




UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

Hifenaciones Instrumentales entre la
Cromatografía Líquida, Diferentes Sistemas
Detectores y Nuevos Métodos de
Pretratamiento de Muestra para la
Determinación de Vitaminas en Alimentos

**Dña. María de los Ángeles Bravo Bravo
2013**



**HIFENACIONES INSTRUMENTALES ENTRE LA
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, DIFERENTES SISTEMAS
DETECTORES Y NUEVOS MÉTODOS DE
PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA
DETERMINACIÓN DE VITAMINAS EN ALIMENTOS**

**Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Química**

Fdo.: MARÍA DE LOS ÁNGELES BRAVO BRAVO



D^a. Pilar Viñas López-Peigrín, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HIFENACIONES INSTRUMENTALES ENTRE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, DIFERENTES SISTEMAS DETECTORES Y NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS EN ALIMENTOS", realizada por D^a María Ángeles Bravo Bravo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Analítica, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 26 de Septiembre de 2013

Fdo.: Pilar Viñas López-Peigrín



D. Ignacio Francisco López García, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "HIFENACIONES INSTRUMENTALES ENTRE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, DIFERENTES SISTEMAS DETECTORES Y NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS EN ALIMENTOS", realizada por D^a María Ángeles Bravo Bravo, bajo mi inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Analítica, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 26 de Septiembre de 2013

Fdo.: Ignacio Francisco López García



D. Manuel Hernández Córdoba, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "HIFENACIONES INSTRUMENTALES ENTRE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, DIFERENTES SISTEMAS DETECTORES Y NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINAS EN ALIMENTOS" ha sido realizada por D^a María Ángeles Bravo Bravo, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a Pilar Viñas López-Peigrín y D. Ignacio Francisco López García y que el Departamento ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 27 de Septiembre de 2013

Fdo.: Manuel Hernández Córdoba

A mis padres

Agradecimientos

Durante todo este tiempo de trabajo científico son muchas las personas que han contribuido y participado en la realización de esta Tesis, ya sea a nivel profesional o personal, y a quienes desde aquí quiero mostrar mi más profunda gratitud ya que sin ellas hubiese sido del todo imposible finalizar con éxito este proyecto.

En primer lugar quiero agradecer al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia por su recibimiento y continua ayuda durante los tres años en los que he desarrollado con ellos mi labor investigadora. En especial a mis directores de Tesis, D^a Pilar Viñas López-Pelegrín y D. Ignacio López García, por todo el tiempo que me han dedicado, por sus sugerencias e ideas, por su apoyo permanente, por su inestimable consejo y experiencia. No me puedo olvidar tampoco de D. Manuel Hernández Córdoba y D^a Natalia Campillo Seva, siempre serviciales y de los que tanto he aprendido. Gracias por confiar en mí.

A la Fundación Séneca por el soporte económico que hizo posible el desarrollo de este estudio.

A mis compañeros, Gema, Nacho, María, Yésica, Ricardo, Nelson y Marisol, gracias por vuestros ánimos cuando los he necesitado, por vuestra guía cuando he estado perdida, por vuestra amistad.

A mis padres, Ángel y Pepita, y a mis hermanas, Jose y Nuria. Os quiero tanto aunque os lo diga tan poco. Gracias por vuestro apoyo incondicional.

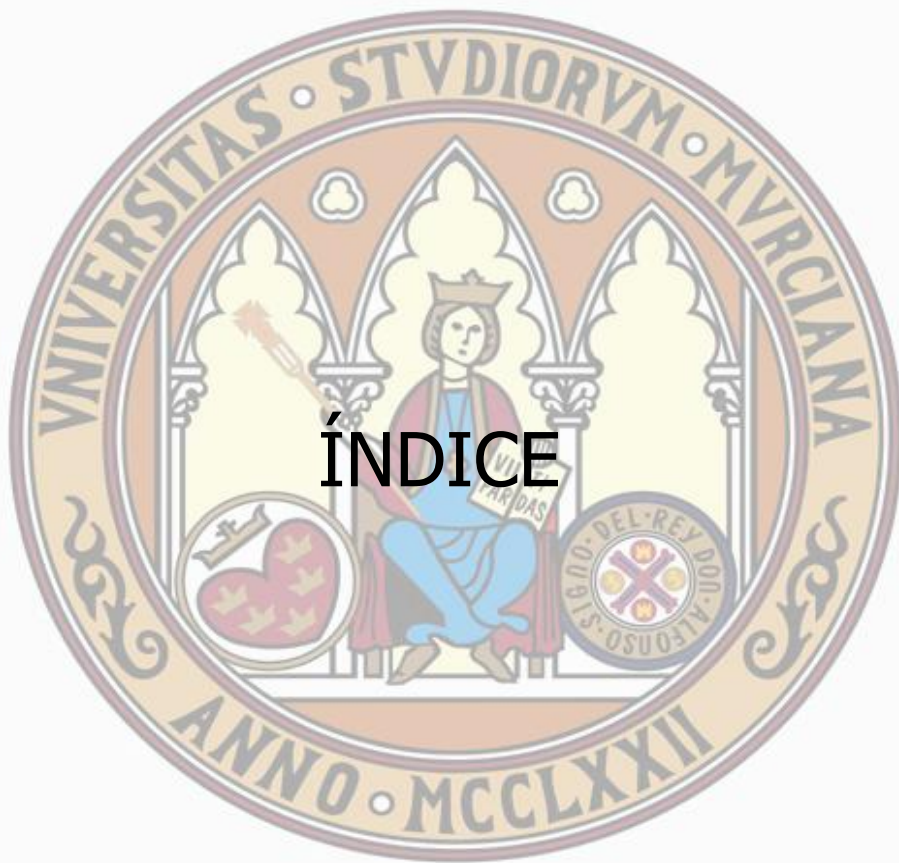
A Jose Ángel, por creer en mí, por compartir su vida conmigo.

A mi prima y ahijada, María de los Ángeles Martínez Bravo, por venir a alegrar mi vida...y la de todos.

Muchas gracias.

“Si te atreves a enseñar, nunca dejes de aprender” John Cotton Dana

Mi agradecimiento a la empresa HERO ESPAÑA, S.A. y al Instituto de Nutrición Infantil "INuI" por la donación de todas las muestras de alimentos infantiles que me han permitido llevar a cabo esta Tesis Doctoral y por su participación en el Plan de Ciencia y Tecnología de la Región de Murcia 2010-2013 a través del cual me fue concedida una Beca asociada a la Realización de Proyectos de I+D, Innovación y Transferencia de Tecnología (Programa Séneca 2010).



ÍNDICE

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	13
1. LAS VITAMINAS	15
1.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y LIPOSOLUBLES	15
1.2. LAS VITAMINAS EN LOS ALIMENTOS	17
1.2.1. Vitaminas y alimentos funcionales	19
1.2.2. Vitaminas y alimentos infantiles	23
2. ANÁLISIS DE ALIMENTOS	25
2.1. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS	29
2.2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS.....	36
2.3. ANÁLISIS DE VITAMINAS EN ALIMENTOS	37
3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	43
4. DERIVATIZACIÓN.....	47
5. LA QUÍMICA VERDE EN EL LABORATORIO CROMATOGRÁFICO	47
5.1. QUÉ ES QUÍMICA VERDE	48
5.2. QUÉ ES QUÍMICA ANALÍTICA VERDE	49
5.3. QUÉ ES CROMATOGRAFÍA VERDE.....	51
6. MINIATURIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA ANÁLISIS DE ALIMENTOS.....	57
7. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA	60
7.1. MICROEXTRACCIÓN EN GOTA SIMPLE	67
7.2. MICROEXTRACCIÓN EN GOTA SUSPENDIDA DIRECTAMENTE	70
7.3. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO–LÍQUIDO	72
7.3.1. Principios básicos.....	72
7.3.2. Parámetros que afectan en DLLME	75
7.3.3. Ecuaciones básicas	78
7.3.4. Hibridación de DLLME con otras técnicas analíticas	79
7.3.5. Aplicaciones de DLLME	83
7.4. MICROEXTRACCIÓN–EMULSIFICACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS	85

8. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	92
8.1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.....	93
8.2. EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN CON BARRAS AGITADORAS	95
9. NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS	97
9.1. LAS NANOPARTÍCULAS EN EL PROCESO ANALÍTICO	98
9.1.1. Purificación y preconcentración de analitos	99
9.1.2. Separaciones cromatográficas.....	100
9.1.3. Otras aplicaciones.....	100
9.2. NANOESTRUCTURAS DE CARBONO.....	101
9.2.1. Clasificación de las nanoestructuras de carbono	103
9.2.2. Nanoestructuras de carbono como herramientas analíticas	112
9.2.3. Propiedades de las nanoestructuras de carbono	114
9.2.4. Empleo de las nanopartículas de carbono para el tratamiento de la muestra	115
9.2.5. Extracción en fase sólida con nanopartículas de carbono.....	116
10. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	121
11. TÉCNICAS HIFENADAS. APLICACIONES EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS	123
11.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM.....	124
11.2. HIFENACIÓN EN LÍNEA CROMATOGRAFÍA–ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	126
11.3. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LÍNEA.....	127
11.4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN MULTIDIMENSIONAL	128
11.5. ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN MÚLTIPLE	129
11.6. HIFENACIÓN CROMATOGRAFÍA DE GASES–ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	133
12. LA HIBRIDACIÓN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA–ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	135
12.1. SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA	136
12.2. DESARROLLOS EN LAS INTERFASES PARA LC–MS.....	138
12.3. DESARROLLOS EN ANALIZADORES DE MASAS PARA LC–MS	144
12.4. APLICACIONES DE LC–MS EN CONTROL DE ALIMENTOS	149

13. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS	152
14. BIBLIOGRAFÍA	155

CAPÍTULO I. LOS NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED COMO ADSORBENTES EN EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA ESPECIACIÓN DE COBALAMINAS EN ALIMENTOS MARINOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ... **179**

CAPÍTULO II. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE TIAMINA EN ALIMENTOS **207**

CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE BENFOTIAMINA EN PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA **239**

CAPÍTULO IV. UNA EVALUACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE *CIS*- Y *TRANS*-RETINOL EN ZUMOS USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE..... **261**

CAPÍTULO V. CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO, RETINOL, ACETATO DE RETINOL Y PALMITATO DE RETINOL EN ZUMOS DE FRUTAS USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA..... **287**

CAPÍTULO VI. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA PARA EL ANÁLISIS DE LAS VITAMINAS D Y K EN ALIMENTOS USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO	317
CAPÍTULO VII. EXTRACCIÓN LÍQUIDA PRESURIZADA Y MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES EN ALIMENTOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA	349
CONCLUSIONES	383



ABREVIATURAS

AAS, espectrometría de absorción atómica

AED, espectrometría de emisión atómica

AOAC, asociación oficial de químicos analíticos

APCI, ionización química con presión atmosférica

API, ionización a presión atmosférica

APPI, fotoionización a presión atmosférica

ASE, extracción con disolventes acelerada

CAD, descarga en corona

CE, electroforesis capilar

CI, ionización química

CIAME, microextracción por agregación inducida por frío

CID, disociación por colisión inducida

CNO, nanocebollas de carbono

CNT, nanotubos de carbono

CZE, electroforesis capilar de zona

DAD, detector de diodos

DI, inmersión directa

DI-SPME, inmersión SPME

DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido

DLLME-SFO, microextracción dispersiva líquido-líquido basada en solidificación de una gota orgánica flotante

DSDME, microextracción en gota suspendida directamente

EF, factor de enriquecimiento

EI, impacto electrónico

ELSD, dispersión de luz con evaporación

ER, recuperación de extracción

ESI, ionización por electrospray

ETAAS, espectrometría de absorción atómica electrotérmica

EU, Unión Europea

FAAS, espectrometría de absorción atómica con llama

FET, transistores de efecto de campo

FID, detector de ionización de llama

FI, fluorescencia

FOSHU, alimentos para uso específico en salud

FT-IR, infrarrojo con transformada de Fourier

GC, cromatografía de gases

GFAAS, espectrometría de absorción atómica con horno de grafito

GPC, cromatografía de permeación en gel

HF, fibra hueca

HF-LPME, microextracción en fase líquida en fibra hueca

HFM, membrana de fibra hueca

HILIC, cromatografía de interacción hidrofílica

HPLC, cromatografía líquida de alta resolución

HS, espacio de cabeza

HSSE, extracción por adsorción en espacio de cabeza

HS-SDME, SDME en espacio de cabeza

HS-SPME, SPME en espacio de cabeza

ICR, resonancia de ion-ciclotrón

IL, líquido iónico

IT, trampa de iones

LC, cromatografía líquida

LIT, trampa de iones lineal

LLE, extracción líquido-líquido

LLPME, microextracción líquido-líquido-líquido

LLME, microextracción líquido-líquido

LOD, límite de detección

LOQ, límite de cuantificación

LPME, microextracción en fase líquida

MAE, extracción asistida por microondas

MRL, límite máximo de residuo

MS, espectrometría de masas

MS-MS, espectrometría de masas en tandem

MSPD, dispersión en fase sólida de la matriz

MWCNT, nanotubos de carbono de pared múltiple

NIST, Instituto Nacional de estándares y tecnología

OAD, diseño experimental de matriz ortogonal

ODS, octadecilo

OS, octilo

PBT, persistente, bioacumulativo y tóxico

PDMS, polidimetilsiloxano

PF, factor de preconcentración

PLE, extracción líquida presurizada

Q, cuadrupolo

QIT, trampa de iones cuadrupolar

QqQ, cuadrupolo triple

QqTOF, cuadrupolo tiempo de vuelo

RID, detector de índice de refracción

RMN, resonancia magnético nuclear

RPLC, cromatografía líquida en fase reversa

RTIL, líquido iónico de temperatura ambiente

SBSE, extracción por adsorción en barras agitadoras

SCX, intercambio catiónico fuerte

SDME, microextracción en gota simple

SFC, cromatografía de fluidos supercríticos

SFE, extracción en fluidos supercríticos

SFO, solidificación de la gota orgánica flotante

SHWE, extracción en agua supercaliente

SIM, medida de iones seleccionados

SPE, extracción en fase sólida

SPME, microextracción en fase sólida

SRM, monitorización de reacción selectiva

SWCNT, nanotubos de carbono de pared simple

TFA, ácido trifluoroacético

TLC, cromatografía de capa fina

TOF, tiempo de vuelo

UHPLC, cromatografía líquida de resolución ultra-rápida

UI, unidad internacional

UPLC, cromatografía líquida de ultraresolución

US, ultrasonidos

USAE, extracción-emulsificación asistida por ultrasonidos

USAEME, microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos

USE, extracción mediante ultrasonidos

UV, detección ultravioleta

VALLME, microextracción asistida por vortex



OBJETIVOS

La química de los alimentos es en la actualidad uno de los campos más importantes de la ciencia. La demanda creciente de alimentos originada por el aumento de la población mundial ha modificado la industria alimentaria, introduciendo una completa revolución en los métodos de producción y procesado de los alimentos. Esta situación, así como las expectativas de los consumidores y las demandas de una gran variedad de alimentos seguros y saludables y alimentos funcionales han propiciado la expansión de esta disciplina. En particular, el análisis de los alimentos está continuamente en desarrollo. Aunque hay un gran interés en la presencia de aditivos, toxinas, contaminantes o residuos (por ejemplo, pesticidas, compuestos farmacéuticos, constituyentes de los envases, etc.), también ha centrado la investigación en este campo la determinación de los constituyentes elementales de los alimentos, como azúcares, lípidos, vitaminas, grasas, etc. debido a su papel nutricional. De hecho, el desarrollo de tales métodos analíticos para alimentos, incluyendo las etapas de preparación de la muestra, es uno de los objetivos más importantes de la química de los alimentos moderna.

En los últimos años, el sector agroalimentario ha sufrido cambios radicales, debido a la globalización y al desarrollo de nuevas tecnologías, que requieren una caracterización profunda de la cadena alimentaria, desde las materias primas hasta los productos finales. Además, los consumidores demandan medidas para asegurar la calidad, seguridad y el origen geográfico de los productos que consumen. Esta caracterización se puede llevar a cabo a nivel molecular, con el objetivo de establecer los parámetros de composición. La caracterización molecular es esencial, siendo requerida por las agencias reguladoras para la evaluación tanto de los alimentos ya en el mercado como de los nuevos.

En esta Tesis Doctoral se desarrollan nuevos métodos analíticos para la determinación de las vitaminas, constituyentes esenciales en la dieta humana. Los

niveles de vitaminas presentes en los alimentos pueden ser tan bajos como algunos microgramos por 100 gramos y a menudo están acompañadas por un gran número de compuestos con propiedades físicas y químicas similares. Cuando se quiere determinar los niveles de vitaminas en alimentos es necesario, por tanto, separar unas vitaminas de otras, así como de las sustancias interferentes. Las vitaminas son generalmente compuestos lábiles y muchas son susceptibles a la oxidación y ruptura de la molécula cuando se exponen al oxígeno, calor o radiación UV.

La determinación de la composición molecular de sistemas complejos, tales como los alimentos, requiere el uso de herramientas analíticas para identificar y cuantificar apropiadamente todos los compuestos de interés. El análisis de alimentos es un campo muy amplio, en el que están especializados muchos laboratorios, tanto en investigación, en industria y agencias regulatorias gubernamentales. La Cromatografía Líquida (LC, HPLC) se utiliza preferentemente como método de confirmación o test de barrido o *screening* para la determinación de aditivos y compuestos naturales. La cromatografía combinada en línea con Espectrometría de Masas (MS) es una de las metodologías analíticas más sensibles y selectivas. Entre los métodos hifenados, la Cromatografía de Gases–Espectrometría de Masas (GC–MS) es el más ampliamente usado para análisis de alimentos. La Cromatografía Líquida–Espectrometría de Masas (LC–MS) se ha usado con menos frecuencia, pero el segmento de aplicación de esta técnica está creciendo rápidamente entre las metodologías analíticas en análisis de alimentos.

