excretada através da urina e fezes em sua forma não metabolizada, atingindo solos e corpos aquáticos. Devido aos resíduos gerados, há uma preocupação crescente sobre os seus efeitos em diferentes compartimentos ambientais [81-83] e em alimentos [84,85]. O problema é agravado pois, mesmo em baixas concentrações, estas moléculas favorecerem a proliferação de bactérias resistentes.

Sulfonamidas são um grupo importante de antibióticos, amplamente empregados para fins veterinários e menos extensivamente em terapia em humanos. São moléculas polares e, portanto, solúveis em água, apresentando baixos coeficientes de adsorção em sedimentos em comparação a outras classes de antibióticos, como as tetraciclinas e quinolinas. Esta característica confere a estas moléculas uma alta mobilidade em compartimentos aquáticos, além de alta biodisponibilidade [86]. Devido à sua continua inserção no ambiente, estes compostos são conhecidos como contaminantes pseudo-persistentes [87]. A agência americana de geologia reportou que até 20% das águas superficiais dos EUA estão contaminadas por sulfonamidas [88].

As sulfonamidas apresentam estrutura molecular formada por um grupo sulfonil conectado a um grupo amida, no qual diferentes grupos funcionais são ligados para formar as diversas espécies (Figura 4.1). Algumas dessas substâncias apresentam grupos funcionais semelhantes e, consequentemente, propriedades físicas semelhantes, o que pode dificultar a separação cromatográfica. Neste caso, a seleção de fases móvel e estacionária apropriada é extremamente importante para se alcançar separações cromatográficas satisfatórias.



**Figura 4.1 -** Estrutura geral das sulfonamidas. R refere-se a um substituinte genérico (*e.g.* C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O para sulfacetamida)

Em razão das baixas concentrações de sulfonamidas em amostras ambientais (níveis de ng L<sup>-1</sup>), etapas de preparo de amostra, incluindo extração e pré-concentração, são necessárias. Extração em fase sólida é a técnica mais

comumente usada para limpeza da amostra e pré-concentração de sulfonamidas em amostras de água. Estes procedimentos usualmente requerem elevados volumes de amostra e de solventes orgânicos, incluindo etapas de evaporação de solvente e redissolução da amostra na fase móvel.

Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta ou espectrometria de massas (MS) são as técnicas mais utilizadas nas análises de antibióticos em matrizes ambientais [83, 89-95]. Procedimentos altamente sofisticados para a determinação multiresíduo, como LC-MS e LC-MS/MS permitem a confirmação estrutural dos analitos e são as alternativas mais empregadas na análise de antibióticos. Entretanto, estes procedimentos são usualmente demorados e requerem equipamentos altamente sofisticados e de alto custo. Neste capítulo da Tese foram exploradas colunas de núcleo fundido em conjunto com SPE em linha para extração, pré-concentração e separação cromatográfica de sulfonamidas.

# 4.2. Experimental

#### 4.2.1. Equipamentos

Um sistema de cromatografia por injeção sequencial SIChrom<sup>™</sup> (FIAlab<sup>®</sup> Instruments) equipado com uma bomba tipo seringa S17 PDP com reservatório de 4,0 mL (Sapphire<sup>™</sup> Engineering) e duas válvulas seletoras C5H com oito portas (Valco Instrument Co.) foram utilizados em todos os experimentos. As tubulações foram constituídas de tubos PEEK de diâmetros internos de 0,25 e 0,50 mm. O sistema foi acoplado a um espectrofotômetro multicanal USB4000 (Ocean Optics) com uma lâmpada de deutério como fonte de radiação UV (Ocean Optics). Fibras óticas de 600 µm de diâmetro interno (Ceram Optec<sup>®</sup>) foram utilizadas para transporte da radiação. As medidas foram realizadas em uma cela de fluxo de 9 µL de volume interno e 20 mm de caminho ótico (FIAlab<sup>®</sup>). Nas saídas da bomba tipo seringa foram instalados um manômetro Alltech AP19258 1/16'' (República Tcheca) e uma válvula de segurança de 750 psi para o monitoramento da pressão em tempo real e para limitar a pressão máxima de trabalho da bomba, respectivamente. Todo o sistema foi controlado por um microcomputador equipado com o programa FIALab<sup>®</sup> 5.9 (FIAlab<sup>®</sup> Instruments).

As separações cromatográficas foram realizadas em três colunas de núcleo fundido de fase reversa com diferentes fases estacionárias: RP-amida, fenil-hexil e F5 (Ascentis<sup>®</sup> Express, 30 mm x 4,6 mm, tamanho de partícula de 2,7 µm Supelco) e duas colunas monolíticas com fases estacionárias C18 e CN (Chromolith<sup>®</sup> 50 mm x 4,6 mm, Merck). Três diferentes resinas de troca aniônica foram avaliadas para a limpeza das amostras e pré-concentração: 2-dietilamino-etil (Iontosorb DEAE, partículas de 80-100 µm, República Tcheca), aminopropil (Applied Separations, cartucho Spe-ed, EUA) e 3-trimetilamino-2-hidroxipropil (Iontosorb TMAHP, partículas de 80-100 µm, República Tcheca) empacotadas em uma coluna Cheminert<sup>®</sup> de 20 mm de comprimento e 1,6 mm de d.i. (VICI Valco Instruments). Todas as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

#### 4.2.2. Reagentes e soluções

Reagentes de grau analítico (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) e água deionizada (resistividade > 18 M $\Omega$  cm) foram utilizados em todos os experimentos. Soluções de referência foram preparadas a partir de sulfanilamida (SAD), sulfacetamida (SCT), sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfamerazina (SMR), sulfadimidina (SDM), sulfametoxazol (SMX) e sulfadimetoxina (SDM) com pureza superior a 98%. Soluções estoque 1,0 g L<sup>-1</sup> foram preparadas em metanol e armazenadas a 5°C. Soluções de trabalho contendo as oito sulfonamidas foram preparadas diariamente pela diluição das soluções estoque na fase móvel. Uma solução com 10,0 mg L<sup>-1</sup> de cada sulfonamida foi utilizada para otimização e avaliação da separação cromatográfica pelas diferentes colunas e uma solução 1,0 mg L<sup>-1</sup> foi utilizada na otimização do processo de extração em fase sólida. Uma solução de bicarbonato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> foi empregada para lavagem e condicionamento da coluna de SPE.

A separação cromatográfica foi inicialmente avaliada em condições de eluição isocrática. A fase móvel foi constituída por uma mistura de uma solução aquosa de ácido acético (pH 3,0) e acetonitrila, sendo que a proporção dos componentes variou com o tipo de fase estacionária empregada: ácido acético/acetonitrila 90/10 (v/v)

para as colunas fenil-hexil, F5 e RP-18; 95/05 (v/v) para RP-amida e 98/02 (v/v) para a coluna monolítica CN. As fases móveis foram previamente sonicadas por 5 min para a remoção de gases dissolvidos.

# 4.2.3. Procedimento

O sistema SIC, cujo diagrama é apresentado na Figura 4.2, foi operado conforme rotina descrita na Tabela 4.1.

A coluna de SPE foi sequencialmente condicionada com uma solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Etapas 1 e 2) e 500 µL de água (Etapa 3) previamente à inserção de 500 µL de amostra (Etapas 4 e 5). A eluição dos analitos da coluna de SPE foi feita pela primeira fase móvel (tampão acetato pH 5,0/acetonitrila, 92/8 v/v) a qual também foi utilizada para a separação cromatográfica das seis primeiras sulfonamidas (SAD, SCT, SDZ, STZ, SMR e SDM) (Etapa 6 e 7). Então a segunda fase móvel (tampão acetato pH 5,0/acetonitrila, 75/25) foi aspirada pela bomba tipo seringa (Etapa 8) e utilizada na separação das duas sulfonamidas ainda retidas na coluna após a eluição com a primeira fase móvel (SMX e SDT), etapa 9. A detecção espectrofotométrica foi realizada em 285 nm (máximo de absorção para STZ) e em 263 nm (máximo de absorção para as demais sulfonamidas). As etapas 10 e 11 foram utilizadas para condicionamento da coluna cromatográfica para a análise seguinte. As medidas foram baseadas nas alturas dos picos como em procedimentos desenvolvidos anteriormente em SIC [12,28]. Os parâmetros cromatográficos (tempo de retenção, simetria de pico, resolução, número de pratos teóricos e altura equivalente a um prato) foram calculados como recomendado pela FDA [64]. A identificação dos picos foi feita pela injeção de soluções padrões contendo cada uma das sulfonamidas.



Figura 4.2 - Esquema do sistema SIC com SPE em linha para a determinação de sulfonamidas. A: amostra; S<sub>1</sub>: NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>; S<sub>2</sub>: água; FM1: fase móvel 1 (tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0)/acetonitrila (92/08, v/v)); FM2: fase móvel 2 (tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0)/acetonitrila (75/25, v/v)); VS1 e VS2: válvulas seletoras; BS: bomba tipo seringa; CC: coluna cromatográfica; SPE: coluna de extração em fase sólida; D: cela de fluxo acoplada ao detector espectrofotométrico; W: recipiente de descarte

Tabela 4.1	- Rotina	de	operação	do	sistema	SIC	para	extração	em	fase	sólida	em
	linha e	sep	paração cr	om	atográfic	a de	sulfo	namidas				

Unidade	Parâmetro
Válvula seletora 1	Porta 2
Válvula seletora 2 Bomba	Porta 1 Volume: 500 µL / Vazão: 50 (µL s⁻¹)
Válvula seletora 1	Porta 7
Вошра	Volume: 500 µL / Vazão: 10 (µL s <sup>-1</sup> )
Válvula seletora 1 Bomba	Porta 4 Volume: 500 µL / Vazão: 50 (µL s⁻¹)
Válvula seletora 1 Bomba	Porta 5 Volume: 500 µL / Vazão: 50 (µL s⁻¹)
Válvula seletora 1 Bomba Válvula seletora 1	Porta 7 Volume: 1000 µL / Vazão: 10 (µL s <sup>-1</sup> ) Porta 8
	UnidadeVálvula seletora 1Válvula seletora 2BombaVálvula seletora 1BombaVálvula seletora 1

continua

Etapas	Unidade	Parâmetro
6 - Aspiração de FM1	Bomba	Volume: 3800 μL / Vazão: 70 (μL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora 1	Porta 7
	Válvula seletora 2	Porta 7
7 - Dispensa de FM1 para colunas de SPE e CC	Bomba	Volume: 3800 µL / Vazão: 10 (µL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora 1	Porta 6
8 - Aspiração de FM2	Bomba	Volume: 2500 µL / Vazão: 70 (µL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora 1	Porta 7
9- Dispensa de FM2 para colunas de SPE e CC	Bomba	Volume: 2500 μL / Vazão: 10 (μL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora 1	Porta 8
10 - Aspiração de FM1	Bomba	Volume: 2500 µL / Vazão: 70 (µL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora 1	Porta 7
11 - Dispensa de FM1	Bomba	Volume: 2500 µL /
para colunas de SPE e CC		Vazão: 10 (µL s-1)

# 4.3. Resultados e discussões

#### 4.3.1. Características cromatográficas

O desempenho cromatográfico de cinco colunas diferentes foi avaliado para a separação das sulfonamidas. Três sulfonamidas foram selecionadas para as avaliações iniciais do comportamento cromatográfico de cada fase (SAD, STZ e SCT). As colunas que apresentaram parâmetros satisfatórios foram aplicadas na separação de oito sulfonamidas. O sistema apresentado na Figura 4.2 foi utilizado, porém com a injeção direta da amostra na coluna cromatográfica, sem pré-concentração por SPE. Os cromatogramas para as três sulfonamidas testadas inicialmente obtidos nas composições ótimas de fase móvel são mostrados na Figura 4.3. Os parâmetros cromatográficos calculados a partir dos dados experimentais obtidos para cada coluna na separação das três sulfonamidas são apresentados na Tabela 4.2, assim como os parâmetros calculados para as oito sulfonamidas para as colunas F5 e fenil-hexil, as quais apresentaram melhor desempenho.

0
Ы
E
fu
õ
<del>В</del>
ĭ
ð
Ð
ß
ö
ΞŦ
2
p
Ε
3S
Ц
8
Ľ
g
S
с С
Ē
ar
Ы
Ę
ร
<u>e</u>
0
ã
ъ
ar
õ
Š
ъ
മ
a
5
ő
Ë
٦,
g
ato
Ë
2
C C
00
эtг
ľ
ສື
a
ш.
2
4
ja
þ
a
<b>—</b>

	rase estacionaria	SAU	201	202	210	SIMIC	NIC	TIME	0
Tempo de retenção (min)	RP-18	1,87	2,78		3,87	l	t	1	'
	CN	1,62	2,07	I	2,95	I	Ι	Ĩ	1
	RP-Amida	0,93	1,93		3,88	]	]	I	1
	Fenil-Hexil	0,98	1,90	2,53	3,27	3,68	5,22	7,36	°,
	F5	1,08	2,23	2,65	3,23	3,73	4,82	7,79	8,4
Simetria de pico	RP-18	1,78	1,55	1	1,44	l	t	I	ľ
	CN	1,36	1,67	I	1,46	I	I	Ĩ	ľ
	RP-Amida	1,43	1,09	I	1,10	Ĺ	ĺ		ŝ
	Fenil-Hexil	1,55	1,28	1,22	1,20	1,10	1,07	1,30	1,2
	F5	1,52	1,31	1,29	1,20	1,10	1,13	1,46	1,2
Resolução	RP-18	2,91	3,20 <sup>5</sup>			I	1		'
	CN	1,83 ª	2,97 b	I	1	]	)	1	1
	RP-Amida	4,51ª	5,34 b	I	1	Ĺ	l	-	
	Fenil-Hexil	4,31ª	2,39	2,26°	1,13⊲	3,30°	6,23	3,52ª	
	F5	5,09 ª	1,64 b	2,07 °	1,54 d	2,48 e	8,531	3,51₽	÷
Número de pratos teóricos	RP-18	1944	3027	1	6153	1	1	I	'
	CN	2260	2862	Ι	3624	]	]	I	Į.
	RP-Amida	1202	2527	I	3144	l	I	- ]	
	Fenil-Hexil	1310	3427	3055	4268	3987	4388	N/A	N/N
	F5	1380	3547	4994	4977	5275	3741	N/A	N/N
ltura equivalente a um prato teórico (µm)	RP-18	25,72	16,51	1	8,13	1	1	I	1
	CN	22,11	17,46	ļ	13,79	ĺ	l		
	RP-Amida	22,32	12,68	I	10,15	I	I	1	
	Fenil-Hexil	22,90	8,76	9,82	7,03	7,52	6,84	N/A	N/N
	F5	21.75	8,46	6,01	6,03	5,38	8,02	N/A	IN



Figura 4.3 - Cromatogramas obtidos na separação de SAD, SCT e STZ por colunas monolíticas e de núcleo fundido. (A) Monolítica C18, ácido acético pH3,0:ACN (90:10, v/v); (B) RP-amida, ácido acético pH3,0:ACN (90:10, v/v); (C) Fenil-hexil, ácido acético pH3,0:ACN (90:10, v/v); (D): F5, ácido acético pH3,0:ACN (85:15, v/v); (E) Monolítica CN, ácido acético pH3,0:ACN (90:10, v/v). Absorbância medida em 263 ( – ) e 285 nm ( – )

As colunas monolíticas C18 e CN, que eram dois centímetros maiores que as colunas de núcleo fundido, apresentaram maior número de pratos teóricos. Entretanto, a melhor eficiência das colunas de núcleo fundido pode ser confirmada pelos menores valores de altura equivalente a um prato (Tabela 4.2). A melhor eficiência das fases de núcleo fundido não se restringe somente às propriedades físicas favoráveis destas colunas, como abordado no Capítulo 3, mas também às diferentes fases estacionárias que permitem modos de interação diferentes com os analitos.

Dentre as fases avaliadas, somente as colunas fenil-hexil e F5 foram capazes de separar as oito sulfonamidas, sendo que a fase F5 apresentou melhor desempenho, com resolução acima de 1,5 para todos os analitos, simetria de pico abaixo de 1,52 e altura equivalente a um prato entre 5,38 e 21,75  $\mu$ m. Colunas com fase F5 tem se tornado uma alternativa às fases alquil tradicionais devido à retenção e seletividade diferenciada. Adicionalmente às interações disponíveis em fases C18, as fases F5 permitem interações de dipolo dos ligantes fluoro substituídos e interações  $\pi$ - $\pi$  com os analitos, assim como transferência de carga e interações por troca iônica. Estes modos de interação contribuíram para que a fase F5 apresentasse boa capacidade de separação das sulfonamidas.

Para reduzir o tempo para a separação completa dos oito analitos foi necessária a eluição em duas etapas: a primeira com menor proporção de solvente orgânico para eluição das seis primeiras sulfonamidas (SAD, SCT, SDZ, STZ, SMR e SDM) e a segunda contendo maior proporção de acetonitrila para eluição das demais espécies (SMZ e SDT), que apresentavam propriedades diferentes do restante do grupo por possuírem átomos de oxigênio nos grupos substituintes, o que modifica consideravelmente a polaridade das moléculas. Na Figura 4.4 é apresentado um cromatograma obtido na separação das oito sulfonamidas pela coluna de núcleo fundido de fase F5.



Figura 4.4 - Cromatograma obtido na separação de oito sulfonamidas 5,0 mg L<sup>-1</sup> por coluna de núcleo fundido F5 (30 x 4,6 mm, 2,7 μm). Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: ácido acético pH3,0:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: ácido acético pH3,0:ACN (75:25, v/v)

# 4.3.2. Extração em fase sólida em linha

Sulfonamidas são espécies anfóteras com propriedades fracamente ácidas e básicas. As características básicas são providas pelo átomo de nitrogênio do grupo amina ligado ao anel benzênico, enquanto o caráter ácido é conferido pelo átomo de nitrogênio da ligação N-H adjacente ao grupo sulfonil. A dissociação da sulfadimetoxina é apresentada na Figura 4.5 como um exemplo. A primeira dissociação se refere ao grupo amina (pK<sub>1</sub>) e a segunda ao grupo amida (pK<sub>2</sub>). Adicionalmente, características fracamente básicas ou ácidas podem ser conferidas

pelo grupo R de cada sulfonamida. As estruturas químicas e os valores de pK<sub>a</sub> das sulfonamidas estudadas são apresentados na Tabela 4.3.



Figura 4.5 - Representação dos equilíbrios de dissociação da sulfadimetoxina

As propriedades ácido-base viabilizam o uso de resinas de troca iônica para extração e pré-concentração das sulfonamidas, após ajuste de pH da amostra e seleção de resina apropriada. Três resinas aniônicas foram avaliadas para esta finalidade em diferentes pH de amostra e de fase móvel. O módulo de análises apresentado na Figura 4.2 foi utilizado, permitindo a transferência em linha da amostra pré-tratada para a coluna cromatográfica. A eficiência de extração e pré-concentração foi avaliada pela altura dos picos obtidos em cada condição.

Analito	Estrutura molecular	pKa
Sulfanilamida (SAD)	H <sub>2</sub> N O NH <sub>2</sub> S O	1,78; 11,19
Sulfacetamida (SCT)	H <sub>2</sub> N O O	1,76; 5,22
Sulfadiazina (SDZ)	O S NH N H <sub>2</sub> N	2,10; 6,28
Sulfatiazol (STZ)	$H_2N$	2,08; 7,07
Sulfamerazina (SMR)	H <sub>2</sub> N H <sub>2</sub> N O N H <sub>2</sub> N N N N	2,17; 6,77
Sulfadimidina (SDM)	H <sub>2</sub> N O N H N	2,28; 7,42
Sulfametoxazol (SMX)	H <sub>2</sub> N O O	1,83; 5,57
Sulfadimetoxina (SDT)	$H_2N \xrightarrow{O, NH} O, NH O,$	1,87; 5,86

Tabela 4.3 - Estruturas moleculares e constantes de dissociação das sulfonamidasestudadas [96-98]

A resina com grupos aminopropil (Figura 4.6) apresenta características polares e age como adsorvente e um trocador aniônico fraco (pK<sub>a</sub> 9,8). Em pH abaixo de 9,8 metade dos grupos amina estão protonados [99].



Figura 4.6 - Estrutura química do grupo funcional aminopropil

O pH da amostra não apresentou influência significativa na extração e préconcentração das sulfonamidas pela resina aminopropil (Figura 4.7), mesmo em condições com valores de pH altos, em que a maioria das sulfonamidas se encontra na forma aniônica.



Figura 4.7 - Influência do pH da amostra na extração de 500 μg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas pela resina de troca aniônica com grupos funcionais aminopropil. Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: ácido acético pH3,0:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: ácido acético pH3,0:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

Fase móvel ácida foi utilizada para a eluição pela protonação das sulfonamidas. A eluição deve ser rápida e quantitativa, afim de se obter uma zona estreita de analitos para introdução na coluna cromatográfica para separação,

evitando assim o alargamento de banda e perda de resolução. O pH da fase móvel para eluição e separação das sulfonamidas da resina de aminopropil também não apresentou influência significativa para a maioria dos analitos na faixa de valores avaliados (Figura 4.8).



Figura 4.8 - Influência do pH da fase móvel na extração de 500 μg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas pela resina de troca aniônica com grupos funcionais aminopropil. pH da amostra:
10, Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: tampão:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: tampão:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

A resina com grupos funcionais 2-dietilamino-etil (Figura 4.9) apresentou maior dependência do pH da amostra do que aquela com grupos aminopropil, pois apresenta maior valor de pka (11,5), permanecendo predominantemente protonada em toda a faixa de pH avaliada. O aumento do pH resultou em maior eficiência de extração e pré-concentração para a maioria das espécies devido à maior ionização

dos analitos (Tabela 4.3), possibilitando maior interação com a resina, como pode ser observado na Figura 4.10.



Figura 4.9 - Estrutura química do grupo funcional 2-dietilamino-etil



Figura 4.10 - Influência do pH da amostra na extração de 500 μg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas pela resina de troca aniônica fracamente básica com grupos funcionais 2-dietilamino-etil. Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: ácido acético pH3,0:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: ácido acético pH3,0:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

A acidez da fase móvel também não afetou significantemente a resposta analítica conforme observado para a resina avaliada anteriormente (Figura 4.11).


Figura 4.11 - Influência do pH da fase móvel na eluição de 500 μg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas da resina com grupos funcionais 2-dietilamino-etil. Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: tampão:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: tampão:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

A resina com grupos funcionais 3-trimetilamino-2-hidroxipropil é um trocador iônico fortemente básico (Figura 4.12). O sitio ativo deste grupo é uma amina quaternária substituída por três grupos metila, que conferem uma carga positiva ao átomo de nitrogênio, justificando a afinidade pelas sulfonamidas aniônicas. Estas características conferiram a resina 3-trimetilamino-2hidroxipropil o melhor desempenho frente as resinas avaliadas para a extração e pré-concentração das sulfonamidas, como pode ser observado na Figura 4.13 na avaliação do pH da amostra para esta resina



Figura 4.12 - Estrutura química do grupo funcional 3-trimetilamino-2hidroxipropil



Figura 4.13. Influência do pH da amostra na extração de 500 μg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas pela resina de troca aniônica fortemente básica com grupo funcional 3-trimetilamino-2-hidroxipropil. Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: ácido acético pH3,0:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: ácido acético pH3,0:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

Assim como nas resinas anteriores, o pH da fase móvel não afetou significativamente a eficiência de eluição, mas os sinais analíticos foram superiores devido à maior eficiência de extração e pré-concentração da resina 3-trimetilamino-

2-hidroxipropil. Em pH 5,0 todas as sulfonamidas estão em sua forma não carregada e são eficientemente desorvidas da resina (Figura 4.14).