Dependiendo de las estructuras químicas y características analíticas de los grupos de vitaminas analizados, los métodos analíticos utilizados en esta Tesis Doctoral han sido, en principio, hifenaciones de la cromatografía líquida con detectores clásicos y sencillos, disponibles en cualquier laboratorio analítico, como el detector de diodos (LC–DAD) y el detector de fluorescencia (LC–FI).

La necesidad de caracterización molecular de los alimentos lleva a la industria alimentaria a aplicar técnicas avanzadas. LC–MS combina el poder

separativo de LC y el poder de MS para identificar la estructura molecular. Las técnicas en línea LC–MS son similares a las que usan las dos técnicas separadamente. Desde el punto de vista cromatográfico, es muy importante el uso de disoluciones reguladoras volátiles y con fuerza iónica baja. Para el análisis MS, son mejores velocidades de flujo relativamente bajas, aunque se pueden tolerar flujos de disolvente mucho más altos e incluso se necesitan para diferentes fuentes.

Se han usado varios tipos de espectrómetros de masas en combinación con LC. Probablemente los instrumentos más simples son los del tipo Cuadrupolo (Q) y la Trampa de Iones (IT). Son simples y robustos y relativamente baratos, excelentes para cuantificación. Entre las técnicas avanzadas, la más importante y más ampliamente usada es la Espectrometría de Masas en Tandem (MS–MS), que proporciona información estructural y, al mismo tiempo, aumenta la selectividad, permitiendo la identificación y cuantificación incluso en presencia de compuestos co-eluyentes.

Hay varias técnicas de ionización, entre ellas la más utilizada es la Ionización por Electrospray (ESI), que se usa en combinación con LC–MS. ESI es excelente para estudiar moléculas polares, ionizadas o ionizables, tanto en modo positivo como negativo. La sensibilidad depende significativamente de la estructura molecular, compuestos de baja polaridad no pueden ser estudiados de forma eficiente por ESI. Para tales compuestos, se pueden usar las técnicas de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI). El efecto matriz es a menudo significativo y debe ser considerado.

Así pues, en esta Tesis Doctoral hemos utilizado también la hifenación LC–MS como técnica general que se puede usar para caracterizar varias clases de moléculas. En el caso de las vitaminas, pueden variar mucho en términos de estructuras y polaridad, así deben aplicarse diferentes preparaciones de muestra y condiciones analíticas. En función de las estructuras de los distintos grupos de

vitaminas analizados, se han aplicado también las hifenaciones LC–DAD y LC–Fluorescencia.

Las vitaminas son compuestos traza esenciales, que tienen estructuras diversas. Los carotenoides son un grupo de nutrientes que producen el color de algunos vegetales. Algunos de ellos son provitaminas y se analizan junto con las vitaminas. Muchas son lábiles térmicamente y se oxidan fácilmente, así LC, especialmente acoplada con MS, es la principal técnica analítica para su análisis. Se usa normalmente LC–MS con ionización ESI o APCI.

La preparación de la muestra constituye una etapa básica y crucial en el éxito de cualquier método analítico. Generalmente depende del analito y de la matriz, requiriendo una optimización adecuada de los diferentes parámetros que influyen en ella. Las tendencias actuales de la Química Analítica Verde se dirigen hacia la simplificación, miniaturización y automatización, implicando también el uso de procedimientos libres de disolventes o respetuosos con el medio ambiente, y manteniendo al mismo tiempo eficiencias de extracción aceptables en mínimo tiempo.

La mayoría de las muestras de alimentos que se analizan por métodos instrumentales de separación son demasiado complejas, están demasiado diluidas o son incompatibles con el sistema cromatográfico, lo que impide su introducción directa. Los métodos clásicos de preparación de muestra presentan algunos inconvenientes, tales como ser tediosos y largos, y requerir volúmenes grandes de muestra y disolventes orgánicos tóxicos. Teniendo como objetivo la química verde, surgen las técnicas modernas de preparación de la muestra, que ofrecen la posibilidad de automatización, son técnicas limpias y selectivas, tienen mayor rapidez y eficacia e, idealmente, son baratas, sencillas y sin disolventes tóxicos. Los métodos emergentes de análisis se dirigen hacia técnicas eficientes y miniaturizadas que sigan las prioridades de la química verde con respecto al medio ambiente a través del uso de procesos químicos que no produzcan residuos y que

utilicen cantidades pequeñas de disolventes orgánicos seguros para disolver o extraer los analitos.

La Extracción Líquida Presurizada (PLE), especialmente usando agua como disolvente, es una tecnología verde emergente comparada con las técnicas de extracción convencionales. PLE es una técnica que implica la extracción usando disolventes líquidos a temperatura y presión elevadas, que mejora la extracción con respecto a las técnicas que se llevan a cabo cerca de la temperatura ambiente y a presión atmosférica. Las ventajas del uso de disolventes a temperaturas por encima del punto de ebullición es el aumento de la solubilidad y las propiedades de transferencia de masa. Recientemente, ha crecido el interés en el desarrollo y mejora de la instrumentación analítica y la integración de diferentes etapas en una sola. Este objetivo ha añadido un nuevo nivel de complejidad y diversidad por los acoplamientos múltiples en-línea y la combinación de diferentes técnicas de análisis y detección multidimensionales, también llamados hifenaciones. La hifenación y/o combinación de diferentes técnicas de preparación de muestra y analíticas en un único proceso es una de las estrategias más recientes en química analítica.

Las técnicas de Microextracción representan un avance en la miniaturización del laboratorio analítico, basándose la extracción selectiva de los compuestos en las diferencias en sus características físico-químicas (peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y volatilidad). La Microextracción en Fase Líquida (LPME) incluye varias técnicas miniaturizadas basadas en la extracción de los analitos en una fase líquida usando cantidades muy pequeñas de disolventes orgánicos. La Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido (DLLME) es una técnica de extracción muy simple y rápida, basada en el uso de un sistema de disolventes ternario, que se ha aplicado a la extracción y preconcentración tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos a partir de muestras acuosas. El bajo consumo de tiempo y disolventes orgánicos son dos de las mayores ventajas de esta técnica, que se ha incluido en el grupo de procedimientos de química limpia.

La Extracción en Fase Sólida (SPE) implica una partición líquido-sólido, donde la fase extractante es un adsorbente sólido y se ha utilizado extensamente para eliminar y concentrar trazas de materiales orgánicos de muestras líquidas o disoluciones. Se dispone de una gran variedad de adsorbentes usando diferentes mecanismos para la extracción/retención de analitos. El descubrimiento y asequibilidad comercial de las nanoestructuras de carbono, como los fullerenos y los nanotubos de carbono, principalmente, ha supuesto una auténtica revolución en este ámbito, pues disminuyen los inconvenientes de las formas tradicionales de carbono como sorbentes.

Así pues, el Objetivo Principal de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar los acoplamientos instrumentales de la cromatografía líquida con los detectores de diodos, fluorescencia y espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica y trampa de iones y con distintos procedimientos verdes de tratamiento de la muestra como extracción con ultrasonidos, extracción líquida presurizada, extracción en fase sólida con nanotubos de carbono multipared y microextracción dispersiva líquido-líquido, para la determinación de diferentes grupos de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en distintos tipos de alimentos.

En concreto, el trabajo se divide en dos grandes bloques, en función del grupo de vitaminas analizado y el tipo de detector empleado.

En un primer bloque (Capítulos I a III), se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de vitaminas hidrosolubles en alimentos de diferentes tipos, nutracéuticos, suplementos dietéticos y alimentos infantiles. Las vitaminas hidrosolubles seleccionadas han sido las cobalaminas, la tiamina y sus ésteres y la benfotiamina. Son compuestos polares y se han analizado en todos los casos por LC en fase reversa. El uso de una fase estacionaria para compuestos básicos que presenta un ligando con grupos amida (RP-Amida C₁₆) y un encapsulante de trimetilsililo permite que los grupos silanol residuales reaccionen fuertemente, proporcionando así buenos resultados para la determinación de vitaminas sin ser necesario el uso de la técnica de pares iónicos. La separación

utilizando la columna basada en grupos amida presenta diferentes ventajas frente a otros métodos existentes debido a que los picos son mucho más estrechos y a la larga vida de la columna por la simplicidad de la fase móvil. Las fases móviles utilizadas han sido mezclas de acetonitrilo y una disolución reguladora de fosfato diácido de potasio 10 mM de pH 7 y trabajando en condiciones isocráticas o mediante elución por gradiente. Se ha utilizado detección por diodos para las cobalaminas o detección fluorescente para la tiamina y sus ésteres y la benfotiamina utilizando derivatización por oxidación a tiocromo.