Figura 4.14 - Influência do pH da fase móvel na extração de sulfonamidas pela resina de troca aniônica fortemente básica com grupos funcionais 3-trimetilamino-2hidroxipropil. Fase móvel: 0 – 6,0 minutos: tampão:ACN (92:08, v/v), 6,0 – 9,5 min: tampão:ACN (75:25, v/v). Barras de erro representam desvio padrão para n=3

A Figura 4.15 apresenta uma comparação das resinas avaliadas em condições de pH de amostra e fase móvel ótimas para cada uma delas, evidenciando o melhor desempenho da resina 3-trimetilamino-2-hidroxipropil, a qual apresentou melhor desempenho com amostra em pH 11,0 e fase móvel com pH 5,0.



Figura 4.15 - Comparação do desempenho das três resinas de troca aniônica avaliadas para a extração e separação de sulfonamidas. Aminopropil: amostra pH 10,0, fase móvel pH 5,0; 2-dietilamino-etil: amostra pH 11,0, fase móvel pH 5,0; 3-trimetilamino-2-hidroxipropil: amostra pH 11,0, fase móvel pH 5,0. Barras de erro representam desvio padrão para n=3

### 4.3.3. Características analíticas e aplicação

Nas as condições cromatográficas e de extração em fase sólida otimizadas, as características analíticas do sistema proposto para a determinação das oito sulfonamidas foram avaliadas (Tabela 4.4).

	Equação da curva de calibraçãoª	R²	Faixa linear (µg L <sup>-1</sup> )	LOD (µg L <sup>-1</sup> )	CV (%), n=6	FE <sup>b</sup>
SAD	A = 1,850 x 10 <sup>-4</sup> C - 1,361 x 10 <sup>-2</sup>	0,999	100 – 1000	27	2,5	2,9
SCT	A = 5,847 x 10 <sup>-4</sup> C - 0,74 x 10 <sup>-2</sup>	0,999	30 - 1000	9	2,8	34,2
SDZ	A = 7,245 x 10 <sup>-4</sup> C – 0,365 x 10 <sup>-2</sup>	0,999	30 – 1000	7,7	2,2	39,2
STZ	A = 8,028 x 10 <sup>-4</sup> C – 0,260 x 10 <sup>-2</sup>	0,999	30 – 1000	6,8	2,9	28,8
SMR	A = 5,319 x 10 <sup>-4</sup> C – 0,341 x 10 <sup>-2</sup>	0,996	30 – 1000	6,8	2,8	27,6
SDM	A = 1,913 x 10 <sup>-4</sup> C – 0,331 x 10 <sup>-2</sup>	0,999	100 – 1000	27	2,7	21,0
SMX	A = 1,160 x 10 <sup>-3</sup> C + 0,633 x 10 <sup>-2</sup>	0,998	30 – 1000	4,9	2,8	28,7
SDT	A = 7,808 x 10 <sup>-4</sup> C - 0,310 x 10 <sup>-2</sup>	0,998	30 – 1000	6,7	2,2	34,7

 Tabela 4.4 - Características analíticas do procedimento desenvolvido com coluna

 de núcleo fundido F5

# <sup>a</sup>A : absorbância (altura do pico) e C = concentração da sulfonamida (µg L<sup>-1</sup>) <sup>b</sup> fator de enriquecimento

Fatores de enriquecimento entre 2,9 e 39,2 foram obtidos mesmo com somente 500  $\mu$ L de amostra. Sulfanilamida (SAD) apresentou baixo fator de enriquecimento por não estar predominantemente dissociada em pH 11,0 (pK<sub>a</sub> 11,19), isto fez com que esta espécie apresentasse baixa afinidade pela resina, afetando a eficiência de pré-concentração. Considerando se tratar de detecção espectrofotométrica, ampla faixa linear foi observada para todos os analitos. O procedimento desenvolvido consumiu somente 900  $\mu$ L de solvente orgânico (acetonitrila) e 500  $\mu$ L de amostra por determinação e evitou o uso de solventes orgânicos na etapa de SPE, seguindo a tendência do desenvolvimento de procedimentos ambientalmente amigáveis [100].

As características analíticas foram melhores que as alcançadas em procedimentos descritos anteriormente na literatura, como demostrado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - (	Características an	alíticas de algu	ins procedim	ientos pa	ara determir	nação de sul	fonamidas	em amostras	de águ	B
Procedimento	Coluna Cromatográfica	Analitos	Tratamento da amostra	Tempo de análise (min)	Consumo de solvente orgânico (mL)	Consumo de amostra (mL)	Índice de consumo (mL)ª	Eficiência de concentração (min <sup>-1</sup> )ª	CV (%)	Referência
HPLC/UV	TC-C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)	6 sulfonamidas	SD-LPME	10,0	3,4	15,0	0,25	3,0	< 8,2 (n=5)	[68]
HPLC/UV	Eclipse XDBC18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	3 sulfonamidas	Extração bifásica com líquido iônico	15,0	3,2	6,0	) ,	:    : <sup>5</sup>	< 3,2 (n=6)	[06]
UHPLC/DAD	Hypersil Gold C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,9 µm)	11 sulfonamidas;14 quinolinas	DLLME	20,0	2,0	5,0	0,15	2,2	<ul><li>&lt; 1,7</li><li>&lt; (n=5)</li></ul>	[91]
HPLC/UV	XTerra RP18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	8 sulfonamidas	TLLME	35,0	5,2	12	0,040	0 <sup>°</sup> 0	< 5,3 (n=7)	[62]
HPLC/DAD/FLU	Eclipse XDB-C18 (3,0 mm x 150 mm, 3,5 µm)	4 sulfonamidas; 5 metabolitos	HF-LPME	32,0	3,1	50,0	0,05	2,66	< 1,8 (n=4)	[63]
LC/MS	Luna C18 (4,6 mm x 150 mm, 5 µm)	6 sulfonamidas; trimetoprim	SPE	18,0	32,0	1000	1,0	3,0	< 4,9 (n=10)	[95]
SIC/UV	Ascentis Express F5 (4,6 mm x 30 mm, 2,7 µm)	8 sulfonamidas	SPE-on-line	10,5 <sup>b</sup>	6'0	0,5	0,013	11,2	< 2,9 (n=6)	Este trabalho
Indice de consum	io: Volume de amostra/F	ΞE								

Eficiência de concentração: FE\*(frequência de amostragem)/60

Valores estimados para a sulfonamida de melhor desempenho analítico; b tempo gasto para SPE mais separação por SIC

DLLME - Microextração líquido-líquido dispersiva; HF-LPME Microextração líquida baseada em fibra oca; LLLME- Microextração líquida-líquida-líquida; SD-LPME - Microextração líquida em gota única;

Um procedimento baseado em extração em fase sólida em batelada, por exemplo, consumiu 1000 mL de amostra e 33,0 mL de metanol para a separação de seis sulfonamidas usando uma coluna de 150 mm [95]. Menor volume de amostra é necessário para um procedimento empregando microextração líquido-líquido em gota única, no entanto, devido à instabilidade da gota, foi observada baixa reprodutibilidade [89]. A maioria dos procedimentos reportados na literatura apresentam desvantagens como suscetibilidade a perdas de analitos e contaminações por serem realizados em sistemas abertos e envolverem várias etapas. Além disso, a etapa de preparo de amostra é frequentemente desprezada na estimativa de tempo de análise e os valores reportados são subestimados. O procedimento de SPE em linha proposto é executado em um sistema fechado evitando estes problemas. Os altos fatores de enriquecimento alcançados com um pequeno volume de amostra e sem prejudicar a frequência de amostragem demonstram a eficiência da etapa de SPE. O procedimento proposto apresentou o maior valor de eficiência de concentração frente aos procedimentos apresentados na literatura (fator de enriquecimento de 11,2 pode ser atingido em um minuto), o que demonstra a melhor frequência de amostragem provida pela extração em fase sólida em linha. O baixo índice de consumo em comparação com os procedimentos listados na Tabela 4.5 demonstra o alto grau de aproveitamento de amostra, em que é possível aumentar no mínimo em uma unidade o fator de enriquecimento pelo uso de 0,013 mL de amostra. Estes valores também indicam a viabilidade de se explorar maiores volumes de amostra para se atingir maiores fatores de enriquecimento e portanto aumentar a detectabilidade.

Para demonstrar a aplicabilidade do procedimento proposto, foram analisadas amostras de águas de diferentes rios da cidade de Hradec Králové na República Tcheca, adicionadas de 100 µg L<sup>-1</sup> de cada sulfonamida. Os cromatogramas obtidos não apresentaram nenhum pico desconhecido, indicando que a etapa de SPE foi eficiente em remover os componentes da matriz que não interessavam à determinação analítica, como pode ser observado no Figura 4.16.



**Figura 4.16** – Cromatograma de amostra de rio adicionada de 100 µg L<sup>-1</sup> de sulfonamidas obtido após extração e pré-concentração em linha.

A Figura 4.17 mostra que SAD e SDM foram quantitativamente recuperadas, enquanto SCT, STZ e SMR apresentaram recuperações acima de 80%.



Figura 4.17 - Recuperações de sulfonamidas adicionadas em amostras de águas de rio pelo procedimento proposto

Baixas recuperações foram observadas para SDZ, SMX e SDT, o que indica interação com componentes da matriz, como a matéria orgânica, interferindo na retenção dos analitos na resina de troca aniônica. Baixas recuperações para estas espécies (entre 37,6 e 61,0%) também foram observadas anteriormente em procedimentos de extração em fase sólida mesmo empregando polímeros de impressão molecular como sorbentes [101].

#### 4.4. Conclusões

Extração em fase sólida foi pioneiramente acoplada a cromatografia por injeção sequencial e o desempenho do sistema foi demonstrado para a separação de sulfonamidas. Uma resina de troca aniônica com grupo ativo composto por uma amina quaternária apresentou melhores resultados para SPE em linha, explorando

as propriedades ácido-base dos analitos para retenção e eluição dos analitos. As eficiências de separação de colunas de núcleo fundido e monolíticas foram comparadas e a coluna de núcleo fundido de fase F5 apresentou melhor desempenho na separação de uma mistura de oito sulfonamidas de estruturas similares. A aplicação desta fase em sistemas SIC é também pioneira e demonstrou a necessidade de seleção de fase estacionária apropriada para separação cromatográfica de analitos com estruturas e propriedades similares. O procedimento é capaz de realizar de forma rápida e automatizada as etapas de extração em fase sólida e separação cromatográfica com baixo consumo de amostra e solventes orgânicos. As principais vantagens da SPE em linha são o reuso da resina e aumento da frequência de amostragem assim como baixos riscos de contaminação e perdas de analito em comparação com procedimentos de pré-tratamento de amostra em batelada. O procedimento desenvolvido apresentou alta eficiência de remoção das espécies potencialmente interferentes das amostras e recuperação adequada para a maioria das sulfonamidas adicionadas em amostras de águas de rio. Com o objetivo de se monitorar sulfonamidas em concentrações tipicamente encontradas em águas superficiais, estudos futuros podem ser focados na injeção de maiores volumes de amostra para aumento dos fatores de enriquecimento, assim como exploração de detecção mais sensível como fluorescência e espectrometria de massas.

# 5. AUMENTO DA CAPACIDADE ANALÍTICA DE SISTEMA SIC EXPLORANDO SEPARAÇÃO EM MEIO MICELAR E PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRA EM LINHA: DETERMINAÇÃO DE MELAMINA EM LEITE<sup>3</sup>

# 5.1. Introdução

# 5.1.1. Cromatografia líquida micelar

A cromatografia líquida micelar (CLM) é uma alternativa aos sistemas de fase reversa convencional, que faz uso de uma fase móvel contendo um surfactante acima de sua concentração micelar crítica, visando alterar os mecanismos de separação [102]. No sistema cromatográfico, além da formação de micelas, os monômeros de surfactantes se adsorvem na fase estacionária, modificando sua seletividade [103]. Surfactantes não-iônicos alteram a polaridade da fase estacionária, enquanto surfactantes iônicos criam uma superfície carregada negativa ou positivamente, causando mudanças mais drásticas de propriedades.

Além das alterações de seletividade na fase estacionária, o surfactante confere particularidades à fase móvel. As micelas criam sítios de interações hidrofóbicas e eletrostáticas (no caso de surfactantes iônicos) em que o centro apresenta características hidrofóbicas e a região externa características hidrofílicas; sendo assim, os analitos associados às micelas encontram um microambiente diferente daquele observado quando livres na fase móvel. Isto faz com que o analito disponha de mecanismos adicionais de separação quando comparado a sistemas cromatográficos de fase reversa convencionais. Apesar de fases móveis com um único solvente serem utilizadas em alguns casos, a maioria das separações em cromatografia líquida micelar é realizada com fases micelares híbridas, *i.e.* em meio aquoso tamponado contendo solventes orgânicos, água e surfactantes [102].

Algumas das vantagens da CLM são [104-107]: (i) baixo custo e toxicidade da fase móvel; (ii) possibilidade de separação simultânea de compostos iônicos e não iônicos; (iii) controle da seletividade do sistema pelo ajuste da composição da fase móvel; (iv) possibilidade da injeção direta de amostras biológicas. Devido a estes aspectos, CLM vem sendo empregada com sucesso no desenvolvimento de

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Anexo C - Batista, A. D.; Nascimento, C. F.; Melchert, W. R.; Rocha, F. R. P. Microchemical Journal, v. 117, p. 106-110, 2014.

procedimentos para a determinação dos mais variados analitos, por exemplo, diversas classes de antibióticos [108] e drogas em urina, alimentos e sangue [109]. Esta última aplicação explora a injeção direta de amostras sem pré-tratamento.

#### 5.1.2. Determinação de melamina em leite

Melamina é uma triazina (Figura 5.1) amplamente utilizada na produção de plásticos, resinas e adesivos em razão de conferir a estes produtos alta tolerância térmica [110,111]. Ela também tem sido utilizada na adulteração de alimentos, especialmente de leite, devido o seu alto teor de nitrogênio, o qual corresponde a 66,7 % da massa total e também ao seu baixo custo [106]. A adição de 1% (m/m) de melamina ao leite eleva o conteúdo aparente de proteínas em 4% [112].



Figura 5.1 - Estrutura química da melamina (1,3,5-triazina-2,4,6-triamina)

Melamina apresenta baixa toxicidade por via oral, mas a exposição prolongada a esta substância causa a formação de cristais nos rins e na bexiga, sendo as crianças mais afetadas devido à imaturidade de seus órgãos [109]. Casos graves de intoxicação por melamina foram reportados, como a adulteração de leite nos EUA em 2008, que levou crianças a óbito; no mesmo ano, vários animais domésticos foram mortos devido à ingestão de ração adulterada por melamina na China [114]. Para evitar casos como estes, a Organização Mundial da Saúde (OMS) [115] e a Agência Americana de Administração de Drogas e Alimentos (FDA) [116] estabeleceram um limite máximo de ingestão de melamina por adultos e crianças de

2,5 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal, respectivamente, além do limite de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de melamina para leite.

A adulteração de leite por melamina não pode ser detectada por métodos convencionais de análises como Kjeldahl [117] e Dumas [118], os quais não são capazes de diferenciar o nitrogênio proteico daquele proveniente da melamina. Desta forma, vários procedimentos para a determinação de melamina nas mais diversas matrizes têm sido desenvolvidos, a maioria baseados em cromatografia líquida de alta eficiência [120-124]. Outros procedimentos empregando eletroforese capilar [112,119], cromatografia de íons [125], cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas [113], voltametria [117], espectrometria de massas MALDI-TOF [126], quimiluminescência [127,128], imunoensaios [129] е espectrometrias Ramam [110] e por fluorescência [130] foram desenvolvidos. Estes procedimentos geralmente envolvem preparo de amostra demorado [126], incluindo etapas de extração e pré-concentração e em alguns casos, alto consumo de solventes orgânicos [120-124]. Neste contexto, as técnicas de análises em fluxo apresentam características atrativas, sendo uma opção conveniente para o desenvolvimento de novos procedimentos para a determinação de melamina.

Por ser um composto hidrofílico, a melamina apresenta baixa afinidade por fases estacionárias reversas, como C18 [131]. Neste capítulo da Tese, cromatografia líquida micelar foi explorada para alterar os mecanismos de retenção da coluna de fase reversa, visando a separação cromatográfica de melamina.

# 5.2. Experimental

#### 5.2.1. Equipamentos

Um sistema de cromatografia por injeção sequencial SIChrom<sup>™</sup> (FIAlab Instruments<sup>®</sup>) equipado com uma válvula seletora de inox de oito portas C5H (Valco Instrument Co.) e uma bomba tipo seringa com reservatório de 4,0 mL foram utilizados em todos os estudos. As tubulações foram constituídas por tubos PEEK com 0,25 mm d.i. O sistema de detecção foi composto por um espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics<sup>®</sup>, modelo USB4000) com uma lâmpada de deutério como

fonte de radiação (Ocean Optics<sup>®</sup>, modelo DH-2000) e cabos de fibra ótica com diâmetro interno de 600 µm (Ceram Optec<sup>®</sup>). O espectrofotômetro foi acoplado a uma cela de fluxo em Z de 9 µL de volume interno e 20 mm de caminho ótico (FIAlab Instruments<sup>®</sup>). O sistema SIC foi controlado por um microcomputador equipado com o programa FIALab<sup>®</sup>5.9 (FIAlab<sup>®</sup>). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna monolítica (Onyx<sup>™</sup> Phenomenex<sup>®</sup> C18, 50-4,6 mm). Um manômetro foi posicionado em uma das saídas da bomba tipo seringa para o monitoramento da pressão do sistema durante as análises. Uma válvula de segurança de 500 psi foi acoplada em outra saída da bomba para limitar a pressão máxima de trabalho.

#### 5.2.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade >18 M $\Omega$  cm), reagentes com grau analítico e solventes grau HPLC. Solução estoque de melamina (Merck) foi preparada dissolvendo-se 100 mg do reagente em aproximadamente 40 mL de água a 40°C, com posterior diluição até 100 mL. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente pela diluição da solução estoque. As separações cromatográficas foram realizadas sob condições de eluição isocrática. A fase móvel foi composta por dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,05 mol L<sup>-1</sup> (Merck, pureza 99%) preparado em tampão fosfato 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (Merck) em pH 3,0 e 1-propanol 7,5 % (v/v) (Merck). Fase móvel foi degaseificada em ultrassom por 5 min antes do uso.

Diferentes tipos de leite (integral, integral em pó, desnatado e semi-desnatado) foram adquiridos em mercados locais. O leite em pó foi preparado seguindo as instruções da embalagem.

#### 5.2.3. Procedimento

O sistema SIC (Figura 5.2) foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 5.1. Primeiramente, foi aspirada a fase móvel (S<sub>1</sub>) seguida pela aspiração sequencial de SDS (S<sub>2</sub>), amostra e uma segunda alíquota de SDS para prétratamento da amostra. A zona de amostra transportada através da coluna monolítica pela fase móvel, sendo a detecção espectrofotométrica realizada em 210 nm. As medidas foram baseadas na altura dos picos como em procedimentos desenvolvidos anteriormente em SIC [35,50]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em temperatura ambiente (25°C).



Figura 5.2 - Diagrama do sistema SIC para a determinação de melamina. S1: fase móvel (SDS 0,05 mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, pH 3,0 + propanol 7,5% (v/v)); S2: SDS 0,2 mol L<sup>-1</sup>; A: amostra de leite ou soluções de referência; VS: válvula seletora. BS: bomba tipo seringa; CC: coluna cromatográfica monolítica; D: cela de fluxos acoplada ao detector espectrofotométrico; W: recipiente de descarte

Ação	Unidade	Parâmetro
	Válvula seletora	Porta 3
Aspiração de fase móvel	Bomba	Volume: 3850 µL
Aspiração de lase mover	Domba	Vazão: 50 µL s-1
	Válvula seletora	Porta 4
Aspiração de SDS	Bomba	Volume: 10 µL Vazão:
	Domba	10 µL s <sup>-1</sup>
	Válvula seletora	Porta 5
Aspiração de amostra	Bomba	Volume: 10 µL Vazão:
	Domba	10 µL s <sup>-1</sup>
	Válvula seletora	Porta 4
Aspiração de SDS	Bomba	Volume: 10 µL Vazão:
Aspiração de 505	Domba	10 µL s <sup>-1</sup>
	Válvula seletora	Porta 2
Injeção da zona de amostra e	Bomba	Volume: 3880 µL
separação cromatográfica	Bomba	Vazão: 10 µL s <sup>-1</sup>

Tabela 5.1 - Rotina de operação do sistema SIC para o preparo de amostra emlinha e separação cromatográfica de melamina em leite

# 5.2.4. Procedimento de referência

O procedimento de referência para avaliação de exatidão foi baseado em cromatografia micelar em HPLC [114]. A separação foi realizada em um cromatógrafo (Agilent<sup>®</sup> Technologies Serie 1100) equipado com um desgaseificador, um auto-injetor e um sistema de detecção espectrofotométrica com arranjo de diodos. Uma coluna de fase estacionária C18 (Kromasil C18, 100 x 4,6 mm, 5 µm) foi utilizada como meio de separação. A fase móvel foi composta por uma solução aquosa de SDS 0,05 mol L<sup>-1</sup> com 7,5% (v/v) de 1-propanol em pH 3,0 utilizada no modo isocrático, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura ambiente. O volume de injeção foi 20 µL. Antes das análises, as amostras de leite foram diluídas na proporção de 1:10 com solução de SDS 0,05 mol L<sup>-1</sup>.

# 5.3. Resultados e discussão

# 5.3.1. Condições cromatográficas

A separação por cromatografia micelar é baseada nos mesmos componentes de um sistema de cromatografia em fase reversa, uma fase estacionária apolar e uma fase móvel polar. No entanto, esta última é composta por duas fases: os agregados micelares e uma solução de surfactante em sua concentração micelar crítica, formando uma fase heterogênea, como representado na Figura 5.3. Adicionalmente, a fase estacionária é modificada pela interação entre as cadeias de carbono dos monômeros de surfactantes e a fase octadecil. Neste contexto, o mecanismo de separação envolve a partição do analito entre três fases: os agregados micelares, a fase estacionária modificada e a fase aquosa com monômeros de surfactantes.

O surfactante está presente em todas as fases envolvidas no processo de separação, sendo assim, sua natureza e concentração têm efeitos pronunciados na eficiência cromatográfica. SDS foi selecionado para a separação de melamina devido às propriedades: presença de carga negativa em meio aquoso, que confere seletividade diferenciada à coluna cromatográfica; baixa CMC (8,1 mmol L<sup>-1</sup>), o que confere boas condições de separação em baixas concentrações de surfactante, sem aumentar o sinal de fundo em detecção espectrofotométrica no UV e a contra-pressão. A concentração de SDS na fase móvel foi avaliada entre 0,01 e 0,15 mol L<sup>-1</sup> e os cromatogramas em cada condição são apresentados na Figura 5.4.