Se han desarrollado dos procedimientos miniaturizados para el tratamiento de la muestra. Para la determinación de las cobalaminas se ha utilizado SPE con una mini-columna rellena con nanotubos de carbono multipared. Se emplea un sistema de flujo para la adsorción de los analitos en la mini-columna y para la elución de los mismos utilizando 400 μ L de dimetilsulfóxido. En el caso de la tiamina y sus ésteres y de la benfotiamina se ha utilizado un sistema DLLME que emplea volúmenes de disolvente extractante tan pequeños como 90-100 μ L.

La extracción de las vitaminas de los alimentos se ha llevado a cabo por medio de ultrasonidos para las cobalaminas o mediante una combinación de digestión ácida y extracción enzimática para romper los enlaces con las proteínas y destruir las formas fosforiladas de las vitaminas del grupo B.

Los métodos de análisis desarrollados se han validado siguiendo los criterios actuales de las Normas Europeas y, posteriormente, se han aplicado al análisis de muestras reales de alimentos. Cabe destacar que se ha prestado especial atención a la confirmación de la identidad de los positivos detectados en las muestras, mediante la comparación de datos de retención y de los espectros UV y de fluorescencia.

Por otra parte, el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) ha reconocido la importancia de los materiales de referencia de matrices de alimentos para los nutrientes orgánicos desde 1990. El uso de materiales de referencia es

inestimable para valorar la precisión del método; sin embargo, únicamente los artículos más recientes utilizan estos materiales. En este bloque de la Tesis Doctoral se utiliza un material de referencia certificado que permite una validación adecuada de los métodos propuestos.

En el segundo bloque de la Tesis Doctoral (Capítulos IV a VII), se han desarrollado nuevos métodos para la determinación de las diferentes formas de las cuatro vitaminas liposolubles (A, D, E y K) en alimentos funcionales como zumos de frutas, alimentos vegetales y lácteos, así como en alimentos infantiles.

Estas vitaminas tienen poca afinidad por el agua y se han analizado por LC en fase reversa o en fase normal. Las fases estacionarias utilizadas han sido C_8 o C_{18} no encapsuladas o encapsuladas con distintos grupos funcionales para fase reversa y una columna de sílice para fase normal. Las fases móviles contienen en este caso una elevada proporción de disolvente orgánico y han sido mezclas de acetonitrilo, metanol, 2-propanol y agua para fase reversa, y hexano y 2-propanol para fase normal, trabajando en condiciones isocráticas o mediante elución por gradiente.

Se han utilizado diferentes acoplamientos de LC con detección DAD o fluorescente y MS. En este último caso, también se han estudiado las interfases típicas a presión atmosférica (ESI y APCI) que permiten el acoplamiento entre LC y MS. Para realizar el estudio comparativo de las fuentes de ionización se han seleccionado tanto su ionización en modo positivo como en negativo. Además, se ha estudiado la posibilidad de adicionar diversos aditivos a la fase móvil, con el objetivo de conocer el comportamiento en la ionización y la supresión de la misma. Por otra parte, se ha comparado la versatilidad de los analizadores Q, IT y tiempo de vuelo (TOF) acoplados a LC, estableciendo sus ventajas e inconvenientes, tanto a nivel cuantitativo como de confirmación.

Para todas las vitaminas liposolubles, dada su elevada afinidad por los disolventes orgánicos, se ha utilizado el procedimiento miniaturizado de química

verde basado en DLLME empleando diferentes disolventes extractantes y dispersantes. La extracción de las vitaminas de los alimentos se ha llevado a cabo utilizando disolventes orgánicos, mediante extracción líquida presurizada o bien por una saponificación alcalina con metanol en el caso de llevar a cabo cromatografía en fase normal y para romper los enlaces de los ésteres y de las vitaminas con las proteínas. De nuevo en estos casos, los métodos de análisis se han validado siguiendo los criterios de las normas europeas, y empleando dos materiales de referencia certificados. La confirmación de la identidad de las vitaminas detectadas en muestras de alimentos se ha llevado a cabo mediante la comparación de datos de retención, de los espectros UV y de fluorescencia y, finalmente, de los espectros de masas, que proporcionan patrones de fragmentación que permiten la identificación inequívoca de los analitos.

Los Objetivos Concretos que nos hemos propuesto alcanzar en esta Tesis Doctoral se indican a continuación:

1. Desarrollo de metodología analítica utilizando los acoplamientos LC–DAD y LC–fluorescencia para la determinación cuantitativa de vitaminas en muestras de alimentos.
2. Empleo del acoplamiento LC–MS. Comparación de diferentes interfases y analizadores. Evaluación del efecto matriz en muestras de alimentos, propuesta de alternativas para su disminución, evitando en lo posible un elevado coste de tiempo o tratamiento de muestra.
3. Comparación de diferentes tipos de fases estacionarias para conseguir separaciones con elevada resolución, picos estrechos y sin necesidad de reactivos formadores de pares de iones.
4. Selección de la fase móvil adecuada a cada problema de separación teniendo en cuenta su compatibilidad con el sistema detector MS.
5. Estudio de los procesos de derivatización para facilitar la extracción y detección de los analitos.

6. Desarrollo y optimización de procedimientos miniaturizados para el tratamiento de la muestra. Se debe llevar a cabo una comparación de las técnicas de extracción en fase sólida y la microextracción en fase líquida, utilizando diferentes métodos de microextracción.
7. Evaluación de la técnica DLLME basada en sistemas de disolventes ternarios. Elección de los disolventes extractante y dispersante, así como del resto de condiciones experimentales. Comparación con otras técnicas LPME, como la Microextracción con Gota Simple (SDME) y la Microextracción-Emulsificación Asistida con Ultrasonidos (USAEME).
8. Aplicación de SPE utilizando nanotubos de carbono para la retención de analitos. Optimización de las condiciones de adsorción y de desorción utilizando un sistema de flujo automático.
9. Nuevos progresos en la integración de múltiples acoplamientos en-línea e hifenación de técnicas de preparación de muestra y analíticas en un solo proceso, como PLE-DLLME-LC-UV-APCI-MS.
10. Estudio, comparación y optimización del procedimiento para la extracción de las vitaminas de los alimentos. Se comparan diferentes posibilidades como uso de ultrasonidos, digestión ácida, extracción enzimática, extracción con disolventes orgánicos, saponificación alcalina con metanol, extracción líquida presurizada, etc.
11. Validación de los métodos analíticos siguiendo los criterios de las normas europeas.
12. Análisis de diferentes tipos de muestras de alimentos. Es importante confirmar la identidad de los positivos detectados en muestras reales.
13. Validación de los métodos propuestos utilizando materiales de referencia certificados.



INTRODUCCIÓN

1. LAS VITAMINAS

Las vitaminas son un grupo de compuestos orgánicos esenciales en cantidades muy pequeñas para el funcionamiento normal del organismo. Son compuestos heterogéneos imprescindibles para la vida, que al ingerirlos de forma equilibrada y en dosis adecuadas promueven el correcto funcionamiento fisiológico. La mayoría de las vitaminas esenciales no pueden ser sintetizadas por el organismo, por lo que éste no puede obtenerlas más que a través de la ingesta equilibrada de alimentos naturales. Las vitaminas son nutrientes que junto con otros elementos nutricionales actúan como catalizadores de todos los procesos fisiológicos (directa e indirectamente). Son precursoras de coenzimas, grupos prostéticos de las enzimas. Esto significa que la molécula de la vitamina, con un pequeño cambio en su estructura, pasa a ser la molécula activa, sea ésta coenzima o no.

Los requisitos mínimos diarios de las vitaminas no son muy altos, se necesitan tan solo dosis de miligramos o microgramos contenidas en los alimentos naturales. Tanto la deficiencia como el exceso de los niveles vitamínicos corporales pueden producir enfermedades que van desde leves a graves e incluso muy graves como la pelagra o la demencia (entre otras), e incluso la muerte. Algunas pueden servir como ayuda a las enzimas que actúan como cofactor, como es el caso de las vitaminas hidrosolubles. La deficiencia de vitaminas se denomina avitaminosis mientras que el nivel excesivo de vitaminas se denomina hipervitaminosis [1–5].

1.1. VITAMINAS HIDROSOLUBLES Y LIPOSOLUBLES

Se conocen 13 vitaminas en nutrición humana y se han clasificado, de acuerdo con su solubilidad, en dos grupos. Las vitaminas liposolubles están

representadas por las vitaminas A, D, E y K; también incluyen alrededor de 50 carotenoides que poseen grados variables de actividad en vitamina A. Las vitaminas hidrosolubles comprenden la vitamina C y los miembros del grupo de la vitamina B, tiamina (vitamina B₁), riboflavina (vitamina B₂), niacina o ácido nicotínico (vitamina B₃), ácido pantoténico (vitamina B₅), piridoxina (vitamina B₆), biotina (vitamina B₈), ácido fólico (vitamina B₉) y cianocobalamina (vitamina B₁₂). Las vitaminas tienen funciones fisiológicas y bioquímicas muy variadas y están ampliamente distribuidas en fuentes de alimentos naturales. Para algunas, la actividad biológica se atribuye a un número de compuestos relacionados estructuralmente conocidos como vitámeros. Los vitámeros tienen, en la mayoría de los casos, propiedades biológicas similares entre sí, pero debido a las diferencias en sus estructuras químicas, exhiben grados de potencia variables.

Las vitaminas liposolubles, vitamina A (retinol), vitamina D (calciferol), vitamina E (tocoferol) y vitamina K (antihemorrágica), se consumen junto con alimentos que tienen grasa. No contienen nitrógeno y se almacenan en el hígado y en los tejidos grasos y, por ello, no es necesario tomarlas todos los días por lo que es posible, tras un consumo suficiente, subsistir una época sin su aporte. Por otra parte, son bastante estables frente al calor. Se absorben en el intestino delgado con la grasa alimentaria y pueden almacenarse en el cuerpo en mayor o menor grado (no se excretan en la orina). Si se consumen en exceso (más de 10 veces las cantidades recomendadas), pueden resultar tóxicas.

Las vitaminas hidrosolubles son coenzimas o precursores de coenzimas, necesarias para muchas reacciones químicas del metabolismo. Se caracterizan porque se disuelven en agua, por lo que pueden pasar al agua del lavado o de la cocción de los alimentos. Muchos alimentos ricos en este tipo de vitaminas no aportan al final de prepararlos la misma cantidad que contenían inicialmente. Para recuperar parte de ellas (algunas se destruyen con el calor), se puede aprovechar el agua de cocción de las verduras. Estas vitaminas contienen nitrógeno en su molécula (excepto la vitamina C) y no se almacenan en el organismo, a excepción

de la vitamina B₁₂, que lo hace de modo importante en el hígado. El exceso de vitaminas ingeridas se excreta en la orina, por lo cual se requiere una ingesta prácticamente diaria, ya que al no almacenarse, se depende de la dieta [1–5].

1.2. LAS VITAMINAS EN LOS ALIMENTOS

La mayoría de las vitaminas esenciales se obtienen a través de la ingesta equilibrada de los alimentos naturales. La afirmación de que las vitaminas no pueden ser producidas por el organismo es válida para muchas de ellas, pero no es estrictamente verdad para otras. Por ejemplo, la vitamina D puede formarse en la piel después de una exposición adecuada a la radiación ultravioleta, la vitamina K es producida normalmente en cantidad suficiente por las bacterias intestinales, y la niacina puede ser sintetizada *in vivo* a partir de un aminoácido precursor, L-triptófano. Las plantas tienen la habilidad de sintetizar la mayoría de las vitaminas y sirven como fuentes primarias de estos nutrientes esenciales. Las frutas y verduras son fuentes importantes de vitaminas.

En países con dietas inadecuadas o no balanceadas, o con deficiencias particulares, aparecen enfermedades típicas debidas a la deficiencia de vitaminas. Ejemplos de enfermedades comunes son la xeroftalmia, raquitismo, beriberi, pelagra y escorbuto, que resultan de deficiencias de vitamina A, vitamina D, tiamina, niacina y vitamina C, respectivamente. La deficiencia de un único miembro del grupo de la vitamina B es rara en humanos ya que estas vitaminas se encuentran juntas ampliamente en la naturaleza.

La vitamina A tiene un papel realmente importante en la vista. Es excelente para la visión nocturna. Además, colabora para que el cuerpo combata las infecciones al reforzar el sistema inmunitario. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina A son: leche enriquecida, hígado, frutas y vegetales anaranjados (melón, zanahorias, batatas) y vegetales de hoja verde oscuro (col rizada, berzas y espinacas).

Las vitaminas B constituyen un complejo numeroso: B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido fólico, biotina y ácido pantoténico. Son importantes para la actividad metabólica; esto significa que ayudan a producir energía y a liberarla cuando el cuerpo la necesita. También participan en la fabricación de los glóbulos rojos, los encargados de transportar el oxígeno por el cuerpo. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina B son: granos integrales, como el trigo y la avena, pescado y productos del mar, carnes, huevos, productos lácteos, como la leche y el yogur, vegetales de hoja verde, frijoles y guisantes.

La vitamina C es importante para mantener en buen estado los tejidos del cuerpo, como las encías y los músculos. También es clave porque ayuda en la cicatrización y colabora para combatir las infecciones. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina C son: frutas cítricas, como las naranjas, melón, fresas, tomates, brócoli, col, kiwi y pimientos rojos.

La vitamina D evita los problemas óseos. También es excelente para la formación de dientes fuertes y ayuda a que el cuerpo absorba la cantidad de calcio que necesita. Se produce en la piel cuando se expone a la luz del sol. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina D son: leche enriquecida, pescado, yema de huevo, hígado y cereales enriquecidos.

La vitamina E protege a las células y tejidos para que no se dañen. También es importante para la salud de los glóbulos rojos. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina E son: granos integrales, como el trigo y la avena, germen de trigo, vegetales de hoja verde, aceites vegetales, como el de girasol y oliva, yema de huevo y frutos secos y semillas.

La vitamina K es la responsable de la coagulación. Los alimentos que tienen un alto contenido de vitamina K son: vegetales de hoja verde, productos lácteos, como la leche y el yogur, brócoli y aceite de soja.

La estabilidad de las vitaminas es muy importante cuando se considera el valor nutricional de un alimento. El procesado y el almacenamiento producen

pérdidas que dependen de condiciones tales como pH, temperatura y humedad. La niacina y biotina son relativamente estables, pero las otras vitaminas hidrosolubles son lábiles en extensiones variables y bajo condiciones diferentes. La riboflavina es notoriamente susceptible a la descomposición por la luz. Durante el cocinado doméstico, las vitaminas hidrosolubles son fácilmente lixiviadas en el agua de cocinado o eliminadas de la carne. En el caso de la vitamina C, el tratamiento rápido con calor, tal como el blanqueo de frutas y vegetales o el pasteurizado de zumos de frutas, sirve para prevenir las pérdidas de vitaminas durante el almacenamiento post-procesado por enzimas inactivadas que promueven la oxidación directa de ácido ascórbico.

El término "biodisponibilidad", cuando se aplica a las vitaminas en nutrición humana, se refiere a la proporción de la cantidad de vitamina ingerida con el alimento que resulta absorbida por el intestino y utilizada por el cuerpo. La vitamina puede ser convertida a una forma que tenga función bioquímica. Alternativamente, la vitamina puede ser metabolizada dentro de la célula a una forma no funcional para su excreción posterior o simplemente almacenada dentro de la célula para su uso futuro. La biodisponibilidad no debe confundirse con la estabilidad del nutriente. Mientras que el procesado del alimento puede producir pérdidas de la vitamina lábil, la biodisponibilidad de la cantidad restante de vitamina no es necesariamente alterada, aunque está afectada por un amplio número de parámetros [1-5].

1.2.1. VITAMINAS Y ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son aquellos alimentos que contienen componentes biológicamente activos que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Este concepto nació en Japón, en los años ochenta, debido a la necesidad de garantizar una mejor calidad de vida a la vista de los elevados gastos sanitarios originados por el aumento de la longevidad

de la población. En la actualidad, los consumidores están cada vez más concienciados de la relación existente entre la dieta y la salud, lo que ha impulsado el desarrollo y comercialización de alimentos con propiedades beneficiosas. Sin embargo, es evidente la necesidad de establecer científicamente las bases en las que se apoyan las alegaciones funcionales, y que se demuestren sus efectos en las cantidades que se consumirían en el contexto de una dieta global [6].

Si bien en Japón ya se estableció en 1991 el concepto de "Alimentos para uso específico en la salud" (Foods for Specified Health Use, FOSHU), en la Unión Europea no existe una legislación uniforme sobre las alegaciones de salud. De hecho, la legislación europea relativa al etiquetado prohíbe hacer referencia a las propiedades preventivas, terapéuticas o curativas de los alimentos, incluso aunque existan pruebas científicas que las avalen. Los aspectos regulatorios y de etiquetado han de comprender dos consideraciones fundamentales: seguridad y consolidación de la alegación funcional o beneficio para la salud que comporta el consumo del alimento. Según la Acción concertada FUFUSE, puesta en marcha en 1995 como respuesta de la Comisión Europea a la expansión de los alimentos funcionales en el mercado, se distinguirían dos tipos de alegaciones de salud: alegaciones funcionales de mejora, asociadas a determinadas funciones fisiológicas y psicológicas y a actividades biológicas que van más allá de su papel establecido en el crecimiento, el desarrollo y otras funciones normales del cuerpo, y alegaciones de reducción del riesgo de padecer una determinada enfermedad o afección.