Figura 5.4 - Efeito da concentração de SDS na fase móvel na separação de melamina em leite. (A) 0,01 mol L<sup>-1</sup>; (B) 0,05 mol L<sup>-1</sup>; (C): 0,10 mol L<sup>-1</sup> e (D): 0,15 mol L<sup>-1</sup>

A concentração de 0,01 mol L<sup>-1</sup> de SDS não possibilitou a separação da melamina dos componentes do leite. Apesar desta concentração estar acima da CMC, parte da fase estacionária não estava recoberta pelo surfactante, como reportado anteriormente [132]. A presença de cadeias livres de C18 conferem características apolares a algumas regiões da fase estacionária que, então apresentam baixa afinidade pela melamina, o que desfavorece a separação da matriz do leite. Em concentração de 0,05 mol L<sup>-1</sup> de SDS, provavelmente toda a fase estacionária se encontra recoberta pelo surfactante, apresentando características químicas uniformes, o que resultou em melhor desempenho cromatográfico e o surgimento do pico referente ao analito, o qual foi confirmado pela injeção de soluções com diferentes concentrações de melamina. Além disto, o maior número de micelas presentes na fase móvel, cria mais sítios de interação para o analito. Nesta

condição, melamina foi separada com resolução de 2,06 com relação ao pico mais próximo correspondente aos componentes da matriz. Em concentração de 0,10 mol L<sup>-1</sup> de SDS, aparentemente foi observado desempenho cromatográfico satisfatório, no entanto, a eluição de um dos componentes do leite próxima ao tempo de retenção da melamina, prejudicou sua resolução em concentrações baixas. A partir 0,15 mol L<sup>-1</sup> de SDS na fase móvel, foi observada diminuição do tempo de retenção da melamina. Este efeito está diretamente relacionado com o maior número de micelas presentes na fase móvel que agem como uma "pseudo fase estacionária". A elevada concentração de micelas diminui a interação dos analitos com a fase estacionária, o que diminui o tempo de retenção da melamina e, consequentemente a resolução.

Separações por cromatografia micelar usualmente necessitam da adição de pequenas quantidades de solventes orgânicos na fase móvel para melhorar resolução dos picos e diminuir os tempos de retenção [102]. A escolha de um modificador orgânico apropriado deve levar em conta a polaridade do analito. No caso da melamina, um composto polar, separações satisfatórias podem ser obtidas pelo uso de 1-propanol, 2-propanol ou acetonitrila [114] e 1-propanol foi selecionado como modificador orgânico. Esta substância compete com os monômeros de surfactante pela fase estacionária e, consequentemente, sua proporção na fase móvel tem influência nos tempos de retenção e no formato dos picos [132]. Fase móvel com 5,0% (v/v) de 1-propanol não foi eficiente para a separação da melamina da matriz do leite, como apresentado na Figura 5.5. O mesmo foi observado para fases com 10% de solvente. Neste caso, é possível que a alta concentração de 1propanol tenha desestabilizado as micelas, modificando as fases envolvidas e afetando diretamente o processo de separação. Entretanto, com a adição de 7,5% (v/v) de 1-propanol à fase móvel, foi observada boa resolução para a melamina, como pode ser observado na Figura 5.5. Esta quantidade de solvente orgânico é bastante reduzida quando comparado aos volumes empregados em cromatografia líquida de fase reversa clássica, o que confere aos procedimentos de CLM menor custo e impacto ambiental [132].

90



Figura 5.5 - Influência da concentração de 1-propanol na fase móvel na separação de melamina em leite. (A) 5,0% (v/v); (B) 7,5% (v/v); (C) 10,0% (v/v)

# 5.3.2. Tratamento de amostra em linha

Leite é uma matriz bastante complexa, como pode ser observado pela composição nutricional média descrita na Tabela 5.2. Devido à variedade de constituintes, a análise de leite geralmente requer tratamento prévio para a remoção de potenciais interferentes. No caso da determinação de melamina, todos os procedimentos apresentados na literatura incluem etapas de remoção de gorduras e proteínas, seja pela adição de um agente precipitante seja de um solvente extrator. Em alguns casos, uma etapa adicional de extração em fase sólida é necessária para a remoção de gorduras [114,119-121,123,124].

	Leite integral	Leite em pó
Água, % (m/v)	88,32	2,47
Proteína, % (m/v)	3,22	26,32
Sólidos, % (m/v)	0,69	6,08
Carboidratos, % (m/v)	4,52	38,42
Energia, kcal/100g	60	496
Colesterol, mg/100g	10	97
Gorduras, % do total	3,25	26,71
Saturadas totais	64,9	66,1
Monoinsaturadas totais	28,3	31,3
Polinsaturadas	6,8	2,6

Tabela 5.2 - Composição nutricional média dos leites integral e em pó [133]

Dentre os procedimentos apresentados, o preparo de amostra mais simples para análise de melamina se baseia na dissolução da amostra em uma solução de SDS em tampão fosfato pH 3,0 [114]. Tomando este procedimento como base, foi avaliada a viabilidade do preparo de amostra em linha pela dissolução do leite em solução de SDS. Foram avaliadas três estratégias para inserção de amostra e SDS no apresentado na Figura 5.6.



Figura 5.6 – Estratégias avaliadas para implementação do preparo de amostra em linha.

Após a avaliação destas estratégias para a implementação desta etapa, empregou-se a terceira alternativa, com as seguintes condições ótimas: aspiração de 10 µL de uma solução de SDS 0,2 mol L<sup>-1</sup>, seguida por alíquotas de mesmo volume de amostra e de SDS, de forma que a amostra fosse intercalada entre duas

zonas de surfactante. A mistura entre as alíquotas ocorre por dispersão, formando uma zona de amostra, a qual é completamente transferida à coluna cromatográfica para a separação da melamina. O uso de soluções de SDS em concentrações inferiores a 0,2 mol L<sup>-1</sup> resultou em zonas de amostra de aspecto turvo, indicando a solubilização incompleta da amostra, o que levou ao entupimento da pré-coluna monolítica. Desta forma, SDS 0,2 mol L<sup>-1</sup> foi utilizado para o tratamento da amostra. A solubilização dos componentes da amostra se dá pela inclusão de compostos apolares (*e.g.* lipídios) no interior das micelas, impedindo a precipitação.

O preparo da amostra em linha apresenta vantagens frente ao procedimento proposto anteriormente, o qual era executado em batelada. Há um menor risco de contaminações e perdas de analito devido a todo o processo ser realizado em um sistema fechado, além da possibilidade da injeção direta da amostra no sistema SIC sem nenhum pré-tratamento, o que torna o procedimento mais rápido. O consumo de SDS também foi reduzido no procedimento em linha, o qual consome 1,2 mg de reagente por determinação, em comparação a 144 mg no procedimento em batelada.

# 5.3.3. Características analíticas e aplicações

Foram obtidas curvas de calibração a partir de soluções de melamina preparadas em água e em diferentes tipos de leite. As equações obtidas por regressão linear são apresentadas na Tabela 5.3, em que A são os valores de absorbância e C a concentração de melamina em mg L<sup>-1</sup>. As curvas de calibração apresentaram coeficientes angulares com variações inferiores a 4,8%, não sendo distintos ao nível de 95% de confiança. Estes resultados indicam a ausência de efeitos de matriz e a viabilidade de calibração externa. Deste modo, a calibração efetuada em meio aquoso foi utilizada para a quantificação de melamina. Resposta linear foi observada entre 2,0 e 6,0 mg L<sup>-1</sup> de melamina com limite de detecção estimado em 0,6 mg L<sup>-1</sup> (95% de confiança) e coeficientes de variação de 2,9% (n=6). A faixa linear inclui os limites estabelecido pelas agências reguladoras (2,5 mg L<sup>-1</sup>) [115,116].

Matriz	Equação*	r
Água	A = 0,0140 (±0,0005) C + 0,048 (±0,002)	0,995
Leite integral	A = 0,0135 (±0,0003) C + 0,046 (±0,010)	0,997
Leite desnatado	A = 0,0140 (±0,0009) C + 0,010 (±0,001)	0,996
Leite em pó integral	A = 0,0125 (±0,0005) C + 0,081 (±0,001)	0,999
Leite semi-desnatado	A = 0,0140 (±0,0006) C + 0,051 (±0,001)	0,998

Tabela 5.3 - Curvas de calibração para melamina em diferentes matrizes

\*resposta linear entre 2,0 e 6,0 mg L <sup>-1</sup>

A Tabela 5.4 apresenta uma comparação das características analíticas do procedimento desenvolvido com alguns procedimentos envolvendo cromatografia líquida de alta eficiência. O procedimento desenvolvido consome somente 50 mg de SDS e 300 µL de 1-propanol por determinação, com separação cromatográfica em 6,5 min, gerando 3,9 mL de efluente por determinação. Estes parâmetros são significantemente menores que os observados no procedimento cromatográfico de referência, que requer 15 min por determinação, com geração de 15 mL de efluente e consome 1,0 mL de propanol e 179 mg de SDS [114]. A maior parte dos trabalhos apresentados na literatura utilizam extração em fase sólida como etapa de preparo de amostra, consumindo volumes elevados de solventes e tornando o procedimento moroso e de custo mais elevada, devido os cartuchos de SPE serem importados. O procedimento proposto realiza a etapa de preparo de amostra em linha, o que traz as vantagens descritas anteriormente.

Tratamento de amoetra	Tempo de	Consumo de solvente orgânico	Faixa linear	1701 10	Rafarância
	análise (min)	por determinação (mL)	(mg L <sup>-1</sup> )		
Diluição com SDS e tampão fosfato pH 3,0	15,0	1,1	0,2 - 100	7,6 (n=6)	[114]
SPE	15,0	58,5	0,8 - 80,0	1,22 (n=6)	[119]
Diluição com acetonitrila:água (50:50 v/v)	7,0	4,8	0,05 – 5,0	1,5 - 2	[120]
Diluição com acetonitrila	10,0	38,8	0,005 - 32,0	1,2 - 4,4 (n=3)	[121]
Ácido tricloroacético 1%, e SPE com NH₄OH 25%:metanol (1:20, v/v)	0,6	14,5	0,1 - 50	3,1 (n=11)	[123]
SPE com NH₄OH 0,025%:metanol (10:90, v/v) e água:metanol (1:1, v/v)	24,0	60,0	0,012 - 1,0	1,8 - 6,5 (n=5)	[124]
Pré-tratamento em linha com SDS	6,5	0,30	2,0 - 6,0	2,9 (n=6)	Este trabalho

Tabela 5.4 - Características analíticas de procedimentos cromatográficos para a determinação de melamina em leite

O procedimento foi aplicado a amostras de diferentes tipos de leite adicionadas de melamina, sendo os resultados comparados com os obtidos pelo procedimento de referência [114] (Tabela 5.5). Todos os valores concordam em um nível de 95% de confiança, o que demostra a exatidão do procedimento desenvolvido em SIC.

		Melamina (	mg L <sup>-1</sup> )	
Leite	SIC	HPLC	SIC	HPLC
Integral	2,64 ± 0,18	2,77 ± 0,26	4,30 ± 0,13	$4,22 \pm 0,44$
Desnatado	1,81 ± 0,11	1,90 ± 0,01	$3,54 \pm 0,14$	$3,67 \pm 0,03$
Em pó integral	1,73 ± 0,15	1,83 ± 0,10	3,06 ± 0,15	3,17 ± 0,07
Semi-desnatado	2,12 ± 0,10	$2,04 \pm 0,39$	3,60 ± 0,17	$3,42 \pm 0,20$
Desnatado 2	$2,09 \pm 0,22$	1,95 ± 0,01	3,03 ± 0,12	3,14 ± 0,10

 Tabela 5.5 - Determinação de melamina em amostras de leite adicionadas pelo procedimento proposto e por HPLC

# 5.4. Conclusões

O uso de cromatografia micelar foi apresentado em SIC e o procedimento desenvolvido foi satisfatoriamente aplicado à determinação de melamina em leite. A estratégia aumentou a capacidade de separação em SIC pela modificação da seletividade pela adsorção de monômeros de surfactante às cadeias funcionais da fase estacionária C18, resultando em uma coluna com propriedades cromatográficas diferentes e ainda capaz de operar a baixas pressões. Em razão das fases monolíticas apresentarem restrita variedade de fases estacionárias, o uso de fase micelar é uma opção viável para expandir a sua aplicabilidade. O procedimento desenvolvido apresentou vantagens em comparação a trabalhos anteriores para a determinação de melamina, incluindo o menor tempo de separação cromatográfica e o preparo de amostra em linha. Reduzidas quantidades de solventes orgânicos e surfactante foram consumidas, sendo então uma alternativa ambientalmente amigável para a determinação deste adulterante.

# 6. PRÉ-CONCENTRAÇÃO ON-COLUMN EM CROMATOGRAFIA POR INJEÇÃO SEQUENCIAL

#### 6.1. Introdução

Análises químicas demandam tempo, conhecimento e, dependendo da técnica empregada, podem envolver altos custos. Muitos procedimentos têm sido propostos objetivando simplicidade, rapidez na emissão de resultados e menores consumos de reagentes e geração de efluentes. A maioria deles se concentra no preparo da amostra, etapa mais morosa de uma análise química e que requer habilidades do analista para minimizar perdas de analitos e contaminações [134].

Extração em fase sólida é uma das estratégias mais aplicadas no preparo de amostra, especialmente em análises cromatográficas. O aparato mais comum para SPE consiste de um cartucho (*e.g.* polipropileno) preenchido por um material sorbente [135]. Os analitos de interesse são particionados entre a amostra e a fase sólida que, portanto, deve apresentar alta afinidade pelas espécies de interesse. Apesar da alta eficiência para a pré-concentração e limpeza (*clean-up*) de amostras complexas, a SPE requer várias etapas, como o condicionamento da fase sólida, percolação da amostra e eluição dos analitos por um solvente apropriado, o que torna o processo moroso e ambientalmente não amigável, devido ao uso de grandes volumes de solventes orgânicos.

Técnicas de microextração têm sido propostas como alternativas à SPE, permitindo contornar alguns de seus inconvenientes. Microextração em fase sólida, o análogo em micro-escala da SPE, se destaca por ser geralmente rápida, simples, requerer volumes menores de solventes orgânicos, ser compatível com sistemas de cromatografia a líquido e a gás e permitir alcançar altos fatores de enriquecimento [136]. No entanto, esta técnica ainda apresenta desvantagens, como a fragilidade mecânica e instabilidade das fibras em meios orgânicos, lixiviação dos revestimentos poliméricos que promovem a extração, preparo moroso das fibras e dificuldades de implementação de procedimentos em linha.

Outra alternativa apresentada na literatura se baseia na pré-concentração do analito na própria fase de separação cromatográfica, denominada pré-concentração on-column. Esta abordagem é análoga ao aprisionamento a frio em procedimentos de cromatografia a gás, em que um grande volume de amostra é injetado no sistema para a pré-concentração dos analitos no início da coluna capilar, que se encontra em baixa temperatura [137]. Com relação à cromatografia a líquido, um procedimento baseado nesta abordagem foi proposto para а determinação de bis(2-etilhexil)ftalato em águas [138]. Após a injeção de um grande volume de amostra em uma fase móvel com baixa força de eluente, foi utilizado um solvente apropriado para eluição dos analitos pré-concentrados no início da coluna cromatográfica, o qual também foi empregado como fase móvel para a separação cromatográfica. A mesma estratégia foi empregada em cromatografia líquida capilar para a determinação de N-acil homoserina lactona em isolados de bactérias [139]. A pré-concentração foi conduzida em uma coluna miniaturada, preparada em laboratório, pela injeção de 1 a 5 µL de amostra antes da separação cromatográfica e detecção por espectrometria de massas. Pré-concentração on-column foi também explorada para a determinação de alguilbenzenos e compostos relacionados ao sabor em amostras de alimentos, com coeficientes de variação abaixo de 5% [140]. Destes trabalhos, pode-se concluir que esta estratégia não necessita de nenhum dispositivo adicional ao sistema de análises, como cartuchos de extração e bombas e permite evitar procedimentos de preparo de amostra em batelada. Entretanto, deve-se dispor de alças de amostragem com volume adequado ou de meios para introduzir maiores volumes de amostra na coluna cromatográfica. Particularmente, no trabalho desenvolvido por Baram et al. [138] a amostra (20 mL) foi continuamente bombeada através da coluna, o que aumenta os riscos de contaminação e o tempo necessário para a substituição da amostra.

A versatilidade dos sistemas de análise por injeção sequencial que fundamenta o SIC, fazem desses sistemas uma alternativa viável para o manuseio de amostras em linha, incluindo a remoção de potenciais interferentes e a pré-concentração dos analitos por SPE. Nestes sistemas, o volume de amostra pode ser rigorosamente definido e controlado pelo uso de reatores e pela taxa de aspiração da bomba tipo seringa, o que facilita a implementação de procedimentos de preparo de amostra em linha. Neste capítulo da Tese, foi explorada a estratégia de pré-concentração *on-column* em um sistema SIC, com base na capacidade de gerenciamento de soluções inerente aos sistemas de análises por injeção sequencial. Extração e pré-concentração de parabenos foi selecionada como modelo para a avaliação da proposta.

# 6.2. Experimental

#### 6.2.1. Equipamentos

Um sistema de cromatografia por injeção sequencial SIChrom<sup>™</sup> (FIAlab Instruments<sup>®</sup>) equipado com uma válvula seletora de inox de oito portas C5H (Valco Instruments Co.) e uma bomba tipo seringa com reservatório de 4,0 mL foi utilizado em todos os estudos. As tubulações foram constituídas por tubos PEEK com 0,25 mm d.i. O sistema de detecção foi composto por um espectrofotômetro multicanal (Ocean Optics<sup>®</sup>, modelo USB4000) com uma lâmpada de deutério (Ocean Optics<sup>®</sup>, modelo DH-2000) como fonte de radiação e cabos de fibra ótica com diâmetro interno de 600 µm (Ceram Optec<sup>®</sup>). O espectrofotômetro foi acoplado a uma cela de fluxo em forma de Z, com 9 µL de volume interno e 20 mm de caminho ótico (FIAlab Instruments<sup>®</sup>). O sistema SIC foi controlado por um microcomputador equipado com o programa FIALab<sup>®</sup> 5.9 (FIAlab<sup>®</sup>). As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna de núcleo fundido (Ascentis Express<sup>®</sup> Supelco, 30 x 4,6 mm, 2,7 µm). Um manômetro foi posicionado em uma das saídas da bomba tipo seringa para o monitoramento da pressão do sistema durante as análises.

#### 6.2.2. Reagentes e soluções

Metil, etil e propil parabenos foram adquiridos da Sigma Aldrich<sup>®</sup>. Soluções estoque 1,00 g L<sup>-1</sup> foram preparadas em metanol e armazenadas a 5 °C. Soluções de trabalho foram preparadas diariamente por diluições da solução estoque em água. As fases móveis foram compostas por água (fase móvel com baixa força de

eluente ou transportador da amostra) uma solução aquosa de ácido fosfórico, pH 2,5 contendo 25% (v/v) de acetonitrila – fase móvel para eluição dos analitos e separação cromatográfica.

## 6.2.3. Procedimento

O sistema apresentado na Figura 6.1 foi operado de acordo com a rotina descrita na Tabela 6.1 para realizar a pré-concentração *on-column* de parabenos. Inicialmente, foram aspiradas sequencialmente pela bomba tipo seringa alíquotas de transportador (água, S<sub>1</sub>) e amostra (A), as quais foram dispensadas para a coluna cromatográfica. Em seguida, a bomba aspirou fase móvel (S<sub>2</sub>) e dispensou-a através da coluna cromatográfica de núcleo fundido para separação e posterior detecção dos parabenos em 255 nm. As medidas foram baseadas nas alturas dos picos e realizadas em triplicata a temperatura ambiente (25±1 °C).



Figura 6.1 - Diagrama do sistema SIC para pré-concentração on-column de parabenos. A: amostra; S<sub>1</sub>: água; S<sub>2</sub>: fase móvel; CC: coluna cromatográfica; D: cela de fluxos acoplada ao detector espectrofotométrico; VS: válvula seletora; BS: bomba tipo seringa; W: recipiente de descarte

Tabela 6.1 ·	- Rotina d	le operação	do sistema	SIC para	pré-concentrag	ção on-colui	mn de
	paraber	nos					

Ação	Unidade	Parâmetro
	Válvula seletora	Porta 3
Aspiração de água	Bomba	Volume: 500 µL / vazão:
		50 (µL s⁻¹)
	Válvula seletora	Porta 5
Aspiração de amostra	Bomba	Volume: 500 µL / Vazão:
		50 (µL s⁻¹)
	Válvula seletora	Porta 2
Dispensa de amostra e água	Bomba	Volume: 1000 µL / Vazão:
através da CC		10 (µL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora	Porta 4
Aspiração de fase móvel	Bomba	Volume: 3300 µL / Vazão:
		50 (µL s <sup>-1</sup> )
	Válvula seletora	Porta 2
Dispensa de fase móvel	Bomba	Volume: 3300 µL / Vazão:
através da CC		10 (μL s <sup>-1</sup> )

# 6.3. Resultados e discussões

Em cromatografia líquida, frequentemente a detectabilidade dos procedimentos é prejudicada pela injeção de pequenos volumes de amostra, com a finalidade de se melhorar a resolução dos picos. Contraditoriamente, uma etapa de pré-concentração é geralmente necessária para a análise de compostos em baixas concentrações. Esta etapa é usualmente realizada em batelada e está propensa a erros sistemáticos e contaminações além de, em alguns casos, ser de alto custo e causar algum impacto ambiental devido ao uso de dispositivos descartáveis e de solventes orgânicos. Alguns destes aspectos podem ser amenizados pela implementação dos procedimentos de tratamento de amostra em linha, no entanto, isto requer uma configuração mais complexa dos sistemas de análises. Procedimentos de pré-concentração em sistemas de análises em fluxo utilizamse um transportador inerte com a finalidade de evitar a sobreposição das zonas de amostra e eluente para garantir alta eficiência de pré-concentração, além da mínima dispersão dos analitos na fase sólida extratora. Em cromatografia líquida, além da função de transportador da zona de amostra, a fase móvel atua na separação dos analitos. A presente proposta combina ambas as estratégias, pelo uso de água como transportador da zona de amostra para a coluna cromatográfica na etapa de pré-concentração e da fase móvel com uma fração orgânica para separação cromatográfica dos analitos.

Sistemas SIC são capazes de realizar amostragens baseadas em tempo com alta repetibilidade, o que permite a variação de volume injetado pelo programa de controle. Altos volumes de amostra podem ser mantidos em um reator antes de serem dispensados na coluna cromatográfica usando um transportador adequado. Analitos com altos fatores de retenção (k > 20) [141] são retidos em uma zona estreita no início da coluna cromatográfica e podem ser eluídos por uma fase móvel apropriada sem perdas na resolução, como ilustrado na Figura 6.2. Nesta Tese, esta estratégia foi avaliada utilizando parabenos como compostos modelo.

A coluna de núcleo fundido RP-amida agiu como sorbente para SPE e como meio de separação cromatográfica. Como apresentado no capitulo 3, esta fase é composta por uma amida ligada a grupos alquil, os quais apresentam alta afinidade pelas moléculas de parabenos, tornando possível a sua extração e pré-concentração em amostras aquosas.