Aunque se han realizado numerosos estudios epidemiológicos *in vitro*, con animales de experimentación y clínicos, que ponen de manifiesto el beneficio para la salud del consumo de ingredientes bioactivos, el conocimiento de cómo estos ingredientes actúan en el organismo no está en muchos casos suficientemente consolidado. Ello se debe entre otras causas, a la complejidad de las múltiples interacciones entre los constituyentes de los alimentos durante el proceso digestivo y las repercusiones en el metabolismo de los mismos. Por tanto, existen todavía

multitud de aspectos de la relación alimentación/salud en las distintas etapas de la vida y para individuos en situaciones metabólicas diferentes que requieren investigación, aunque hay resultados que impulsan cada vez más el desarrollo de nuevos productos.

Dentro del mercado de los alimentos funcionales, en continua expansión, los alimentos lácteos funcionales y los ingredientes funcionales de origen lácteo suponen un segmento muy importante y en crecimiento [7]. Debe destacarse que, debido a sus propiedades beneficiosas para la salud, muchos productos lácteos tradicionales (yogur, leches fermentadas, calostro, leches maternizadas o la propia leche) pueden considerarse en sí mismos alimentos funcionales, a la vez que contienen multitud de ingredientes para la formulación de otros alimentos funcionales. Por otra parte, cada vez es más frecuente la inclusión de ingredientes funcionales de origen lácteo y no lácteo en leche y alimentos de base láctea, que incluyen bacterias probióticas y carbohidratos prebióticos, salvado, avena, almidón, calcio, ácidos grasos omega-3, ácido fólico, nucleótidos, vitaminas, minerales, etc.

En los últimos años han aparecido en el mercado los zumos funcionales o también llamados zumos ACE. Se trata de bebidas basadas en frutas o vegetales a las cuales se añaden las vitaminas antioxidantes A, C y E [8]. Los zumos enriquecidos con vitaminas presentan beneficios para la salud, contra la oxidación y el envejecimiento [9]. La mayoría de los agentes antioxidantes se encuentran en alimentos derivados de las plantas, lo que explica la necesidad de incluir frutas, legumbres, vegetales y cereales en la dieta [10].

La Tabla 1 muestra los tipos de alimentos funcionales en España y sus posibles efectos beneficiosos en la salud [11]. Como puede comprobarse, las vitaminas aparecen como componentes esenciales en todos ellos, de ahí la importancia de disponer de métodos analíticos para su preconcentración y determinación.

Tabla 1. Tipos de alimentos funcionales en España y posibles efectos beneficiosos en la salud [11]		
Leches enriquecidas	Con ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA)*	Contribuyen a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, de ciertos tipos de cáncer y mejoran el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales. Pueden reducir los procesos inflamatorios
	Con ácido oleico	Ayudan a reducir la concentración de colesterol en sangre y el riesgo de enfermedad cardiovascular
	Con ácido fólico	Pueden disminuir malformaciones en el tubo neural y ayudan a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular
	Con calcio	Ayudan al desarrollo de huesos y dientes. Intervienen en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Pueden prevenir la osteoporosis
	Con vitaminas A y D	Favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente
	Con fósforo y cinc	Ayudan al desarrollo de los huesos y mejoran el sistema inmunológico
Leches infantiles de iniciación y de continuación	Con ácidos grasos	Ayudan a mejorar el desarrollo de los niños de 0 a 3 años
	Con vitaminas y minerales	Estos alimentos pueden tomarse cuando la lactancia materna no es posible
Yogures enriquecidos	Con calcio	Ayudan al desarrollo de huesos y dientes. Intervienen en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Pueden prevenir la osteoporosis
	Con vitaminas A y D	Favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente
Leches fermentadas	Con ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA)* y ácido oleico	Contribuyen a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, ciertos tipos de cáncer y mejoran el desarrollo del tejido nervioso y las funciones visuales. Pueden reducir los procesos inflamatorios
	Con bacterias probióticas específicas	Favorecen el funcionamiento del sistema gastrointestinal y reducen la incidencia y la duración de las diarreas. Mejoran la calidad de la microflora intestinal
Zumos enriquecidos	Con vitaminas y minerales	Vitaminas A y D: Favorecen la función visual y la absorción del calcio, respectivamente. Calcio: Ayuda al desarrollo de huesos y dientes. Interviene en la transmisión nerviosa y los movimientos musculares. Puede prevenir la osteoporosis Hierro: Facilita el transporte de oxígeno en la sangre. Puede prevenir la aparición de anemia
Cereales fortificados	Con fibra, vitaminas y minerales	Fibra: Ayuda a reducir el riesgo de cáncer de colon y mejora la calidad de la microflora intestinal Hierro: Facilita el transporte de oxígeno en la sangre y puede prevenir la aparición de anemia
Pan enriquecido	Con ácido fólico	Pueden disminuir malformaciones en el tubo neural y ayudan a reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular
Huevos enriquecidos	Con ácidos omega-3	Pueden reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular
Margarinas enriquecidas	Con fitoesteroles	Ayudan a disminuir la concentración de colesterol en sangre y el riesgo de enfermedad cardiovascular
Sal iodada	Con iodo	El iodo facilita la fabricación de hormonas tiroideas, necesarias para un desarrollo físico y psíquico normal

*EPA: ácido eicosapentaenoico. *DHA: ácido docosahexaenoico

Por otra parte, cuando un producto alimenticio es enriquecido con vitaminas, debe establecerse un programa de control de calidad para asegurar que el producto contiene los niveles de vitaminas declarados. Esto se debe a que un exceso de algunas vitaminas podría tener efectos perjudiciales para la salud de los consumidores. Sin embargo, el enriquecimiento con vitaminas implica menores problemas de procesado que el enriquecimiento con minerales o proteínas, ya que se requieren cantidades más pequeñas. Cualquier pérdida de vitaminas durante el manufacturado y almacenamiento de los zumos debería ser compensado por la adición de cantidades sustanciales del nutriente si el consumidor debe recibir los niveles requeridos.

La Comisión de la Unión Europea ha establecido [12] el nivel de vitamina A en zumos de frutas y vegetales como un contenido final no inferior a 25 $\mu\text{g RE}/100 \text{ kJ}$ (100 $\mu\text{g RE}/100 \text{ kcal}$), siendo RE los equivalentes de todo-*trans*-retinol (anexo II). Los compuestos permitidos para ser añadidos como vitamina A son retinol, acetato de retinol, palmitato de retinol y β -caroteno (anexo IV). El contenido máximo de vitamina A en productos basados en cereales y en alimentos infantiles es 180 $\mu\text{g RE}/100 \text{ kcal}$ (anexo VI).

1.2.2. VITAMINAS Y ALIMENTOS INFANTILES

La infancia constituye el período de vida con una mayor demanda nutricional pues el peso corporal del niño se duplica entre los primeros 4 y 6 meses de vida y se triplica al finalizar el año de vida. Por ello, los niños constituyen uno de los segmentos más vulnerables de nuestra sociedad. Así, para conseguir una nutrición óptima para ellos, la investigación debe orientarse hacia una mejora de su salud y calidad de vida y no sólo para la obtención de unos beneficios inmediatos. Los lactantes que, por alguna razón, no pueden recibir leche materna deben disponer de los beneficios de ésta con una fórmula que les proporcione todos los nutrientes necesarios para asegurar un desarrollo corporal y, en

particular de su sistema neurológico, similar al que pudiera tener con la leche materna.

La investigación científica en el campo de la nutrición infantil permitió establecer los requerimientos óptimos de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales, en cada una de las distintas etapas de crecimiento de los niños. Avances más recientes, han permitido conocer la importancia de otros nutrientes para promover en el niño un mejor desarrollo de distintas funciones orgánicas, a nivel del sistema nervioso, la visión, el sistema inmunológico de defensa, la osificación y el crecimiento. Entre estos destacan, los ácidos grasos Omega 3 y 6, las mejores fuentes de lípidos, los nucleótidos, el hierro, la taurina, la carnitina y la colina. La importancia de incluir en las fórmulas para lactantes los nutrientes mencionados ha sido evaluada en estudios realizados por expertos en nutrición infantil, destacando su participación en los procesos del desarrollo cerebral, el aprendizaje, el lenguaje receptivo y expresivo, y el desarrollo visual.