Como pode ser observado na Tabela 6.2, não foi observado alargamento significativo dos picos pelo aumento do volume de amostra injetado, o que indica que a fase estacionária apresenta afinidade suficiente pelas moléculas de parabenos, quando em meio aquoso, para formar uma zona estreita de analitos no início da coluna.



- Figura 6.2 Representação esquemática do processo de pré-concentração *on-column*. (A) introdução de amostra; (B) retenção dos analitos no início da coluna cromatográfica e (C) separação cromatográfica
- Tabela 6.2 Influência do volume de amostra no tempo de retenção e na largura dospicos na separação cromatográfica de parabenos após pré-<br/>concentração on-column

Volume de amostra	Tempo	de reten	ção (min)	Largu	ra dos picos	s (min)*
(μL)						
	MP	EP	PP	MP	EP	PP
10	1,6	2,5	4,1	0,10	0,14	0,21
50	1,8	2,6	4,3	0,11	0,15	0,24
100	1,6	2,4	4,1	0,09	0,13	0,22
200	1,6	2,5	4,2	0,10	0,13	0,23
300	1,7	2,6	4,5	0,10	0,15	0,25
400	1,8	2,7	4,6	0,11	0,14	0,24
500	1,8	2,8	4,7	0,12	0,15	0,25

\*medidas na base dos picos.

Os tempos de retenção também foram pouco alterados e não houve perdas de resolução mesmo para o maior volume de amostra injetado (500  $\mu$ L). Deve-se ressaltar que este volume é muito maior do que o volume morto da coluna (*ca.*280  $\mu$ L) [28], tornando inviável a separação cromatográfica direta de volumes tão elevados de amostra. Este efeito é mais crítico no procedimento desenvolvido, devido ao curto comprimento da coluna de núcleo fundido (3 cm).

A eficiência da estratégia para a pré-concentração também foi avaliada pela injeção de volumes crescentes de amostra, mantendo a massa de analito constante (Figura 6.3). Não foram observadas variações significativas nas alturas e larguras dos picos, o que confirma o eficiente acúmulo dos analitos no início da coluna cromatográfica. Isto indica o potencial do procedimento proposto para o aumento de detectabilidade em sistemas SIC. Os tempos de retenção apresentaram o mesmo comportamento observado no estudo anterior. As perturbações observadas para tempos de retenção abaixo de 1,0 min são devidas às diferenças no índice de refração causadas pela mudança de água para fase móvel (efeito Schlieren).



**Figura 6.3 -** Influência do volume de amostra injetado mantendo a massa de parabenos constante em 500 ng. Fase móvel: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,5):acetonitrila (60:40, v/v)

Utilizando um volume de amostra de 500  $\mu$ L, foi observada resposta linear entre 0,25 e 1,00  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. As principais características analíticas do procedimento estão apresentadas na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 -	Características	analíticas	do	procedimento	de	pré-concentração	on-
	<i>column</i> de pai	abenos					

	Equação	R²	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	CV t <sub>r</sub> (%)	CV AP (%)	FE
MP	A = 0,0006C + 0,0244	0,998	0,040	0,54	1,22	34,8
EP	A = 0,0004C + 0,0117	0,999	0,060	0,58	1,46	38,0
PP	A = 0,0003C + 0,0071	0,999	0,080	0,68	2,08	30,0

CV tr: coeficiente de variação do tempo de retenção

CV AP: coeficiente de variação da altura do pico

FE: fator de enriquecimento

A: absorbância em altura do pico/ C:concentração de parabenos (mg L-1)

Os coeficientes de variação dos tempos de retenção e altura dos picos foram relativamente baixos (comparáveis aos usualmente obtidos em SIC [28,35,40], indicando boa reprodutibilidade do procedimento. Esta observação é importante tendo em vista que não há um estágio de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária antes da separação, o que poderia resultar em variações dos parâmetros cromatográficos [142]. Fatores de enriquecimento foram estimados entre 30,0 e 38,0 a partir das razões entre os coeficientes angulares das curvas obtidas na injeção de volumes de amostra de 500 e 10  $\mu$ L. Isto corresponde a eficiências de concentração relativamente altas (entre 18 e 22,8 min<sup>-1</sup>), *i.e.* em 1,0 min pode-se atingir fatores de enriquecimento de no mínimo 18 pelo procedimento proposto, os quais são significantemente maiores do que os obtidos em procedimentos em batelada, usualmente mais morosos [143]. Além disso, baixos índices de consumo foram estimados (entre 0,0132 e 0,0167 mL), o que demostra a alta eficiência de aproveitamento da amostra, *i.e.* o sinal analítico aumenta no mínimo 30 vezes para 500  $\mu$ L de amostra.

# 6.4. Conclusões

O uso de cromatografia micelar foi apresentado em SIC e o procedimento desenvolvido foi satisfatoriamente aplicado à determinação de melamina em leite. A estratégia aumentou a capacidade de separação em SIC pela modificação da seletividade pela adsorção de monômeros de surfactante às cadeias funcionais da fase estacionária C18, resultando em uma coluna com propriedades cromatográficas diferentes e ainda capaz de operar a baixas pressões. Em razão das fases monolíticas apresentarem restrita variedade de fases estacionárias, o uso de fase micelar é uma opção viável para expandir a sua aplicabilidade. O procedimento desenvolvido apresentou vantagens em comparação a trabalhos anteriores para a determinação de melamina, incluindo o menor tempo de separação cromatográfica e o preparo de amostra em linha. Reduzidas quantidades de solventes orgânicos e surfactante foram consumidas, sendo então uma alternativa ambientalmente amigável para a determinação deste adulterante.

Um procedimento para pré-concentração *on-column* em sistema SIC foi desenvolvido e teve sua eficiência avaliada pela pré-concentração de parabenos. A estratégia permitiu extrações reprodutíveis com altos fatores de enriquecimento e baixo alargamento de picos. Vantagens como o baixo custo, baixo consumo de amostra e de solventes orgânicos, assim como a não utilização de cartuchos de extração fazem do procedimento proposto uma alternativa atrativa à SPE convencional. Esta estratégia pode ser aplicada para a pré-concentração de diferentes espécies em amostras aquosas pela escolha de fase estacionária e solvente da amostra apropriados, visando alta afinidade da fase estacionária pelos analitos. O procedimento apresentado aumenta a aplicabilidade de sistemas SIC pela melhoria da sensibilidade promovida pelos altos fatores de enriquecimento.

106
## 7. CONCLUSÕES GERAIS

As estratégias apresentadas nesta Tese contribuíram para o desenvolvimento das separações cromatográficas em sistemas de análises em fluxo através do aumento de seletividade e detectabilidade por diferentes abordagens. O emprego de colunas de núcleo fundido curtas em sistemas de análises por injeção em fluxo ampliou a seletividade de separações cromatográficas realizadas nestes sistemas pela variedade de fases estacionárias disponíveis, ampliando também a aplicabilidade destes sistemas. O uso de SPE em linha para extração e préconcentração de sulfonamidas ampliou tanto a seletividade como a detectabilidade dos sistemas de cromatografia por injeção sequencial, o que aumenta a potencialidade de aplicação destes sistemas uma vez que ele não dispõe de sistemas de detecção de alta sensibilidade. O uso de fase micelar no sistema SIC com coluna monolítica C18 também acarretou em um ganho de seletividade pela alteração das propriedades da fase estacionaria, com a qual foi possível realizar a separação de melanina em leite e ainda operar em pressões menores do que as colunas de partículas. Por fim, o desenvolvimento de uma estratégia para préconcentração on-column contribuiu para o aumento da detectabilidade na separação e determinação de parabenos, sem a utilização de cartuchos de extração e solventes orgânicos na etapa de pré-concentração. Todas estas estratégias ampliaram a aplicabilidade dos sistemas de separações cromatografias por injeção em fluxo e contribuirão para o desenvolvimento destas técnicas em abordagens futuras.

## REFERÊNCIAS

- 1. RUŽIČKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 145-157, 1975.
- 2. MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova,** São Paulo, v. 32, p. 214-222, 2009.
- 3. GUILLARME, D. et al. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: a critical comparison of existing approaches. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 397, n. 3, p. 1069-1082, 2010.
- 4. RUZICKA, J.; MARSHALL, G. D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 237, p. 329-343, 1990.
- 5. ROCHA, F. R. P. et al. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 468, n. 1, p. 119-131, 2002.
- 6. BATISTA, A. D. et al. Flow analysis in Brazil: contributions over the last four decades. **Analyst,** London, v. 139, n. 15, p. 3666-3682, 2014.
- SAURINA, J. Flow-injection analysis for multi-component determinations of drugs based on chemometric approaches. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam, v. 29, n. 9, p. 1027-1037, 2010.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 499, n. 1–2, p. 205-214, 2003.
- RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. Sequential Injection Chromatography for Fluorimetric Determination of Intracellular Amino Acids in Marine Microalgae. In: ALTERMAN, M. A.; HUNZIKER, P. (Ed.). Amino acid analysis. Totowa: Humana Press, 2012. p. 305-315.
- RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C. Improvements in the Separation Capabilities of Sequential Injection Chromatography: Determination of Intracellular Dissolved Free Amino Acid Profiles in Three Taxonomic Groups of Microalgae. Phytochemical Analysis, Chichester, v. 24, n. 3, p. 224-229, 2013.

- 11. ELGORASHE, R. et al. Facile assay method for norfloxacin and ciprofloxacin by sequential injection chromatography. **Acta Chromatographica**, Katovice, Poland, v. 26, n. 2, p. 321-334, 2014.
- CHOCHOLOUŠ, P. et al. Advantages of core–shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids.
   Talanta, Oxford, v. 103, n. 0, p. 221-227, 2013.
- IDRIS, A. M.; ELGORASHE, R. E. E. Sequential Injection Chromatography for Separation and Quantification of Chlorpromazine in Human Urine and Pharmaceutical Formulations. Journal of AOAC International, Arlington, v. 96, n. 2, p. 282-289, 2013.
- ELGORASHE, R. E. E. et al. Micro-scale method for separation and quantification of atenolol and hydrochlorothiazide by sequential injection chromatography. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, New York, v. 36, n. 19, p. 2814-2827, 2013.
- 15. IBARRA, I. S. et al. Sequential injection magneto chromatography determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceutical formulations. **Analytical Letters**, New York, v. 46, n. 11, p. 1732-1742, 2013.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. Two-column sequential injection chromatography for fast isocratic separation of two analytes of greatly differing chemical properties.
   Talanta, Oxford, v. 114, p. 311-317, 2013.
- 17. IDRIS, A.; ALNAJJAR, A. Native fluorescent detection with sequential injection chromatography for doping control analysis. **Chemistry Central Journal**, London, v. 7, n. 1, p. 144, 2013.
- IDRIS, A. M.; ALNAJJAR, A. O. Optimizing SIC assay method for acetyl salicylic acid and rosuvastatin and adapting to HPLC with performance comparison. Acta Chromatographica, Katovice, Poland, 2013. DOI: 10.1556/AChrom.27.2015.1.9.
- IDRIS, A. M. Sequential injection chromatography for biofluidic analysis: application to promethazine assay. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, New York, v. 35, n. 20, p. 2884-2899, 2012.
- 20. JANGBAI, W. et al. Sequential Injection Chromatography as Alternative Procedure for the Determination of Some Food Preservatives. **Food Analytical Methods,** H eidelberg, v. 5, n. 4, p. 631-636, 2012.

- 21. IDRIS, A. M. et al. Multi-response optimization of sequential injection chromatographic method for determination of lisinopril and hydrochlorothiazide. **Analytical Methods,** London, v. 4, n. 7, p. 2081-2087, 2012.
- 22. KOBLOVÁ, P. et al. Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolithic column. **Talanta,** Oxford, v. 84, n. 5, p. 1273-1277, 2011.
- 23. SKLENÁŘOVÁ, H. et al. Separation of vitamins retinol acetate, ergocalciferol, or cholecalciferol and tocopherol acetate using sequential injection chromatography. **Analytical Letters**, New York, v. 44, n. 1-3, p. 446-456, 2011.
- 24. IDRIS, A. M. et al. Reversed-phase sequential injection liquid chromatographic method for sildenafil assay. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, New York, v. 34, n. 19, p. 2256-2270, 2011.
- 25. IDRIS, A. et al. Inexpensive green method for diclofenac assay utilizing sequential injection chromatography. **Chromatographia**, New York, v. 73, n. 5-6, p. 431-437, 2011.
- IDRIS, A. M.;ELGORASHE, R. E. E. Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid. *Microchemical Journal,* New York, v. 99, n. 2, p. 174-179, 2011.
- IDRIS, A.; ELGORASHE, R. Sequential injection chromatography with a miniaturized multi-channel fiber optic detector for separation and quantification of propranolol and hydrochlorothiazide. Chemistry Central Journal, London, v. 5, n. 1, p. 28, 2011.
- CHOCHOLOUŠ, P. et al. Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column. **Talanta**, Oxford, v. 85, n. 2, p. 1129-1134, 2011.
- 29. BJÖRKLUND, E. et al. Possibilities and limitations of the sequential injection chromatography technique for the determination of anticoccidial agents in water, pharmaceutical formulations and feed. **Microchemical Journal**, New York, v. 98, n. 2, p. 190-199, 2011.

- INFANTE, C. M. C.; URIO, R. D. P.; MASINI, J. C. Improving the detectability of Sequential Injection Chromatography (SIC): determination of triazines by exploiting Liquid Core Waveguide (LCW) detection. Analytical Letters, New York, v. 44, n. 1-3, p. 503-513, 2011.
- SANTOS, L. B. O. D.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Determination of picloram in waters by sequential injection chromatography with UV detection. Journal of the Brazilian Chemical Society, São Paulo, v. 21, p. 1557-1562, 2010.
- 32. CHOCHOLOUŠ, P. et al. Two-column Sequential Injection Chromatography— New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 668, n. 1, p. 61-66, 2010.
- ZACHARIS, C. K. et al. Automated sample preparation coupled to sequential injection chromatography: On-line filtration and dilution protocols prior to separation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Oxford, v. 49, n. 3, p. 726-732, 2009.
- SANTOS, L. B. O.; INFANTE, C. M. C.; MASINI, J. C. Development of a sequential injection chromatography (SIC) method for determination of simazine, atrazine, and propazine. Journal of Separation Science, New York, v. 32, n. 4, p. 494-500, 2009.
- 35. CHOCHOLOUŠ, P. et al. Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column. **Talanta**, Oxford, v. 77, n. 2, p. 566-570, 2008.
- FERNÁNDEZ, M. et al. Modulation of mobile phase composition in flowinjection/sequential-injection chromatography exploiting multisyringe flow analysis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Heidelberg, v. 391, n. 3, p. 817-825, 2008.
- RIGOBELLO-MASINI, M. et al. Implementing stepwise solvent elution in sequential injection chromatography for fluorimetric determination of intracellular free amino acids in the microalgae Tetraselmis gracilis. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 628, n. 2, p. 123-132, 2008.
- GÓMEZ, V. et al. Coupling of Sequential Injection Chromatography with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares for Enhancement of Peak Capacity. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 79, n. 20, p. 7767-7774, 2007.

- 39. CHOCHOLOUŠ, P. et al. A novel application of Onyx<sup>™</sup> monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography. **Talanta**, Oxford, v. 72, n. 2, p. 854-858, 2007.
- 40. CHOCHOLOUŠ, P.; ŠATÍNSKÝ, D.; SOLICH, P. Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography. **Talanta,** Oxford, v. 70, n. 2, p. 408-413, 2006.
- 41. ŠATÍNSKÝ, D. et al. Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system. **Journal of Separation Science**, New York, v. 29, n. 16, p. 2494-2499, 2006.
- KLIMUNDOVÁ, J. et al. Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell. Talanta, Oxford, v. 69, n. 3, p. 730-735, 2006.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. Sequential injection chromatographic determination of ambroxol hydrochloride and doxycycline in pharmaceutical preparations.
   Talanta, Oxford, v. 68, n. 2, p. 214-218, 2005.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets.
   Journal of Separation Science, New York, v. 27, n. 7-8, p. 529-536, 2004.
- ŠATÍNSKÝ, D. et al. Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1015, n. 1–2, p. 239-244, 2003.
- ISHIZUKA, N. et al. Chromatographic characterization of macroporous monolithic silica prepared via sol-gel process. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, Amsterdam, v. 187–188, p. 273-279, 2001.
- 47. VALLANO, P. T. et al. Monolithic silica liquid chromatography columns for the determination of cyclooxygenase II inhibitors in human plasma. Journal of Chromatography B, Amsterdam, v. 779, n. 2, p. 249-257, 2002.
- 48. HEFNAWY, M. M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Fast high-performance liquid chromatographic analysis of mianserin and its metabolites in human plasma using monolithic silica column and solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 504, n. 2, p. 291-297, 2004.

- 49. OBERACHER, H.; HUBER, C. G. Capillary monoliths for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2002.
- 50. CHOCHOLOUŠ, P.; SOLICH, P.; ŠATÍNSKÝ, D. An overview of sequential injection chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 600, n. 1–2, p. 129-135, 2007.
- 51. GUIOCHON, G.; GRITTI, F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1218, n. 15, p. 1915-1938, 2011.
- 52. BRICE, R. W.; ZHANG, X.; COLÓN, L. A. Fused-core, sub-2 μm packings, and monolithic HPLC columns: a comparative evaluation. Journal of Separation Science, New York, v. 32, n. 15-16, p. 2723-2731, 2009.
- 53. VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG, A. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. **Chemical Engineering Science**, London, v. 5, n. 6, p. 271-289, 1956.
- 54. WU, N.; CLAUSEN, A. M. Fundamental and practical aspects of ultrahigh pressure liquid chromatography for fast separations. **Journal of Separation Science**, New York, v. 30, n. 8, p. 1167-1182, 2007.
- 55. SANTOS, J. R.; RANGEL, A. O. S. S. Development of a chromatographic low pressure flow injection system: Application to the analysis of methylxanthines in coffee. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 715, p. 57-63, 2012.
- 56. HANDA, O. et al. Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes. **Toxicology**, Amsterdam, v. 227, n. 1–2, p. 62-72, 2006.
- 57. DARBRE, P. D. et al. Oestrogenic activity of benzylparaben. Journal of Applied Toxicology, Chichester, v. 23, n. 1, p. 43-51, 2003.
- 58. TERASAKI, M. et al. Evaluation of estrogenic activity of parabens and their chlorinated derivatives by using the yeast two-hybrid assay and the enzymelinked immunosorbent assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 1, p. 204-208, 2009.
- 59. LUNDOV, M. D. et al. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 60, n. 2, p. 70-78, 2009.

- 60. SANDERSON, H. et al. Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Orlando, v. 39, n. 2, p. 158-183, 2004.
- 61. GARCÍA JIMÉNEZ, J.; CARMEN VALENCIA, M.; CAPITÁN-VALLVEY, L. Parabens determination with a hybrid FIA/HPLC system with ultra-short monolithic column. Journal of Analytical Chemistry, Moscow, v. 65, n. 2, p. 188-194, 2010.
- GARCÍA-JIMÉNEZ, J. F.; VALENCIA, M. C.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweetener additives in food and cosmetics by flow injection analysis coupled to a monolithic column. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 594, n. 2, p. 226-233, 2007.
- 63. CLAVER, J. B.; VALENCIA, M. C.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Analysis of parabens in cosmetics by low pressure liquid chromatography with monolithic column and chemiluminescent detection. **Talanta,** Oxford, v. 79, n. 2, p. 499-506, 2009.
- 64. US FDA. Center for Drug Evaluationand Research. **Technical Review Guide**: validation of chromatographic method. Silver Spring, MD, 1993. 30 p.
- 65. TZANAVARAS, P. et al. Isocratic liquid chromatographic determination of three paraben preservatives in hygiene wipes using a reversed phase coreshell narrow-bore column. **Central European Journal of Chemistry**, Heidelberg, v. 10, n. 5, p. 1459-1463, 2012.
- 66. UYSAL, U. D.; GÜRAY, T. Determination of parabens in pharmaceutical and cosmetic products by capillary electrophoresis. Journal of Analytical Chemistry, Moscow, v. 63, n. 10, p. 982-986, 2008.
- LABAT, L. et al. Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Oxford, v. 23, n. 4, p. 763-769, 2000.
- 68. MYINT, A. et al. Flow injection-chemiluminescence determination of paraben preservative in food safety. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 517, n. 1-2, p. 119-124, 2004.
- ZHANG, Q. et al. High-performance liquid chromatographic assay of parabens in wash-off cosmetic products and foods using chemiluminescence detection. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 537, n. 1–2, p. 31-39, 2005.

- EBRAHIMPOUR, B.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Emulsification liquid phase microextraction followed by on-line phase separation coupled to high performance liquid chromatography. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 751, p. 79-85, 2012.
- 71. CHARY, N. S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Determination of volatile organic compounds in drinking and environmental waters. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 32, p. 60-75, 2012.
- 72. GUILLARME, D.; VEUTHEY, J.-L. State-of-the art of (UHP)LC–MS(–MS) techniques and their practical application. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1292, p. 1, 2013. doi: 10.1016/j.chroma.2013.03.055.
- 73. LUCCI, P. et al. Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis. In: Calderon, L. A. (Ed.). **Chromatography** The most versatile method of chemical analysis. Rijeka, Croatia: InTech, 2012.
- 74. RIBEIRO, C. et al. New trends in sample preparation techniques for environmental analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 44, n. 2, p. 142-185, 2014.
- 75. WAN IBRAHIM, W. A. et al. Application of Solid-Phase Extraction for Trace Elements in Environmental and Biological Samples: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Boca Raton, v. 44, n. 3, p. 233-254, 2014.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; LOPEZ DE ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1152, n. 1–2, p. 97-115, 2007.
- 77. ROGEBERG, M. et al. On-line solid phase extraction–liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 87, p. 120-129, 2014.
- 78. ASPERGER, A. et al. Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction–liquid chromatography– tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 960, n. 1–2, p. 109-119, 2002.
- 79. GRUDPAN, K. Some recent developments on cost-effective flow-based analysis. **Talanta**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 1084-1090, 2004.

- 80. MIRÓ, M.; HANSEN, E. H. Solid reactors in sequential injection analysis: recent trends in the environmental field. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 25, n. 3, p. 267-281, 2006.
- 81. GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, S.; BARCELÓ, D. Multiresidue trace analysis of sulfonamide antibiotics and their metabolites in soils and sewage sludge by pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography– electrospray-quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 1275, p. 32-40, 2013.
- 82. HUANG, Y. et al. Simultaneous extraction of four classes of antibiotics in soil, manure and sewage sludge and analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the isotope-labelled internal standard method. Analytical Methods, London, v. 5, n. 15, p. 3721-3731, 2013.
- 83. SEIFRTOVÁ, M. et al. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, n. 2, p. 158-179, 2009.
- 84. GAO, S. et al. lonic liquid-based homogeneous liquid–liquid microextraction for the determination of antibiotics in milk by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1218, n. 41, p. 7254-7263, 2011.
- 85. HUANG, X. et al. Sensitive monitoring of penicillin antibiotics in milk and honey treated by stir bar sorptive extraction based on monolith and LCelectrospray MS detection. Journal of Separation Science, New York, v. 36, n. 5, p. 907-915, 2013.
- 86. THIELE-BRUHN, S. et al. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 4, p. 1331-1342, 2004.
- 87. HERNANDO, M. D. et al. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. **Talanta,** Oxford, v. 69, n. 2, p. 334-342, 2006.
- KOLPIN, D. W. et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. Environmental Science and Technology, Easton, v. 36, n. 6, p. 1202-1211, 2002.