Los alimentos infantiles engloban un amplio rango de diferentes matrices [13]: alimentos infantiles no grasos basados en frutas y vegetales (con contenidos en grasa inferiores al 2%), alimentos grasos basados en carne/huevos/queso y alimentos basados en cereales con diversos contenidos en grasa. Además, se incluye la leche materna y fórmulas adaptadas. Estos alimentos poseen alto valor nutricional, complementarios de la leche, que contribuirán al balance energético deseable para el óptimo crecimiento del niño. En el presente, la tecnología ha alcanzado un grado de desarrollo lo suficientemente importante como para poder ofrecer productos de elevada calidad nutritiva. Por otro lado, los procesos industriales empleados en la preparación de estos alimentos son lo suficientemente agresivos como para que sea muy importante el control de su efecto sobre la posible contaminación o destrucción de los ingredientes originales. La realidad es que, para estos preparados, la legislación vigente no exige, excepción hecha del natural examen microbiológico, nada más que el control químico de sus componentes mayoritarios.

Teniendo en cuenta la importancia de estos alimentos en la dieta del niño y considerando las especiales características del grupo de población al que van destinados, así como la gran sensibilidad de los consumidores frente a este tipo de alimentos, se hace necesario profundizar en el conocimiento de la calidad de estos productos. En los últimos años se ha ido incrementando el interés sobre el conocimiento, lo más exacto posible, del deterioro y la contaminación que los alimentos inevitablemente sufren durante los procesos de elaboración, envasado y distribución, y ello debido, en gran parte, a las exigencias que las autoridades sanitarias de los diversos países con legislación alimentaria avanzada imponen.

A lo largo de los distintos capítulos que constituyen esta Tesis Doctoral se ha abordado la determinación de las cuatro vitaminas liposolubles A, D, E y K, en sus diferentes formas, así como del carotenoide β -caroteno, que posee actividad en vitamina A. Dentro del grupo de las vitaminas hidrosolubles, se han determinado una representación de las vitaminas del grupo B, tiamina (vitamina B₁) y sus ésteres, benfotiamina y las diferentes cobalaminas (vitamina B₁₂). Todas estas vitaminas se han determinado en diferentes tipos de alimentos funcionales, como alimentos lácteos funcionales, leches fermentadas, alimentos vegetales y zumos funcionales o zumos ACE. También se han analizado alimentos infantiles, cereales y fórmulas infantiles, así como otros tipos de alimentos marinos, cerveza, levadura y miel. Por último, se ha llevado a cabo el análisis de productos nutracéuticos y suplementos dietéticos que contienen ingredientes naturales, usualmente extraídos de plantas o frutas, minerales y vitaminas, y representan los últimos avances en la ciencia de la nutrición para conseguir una buena salud y reducir los efectos del envejecimiento.

2. ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La determinación de especies traza en matrices complejas, tales como alimentos, requiere a menudo la extracción extensiva de la muestra y su

preparación previa al análisis instrumental. El proceso de preparación de la muestra depende de la matriz de la misma y de las propiedades y nivel de los analitos a determinar. Las etapas típicas de la preparación de la muestra incluyen muestreo/homogeneización, extracción, limpieza y concentración, seguidas del análisis final. Otra etapa que puede estar incluida es la derivatización.

Para la determinación de trazas de compuestos orgánicos, el análisis final se lleva a cabo invariablemente utilizando una técnica de separación poderosa, típicamente cromatografía, combinada con un detector apropiado. La preparación de la muestra debe estar adaptada al análisis final, considerando la instrumentación que se va a utilizar y el grado de exactitud requerida, así como si se trata de un análisis cualitativo o cuantitativo. Para análisis cuantitativo, es necesario considerar cuál es la preparación más apropiada de los estándares de calibración. En algunos casos, es necesario utilizar estándares conteniendo la matriz o aplicar el método de adiciones estándar. También hay que considerar la posibilidad de utilizar un estándar interno apropiado. Cualquiera de las técnicas seleccionadas, tanto manuales como automáticas, deben ser robustas y reproducibles [14].

La determinación de la composición molecular de sistemas complejos, tales como los alimentos, requiere el uso de herramientas analíticas para identificar y cuantificar apropiadamente todos los compuestos de interés. El análisis de alimentos es un campo muy amplio, en el que están especializados muchos laboratorios, tanto en investigación como en industria y agencias regulatorias gubernamentales. Las técnicas cromatográficas de gases y líquidos, GC y LC, combinadas en línea con Espectrometría de Masas (MS) son las metodologías analíticas más sensibles y selectivas. Entre los métodos hifenados, GC-MS es el más ampliamente usado para análisis de alimentos. LC-MS se ha usado con menos frecuencia, pero el segmento de aplicación de esta técnica está creciendo rápidamente entre las metodologías analíticas en análisis de alimentos (Figura 1) [15].

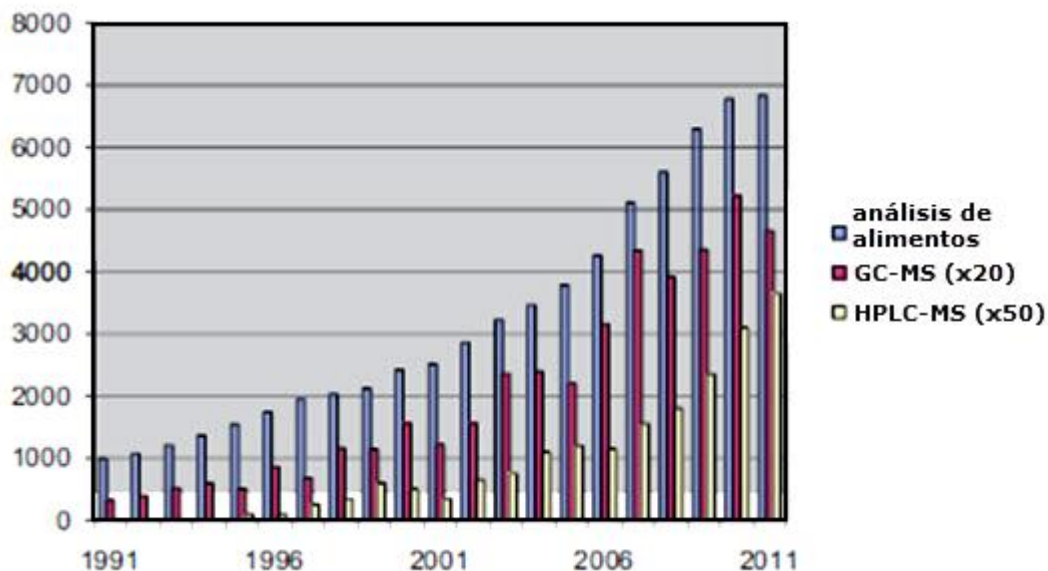


Figura 1. Aumento en el número de trabajos relativos al análisis de alimentos usando metodologías GC-MS o LC-MS (los últimos multiplicados por 20 y 50 veces, respectivamente). Los datos se basan en la base de datos Web of Science

Las aplicaciones se pueden agrupar según diferentes aspectos. Un concepto puede ser identificar varios componentes orgánicos, inorgánicos o macromoleculares. Estos pueden ser mayoritarios (como ácidos grasos) o componentes traza; los últimos pueden ser beneficiosos (como vitaminas o polifenoles), indeseables (trazas de pesticidas) o prohibidos (como toxinas). En particular, la presencia de moléculas indeseables de origen natural o sintético **tiene una** importancia fundamental para asegurar la seguridad alimentaria. Un tipo diferente de categorización se basa en el tipo de alimento [15].

Las muestras de alimentos abarcan multitud de tipos físicos, desde muestras secas a matrices biológicas, tales como carne, grasas y líquidos o disoluciones. El tamaño de partícula puede ser un parámetro importante para obtener resultados reproducibles y la extensión a la cual se rompe la matriz puede influir en la velocidad de extracción. El analito es desorbido de la matriz y disuelto en un disolvente o fluido. La extracción de un analito está influenciada, por tanto, por la solubilidad, penetración del disolvente en la muestra (transferencia de

masa) y efectos de matriz. Las muestras sólidas pueden ser preparadas por molienda antes o después de secado, seguida de extracción líquida. Después de la mayoría de estos métodos de extracción, los analitos de interés se encuentran en una disolución orgánica o acuosa, que requiere entonces la concentración o limpieza adicional. Estas disoluciones del extracto se pueden tratar como muestras líquidas. Las muestras líquidas se pueden manejar directamente por métodos de extracción líquido-líquido o métodos de adsorción. Sin embargo, algunas muestras, tales como tejidos animales o de pescado y similarmente sólidos húmedos, pueden ocasionar problemas especiales. El secado previo a la extracción no siempre resulta práctico ya que la mayoría de las muestras, como la carne, debido a la presencia de elevadas proporciones de grasa o debido al colapso de las células, retienen a los analitos.