- 90. HAN, J. et al. lonic liquid-salt aqueous two-phase extraction based on saltingout coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of sulfonamides in water and food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 405, n. 4, p. 1245-1255, 2013.
- 91. HERRERA-HERRERA, A. V. et al. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Oxford, v. 75, p. 130-137, 2013.
- LIN, C. Y.; HUANG, S.-D. Application of liquid–liquid–liquid microextraction and high-performance liquid-chromatography for the determination of sulfonamides in water. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 612, n. 1, p. 37-43, 2008.
- RAMOS PAYÁN, M. et al. Hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) for a highly sensitive HPLC determination of sulfonamides and their main metabolites. Journal of Chromatography B, Amsterdam, v. 879, n. 2, p. 197-204, 2011.
- 94. VOSOUGH, M.; MASHHADIABBAS ESFAHANI, H. Fast HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second-order calibration based on MCR-ALS. **Talanta**, Oxford, v. 113, p. 68-75, 2013.
- 95. LE-MINH, N.; STUETZ, R. M.; KHAN, S. J. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Talanta,** Oxford, v. 89, p. 407-416, 2012.
- 96 LIN, C. E.; CHANG, C. C.; LIN, W. C. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis III. Citrate buffer as a background electrolyte. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 768, n. 1, p. 105-112, 1997.
- 97 TAM, K. Y.; TAKÁCS-NOVÁK, K. Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 434, n. 1, p. 157-167, 2001.

- 98 GEISER, L.; et al. Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. **Journal of Separation Science**, New York, v. 28, n. 17, p. 2374-2380, 2005.
- 99 Moldoveanu, S.C.; David, V. **Sample Preparation in Chromatography**. 1<sup>a</sup> ed. Elsevier Science, Amsterdam, p.354, 2002.
- 100. MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 714, p. 8-19, 2012.
- 101. DÍAZ-ÁLVAREZ, M. et al. Supported liquid membrane-protected molecularly imprinted beads for micro-solid phase extraction of sulfonamides in environmental waters. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1357, p. 158-164, 2014.
- 102. RAMBLA-ALEGRE, M. Basic Principles of MLC. Chromatography Research International, New York, v. 2012, p. 6, 2012.
- BORGERDING, M. F. et al. Investigations of stationary phase modification by the mobile phase surfactant in micellar liquid chromatography. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 61, n. 13, p. 1353-1358, 1989.
- FOLEY, J. P. Critical compilation of solute-micelle binding constants and related parameters from micellar liquid chromatographic measurements. Analytica Chimica Acta, Amsterdam, v. 231, p. 237-247, 1990.
- 105. YARMCHUK, P. et al. Selectivity in liquid chromatography with micellar mobile phases. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 54, n. 13, p. 2233-2238, 1982.
- 106. BARFORD, R. A.; SLIWINSKI, B. J. Micellar chromatography of proteins. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 56, n. 9, p. 1554-1556, 1984.
- 107. ARMSTRONG, D. W.; NOME, F. Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 53, n. 11, p. 1662-1666, 1981.
- 108. RAMBLA-ALEGRE, M. Micellar liquid chromatography in the determination of antibiotics: an overview. **Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, New York, v. 5, n. 12, p. 1-27, 2011.
- 109. KALYANKAR, T. M. et al. Applications of micellar liquid chromatography in bioanalysis: a review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Lashkar, India, v. 4, n. 1, p. 128-134, 2014.

- VASIMALAI, N.; ABRAHAM JOHN, S. Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold nanoparticles: Spectrofluorimetric determination of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped goldnanoparticles. Biosensors and Bioelectronics, Barking, v. 42, p. 267-272, 2013.
- 111. YANG, H. H. et al. Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products. **Talanta**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 821-825, 2009.
- 112. GUO, C. Y. et al. Fast and selective determination of total protein in milk powder via titration of moving reaction boundary electrophoresis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 34, n. 9-10, p. 1343-1351, 2013.
- 113. PAN, X. D. et al. Simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in dairy products by mixed-mode solid phase extraction and GC–MS. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 2, p. 545-548, 2013.
- 114. RAMBLA-ALEGRE, M. et al. Development of an analytical methodology to quantify melamine in milk using micellar liquid chromatography and validation according to EU Regulation 2002/654/EC. **Talanta**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 894-900, 2010.
- 115. WHO. Toxiacal and Health Aspects of Melamine and Cyanuric Acid. Disponível em: http://www.who.int. Acesso em: 10 out. 2013.
- 116. US FDA. LIB 4422 Melamine and Cyanuric Acid Residues in Foods Disponível em: http://www.fda.gov. Acesso em: 10 out. 2013.
- SUN, F. et al. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, Amsterdam, v. 29, n. 11, p. 1239-1249, 2010.
- 118. SAINT-DENIS, T.; GOUPY, J. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 515, n. 1, p. 191-198, 2004.
- 119. WEN, Y. et al. Determination of melamine in milk powder, milk and fish feed by capillary electrophoresis: a good alternative to HPLC. Journal of the Science of Food and Agriculture, London, v. 90, n. 13, p. 2178-2182, 2010.
- FILAZI, A. et al. Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 95, n. 2, p. 602-608, 2012.

- 121. ZHENG, X. L. et al. Determination of melamine in dairy products by HILIC-UV with NH2 column. **Food Control**, Guildfrod, v. 23, n. 1, p. 245-250, 2012.
- 122. CHAO, Y. Y. et al. Using an on-line microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 702, n. 1, p. 56-61, 2011.
- 123. SUN, H. et al. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 5, p. 686-691, 2010.
- 124. KHEDR, A. Optimized extraction method for LC–MS determination of bisphenol A, melamine and di(2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes, and milk powder. Journal of Chromatography B, Amsterdam, v. 930, p. 98-103, 2013.
- 125. ONO, S. et al. Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 815, n. 2, p. 197-204, 1998.
- 126. SU, X. et al. Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS. International Journal of Mass Spectrometry, Amsterdam, v. 338, p. 39-44, 2013.
- 127. ZENG, H. J. et al. Determination of melamine by flow injection analysis based on chemiluminescence system. **Food Chemistry**, Barking, v. 127, n. 2, p. 842-846, 2011.
- 128. ZHANG, J. et al. Ultrasensitive determination of melamine in milk products and biological fluids by luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence. Journal of Food Composition and Analysis, San Diego, v. 24, n. 7, p. 1038-1042, 2011.
- 129. FODEY, T. L. et al. Development of an Optical Biosensor Based Immunoassay to Screen Infant Formula Milk Samples for Adulteration with Melamine. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 83, n. 12, p. 5012-5016, 2011.
- 130. FENG, W. et al. Determination of melamine concentrations in dairy samples. **LWT Food Science and Technology**, London, v. 47, n. 1, p. 147-153, 2012.

- 131. THERMO SCIENTIFIC. Rapid determination of melamine in liquid milk and milk powder by HPLC on the acclaim mixed-mode WCX-1 column with UV detection. Sannyvalle, CA, 2009. (Applicantion Note, 221).
- 132. RUIZ-ÁNGEL, M. J. et al. Retention mechanisms in micellar liquid chromatography. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 1216, n. 10, p. 1798-1814, 2009.
- JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major Advances in Nutrition: Impact on Milk Composition. Journal of Dairy Science, Lancaster, v. 89, n. 4, p. 1302-1310, 2006.
- 134. SINGH, B.; KUMAR, A.; MALIK, A. K. Recent advances in sample preparation methods for analysis of endocrine disruptors from various matrices. Critical Reviews in Analytical Chemistry, Boca Raton, v. 44, n. 3, p. 255-269, 2014.
- 135. HENNION, M.-C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 856, n. 1–2, p. 3-54, 1999.
- 136. ZHANG, Z.; YANG, M. J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. a solvent-free alternative for sample preparation. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 66, n. 17, p. 844A-853A, 1994.
- 137. DIETZ, C. et al. The Capillary Cold Trap as a Suitable Instrument for Mercury Speciation by Volatilization, Cryogenic Trapping, and Gas Chromatography Coupled with Atomic Absorption Spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 72, n. 17, p. 4178-4184, 2000.
- 138. BARAM, G. I. et al. Determination of bis(2-ethylhexyl) phthalate in water by high-performance liquid chromatography with direct on-column preconcentration. Journal of Analytical Chemistry, Moscow, v. 55, n. 8, p. 750-754, 2000.
- 139. FROMMBERGER, M. et al. A simple and robust set-up for on-column sample preconcentration – nano-liquid chromatography – electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of N-acylhomoserine lactones. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Heidelberg, v. 378, n. 4, p. 1014-1020, 2004.
- 140. ÁVILA, M. et al. Determination of alkenylbenzenes and related flavour compounds in food samples by on-column preconcentration-capillary liquid chromatography. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v. 1216, n. 43, p. 7179-7185, 2009.

- 141. RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. D. In-column micro-highperformance liquid chromatographic concentration-separation prior to ultraviolet detection for the determination of chlorophenols in water samples. **Journal of Chromatography A,** Amsterdam, v. 1174, n. 1–2, p. 78-84, 2007.
- 142. SCHELLINGER, A. P.; STOLL, D. R.; CARR, P. W. High speed gradient elution reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1064, n. 2, p. 143-156, 2005.
- 143. BENIJTS, T.; LAMBERT, W.; DE LEENHEER, A. Analysis of Multiple Endocrine Disruptors in Environmental Waters via Wide-Spectrum Solid-Phase Extraction and Dual-Polarity Ionization LC-Ion Trap-MS/MS. Analytical Chemistry, Washington, DC, v. 76, n. 3, p. 704-711, 2003.

## ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado no periódico internacional Analytical Methods

Anexo B - Artigo publicado no periódico internacional Talanta (on line first)

Anexo C - Artigo publicado no periódico internacional Microchemical Journal

## Analytical Methods

## PAPER



Cite this: DOI: 10.1039/c4ay02032d

Received 29th August 2014 Accepted 29th September 2014 DOI: 10.1039/c4ay02032d

www.rsc.org/methods

## 1. Introduction

Monolithic stationary phases were introduced to liquid chromatography as an alternative to particle-packed columns in highly efficient separations. Due to their high porosity, they can be operated at relatively high flow-rates with low backpressure.<sup>1</sup> A logical evolution was to implement monolithic columns to sequential injection analysis (SIA) to perform chromatographic separations, thus increasing the potential of flow analysis to multicomponent determination.<sup>2</sup> This combination was originally named as sequential injection chromatography (SIC).

Different monolithic stationary phases (silica, RP-C8, RP-C18, CN, NH<sub>2</sub> and HILIC) are currently available. However, the availability of only silica and RP-C18 phases for pioneering work restricted the SIC applications, and the introduction of fused-core particle columns contributed to overcoming this drawback.<sup>3</sup> These columns are composed of a fused-silica particle (*e.g.* 1.7  $\mu$ m diameter) covered by a shell (*e.g.* 0.5  $\mu$ m thickness), which acts as the stationary phase. This physical constitution improves the chromatographic performance by operation at the backpressure of 3  $\mu$ m particle columns, but achieves the performance of the sub-2  $\mu$ m particle ones.<sup>4</sup> Since the analytes cannot penetrate the solid inner core, the fused-core particle provides a shorter diffusion path compared with the traditional silica particles, thus lessening the resistance to mass transfer<sup>5</sup>

## A flow injection low-pressure chromatographic system exploiting fused-core columns

Alex D. Batista and Fábio R. P. Rocha\*

Chromatography with ultra-short monolithic columns, although attractive in view of its operation at low pressure without the need for expensive pumps, presents limited selectivity due to the low availability of stationary phases. In this work, fused-core columns are for the first time exploited in flow injection systems aimed at low-pressure chromatography. The proposed approach expands selectivity of flow injection low-pressure chromatography by considering the range of different stationary phases available for fused-core columns. Separation of methyl, ethyl and propylparabens was selected as an application and a critical comparison of chromatographic efficiencies of four columns (C18, RP-amide, F5 and phenyl-hexyl) is presented. An acetonitrile/phosphoric acid pH 2.5 solution was selected as the mobile phase, with specific ratios for each column. RP-amide provided the best chromatographic efficiency, performing quantitative separation of the three analytes in 8.0 min, with resolutions > 1.72, peak symmetry < 1.66, LODs between 0.12 and 0.39 mg L<sup>-1</sup>, linear response ranges up to 5.0 mg L<sup>-1</sup> (r > 0.996) and coefficients of variation of peak heights < 3.5% (n = 10). The procedure was applied to the determination of parabens in personal care products, and the results agreed with the HPLC reference procedure at the 95% confidence level.

and reducing the axial dispersion, especially at high flow rates. Moreover, compared to porous particles, these columns present narrower particle size distribution and higher packing density, promoting a lower eddy diffusion,<sup>6</sup> thus resulting in a low peak broadening and a high number of theoretical plates. Fused-core columns were pioneered for use in a SIC system for the separation of four estrogens with a similar structure, using ethylparaben as the internal standard. The chromatographic performances of fused-core and monolithic columns, both with C18 stationary phases, were evaluated, and the results highlighted the benefits of the former on the SIC system.<sup>3</sup> Further work indicated the superior performance of pentafluorophenylpropyl fused-silica columns in comparison to the monolithic ones for the separation of eight sulfonamides.<sup>7</sup>

Although SIC performs chromatographic separations at much lower backpressures than conventional liquid chromatography, it still needs a special propulsion unit (syringe pump) to assure the flow rate of the mobile phase, reaching pressures of up to 600 psi. Peristaltic pumps normally used in flow analysis do not allow the achievement of such high pressures. An alternative to reduce backpressure is to use short columns (*e.g.* 0.5 cm length). Coupling of these columns to FIA manifolds was named as flow injection chromatography (FIC) and was successfully applied to the separation of theobromine, theophylline and caffeine in coffee brewed samples.<sup>8</sup> The flow system was composed of a peristaltic pump, an injection valve and a 0.5 cm long monolithic column, usually used as the guard column in chromatography. Resolution > 1.83 was achieved for



YAL SOCIETY CHEMISTRY

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, P.O. Box 96 -13400-970, Piracicaba - SP, Brazil. E-mail: frprocha@cena.usp.br

all analytes in 6.5 min. A FIC system was also employed for aspartame, saccharin, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, propylgallate and butylhydroxyanisole determinations in food and cosmetic samples.<sup>9</sup> Gradient elution was required for complete separation of the analytes with a 0.5 cm long C18 monolithic column. A similar strategy was further used for the determination of parabens in cosmetics with spectrophotometric<sup>10</sup> or chemiluminometric<sup>11</sup> detection. The main disadvantage of FIC is the limited column size, which may hinder the separation efficiency due to the low number of theoretical plates. Since monolithic phases were the only available option for operation at low pressures, the selectivity was restricted as well.

The goal of this work is to evaluate the chromatographic performance of short-fused core columns with different stationary phases in a flow system with a peristaltic pump as the propulsion unit. Separation of parabens was taken as a model with their determinations in different personal care products.

### 2. Experimental

#### 2.1. Apparatus

The flow injection low-pressure chromatographic system comprised a peristaltic pump (Ismatec IPC, Switzerland; model CP 78017-10) with Tygon® pumping tubes; three-way solenoid valves (NResearch, USA); Teflon™ confluence and flow lines of 0.25 mm i.d PEEK tubes. The system was controlled by a microcomputer through a parallel interface connected to a current drive based on an ULN2803 integrated circuit, as previously described.12 The control software was developed in Visual Basic 6.0 (Microsoft, Redmond, USA). The detection unit was composed of a USB2000 fiber-optic CCD UV-Vis spectrophotometer (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA), a DH-2000 deuterium UV light source (Ocean Optics), SMA ended optical fibers with a 600 µm core diameter (CeramOptec®, East Longmeadow, MA, USA) and Z-shaped flow-cell with a 20 mm optical path and 9 µL inner volume (FIAlab Instruments®, Bellevue, WA, USA). Data acquisition was performed using the OOIBase32 software provided by the spectrophotometer manufacturer.

The reversed-phase fused-core columns (C18, F5, RP-amide and phenyl-hexyl; 5 mm  $\times$  4.6 mm, particle size 2.7  $\mu$ m) were purchased from Supelco, USA.

#### 2.2. Reagents and solutions

Methyl (MP), ethyl (EP) and propyl (PP) parabens were purchased from Sigma Aldrich. Stock 1.000 g L<sup>1</sup> solutions were prepared in methanol and stored at 5 °C. Working solutions between 1.00 and 5.00 mg L<sup>1</sup> were prepared daily by dilution with the mobile phase. Solutions with different ratios of acetonitrile and aqueous phosphoric acid solution (pH 2.5) were used as mobile phases. Personal care products were purchased from a local market.

#### 2.3. Procedure

The low-pressure chromatographic flow manifold was designed with two convergent flow lines (Fig. 1), with both solutions



Fig. 1 Flow diagram of the system for the determination of parabens.  $V_1$  and  $V_2$ : three-way solenoid valves; CC: fused-core chromatographic column; D: detection unit; S: sample; MP: mobile phase; X: confluence; W: waste vessel. Dashed and continuous lines in the valves indicate the flow pathways when the valves are switched on and off, respectively.

flowing at 0.6 mL min <sup>1</sup>. The mobile phase was continuously pumped through valve  $V_2$ , and sample solutions were inserted into the system by simultaneously switching  $V_1$  and  $V_2$ . The sample volume (10  $\mu$ L) was defined by the flow-rate and the valve switching time. Detection was carried out at 255 nm (maximum absorption for all parabens). Chromatograms were evaluated using the graphical OriginLab® software, and peak heights were used as the measurement basis, as in previous works on SIC.<sup>2,13</sup> Retention time, resolution, peak symmetry, number of theoretical plates and height equivalent to a theoretical plate were calculated from experimental data based on FDA recommendations.<sup>14</sup>

The reference procedure for accuracy assessment relied on reversed-phase HPLC.<sup>15</sup> The parabens extractions from the samples were performed by the procedures previously described for wet wipes<sup>16</sup> or gel and cream samples.<sup>17</sup>

### Results and discussion

The requirements for low-pressure chromatography (*i.e.*, a highly efficient separation with low backpressure) are fulfilled by fused-core columns, which also show a higher diversity of stationary phases. During the experiments, backpressure did not exceed 80 psi and suitable resolution was achieved even with short 5 mm columns. In addition, the propulsion unit needs to allow a reproducible flow rate to achieve reliable results, including reproducible peak heights and retention times. Flow-rate stability was evaluated during all experiments and no significant variation was observed, demonstrating the robustness of the peristaltic pumping. Another concern on this kind of system was the resistance of the pumping tubes to organic solvents that could harm its performance. The same tubes were employed during all the experiments, and no damage was observed.

#### 3.1. Chromatographic characteristics

The process of separation of parabens was exploited to evaluate the chromatographic performance achieved with different fused-core columns. Fig. 2 shows the chromatograms obtained in the optimal compositions of the mobile phases, whereas Table 1 shows the corresponding chromatographic parameters. For F5, phenyl-hexyl and C18 columns, acceptable resolution

View Article Online

Paper

126

Paper

#### View Article Online Analytical Methods



Fig. 2 Chromatographic separation of methyl (MP), ethyl (EP) and propyl (PP) parabens with different stationary phases and ratios of mobile phase. (1) C18 column, (a) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (2) phenyl-hexyl column, (a) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (3) F5 column, (a) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (3) F5 column, (a) water (pH 2.5)/acetonitrile (80 : 20), (b) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (a) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) water (pH 2.5)/acetonitrile (85 : 15); (c) phenyl-hexyl column, (c) phenyl-hexyl c

 $(R_{\rm s}>1.5)$  was not achieved, even for mobile phases with a high water content. Under these conditions, high retention times were observed due to the increased polarity of mobile phase; moreover, broader peaks caused by higher analyte dispersion inside the column were observed.

The phenyl-hexyl phase shows  $\pi$ - $\pi$  interactions with the analyte, through its aromatic ring and delocalized electrons (Fig. 3). The aromatic ring acts as a donator of  $\pi$  electrons, thus as a Lewis base that strongly interacts with  $\pi$  receptors. Consequently, good selectivity for aromatic molecules with electronegative groups such as parabens is attained. Despite these favourable properties, exploitation of this phase leads to better resolution only at high retention times and with higher peak broadening, which hinders sensitivity and sample throughput. The F5 column is composed of electron-deficient phenyl rings as a result of the fluorine substituents (Fig. 3), forming a less apolar reversed phase. Beyond  $\pi$ - $\pi$  interactions, it retains analytes by polar and nonpolar interactions. Parabens presents high interaction with this phase, but similar drawbacks, as mentioned for the phenyl-hexyl columns, were observed.

RP-amide, whose structure is similar to the C18 phase, except for the amide linked to the silanyl group (Fig. 3), is an alternative for reversed phase separations of polar compounds. Thus, this phase showed the best chromatographic performance for parabens separation. Satisfactory resolutions  $(R_s > 1.5)$  were achieved for MP and EP that present similar molecular structures, with lower retention times and less broadened peaks. Peak symmetries were in the range of 1.04-1.82, and the high values are due to the relatively high sample volume (10  $\mu$ L) for the short column length. Another noteworthy behaviour observed in the separations with RP-amide was the high dependence on the mobile phase composition. A 5% alteration in the ratio of the organic component of the mobile phase halved the retention time and the peak width of the more retained analyte (PP), without losses in the resolution of the other peaks (MP and EP). This aspect is useful in the separation of polar compounds with similar properties and molecular structures, as slight changes in mobile phase composition result in significant alterations in the chromatographic performance. On the other hand, robustness of the procedure may become critical.

#### 3.2. Optimization

The RP-amide column was used to evaluate other system parameters that might affect the chromatographic performance. Higher retention times and more broadened peaks were

#### **Analytical Methods**

Table 1 Chromatographic parameters estimated for the different fused core particle columns^c

		MP	EP	PP	MP	EP	PP
Stationary phase Parameter		Water acetor (85 : 1	(pH 2. nitrile 5)	5)/	Water (pH 2.5)/ acetonitrile (80 : 20)		
Phenyl-hexyl	RT (min)	2.13	4.58	12.2	1.42	2.57	5.70
	PW (min)	0.78	1.25	3.27	0.47	0.63	1.35
	PS	1.48	1.28	1.10	2.05	1.56	1.27
	NTP	119	214	222	140	260	281
	PR	$1.42^{a}$	$1.98^{b}$	-	$1.22^{a}$	$1.85^{b}$	_
	HETP (µm)	4.22	2.34	2.26	3.56	1.92	1.78
C18	RT (min)	1.58	3.78	11.6	1.18	2.20	5.47
	PW (min)	0.92	1.41	3.47	0.47	0.59	0.91
	PS	1.36	1.28	1.01	2.22	1.59	1.34
	NTP	47.6	116	179	103	222	574
	PR	$1.12^{a}$	$1.89^{b}$	<u>12-10</u>	$1.14^{a}$	$2.57^{b}$	<u></u>
	HETP (µm)	105	43.1	27.9	48.5	22.5	8.71
F5	RT (min)	2.98	5.93	13.7	1.88	3.15	6.12
	PW (min)	1.28	1.89	3.92	0.75	0.96	1.72
	PS	1.20	1.18	1.16	1.51	1.33	1.28
	NTP	87.2	158	197	102	173	202
	PR	$1.10^{a}$	$1.59^{b}$		$0.88^{a}$	$1.31^{b}$	
	HETP (µm)	5.73	3.16	2.54	4.91	2.89	2.47
Stationary phase	Parameter	Water acetor (75 : 2	(pH 2. nitrile 5)	5)/	Water acetor (80 : 2	(pH 2. nitrile .0)	5)/
	and a second		1			1	
RP-amide	RT (min)	1.68	3.17	7.18	2.23	4.87	12.7
	PW (min)	0.42	0.60	1.30	0.55	0.93	2.47
	PS	1.50	1.66	1.28	1.82	1.23	1.04
	NTP	261	446	489	264	435	426
	PR	$1.72^{a}$	$2.49^{b}$	1-1-10	$2.09^{a}$	$2.73^{b}$	-
	HETP (µm)	1.91	1.12	1.02	1.90	1.15	1.17

<sup>*a*</sup> MP/EP. <sup>*b*</sup> EP/PP. <sup>*c*</sup> RT: retention time; PW: peak width measured at the peak base; PS: peak symmetry; NTP: number of theoretical plates; PR: peak resolution; HETP: height equivalent to a theoretical plate.



Fig. 3 Chemical structures of the stationary phases of the evaluated fused-core columns.

observed for lower flow rates because of the higher sample dispersion. Peak resolution was not critically affected at the maximum evaluated flow-rate (0.6 mL min <sup>1</sup>), because it is still

#### View Article Online

Paper

below the optimum flow-rate for fused-core columns according to the van Deemter equation.<sup>18</sup> Higher flow rates were not evaluated due to the limitation of the peristaltic pump and the backpressure promoted by the chromatographic column. In fact, 80 psi was necessary to maintain the flow rate at 0.6 mL min <sup>1</sup>.

Injection of higher sample volumes is an alternative to increase sensitivity in chromatography, but losses in peak resolution should be critically evaluated. These effects can be observed in Fig. 4, where even the highest evaluated sample volume did not hinder resolution of the two critical analytes (MP and EP). As sensitivity was not critical due to the relatively high parabens concentrations in personal care products, the sample volume was selected as 10  $\mu$ L.

#### 3.3. Analytical features and application

The low-pressure chromatographic procedure presented a linear response within 1.0 and 5.0 mg L  $^{-1}$  for MP (A = 0.0479  $\pm$  0.0010C + 0.008  $\pm$  0.002), EP ( $A = 0.0287 \pm 0.0009C + 0.017 \pm 0.002$ ) and  $PP(A = 0.0153 \pm 0.0015C + 0.008 \pm 0.005)$  with linear correlation coefficients higher than 0.996. Limits of detection were estimated at 0.12, 0.21 and 0.39 mg L<sup>1</sup> for MP, EP and PP, respectively. Coefficients of variation for peak heights and retention times were lower than 3.5% and 4.1%, respectively, emphasising the repeatability of the separation process and the stability of the mobile phase flow rate. Compared to previously described procedures for the determination of parabens with chromatographic separation<sup>10,11,19-22</sup> (Table 2), the proposed system presents some advantages such as the lowest consumption of organic solvent, shorter analysis time compared to HPLC<sup>20,22</sup> and electrophoresis19 and lower coefficients of variation than those attained in FIC procedures.<sup>10,11</sup> The main advantage, in comparison to FIC systems using ultra-short columns, is the use of isocratic elution, which simplifies the manifold architecture.

Recoveries from 93% to 102% were estimated for parabens spiked to different samples of personal care products, thus demonstrating the absence of matrix effects. Samples were analysed using the proposed and a reference HPLC procedure<sup>15</sup>



Fig. 4 Influence of sample volume on the chromatographic separation of parabens (5.0 mg  $L^{-1}$ ).

 Table 2
 Analytical figures of merit for some procedures for the determination of parabens by different separation techniques

Procedure	Stationary phase	Organic solvent consumption (mL)	Analysis time (min)	CV (%)	Reference
FIC	Monolithic C18 (5 $ imes$ 4.6 mm)	1.9	3.3	0.65 - 1.80	10
FIC	Monolithic C18 (5 $\times$ 4.6 mm)	1.6	2.8	3.5-6.2	11
Capillary electrophoresis	Fused silica capillary		16.0	0.86 - 2.48	19
HPLC	C18 (125 $\times$ 4 mm i.d., 5 $\mu$ m)	21	40.0	1.53-3.23	20
HPLC	C8 (150 $\times$ 4.6 mm i.d., 5 $\mu$ m)	6.0	10.0	2.0 - 3.1	22
FIC	Fused-core RP-amide (5 $\times$ 4.6 mm, 2.7 $\mu m)$	1.4	8.0	2.9-3.5	This work

Table 3 Mean values (% w/w) and standard deviations for the determination of parabens in personal care products (n = 3) by the proposed procedure and HPLC

	Proposed procee	lure		Reference procedure <sup>15</sup>				
Sample	МР	EP	РР	МР	EP	PP		
Intimate lubricant 1	$0.34\pm0.01$	$0.41\pm0.03^a$	$0.39\pm0.02^a$	$0.32\pm0.01$	$0.40\pm 0.02^{a}$	$0.40\pm0.01^a$		
Intimate lubricant 2	$0.32\pm0.01$	$0.41\pm0.03^a$	$0.40\pm0.01^a$	$0.30\pm0.01$	$0.40\pm0.01^a$	$0.39\pm0.02^a$		
Intimate lubricant 3	$0.43 \pm 0.02$	$0.40\pm0.01^a$	$0.39\pm0.03^a$	$0.44 \pm 0.01$	$0.41\pm0.01^a$	$0.40\pm0.02^a$		
Insect repellent	$0.45\pm0.02$	_	_	$0.44\pm0.01$	—	_		
Ointment	$0.52\pm0.02$	$0.38\pm0.02^a$	$0.37\pm0.01^a$	$0.51\pm0.01$	$0.39\pm0.01^a$	$0.38\pm0.01^a$		
Wet wipe 1	$0.70\pm0.04$	-		$0.70\pm0.01$				
Wet wipe 2	$0.45\pm0.02$	<u></u>	2 <u></u>	$0.44 \pm 0.01$	( <u> </u>	<u>10 - 1</u>		
Wet wipe 3	$0.58\pm0.01$			$0.57\pm0.01$				
Wet wipe 4	$0.39\pm0.02^a$	$0.40\pm0.01^a$	$0.39\pm0.02^a$	$0.40\pm0.01^a$	$0.41\pm0.02^a$	$0.40\pm0.02^a$		
<sup>a</sup> Samples spiked with 0	.40% w/w of each pa	raben.						

for accuracy assessment (Table 3). Spikes of ethyl and propylparabens were also exploited to demonstrate the separation capability. Variances were not significantly different, and all results agreed at the 95% confidence level.

## 4. Conclusions

Pioneering exploitation of ultra-short fused-core columns for low-pressure chromatographic separations in FIA was proposed, and the developed analytical procedure was successfully applied to the determination of parabens in personal care products. The evaluation of different columns highlighted the importance of a suitable stationary phase to achieve efficient separations in FIC, as the chromatographic efficiency is limited by the short column length. The critical dependence of the mobile phase composition was demonstrated as well. The use of fused-core columns enhanced the potentialities of the system by increasing selectivity and also presented the potential to perform in-line sample treatment and derivatization steps by resorting to the multicommutation approach.

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Brazilian Agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 2011/06437-6 and 2011/ 23498-9), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). E. A. G. Zagatto is thanked for the critical comments. This is a contribution of the National Institute of Advanced Analytical Science and Technology (INCTAA) and Núcleo de Pesquisa em Tecnologia e Inovação para Sustentabilidade na Agricultura.

#### References

- 1 O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C. P. B. Martins and P. Lucci, *J. Chromatogr. A*, 2012, **1228**, 298–323.
- 2 D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš and R. Karlíček, Anal. Chim. Acta, 2003, 499, 205–214.
- 3 P. Chocholouš, L. Kosařová, D. Šatínský, H. Sklenářová and P. Solich, *Talanta*, 2011, 85, 1129–1134.
- 4 J. J. Kirkland, S. A. Schuster, W. L. Johnson and B. E. Boyes, *J. Pharm. Anal.*, 2013, **3**, 303–312.
- 5 A. Cavazzini, F. Gritti, K. Kaczmarski, N. Marchetti and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 5972–5979.
- 6 F. Gritti, A. Cavazzini, N. Marchetti and G. Guiochon, J. Chromatogr. A, 2007, 1157, 289–303.
- 7 A. D. Batista, P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich and F. R. P. Rocha, *Talanta*, 2014, DOI: 10.1016/ j.talanta.2014.07.056, in press.
- 8 J. R. Santos and A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **715**, 57–63.

Paper

**Analytical Methods** 

- 9 J. F. García-Jiménez, M. C. Valencia and L. F. Capitán-Vallvey, Anal. Chim. Acta, 2007, 594, 226–233.
- 10 J. García Jiménez, M. C. Valencia and L. Capitán-Vallvey, J. Anal. Chem., 2010, 65, 188–194.
- 11 J. B. Claver, M. C. Valencia and L. F. Capitán-Vallvey, *Talanta*, 2009, **79**, 499–506.
- 12 E. Rodenas-Torralba, F. R. P. Rocha, B. F. Reis, A. Morales-Rubio and M. Guardia, *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, 2006, 20384.
- 13 A. D. Batista, C. F. Nascimento, W. R. Melchert and F. R. P. Rocha, *Microchem. J.*, 2014, **117**, 106–110.
- 14 L. L. Ng, US FDA Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Method, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1993.

- 15 B. Ebrahimpour, Y. Yamini and A. Esrafili, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **751**, 79–85.
- 16 P. Tzanavaras, T. Karakosta, P. Rigas, D. Themelis and A. Zotou, *Cent. Eur. J. Chem.*, 2012, **10**, 1459–1463.
- 17 N. R. Cha, J. K. Lee, H. J. Jeong, J. C. Cho, M. J. Kim and S. Y. Lee, Anal. Lett., 2012, 45, 2148–2160.
- 18 F. Gritti and G. Guiochon, J. Chromatogr. A, 2013, 1302, 1-13.
- 19 U. D. Uysal and T. Güray, J. Anal. Chem., 2008, 63, 982-986.
- 20 L. Labat, E. Kummer, P. Dallet and J. P. Dubost, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, 23, 763-769.
- 21 A. Myint, Q. Zhang, L. Liu and H. Cui, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 517, 119–124.
- 22 Q. Zhang, M. Lian, L. Liu and H. Cui, Anal. Chim. Acta, 2005, 537, 31–39.

View Article Online

Paper

#### Talanta 🖩 (■■■) ■■■-■■■



#### Contents lists available at ScienceDirect

## Talanta

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

## On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography

Alex D. Batista<sup>a</sup>, Petr Chocholouš<sup>b,\*</sup>, Dalibor Šatínský<sup>b</sup>, Petr Solich<sup>b</sup>, Fábio R.P. Rocha<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, P.O. Box 96, 13400-970 Piracicaba SP, Brazil
<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University in Prague, Heyrovského 1203, Hradec Králové, Czech Republic

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 15 December 2013 Received in revised form 14 July 2014 Accepted 21 July 2014

Keywords: SPE-SIC Sequential Injection Chromatography Pentafluorophenylpropyl F5 Fused core Sulfonamides On-line SPE Anion-exchange

#### ABSTRACT

On-line sample pretreatment (clean-up and analyte preconcentration) is for the first time coupled to sequential injection chromatography. The approach combines anion-exchange solid-phase extraction and the highly effective pentafluorophenylpropyl (F5) fused-core particle column for separation of eight sulfonamide antibiotics with similar structures (sulfathiazole, sulfadinalmide, sulfacetamide, sulfadiazine, sulfadimidine, sulfadimethoxazole and sulfadimethoxine). The stationary phase was selected after a critical comparison of the performance achieved by three fused-core reversed phase columns (Ascentis<sup>®</sup> Express RP-Amide, Phenyl-Hexyl, and F5) and two monolithic columns (Chromolith<sup>®</sup> High Resolution RP-18 and CN). Acetonitrile and acetate buffer pH 5.0 at 0.60 mL min<sup>-1</sup> were used as mobile phase to perform the separations before spectrophotometric detection. The first mobile phase was successfully used as eluent from SPE column ensuring transfer of a narrow zone to the chromatographic column. Enrichment factors up to 39.2 were achieved with a 500  $\mu$ L sample volume. The developed procedure showed analysis time < 10.5 min, resolutions > 1.83 with peak symmetry  $\leq$  1.52, LODs between 4.9 and 27  $\mu$  L<sup>-1</sup>, linear response ranges from 30.0 to 1000.0  $\mu$  L<sup>-1</sup> ( $r^2 > 0.996$ ) and RSDs of peak heights <2.9% (n=6) at a 100  $\mu$  L<sup>-1</sup> level and enabled the screening control of freshwater samples contaminated at the 100  $\mu$  g L<sup>-1</sup> level. The proposed approach expanded the analytical potentiality of SIC and avoided the time-consuming batch sample pretreatment step, thus minimizing risks of sample

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

talanta

#### 1. Introduction

Aiming multidetermination, sequential injection analysis (SIA) was coupled with chromatographic monolithic columns, introducing the sequential injection chromatography (SIC). This approach combines the versatility of SIA for solutions handling with the potential of chromatography for highly efficient separations [1]. Monolithic columns, which operate at pressures within 300–750 psi, were until recently the only option for SIC separations. The major hindrance was the lack of different stationary phases, being the RP-C18, RP-C8 and silica phases, the only commercially available options.

The introduction of chromatographic columns with fused-core particle technology increased the applicability of SIC [2]. These columns are filled by 2.7-µm diameter solid fused-silica core

http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056 0039-9140/@ 2014 Elsevier B.V. All rights reserved. particles which 1.7- $\mu$ m core is impermeable to the mobile phase (as well as to the analytes) and a 0.5- $\mu$ m thick layer shell of porous silica gel that acts as stationary phase. Thus, the mobile phase has shorter diffusion path in the particle, which reduces axial dispersion of the analytes and minimizes peak broadening. Short fusedcore particle columns with lower dead volumes then provides better separation performance than longer monolithic columns [2] and it is possible to exploit different commercially available stationary phases to improve selectivity [3].

The F5 stationary phase is composed by pentafluorophenylpropyl groups that provide a stable, reversed-phase packing with electron-deficient phenyl rings due to the presence of electronegative fluorines, which can retain compounds by forming p-p and polar interactions [4]. This phase exhibits higher ion-exchange character compared to its alkyl counterparts (*i.e.* C18 and C8) and thus it provides excellent chromatographic separations of analytes with different ionization grades. Then, F5 columns can show a dual-mode retention (reversed-phase and hydrophilic interaction).

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: petr.chocholous@faf.cuni.cz (P. Chocholouš).

A.D. Batista et al. / Talanta 🛚 (■■■) ■■■-■■■

As sulfonamides are widely used for treatment of bacterial infections in human and animals, there is a growing concern about their effect in the environment [5–7] and food [8,9]. Because the organism poorly absorbs antibiotics, most of them are excreted in the unchanged form through urine and feces to water bodies. The US Geological survey has found that up to 20% of the surface water is contaminated by sulfonamides [10] and even low levels of these substances can favor the proliferation of resistant bacteria. High performance liquid chromatography (HPLC) with detection by spectrophotometry or mass spectrometry are the main techniques used for the analysis of sulfonamides in environmental matrices [7,11–17]. These procedures are often time-consuming and require highly sophisticated and expensive equipment. For screening of environmental contamination, simpler, portable and less expensive approaches are needed.

2

Because sulfonamides are found in environmental samples at low concentrations, analyte preconcentration is often required before analysis. This is a critical step, which is susceptible to losses of analyte and external contaminations. The procedures usually require high volumes of samples and organic solvents, often including solvent evaporation and sample reconstitution in the mobile phase. When solid-phase extraction (SPE) is used, the cartridges are usually discarded after a single use, which increases waste generation and analysis cost.

The column-switching approach allows the selective on-line transfer of analytes from the first column (sample pretreatment) to the second one (chromatographic column). It automates the analytical process, with improvements in precision and sample throughput. For sample pretreatment, typical SPE sorbents enable loading of large sample volumes (some milliliters) with high retention of the analytes but low retention of the matrix. A suitable eluent solution assures the transference of a narrow sample zone to the chromatographic column. This concept was introduced in HPLC almost three decades ago [18,19] and some applications were recently presented [20,21]. In spite of its inherent characteristics for solutions handling, this approach has not been exploited in SIC.

The aim of this work was to develop a two-step SPE–SIC method for on-line sample pretreatment before chromatographic separation of sulfonamides. To this aim, the performance of different



Fig. 1. Scheme of SIC setup with on-line SPE for determination of sulfonamides. SV1 and SV2: selection valves; SP: syringe pump; CC: chromatography column; SPE: extraction column; S: sample, Wash: 0.1 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>; Water: water; MP1: first mobile phase 1; MP2: second mobile phase 2; W: waste; D: spectrophotometric detector.

-				
-	3		0	
	<b>ca</b> .	U1		

Steps of the SPE-SIC control program for on-line extraction, preconcentration and separation of sulfonamides.

Action	Unit	Parameter
Aspiration of wash solution	Selection valve 1	Valve port 2
	Pump	Volume: 500 $\mu$ L/Flow rate: 50 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Dispense of wash solution to SPE column	Selection valve 1	Valve port 7
	Pump	Volume: 500 $\mu$ L/Flow rate: 10 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Aspiration of water	Selection valve 1	Valve port 4
	Pump	Volume: 500 $\mu$ L/Flow rate: 50 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Aspiration of sample	Selection valve 1	Valve port 5
	Pump	Volume: 500 $\mu$ L/Flow rate: 50 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Dispense of sample and water to SPE column	Selection valve 1	Valve port 7
	Pump	Volume: 700 $\mu$ L/Flow rate: 10 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Dispense to waste	Selection valve 1	Valve port 1
	Pump	Volume: 300 $\mu$ L/Flow rate: 50 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Aspiration of MP1	Selection valve 1	Valve port 8
	Pump	Volume: 3800 $\mu$ L/Flow rate: 70 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
	Selection valve 1	Valve port 7
Dispense of MP1 to SPE and CC	Selection valve 2	Valve port 7
	Pump	Volume: 3800 $\mu$ L/Flow rate: 10 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Aspiration of MP2	Selection valve 1	Valve port 6
	Pump	Volume: 2500 $\mu$ L/Flow rate: 70 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Dispense of MP2 to SPE and CC	Selection valve 1	Valve port 7
	Pump	Volume: 2500 $\mu$ L/Flow rate: 10 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Aspiration of MP1	Selection valve 1	Valve port 8
	Pump	Volume: 2500 $\mu$ L/Flow rate: 70 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )
Dispense of MP to SPE and CC	Selection valve 1	Valve port 7
	Pump	Volume: 2500 $\mu$ L/Flow rate: 10 ( $\mu$ L s <sup>-1</sup> )

#### A.D. Batista et al. / Talanta = (====) ====

monolithic and fused-core particle columns was critically evaluated. An on-line SPE procedure was for the first time implemented in SIC for sample clean-up and analyte preconcentration.

#### 2. Experimental

#### 2.1. Apparatus

A SIChrom<sup>TM</sup> instrument (FIAlab<sup>®</sup> Instruments, Bellevue, WA, USA) equipped with an S17 PDP syringe pump with a 4.0 mL reservoir (Sapphire<sup>TM</sup> Engineering, MA, USA) and two 8-port highpressure stainless-steel selection C5H valves (Valco Instrument Co., Houston, TX, USA) were used in the presented work. The flow lines were made of 0.25 mm and 0.50 mm i.d. PEEK tubing. The manifold was coupled to an USB4000 fiber-optic CCD UV-vis detector (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA), with a DH-2000 deuterium UV light source (Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) and SMA connector ended optical fibers with a core diameter of 600 µm (CeramOptec<sup>®</sup>, East Longmeadow, MA, USA). Measurements were carried out in an Ultem® micro-volume 9-µL Z-flow cell with a 20-mm optical path (FIAlab®, Bellevue, WA, USA). In one of the pump outlets, an Alltech AP19258 1/16" (Czech Republic) manometer with 0-3000 psi gauge and a system pressure safety 750-psi relief valve were mounted, which enabled realtime monitoring of the system pressure and to set the pressure limit of the system. The whole SIC system was controlled by a PC equipped with FIAlab® 5.9 software (FIAlab® Instruments, Bellevue, WA, USA).

Chromatographic separations were performed on three fusedcore particle reversed phase columns with different stationary phases: RP-Amide, Phenyl-Hexyl, and F5 (Ascentis<sup>®</sup> Express, 30 mm × 4.6 mm, core-shell particle size 2.7  $\mu$ m, Supelco, USA) and two monolithic columns with High Resolution RP-18 and CN (Chromolith<sup>®</sup> 50 mm x 4.6 mm, Merck, Germany) stationary phases. Three different SPE anion-exchange resins were evaluated: 2-diethylamino-ethyl (Iontosorb DEAE, 80–100  $\mu$ m particle, Czech Republic), aminopropyl (Applied Separations, Spe-ed cartridge, USA) and 3-trimethylamino-2-hydroxypropyl (Iontosorb TMAHP, 80–100  $\mu$ m particle, Czech Republic) packed into a Cheminert<sup>®</sup> column with 20 mm length and 1.6 mm i.d. (VICI Valco Instruments, TX, USA). All measurements were performed at ambient temperature (25 °C).

#### 2.2. Reagents and solutions

Analytical grade chemicals (from Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) and ultrapure water (Millipore<sup>TM</sup>, Czech Republic) were used throughout the experiments. Reference solutions were prepared from sulfanilamide (SAD), sulfacetamide (SCT), sulfadiazine (SDZ), sulfathiazole (STZ), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SDM), sulfamethoxazole (SMX) and sulfadimethoxine (SDT) with purity  $\geq$  98%. Stock 1.0 g L<sup>-1</sup> solutions were prepared in methanol and stored at 5 °C. Working standard solutions with eight sulfonamides were daily prepared in the first mobile phase. A 10.0 mg L<sup>-1</sup> solution of each sulfonamide was used for optimization of the chromatographic separation and evaluation of the different columns. Optimization of the SPE step was performed with an 1.0 mg L<sup>-1</sup> solution was used for washing and conditioning the SPE column.

Table 2

Characterization of the SIC process performed on monolithic and fused core particle columns.

	Stationary phase	SAD	SCT	SDZ	STZ	SMR	SDM	SMZ	SDT		
Retention time (min)	RP-18	1.87	2.78	-	3.87	-	-	-1	1-		
	CN	1.62	2.07	-	2.95	-	-	-1	1-		
	RP-Amide	0.93	1.93	-	3.88	-	-	- 1	1-		
	Phenyl-Hexyl	0.98	1.90	2.53	3.27	3.68	5.22	7.36	8.16		
	F5	1.08	2.23	2.65	3.23	3.73	4.82	7.79	8.44		
Peak symmetry	RP-18	1.78	1.55	-	1.44		~	-			
	CN	1.36	1.67	-	1.46	-	-	-	-		
	RP-Amide	1.43	1.09	-	1.10	-	-	-	-		
	Phenyl-Hexyl	1.55	1.28	1.22	1.20	1.10	1.07	1.30	1.23		
	F5	1.52	1.31	1.29	1.20	1.10	1.13	1.46	1.26		
Peak resolution	RP-18	2.91 <sup>a</sup>	3.20 <sup>b</sup>	-	-	-	-	- 1	-		
	CN	1.83ª	2.97 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-1	1-		
	RP-Amide	4.51 <sup>a</sup>	5.34 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-1	-		
	Phenyl-Hexyl	4.31 <sup>a</sup>	2.39 <sup>b</sup>	2.26°	1.13 <sup>d</sup>	3.30°	6.23	3.52 <sup>g</sup>			
	F5	5.09 <sup>a</sup>	1.64 <sup>b</sup>	2.07 °	1.54 d	2.48 °	8.53 <sup>r</sup>	3.51 <sup>g</sup>	-		
Number of theoretical plates	RP-18	1944	3027	~	6153	~	-	-	1.5		
	CN	2260	2862	-	3624	-	-	-	1.0		
	RP-Amide	1202	2527	-	3144	-	-	-	-		
	Phenyl-Hexyl	1310	3427	3055	4268	3987	4388	N/A	N/A		
	F5	1380	3547	4994	4977	5575	3741	N/A	N/A		
Height equivalent to a theoretical plate (µm)	RP-18	25.72	16.51	-	8.13	-	-	-1	-		
	CN	22.11	17.46	-	13.79	-	-	-1	1		
	RP-Amide	22.32	12.68	-	10.15	-	-	-	-		
	Phenyl-Hexyl	22.90	8.76	9.82	7.03	7.52	6.84	N/A	N/A		
	F5	21.75	8.46	6.01	6.03	5.38	8.02	N/A	N/A		

a SAD/SCT.

° SDZ/STZ.

d STZ/SMR.

e SMR/SDM. SDM/SMZ.

8 SMZ/SDT.

Please cite this article as: A.D. Batista, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> SCT/SDZ.

#### A.D. Batista et al. / Talanta = (

The chromatographic separation was initially evaluated under isocratic conditions. The mobile phases were composed by acetonitrile and diluted acetic acid (pH 3.0), whose exact ratio depended on the column used: acetic acid/acetonitrile (90/10, v/v) for the Phenyl-Hexyl, F5 and RP-18 columns; 95/5 (v/v) for the RP-Amide and 98/2 (v/v) for the CN column.

The separation of the eight sulfonamides by F5 fused-core particle column was performed under gradient elution: 0.1 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer pH 5.0/acetonitrile (92/8) for 6.3 min (volume 3.8 mL) and then 0.1 mol L<sup>-1</sup> acetate buffer pH 5.0/ acetonitrile (75/25) until 10.5 min (volume 1.7 mL). The mobile phases were degassed before use by sonication for 5 min.

#### 2.3. Procedure

4

The SIC system (Fig. 1) was operated according to the sequence described in Table 1. Initially the SPE column was conditioned with water and NaHCO3 solution and then loaded with 500 µL of sample. The elution of the analytes from the SPE column was performed by the first mobile phase (acetate buffer pH 5.0/ acetonitrile, 92/8) which was also used for separation of six sulfonamides (SAD, SCT, SDZ, STZ, SMR, and SDM). Then the second mobile phase (acetate buffer pH 5.0 /acetonitrile, 75/25) was aspirated by the syringe pump and used for the chromatographic separation of the two sulfonamides that remained in the column after the elution with the first mobile phase (SMX and SDT). Detection was simultaneously carried out at 285 nm (absorption maximum for STZ) and 263 nm (absorption maximum for the other evaluated sulfonamides). Measurements were based on peak heights as in previous works with SIC [2,3]. The chromatographic parameters (retention time, peak symmetry, peak resolution, number of theoretical plates and height equivalent to a theoretical plate) were calculated from experimental data as recommended by FDA [22].

#### 3. Results and discussions

#### 3.1. Chromatographic characteristics

The chromatographic performance of five different columns was evaluated for the separation of eight sulfonamides. SAD, STZ and SCT were selected for the initial experiments to evaluate the chromatographic behavior of different stationary phases, by using the manifold presented in Fig. 1 with direct injection of the sample on the chromatographic column (*i.e.* without the SPE step). The chromatographic parameters for the different columns are shown in Table 2.

Columns with F5 and Phenyl-Hexyl stationary phases allowed the complete separation of the eight sulfonamides, whose structures and the respective pK<sub>a</sub> values are shown in Table 3 [23–25]. The F5 phase presented the best chromatographic characteristics among the tested columns (Resolution > 1.54, peak symmetry < 1.52 and HETP from 5.38 to 21.75  $\mu$ m for all species.) and it was used in the SPE-SIC procedure. The successful separation of the sulfonamides is not attributed only to the best physical properties of the columns (*i.e.* shorter diffusion path and partial porosity) but to the differential interactions with the analytes. Some of the sulfonamides in this study present similar substituents (*e.g.* SDZ and SMR, Table 3), which makes the chromatographic separation difficult and the selection of a proper stationary phase is then extremely important.

#### Table 3

Chemical structures and dissociation constants of analyzed sulfonamides.



#### 3.2. On-line solid-phase extraction

The SPE–SIC manifold presented in Fig. 1 enabled on-line transfer of a pre-treated sample to the chromatographic column, according to the steps showed in Table 1. Sulfonamides are amphoteric species with weakly basic and acid properties, which make feasible the use of anion-exchange for extraction and preconcentration. Three resins were evaluated to this aim, and their performance at different pH of sample and mobile phase is presented in Fig. 2.

The strongly basic anion-exchange resin with 3-trimethylamino-2-hydroxypropyl groups presented the best performance. The active site of this sorbent is a tertiary amine substituted by three methyl groups, which provide a positive charge to the nitrogen atom, increasing the affinity to the anionic sulfonamides. The weakly basic anion-exchange resin with 2-diethylamino-ethyl functional group did not yield good extraction efficiency due to the longer amine substituents that hinder the interaction with the anionic sulfonamides. The anion-exchange resin with aminopropyl group presented an intermediary performance because of its shorter substituents.

The sample pH critically affects the interaction of analytes with the active surface of SPE sorbent as observed in Fig. 2. Samples were maintained at pH 11.0 to keep the species at anionic form and increase the adsorption efficiency (see the  $pK_a$  values in Table 3). The first mobile phase was used for elution of the analytes and its pH controlled release of the analytes from the anion-exchange resin, forming a narrow zone for injection



Fig. 2. Comparison of SPE efficiency with different anion exchange resins at different pH of mobile phase and sample (A: pH 7–11; B: pH 3–5). 1: 2-diethylamino-ethyl resin; 2: aminopropyl resin; 3: 3-trimethylamino-2-hydroxypropyl resin.

on the chromatographic column, *i.e.* avoiding peak broadening. The best elution was observed at pH 5.0, in which all sulfonamides were predominantly at their non-charged form (see Fig. 2). The efficiency of the column switching can be observed in the chromatogram presented in Fig. 3, which shows that the SPE step did not hinder the chromatographic separation.

#### 3.3. Analytical features and application

Under the optimized conditions, the analytical characteristics of the proposed system were evaluated for eight sulfonamides (Table 4). Enrichment factors up to 39.2 were achieved even with only 500  $\mu$ L of the sample. Sulfanilamide presented a poor

enrichment factor because it is not predominantly dissociated in pH 11 (pK<sub>a</sub>=11.19). Wide linear working ranges were observed for all analytes. The developed procedure consumed just 900  $\mu$ L of organic solvent (acetonitrile) and 500  $\mu$ L of sample per analysis and avoid using organic solvent in the SPE step, thus following the trend to the development of more environmentally friendly procedures [26]. The complete analysis (including extraction, separation and column re-equilibration) of all analytes was achieved in 10.5 min. Characterization of separation process of sulfonamides spiked to freshwater samples (500  $\mu$ g L<sup>-1</sup> each) is showed in Table 5.

The analytical features were better in comparison to the achieved in previously described procedures (Table 6). A chromatographic procedure with batch SPE, for example, consumed



Fig. 3. Chromatogram obtained from the on-line SPE of a solution of sulfonamides (500  $\mu$ g L  $^{-1}$  each). Absorbance values measured at 263 nm (continuous line) and 285 nm (dashed lines).

1000 mL of sample and 33.0 mL of methanol for the separation of six sulfonamides using a 150 mm column [17]. Lower sample volume is needed for the single-drop liquid-liquid microextraction procedure, however, low reproducibility was reported due the mechanical instability of the drop [11]. Most of the reported works performed batch extraction procedures that have some drawbacks, as susceptibility to both analyte losses and contamination. In addition, this step is often ignored when the analysis time is estimated. The on-line SPE procedure is performed in a closed system that avoids these problems. The high enrichment factors achieved with a low sample volume and without hinder the sample throughput demonstrate the efficiency of the SPE step. It was achieved the highest concentration efficiency value (an enrichment factor of 11.2 can be achieved in one minute), demonstrating the improvement of sample throughput by on-line SPE. The low consumptive index in comparison to procedures listed in Table 6 demonstrates the feasibility of exploiting higher sample volumes to achieve higher enrichment factors.

Four spiked river water samples were analyzed to demonstrate the applicability of the on-line SPE–SIC procedure. Samples were spiked with the target compounds at  $100 \ \mu g \ L^{-1}$  which correspond to the high contamination of waters. The chromatograms obtained from the samples did not show any unknown peak, indicating that the SPE step was efficient for removing matrix components. Fig. 4 shows that SAD and SDM were quantitatively recovered, while SCT, STZ and SMR showed recoveries better than 80%. Low recoveries were observed for SDZ, SMX and SDT, which indicate that they can interact with matrix components (*e.g.* organic matter), interfering in the adsorption of the analytes on the anion-exchange resin. Low recoveries values for this species from freshwaters were previously observed on SPE procedures, even employing molecularly imprinted polymer as sorbent (recoveries from 37.6% to 61.0%) [27].

Table 4		
Analytical features of the on-line SPE and	chromatographic separation by SIC w	ith F5 fused core particle column

	Calibration equation <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Linear range ( $\mu$ g L $^{-1}$ )	LOD (µg L <sup>1</sup> )	RSD (%), n=6	Enrichment factor
SAD	$y = (1.850 \pm 0.027) \times 10^{-4} C - (1.361 \pm 0.102) \times 10^{-2}$	0.999	100-1000	27	2.5	2.90
SCT	$y = (5.847 \pm 0.089) \times 10^{-4}C - (0.741 \pm 0.200) \times 10^{-2}$	0.999	30-1000	9	2.8	34.2
SDZ	$y = (7.245 \pm 0.125) \times 10^{-4}C - (0.365 \pm 0.230) \times 10^{-2}$	0.999	30-1000	7.7	2.2	39.2
STZ	$y = (8.028 \pm 0.085) \times 10^{-4}C - (0.260 \pm 0.070) \times 10^{-2}$	0.999	30-1000	6.8	2.9	28.8
SMR	$y = (5.319 \pm 0.640) \times 10^{-4}C - (0.341 \pm 0.141) \times 10^{-2}$	0.996	30-1000	6.8	2.8	27.6
SDM	$y = (1.913 \pm 0.083) \times 10^{-4}C - (0.331 \pm 0.052) \times 10^{-2}$	0.999	100-1000	27	2.7	21.0
SMX	$y = (1.160 \pm 0.009) \times 10^{-3}C + (0.633 \pm 0.322) \times 10^{-2}$	0.998	30-1000	4.9	2.8	28.7
SDT	$y{=}(7.808\pm0.026){\times}10^{-4}C{-}(0.310\pm0.089){\times}10^{-2}$	0.998	30-1000	6.7	2.2	34.7

<sup>a</sup> y=peak height and C=sulfonamide concentration ( $\mu$ g L<sup>-1</sup>).

Characterization of separation	process of river water spik	ed with eight sulfonamide	antibiotics performed on SPE-SIC.

	SAD	SCT	SDZ	STZ	SMR	SDM	SMX	SDT
Retention time (min)	1.24	1.83	2.48	2.98	3.52	4.67	8.15	9.30
Peak symmetry	1.37	1.18	1.45	1.17	1.40	1.03	1.14	1.09
Resolution	6.25 <sup>a</sup>	5.04 <sup>b</sup>	3.07 <sup>c</sup>	3.13 <sup>d</sup>	7.14°	25.7 <sup>r</sup>	9.04 <sup>g</sup>	-
Retention factor	1.12	2.17	3.24	4.13	5.05	7.03	13.05	15.03

a SAD/SCT.

Table 5

f SDM/SMZ

8 SMZ/SDT.

Please cite this article as: A.D. Batista, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> SCT/SDZ.

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> SDZ/STZ. <sup>d</sup> STZ/SMR.

<sup>°</sup> SMR/SDM

Table 6

## ARTICLE IN PRESS

#### A.D. Batista et al. / Talanta 🛯 (■■■■) ■■■-■■■

7

nalytical	features	of some	procedures	for	sulfonamides	determination	in	water	samples	i,

Procedure	Chromatographic column	Analytes	Sample treatment	Analysis time (min)	Organic solvent consume (mL)	Sample consume (mL)	Consumptive index (mL) <sup>a</sup>	Concentration efficiency (min <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	RSD (%)	Reference
HPLC/UV	TC-C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 um)	6 sulfonamides	SD-LPME	10.0	3.4	15.0	0.25	3.0	< 8.2 (n=5)	[11]
HPLC/UV	Eclipse XDBC18 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)	3 sulfonamides	lonic liquid-salt aqueous two-phase extraction	15.0	3.2	9.0	-	-	< 3.2 (n=6)	[12]
UHPLC/DAD	Hypersil Gold C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9 $\mu$ m)	11 sulfonamides; 14 quinolines	DLLME	20.0	2.0	5.0	0.15	2.2	<1.7 ( <i>n</i> =5)	[13]
HPLC/UV	XTerra RP18 (4.6 mm × 250 mm, 5 µm)	8 sulfonamides	LLLME	35.0	5.2	12	0.040	9.9	< 5.3 (n=7)	[14]
HPLC/DAD/FLU	Eclipse XDB-C18 ( $3.0 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ , 3.5  um)	4 sulfonamides; 5 metabolites	HF-LPME	32.0	3.1	50.0	0.05	2.66	<1.8 (n=4)	[16]
LC/MS	Luna C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 um)	6 sulfonamides; trimethoprim	SPE	18.0	32.0	1000	1.0	3.0	<4.9 (n=10)	[17]
SIC/UV	Ascentis Express F5 (4.6 mm × 30 mm, 2.7 µm)	8 sulfonamides	On-line SPE	10.5 <sup>b</sup>	0.9	0.5	0.013	11.2	<2.9 (n=6)	This work

DLME-Dispersive liquid-liquid microextraction; HF-LPME-Hollow fiber based-liquid phase microextraction; LLLME-Liquid-liquid-liquid microextraction; SDME-Single drop-liquid phase microextraction.

<sup>a</sup> Values estimated for the sulfonamide with best analytical performance.

<sup>b</sup> Time elapsed for SPE plus SIC separation.



Fig. 4. Recoveries of sulfonamides from different river water samples after on-line SPE.

#### 4. Conclusions

A hyphenated two-step method using on-line SPE coupled to sequential injection chromatography was developed. The anionexchange resin with a tertiary amine group showed the best results for on-line SPE, by exploiting the acid-base properties of the analytes for sample loading and elution, and compatibility with chromatographic step. Fused-core and monolithic columns were compared in terms of separation efficiency in SIC. A F5 fused-core column achieved the complete separation of a mixture of eight sulfonamides with similar structure. This is the first report of the application of this sorbent on SIC and it demonstrates the need for proper selection of the stationary phase in chromatographic separation of closely related analytes. The procedure provided fast, fully automated SPE/chromatographic separation, with low consumption of organic solvent. The main advantages of the on-line SPE were reuse of the resin, increase of sample throughput as well as low risks of contaminations and analyte losses in comparison to the manual off-line methods of sample pretreatment. The developed procedure yielded suitable sample clean-up and recoveries of most of the sulfonamides spiked to freshwater samples. However, the detection limits achieved enabled only the screening of highly contaminated waters. Aiming the monitoring of sulfonamides at the concentrations typically found in freshwaters, further development will be focused on injection of higher sample volumes (*i.e.* some milliliters) to increase the enrichment factors as well as exploitation of more sensitive detectors, including fluorescence and mass spectrometry.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP (proc. 2012/14950-8, 2011/06437-6) and of the Charles University in Prague - project UNCE 204026/2012.

#### References

- D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 205–214.
   P. Chocholouš, L. Kosařová, D. Šatínský, H. Sklenářová, P. Solich, Talanta 85
- P. Chocholouš, L. Kosařova, D. Satinský, H. Sklenářova, P. Solich, Talanta 85 (2011) 1129–1134.
   P. Chocholouš, J. Vacková, I. Šrámková, D. Šatínský, P. Solich, Talanta 103 (2013)
- [4] S.R. Needham, P.M. Jeanville, P.R. Brown, E.S. Estape, J. Chromatogr. B 748
- (2000) 77–87.
   Y. Huang, M. Cheng, W. Li, L. Wu, Y. Chen, Y. Luo, P. Christie, H. Zhang, Anal. Methods 5 (2013) 3721–3731.
- [6] M.J. García-Galán, S. Díaz-Cruz, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1275 (2013) 32–40.

#### A.D. Batista et al. / Talanta 🗉 (■■■) ■■■-■■■

- [7] M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich, Anal. Chim. Acta 649 [7] M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich, Anal. Chim. Acta 649 (2009) 158–179.
  [8] S. Gao, H. Jin, J. You, Y. Ding, N. Zhang, Y. Wang, R. Ren, R. Zhang, H. Zhang, J. Chromatogra. A 1218 (2011) 7254–7263.
  [9] X. Huang, L. Chen, M. Chen, D. Yuan, S. Nong, J. Sep. Sci. 36 (2013) 907–915.
  [10] D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, H.T. Buxton, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 1202–1211.
  [11] X. Guo, D. Yin, J. Peng, X. Hu, J. Sep. Sci. 35 (2012) 452–458.
  [12] J. Han, Y. Wang, Y. Liu, Y.F. Li, Y. Lu, Y.S. Yan, L. Ni, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 1245–1255.
  [13] A.V. Herrera-Herrera, I. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-

- (2013) 1240-1255.
  [13] AV. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.Á. Rodríguez-Delgado, J. Pharm. Biomed. 75 (2013) 130-137.
  [14] C.Y. Lin, S.-D. Huang, Anal. Chim. Acta 612 (2008) 37-43.
  [15] M. Vosough, H. Mashhadiabbas Esfahani, Talanta 113 (2013) 68-75.
  [16] M. Ramos Payán, M.Á.B. López, R. Fernández-Torres, M.V. Navarro, M.C. Mochón, J. Chromatogr. B 879 (2011) 197-204.

- [17] N. Le-Minh, R.M. Stuetz, S.J. Khan, Talanta 89 (2012) 407-416.
- [18] H. Gu, Y. Huang, M. Filgueira, R.W. Carr, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6675–6687.
   [19] P. Jandera, J. Chromatogr. A 1255 (2012) 112–129.
- [20] I. Brabcová, M. Hlaváčková, D. Šatínský, P. Solich, Food Chem. 141 (2013)
- [20] I. Statioský, H. Havliková, P. Solich, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 6583–6587.
   [21] D. Šatínský, L. Havliková, P. Solich, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 6583–6587. [21] D. SHUDNY, L. FRANKLY, R. SARCH, AND DOMING CONTROL (2007) Construction of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), (1994).

- [23] C.-E. Lin, C.-C. Chang, W.-C. Lin, J. Chromatogr. 768 (1997) 105–112.
   [24] K.Y. Tam, K. Takács-Novák, Anal. Chim. Acta 434 (2001) 157–167.
   [25] L. Geiser, Y. Henchoz, A. Galland, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, J. Sep. Sci. 28
- [20] L. Gersa, F. Henrich, F. Gunani, F. F. Cartopi, J.-J. Ventey, J. Sep. 54, 26 (2005) 2374–2380.
   [26] W.R. Melchert, B.F. Reis, F.R.P. Rocha, Anal. Chim. Acta 714 (2012) 8–19.
   [27] M. Díaz-Álvarez, F. Barahona, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J. Chromatogr. A 1357 (2014) 158–164.

Please cite this article as: A.D. Batista, et al., Talanta (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056

Microchemical Journal 117 (2014) 106-110



#### Contents lists available at ScienceDirect

## Microchemical Journal



# Expanding the separation capability of sequential injection chromatography: Determination of melamine in milk exploiting micellar medium and on-line sample preparation $\stackrel{\leftrightarrow}{\approx}$



Alex D. Batista<sup>a</sup>, Carina F. Nascimento<sup>a</sup>, Wanessa R. Melchert<sup>b</sup>, Fábio R.P. Rocha<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, PO Box 96, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil
<sup>b</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, PO Box 9, 13418-970 Piracicaba, SP, Brazil

#### ARTICLE INFO

Article history: Received 16 November 2013 Received in revised form 6 April 2014 Accepted 12 June 2014 Available online 20 June 2014

Keywords: Sequential injection chromatography Micellar chromatography Monolithic columns Melamine Milk

#### ABSTRACT

Silica, C8 and C18 monolithic column were the only option for separation on a sequential injection chromatography (SIC) system due its low-pressure operation. Therewith, the separation of molecules poorly retained by this stationary phase was a difficult task. This work presents the first use of micellar chromatography on a SIC system, with the applicability demonstrated by the determination of melamine in milk. The mobile phase was composed by aqueous sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and propanol (92.5:7.5). The adsorption of SDS monomers on the C18 stationary phase modified its chromatographic properties, enabling satisfactory melamine separation from the milk components. The sample pretreatment procedure was on-line implemented by dilution of the sample with SDS using a multiposition valve. Calibration equations obtained from melamine solutions prepared in different types of milk and water presented similar sensitivity, indicating absence of matrix effects. A linear response was observed within 2.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> of melamine with a detection limit estimated at 0.6 mg L<sup>-1</sup> and coefficients of variation at 2.9% (n = 6). The procedure was suitable for fast determination of melamine below the limits established by FDA and WHO (2.5 mg L<sup>-1</sup>), with minimized reagent consumption. Results for different milk samples agreed with those obtained by high performance liquid chromatography at the 95% confidence level.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Sequential injection chromatography (SIC) is based on sequential injection analysis systems coupled to short chromatographic monolithic columns to perform separations of simple mixtures, operating at low pressures (up to 250 psi) [1]. The main limitation of these systems was the lack of chemical variety of stationary phases, being silica, C8 and C18 the only commercially available options, which makes the separation of polar and closely related compounds a difficult task. Recently, the introduction of fused-core particle columns increased the applicability of SIC systems. They present similar symmetry and peak resolution to the monolithic columns but a lower height equivalent to a theoretical plate [2]. These columns can be operated at pressures higher than 250 psi but still lower than conventional columns and some chemically different stationary phases are available (e.g. amine, pentafluorophenylpropyl and phenyl-hexyl). Chocholouš et al. presented the use of fused-core particle columns

E-mail address: frprocha@cena.usp.br (F.R.P. Rocha).

with three different stationary phases (C18, amide and phenyl-hexyl) for the determination of phenolic acids [3]. The amide column provided the best chromatographic performance (peak symmetry  $\leq$  1.33, resolution  $\geq$  1.87, height equivalent to theoretical plate  $\leq$  10 µm), which demonstrates the potential of application of these new columns in comparison to conventional C18 monolithic phases used in SIC [3].

The chromatographic performance critically depends on chemical and physical characteristics of the stationary phase. The addition of surfactants to the mobile phase can change these properties, thus resulting on different selectivity to the analytes. This is due to the adsorption of the surfactant monomers to the stationary phase and to the formation of micelles in the mobile phase above the surfactant critical micellar concentration (CMC) [4]. The partitioning of the analyte between micelles, mobile and stationary phases depends on the nature and concentration of surfactants, as well as pH and ionic strength [5]. The use of aqueous surfactants solutions as mobile phases is a very attractive alternative due to their low toxicity, costs and environment impacts, although it is necessary the addition of small volume of an organic solvent to the micellar phase to improve resolution [6]. All these features make the micellar chromatography a good option to expand the separation capability of SIC. This artifice increases the possibilities to perform

<sup>🕆</sup> Paper presented at the Brazilian Congress on Analytical Chemistry.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2014.06.015 0026-265X/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

separations at low pressures of analytes that would be hardly achieved by the C18 phases of monolithic columns.

Melamine is a toxic triazine, used in the manufacture of plastics, resins, and adhesives because of their thermotolerant properties [7,8]. It is also used as a milk adulterant due to its high nitrogen content (66.7% w/w) and low cost [7]. The addition of melamine at 1% (w/w) increases the apparent protein content of feed in 4% [9]. Melamine has a low oral toxicity, but excessive exposure causes formation of kidney stones and bladder; children being more affected due to the immaturity of their organs [10]. In 2008 in China and the United States were found the main cases of melamine adulteration in milk and pet food, respectively, leading to death in children and small animals [11]. The World Health Organization [12] and the US Food and Drugs Administration [13] established daily intake limits for melamine by adults and children as 2.5 and 1.0 mg kg<sup>-1</sup> of body weight, respectively, as well as the threshold limit of 2.5 mg L<sup>-1</sup> in milk.

The adulteration of milk by melamine cannot be detected by conventional methods, such as Kjeldahl [14] and Dumas [15], which do not differentiate proteic and non-proteic nitrogen. Several procedures for determination of melamine in different matrices have been developed in which the main group is based on high performance liquid chromatography (HPLC) [16–21]. Other procedures have exploited capillary electrophoresis [16,22], cation-exchange chromatography [23], gas chromatography coupled to mass spectrometry [10], voltammetry [22], MALDI-TOF [24], chemiluminescence [25,26], immunoassays [27], Raman [7] or fluorescence [28] spectrometry. These procedures generally involve time-consuming sample preparation, including extraction and preconcentration steps, in addition to the high consumption of organic solvents.

The objective of this work was to expand the separation capability of SIC by exploiting micellar chromatography. The approach was applied for determination of melamine in milk exploiting on-line sample preparation.

#### 2. Experimental

#### 2.1. Apparatus

A SIChrom<sup>™</sup> equipment (FIAlab Instruments®, Bellevue, WA, USA) with an 8-port high-pressure stainless-steel selection C5H valve (Valco Instrument Co., Houston, TX, USA) and an S17 PDP syringe pump (Sapphire<sup>™</sup> Engineering, MA, USA) with a 4.0 mL reservoir was used to develop the present work. All tubes were of PEEK with 0.25 mm i.d. The detection system was a multi-channel CCD spectrophotometer (model USB4000, Ocean Optics®, Dunedin, FL, USA), with a deuterium light source (model DH-2000, Ocean Optics®) and optical fibers with a core diameter of 600 µm and SMA connectors ended (CeramOptec®, East Longmeadow, MA, USA). The spectrophotometer was coupled to a Z-flow cell with 9 µL inner volume and 20-mm optical path (FIAlab Instruments®). The SIC system was controlled by a microcomputer equipped with FIAlab® 5.9 software. The chromatographic separations were performed on a monolithic column (Phenomenex® Onyx™, monolithic C18, 50 mm length and 4.6 mm d.i.). A manometer was coupled to the SIC system for pressure monitoring during the chromatographic separations.

#### 2.2. Chemicals and solutions

All solutions were prepared in ultrapure water (18 M $\Omega$  cm). Melamine stock solution (Merck, Germany) was prepared by dissolving 100.0 mg of the reagent in ca. 40 mL of water at 40 °C and diluting up to 100 mL Reference working solutions were daily prepared from dilutions of the stock in milk or water. The evaluation of the chromatographic performance was carried out at isocratic elution conditions. The mobile phase was composed by 0.05 mol L<sup>-1</sup> sodium dodecyl sulphate (Merck, Germany, 99% purity) prepared in 1.0 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer (Merck, Germany) at pH 3.0 plus 7.5% ( $\nu/\nu$ ) 1-propanol (Merck, Germany). This solution was degassed before use by sonication for 5 min.

Different types of milk (whole, whole powdered, skimmed and semi-skimmed) were obtained at the local market. The powdered milk was prepared according to package instructions. Samples were analyzed without any pretreatment.

#### 2.3. Procedure

The SIC system (Fig. 1) was operated according to the routine described in Table 1. Initially the pump aspirated the mobile phase ( $S_1$ ) for conditioning the chromatographic column followed by the sequential aspiration of SDS ( $S_2$ ), sample ( $S_3$ ) and again SDS ( $10 \mu$ L each) to perform the on-line pretreatment. Then, the mixture was introduced into the monolithic column and detection was performed at 210 nm. Measurements were based on peak heights as in previous works with SIC [29] and carried out in triplicate. All experiments were performed at room temperature (25 °C).

#### 2.4. Reference procedure

The reference procedure for accuracy assessment was based on micellar chromatography as previously proposed [11], except for a short C18 chromatographic column ( $0.46 \times 10$  cm, 3.5 µm) and calibration performed in a milk sample medium to compensate matrix effects.

#### 3. Results and discussions

#### 3.1. Chromatographic conditions

Melamine is a hydrophilic compound that is poorly retained by typical reversed-phase columns (e.g. C18 or C8) [30]. An alternative to perform the chromatographic separation is the micelle mediated separation, which changes the properties of the original stationary phase. The chromatographic evaluation was performed by using an SDS aqueous solution containing propanol and phosphate buffer as mobile phase, which had its concentration optimized to achieve acceptable chromatographic resolution between melamine and the matrix components.

Separation by micellar liquid chromatography is based on the same components of a reversed phase liquid chromatography system, a polar mobile phase and a non-polar stationary phase. However, two different media compose the mobile phase: the micellar aggregates and the aqueous–organic solution that contains surfactant at the CMC levels, forming a microscopically heterogeneous media as represented in Fig. 2. Additionally, the stationary phase is modified by the interaction between the carbon chains of the surfactant monomers and the



Fig. 1. Diagram of the SIC system for melamine determination. SV: selection valve; SP: syringe pump; CC: monolithic chromatographic column; D: detection system; S1: mobile phase (0.05 mol  $L^{-1}$  SDS in 1.0 mmol  $L^{-1}$  phosphate buffer pH 3.0 plus 7.5% (v/v) 1propanol; S2: 0.2 mol  $L^{-1}$  SDS; S3: milk samples or reference solutions; W: waste vessel

#### A.D. Batista et al. / Microchemical Journal 117 (2014) 106-110

## 108 Table 1

Steps of the SIC control program for on-line sample preparation and separation of melamine.

Action	Unit	Parameter	
	Selection valve	Valve port 3	
Aspiration of mobile phase	Pump	Volume: 3850 µL/flow rate: 50 (µL s <sup>-1</sup> )	
	Selection valve	Valve port 4	
Aspiration of SDS	Pump	Volume: 10 µL/flow rate: 10 (µL s <sup>-1</sup> )	
	Selection valve	Valve port 5	
Aspiration of sample	Pump	Volume: 10 µL/flow rate: 10 (µL s <sup>-1</sup> )	
	Selection valve	Valve port 4	
Aspiration of SDS	Pump	Volume: 10 µL/flow rate: 10 (µL s <sup>-1</sup> )	
	Selection valve	Valve port 2	
Sample injection and chromatographic separation	Pump	Volume: 3880 $\mu L/flow$ rate: 10 ( $\mu L~s^{-1})$	

octadecyl phase. For these reasons, the surfactant concentration has a pronounced influence on the chromatographic process.

The SDS concentration on the mobile phase was evaluated from 0.01 to 0.15 mol  $L^{-1}$  (Fig. 3). At concentrations of 0.01 mol  $L^{-1}$  SDS (Fig. 3a), part of the stationary phase was not covered by the surfactant, as previously reported by Ruiz-Ángel [5]. The presence of free C18 chains conferred a non-polar characteristic to some sites that have low affinity by melamine, thus decreasing its retention time and hindering the separation from the milk matrix. At 0.05 mol  $L^{-1}$  SDS (Fig. 3b), all the stationary phase was covered by the surfactant, then presenting uniform chemical characteristics, which provided a satisfactory resolution. At this condition, the retention time was 5.6 min and resolution was 2.06 in relation to the closest matrix peak. Lower retention times were observed for higher SDS concentrations (Fig. 3c-d) due to the high density of micelles in the mobile phase that increases the probability of interaction of the melamine with the micelles. The effect is more pronounced for 0.15 mol L<sup>-1</sup> SDS, completely hindering the melamine separation (Fig. 3d). For 0.10 mol  $L^{-1}$  SDS, melamine retention time was 3.4 min and resolution was 2.65 in relation to the next matrix peak. Other peaks observed in the chromatograms refer to a mixture of species, mainly proteins from milk [11].

Micellar chromatography usually requires addition of low amounts of organic solvents to the mobile phase and propanol is the most common and efficient modifier. The propanol molecule compete with the surfactant monomer by the stationary phase and, consequently, its proportion on the mobile phase has an influence on the retention time and peak shape [5]. Excessive amounts of propanol can hinder the surfactant retention on C18. The proportion of propanol in the mobile phase was then optimized to achieve the best peak resolution, and the optimum proportion was defined as 7.5% (v/v).

#### 3.2. On-line sample preparation

The direct injection of milk samples into the micellar mobile phase increased system pressure to above 500 psi, which is incompatible to syringe pump used in the SIC system. In spite of complex procedures for preparation of milk samples [21], this can be efficiently carried out by direct sample dilution in a surfactant media and a 10-fold sample dilution in 0.05 mol L<sup>-1</sup> SDS was used in a previous study [11]. In the present work, sample preparation was on-line implemented using the multiposition selection valve by the aspiration of SDS solution and milk at different proportions and aliquot sequences. In addition and thus improve the melamine detectability. Suitable results were achieved by the aspiration of 0.2 mol L<sup>-1</sup> SDS solution, sample and an additional aliquot of SDS solution by using 10  $\mu$ L each.

The on-line sample pretreatment decreases the risks of contaminations because all processes are performed on a closed system, beyond the possibility of the direct sample injection in the SIC system without any pretreatment which also makes the procedure faster.

#### 3.3. Analytical features and application

Calibration equations were obtained by the injection of melamine solutions in water and different types of milk (r > 0.998): A = 0.0140C + 0.048 (water), A = 0.0135C + 0.046 (whole), A = 0.0140C + 0.010 (skimmed), A = 0.0125C + 0.081 (skimmed powdered), and A = 0.0140C + 0.051 (semi-skimmed), in which A is the absorbance value and C is melamine concentration in mg L<sup>-1</sup>. The equations presented similar slopes (coefficient of variation = 4.8%), without significant differences at 95% confidence level, indicating the absence of



Fig. 2. Representation of the solute (melamine) environment in micellar chromatography using C18-bonded silica as stationary phase.



Fig. 3. Comparison of chromatographic efficiency on different SDS concentrations: (A) 0.01 (B) 0.05; (C) 0.10 and (D) 0.15 mol L<sup>-1</sup>.

matrix effects and calibration curves obtained from aqueous solutions were then used for quantification of melamine. A linear response was observed within 2.0 and 6.0 mg L<sup>-1</sup> of melamine with a detection limit estimated at 0.6 mg L<sup>-1</sup> (95% confidence level) and coefficients of variation at 2.9% (n = 6). When peak areas were used instead of peak heights the coefficient of variation increased to 6.1%. The linear response range includes the limits established by regulatory agencies, i.e. 2.5 mg L<sup>-1</sup> [12,13].

Table 2 shows a comparison of analytical features of some HPLC procedures described on the literature for melamine determination in milk. The proposed procedure stands out as an environmental friendly alternative due to the replacement of toxic organic solvents and the lowest consumption of the mobile phase (only 50 mg of SDS and 300 µL of propanol per determination) as well as an increase of sample throughput in view of the lowest retention time. The linear range is relatively shorter, but the interval includes the threshold value for melamine in milk. Previously proposed procedures also require a time-consuming sample treatment [20,21]. In comparison to the HPLC procedure, the SIC procedure reduces the effluent volume from 15.0 to 3.9 mL per determination and the analysis time from 15.0 to 6.5 min [11]. Moreover, the proposed procedure involved the on-line sample preparation, decreasing contamination sources, risks of analyte losses and analysis time.

Results obtained for spiked milk samples agreed with those achieved by the HPLC reference procedure [11] (Table 3) which demonstrate the accuracy of the new SIC procedure at the 95% confidence level.

#### 4. Conclusions

The first use of micellar chromatography on a SIC manifold was reported and the developed procedure was successfully applied to the determination of melamine in milk. The use of micellar mobile phases increased the separation capabilities of the SIC systems, changing the stationary phase selectivity by the adsorption of surfactant monomers to the C18 substrate, resulting in a column with different chromatographic properties and still able to operate at low pressures. Because monolithic columns have limited options of stationary phases, the use of a micellar phase is a suitable option to expand its applicability. The developed procedure presented some advantages compared to previous works for melamine determination. It consumed reduced amounts of

Table 2

Analytical features of chromatographic procedures for melamine determination in milk.

Sample treatment	Analysis time (min)	Organic solvent consume per analysis (mL)	Linear range (mg L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Reference
Dilution with SDS and phosphate buffer pH 3	15.0	1.1	0.2-100	7.6 (n = 6)	[11]
SPE	15.0	58.5	0.8-80.0	1.22(n=6)	[16]
Dilution with acetonitrile:water (50:50, $v/v$ )	7.0	4.8	0.05-5.0	1.5-2.0	[17]
Dilution with acetonitrile	10.0	38.8	0.005-32.0	1.2-4.4 (n = 3)	[18]
SPE (1% trichloroacetic acid solution and 25% ammonia solution-methanol (1:20, v/v)	9.0	14.5	0.1-50	3.1 (n = 11)	[20]
SPE (ammonia solution-methanol (10:90, v/v) and water-methanol (1:1, v/v)	24.0	60.0	0.012-1.0	1.8-6.5 (n = 5)	[21]
On-line pretreatment with SDS	6.5	0.30	2.0-6.0	2.9(n=6)	This work

Mean values and uncertainties (standard deviations) for determination of melamine in spiked milk samples (n = 3) by the proposed procedure and HPLC [11].

Sample	Melamine (mg L <sup>-1</sup> )					
	SIC	HPLC	SIC	HPLC		
Whole UHT	$2.64 \pm 0.18$	$2.77 \pm 0.26$	$4.30 \pm 0.13$	$4.22 \pm 0.44$		
Pasteurized skimmed	$1.81 \pm 0.11$	$1.90 \pm 0.01$	$3.54\pm0.14$	$3.67 \pm 0.03$		
Whole powdered	$1.73 \pm 0.15$	$1.83 \pm 0.10$	$3.06 \pm 0.15$	$3.17 \pm 0.07$		
Semi-skimmed UHT Pasteurized skimmed 2	$\begin{array}{c} 2.12  \pm  0.10 \\ 2.09  \pm  0.22 \end{array}$	$\begin{array}{c} 2.04  \pm  0.39 \\ 1.95  \pm  0.01 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.60  \pm  0.17 \\ 3.03  \pm  0.12 \end{array}$	$\begin{array}{c} 3.42  \pm  0.20 \\ 3.14  \pm  0.10 \end{array}$		

organic solvent and surfactant, being then a greener alternative for melamine determination; it was the faster chromatographic separation, beyond the performance of an on-line sample pretreatment step that improves reproducibility, avoids contamination and risks of analyte losses.

#### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Brazilian Agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 2011/06437-6 and 2011/23498-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### References

- [1] D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček, Monolithic columns-a new concep of separation in the sequential injection technique, Anal. Chim. Acta. 499 (2003) 205-214
- [2] P. Chocholouš, L. Kosařová, D. Šatínský, H. Sklenářová, P. Solich, Enhanced capabilities of separation in sequential injection chromatography-fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column, Talanta 85 (2011) 129-1134
- [3] P. Chocholouš, J. Vacková, I. Šrámková, D. Šatínský, P. Solich, Advantages of core-shell particle columns in sequential injection chromatography for determination of phenolic acids, Talanta 103 (2013) 221-227.
- [4] M.J.R. Ángel, S.C. Broch, M.C.G.A. Coque, Chromatographic efficiency in micellar liquid chromatyraphy: School it be still a topic of concern 7 sep. Purif. Rev. 42 (2012) 1–27.
   M.J.R. Ángel, S.C. Broch, J.R.T. Lapasió, M.C.G.A. Coque, Retention mechanisms in mi-
- [6] M.E. Montgomery, M.J. Wirth, Spectroscopic study of the molecular basis of wetting of a C18 surface by long-chain n-alcohols, Anal. Chem. 66 (1994) 680–684.
- [7] N. Vasimalai, S.A. John, Picomolar melamine enhanced the fluorescence of gold
- nanoparticles: spectrofluorimetric determination of melamine in milk and infant formulas using functionalized triazole capped goldnanoparticles, Biosens. Bioelectron. 42 (2013) 267-272.
- [8] H.H. Yang, W.H. Zhou, X.C. Guo, F.R. Chen, H.Q. Zhao, L.M. Lin, X.R. Wang, Molecularly imprinted polymer as SPE sorbent for selective extraction of melamine in dairy products, Talanta 80 (2009) 821-825.

- [9] X. Cao, F. Shen, M. Zhang, J. Guo, Y. Luo, X. Li, H. Liu, C. Sun, J. Liu, Efficient inner filter effect of gold nanoparticles on the fluorescence of CdS quantum dots for sensitive detection of melamine in raw milk, Food Control 34 (2013) 221-229.
- [10] X.D. Pan, P.G. Wu, D.J. Yang, L.Y. Wang, X.H. Shen, C.Y. Zhu, Simultaneous determi-nation of melamine and cyanuric acid in dairy products by mixed-mode solid
- phase extraction and GC-MS, Food Control 30 (2013) 545-548.
   [11] M. Rambla-Alegre, J. Peris-Vicente, S. Marco-Peiró, B. Beltrán-Martinavarro, J. Esteve-Romero, Development of an analytical methodology to quantify melamine in milk using micellar liquid chromatography and validation according to EU Regulation 2002/654/EC, Talanta 81 (2010) 894–900. W.H. Organization, available at http://www.who.int (accessed October 10th, 2013).
- U.S.F.D.A, available at http://www.fda.gov (accessed October 10th, 2013)
- F. Sun, W. Ma, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, C. Peng, L. Wang, H. Kuang, C. Xu, Analytical methods and recent developments in the detection of melamine, Trends Anal. [14] Chem. 29 (2010) 1239-1249.
- T. Saint-Denis, J. Goupy, Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method, Anal. Chim. Acta. 515 (2004) 191–198. Y. Wen, H. Liu, P. Han, Y. Gao, F. Luan, X. Li, Determination of melamine in milk pow-
- [16] der, milk and fish feed by capillary electrophoresis: a good alternative to HPLC, J. Sci. Food Agric. 90 (2010) 2178-2182.
- A. Filazi, U.T. Sireli, H. Ekici, H.Y. Can, A. Karagoz, Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography, J. Dairy Sci. 95 (2012) 602–608. X.L. Zheng, B.S. Yu, K.X. Li, Y.N. Dai, Determination of melamine in dairy products by
- [18] HILC-UV with NH<sub>2</sub> column, Food Control 23 (2012) 245-250. Y.Y. Chao, C.T. Lee, Y.T. Wei, H.S. Kou, Y.L. Huang, Using an on-line microdialysis/
- [19] HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer, Anal. Chim. Acta. 702 (2011) 56-61.
- [20] H. Sun, L. Wang, L. Ai, S. Liang, H. Wu, A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high-performance liq-uid chromatography with solid-phase extraction, Food Control 21 (2010) 686–691.
- [21] A. Khedr, Optimized extraction method for LC-MS determination of bisphenol A, melamine and di(2-ethylhexyl) phthalate in selected soft drinks, syringes, and milk powder, J. Chromatogr. B 930 (2013) 98-103. C.Y. Guo, H.Y. Wang, X.P. Liu, L.Y. Fan, L. Zhang, C.X. Cao, Fast and selective determi-
- [22] nation of total protein in milk powder via tirration of moving reaction boundary electrophoresis, Electrophoresis 34 (2013) 1343–1351. S. Ono, T. Funato, Y. Inoue, T. Munechika, T. Yoshimura, H. Morita, S.-I. Rengakuji, C.
- Shimasaki, Determination of melamine derivatives, melame, meleme, ammeline and ammelide by high-performance cation-exchange chromatography, J. Chromatogr. A 815 (1998) 197-204
- X. Su, H.Y. Zhou, F.C. Chen, B.X. Gao, Z.W. Liu, Y.H. Zhang, F. Liu, F. Liu, Z.R. Li, Z.X. [24] Gao, Modified SBA-15 matrices for high-throughput screening of melamine in milk samples by MALDI-TOF MS, Int. J. Mass Spectrom. 338 (2013) 39-44.
- [25] H.J. Zeng, R. Yang, Q.W. Wang, J.J. Li, L.B. Qu, Determination of melamine by flow in-jection analysis based on chemiluminescence system, Food Chem. 127 (2011) 842-846.
- [26] J. Zhang, M. Wu, D. Chen, Z. Song, Ultrasensitive determination of melamine in milk products and biological fluids by luminol-hydrogen peroxide chemiluminescence, J. Food Compos. Anal. 24 (2011) 1038–1042.
- T.L. Fodey, C.S. Thompson, I.M. Traynor, S.A. Haughey, D.G. Kennedy, S.R.H. Crooks, Development of an optical biosensor based immunoassay to screen infant formula milk samples for adulteration with melamine, Anal. Chem. 83 (2011) 5012-5016.
- W. Feng, C. Lv, L. Yang, J. Cheng, C. Yan, Determination of melamine concentrations in dairy samples, LWT Food Sci. Technol. 47 (2012) 147-153. [28]
- [29] P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský, An overview of sequential injection chromatog-raphy, Anal. Chim. Acta. 600 (2007) 129–135.
- [30] Dionex, ThermoScientific, Rapid determination of melamine in liquid milk and milk powder by HPLC on the acclaim mixed-mode WCX-1 column with UV detection, Applicantion Note 221.

## 110 Table 3