Una técnica particularmente efectiva es la Dispersión en Fase Sólida de la Matriz (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), desarrollada por primera vez en 1989 [16–17]. Proporciona una estructura porosa para permitir que el disolvente penetre en la matriz y extraiga los analitos, pero también tiene una funcionalidad que puede retener las grasas/lípidos. La muestra se mezcla con una matriz, tal como sílica enlazada C₁₈, sulfato sódico o hidromatriz, seguida de lavado y elución con un pequeño volumen de disolvente. Esta técnica utiliza menos disolvente que la extracción líquido-líquido y puede eliminar la necesidad de extracciones múltiples. Alternativamente, la matriz se puede mezclar con un material adsorbente y empaquetarla en una mini-columna y los analitos eluyen en una técnica comparable con la SPE. Se puede empaquetar una capa de adsorbente al final de la columna como procedimiento de limpieza posterior para conseguir una extracción más selectiva. Se han publicado dos reviews recientes [18–19] sobre aplicaciones de MSPD.

2.1. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

Se han desarrollado diferentes métodos para la extracción de muestras sólidas. Entre ellas destacan las siguientes:

A. Extracción Soxhlet (Soxhlet Extraction). Esta técnica es exhaustiva aunque no selectiva y precisa de posterior limpieza, tal como SPE, y a menudo, concentración. Debido a las temperaturas implicadas, la extracción Soxhlet puede degradar compuestos lábiles térmicamente [20]. El tiempo requerido a menudo es largo, típicamente 1–6 h, y se necesita un volumen significativo de disolvente orgánico (50–200 mL para 10 g de muestra). Se dispone de sistemas Soxhlet automáticos, que permiten reducir los tiempos de extracción y llevar a cabo la ebullición, lavado y recuperación del disolvente automáticamente. Se pueden extraer más de 6 muestras simultáneamente usando volúmenes de disolvente más pequeños.

B. Extracción Líquida Presurizada (Pressurized Liquid Extraction, PLE). Debido al gran número de muestras a analizar, se han desarrollado métodos para acelerar el proceso de extracción. PLE implica la extracción con disolventes líquidos, pero a temperaturas y presiones elevadas [21] y es una tecnología verde emergente comparada con las técnicas de extracción convencionales [22]. Todas estas técnicas utilizan la disminución de la viscosidad de los disolventes a elevadas temperaturas para aumentar la solubilidad de los analitos. Estas temperaturas también colaboran en romper las interacciones analito–matriz y favorecer la difusión del analito a la superficie de la matriz.

La eficiencia de la extracción depende de la naturaleza de la matriz de la muestra, del analito y de la localización del analito dentro de la matriz. El proceso de extracción de muestras heterogéneas fue ilustrado por Pawliszyn en 2003 mediante un modelo que asumía que la partícula de la muestra es porosa y está rodeada de una capa orgánica [23]. La extracción y recuperación del analito a partir de la matriz de la muestra se puede representar en varias etapas.

Inicialmente, el compuesto es desorbido de su lugar en la matriz de la muestra, entonces se difunde a través de la parte orgánica de la matriz hasta ser capaz de alcanzar la interfase matriz-fluido. En este punto, el analito es distribuido en la fase extractante, entonces se difunde a través de la fase de extracción que está presente dentro de los poros, por tanto, alcanza la parte de la fase extractante que está afectada por convección. La etapa final del proceso de extracción es la colección del analito extraído.

Una etapa crítica en el proceso de extracción es la posición y el estado del analito en el interior de la matriz de la muestra. Se han postulado cinco posiciones diferentes, como muestra la Figura 2: (1) adsorbido sobre la superficie de la matriz, (2) disuelto en un poro de disolvente y/o adsorbido sobre la superficie, (3) disuelto/adsorbido en una matriz de micro/nano-poro, (4) enlazado químicamente a la matriz o (5) disuelto en un volumen de disolución [23].

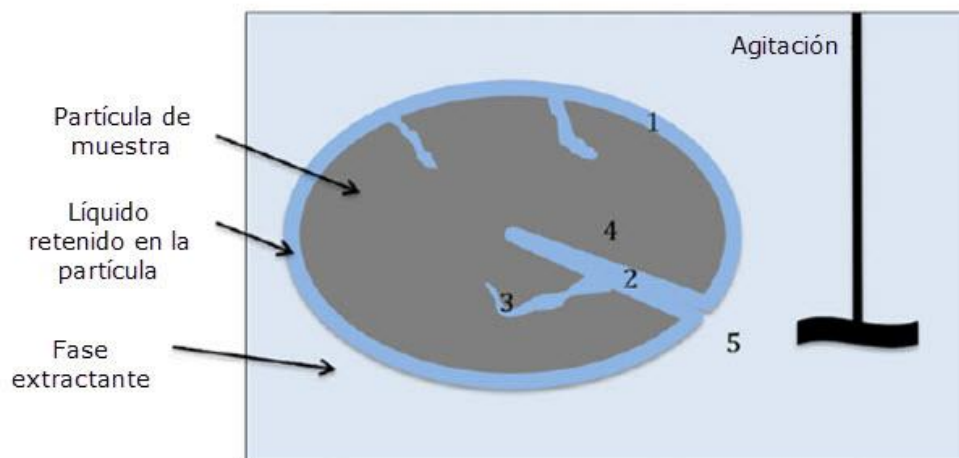


Figura 2. Posición del analito en la matriz de la muestra

La etapa limitante de la velocidad en el proceso de extracción depende de la naturaleza de la matriz a extraer. En aplicaciones medioambientales, la etapa de desorción es usualmente la etapa limitante de la velocidad, ya que las interacciones soluto-matriz son difíciles de superar, por ejemplo en sedimentos

naturales, suelos y lodos. En materiales vegetales, la etapa limitante de la velocidad es más comúnmente la solubilización o la difusión.

Las ventajas que se obtienen con el uso de disolventes a temperaturas por encima de su punto de ebullición atmosférico son las mejoras en la solubilidad y las propiedades de transferencia de masa. Bajo estas condiciones, los disolventes aumentan su poder de solvatación y la velocidad de extracción. PLE fue introducida en 1995, como Tecnología de Extracción con Disolventes Acelerada (Accelerated Solvent Extraction Technology, ASE). Esta técnica también se conoce como Extracción Líquida Presurizada, Extracción con Disolventes Presurizada, Extracción con Disolventes Acelerada y Extracción con Disolventes Mejorada.

PLE se puede llevar a cabo en modo estático o dinámico o una combinación de ambos [22]. En el dispositivo dinámico, el disolvente extractante se bombea continuamente a través del vaso de la muestra. El sistema dinámico requiere bombas de alta presión. El desarrollo de nueva instrumentación proporciona ambos modos estático y dinámico simultáneamente. Esto se consigue mediante la introducción de disolventes frescos durante el proceso de extracción. Se puede aplicar un amplio intervalo de temperaturas y presiones de extracción en PLE, que varían desde la temperatura ambiente hasta 200 °C, y entre 35–200 bar, respectivamente.

Dependiendo de la naturaleza de la matriz de la muestra, se utilizan papel de filtro o agentes dispersantes o desecantes para facilitar la eficiencia de la extracción. Un agente muy utilizado es la hidromatriz (hydromatrix) que es una tierra de diatomeas inerte que se usa como agente dispersante y/o deshidratante durante la extracción. La presencia de humedad en la matriz de la muestra afecta a la eficiencia de extracción, por tanto, la hidromatriz se usa para adsorber el agua de la matriz, lo que mejora el proceso de extracción. También se pueden usar bolitas de vidrio como agentes dispersantes cuando no se necesita absorber la humedad de la muestra. Los agentes dispersantes también se usan para llenar la

célula de extracción y reducir el consumo de disolventes reduciendo el volumen de la célula.

En la mayoría de los equipos PLE, cuando se alcanzan los parámetros fijados de temperatura de extracción y presión, se lleva a cabo entonces la extracción en un modo estático durante un tiempo predeterminado, siendo un intervalo común 5–15 min que se puede llevar a cabo en ciclos diferentes. Al final del último ciclo de extracción y para evitar cualquier pérdida o efectos de memoria, la célula de la muestra se purga con un gas inerte para lavar el disolvente de la célula y los tubos en el vial de colección. La mayoría de las células de extracción están hechas de acero inoxidable, lo que restringe la extracción a pH extremos; sin embargo, el nuevo instrumento de extracción PLE tiene vasos de extracción hechos de Dionium[®] y los tubos que salen de la cámara de extracción son resistentes al pH y, por tanto, se pueden utilizar en un amplio rango de pH. Esto permite llevar a cabo distintos tratamientos en la célula durante la extracción, por ejemplo, saponificación durante la extracción de lípidos.

En el modo de extracción estático, los factores críticos son la temperatura y el tiempo de extracción. La eficiencia de la extracción depende de la solubilidad del analito en el disolvente y de su partición entre el agua y el disolvente extractante. Se ha sugerido como inconveniente del modo de extracción estático que no se puede conseguir la extracción completa debido al volumen limitado del fluido de extracción. Para eliminar esta limitación se podría adoptar la estrategia de usar más ciclos de extracción.

El proceso de extracción podría explicarse en dos etapas, como ocurre usualmente en SFE, primero comienza como una fase controlada por la solubilidad, y después seguida por una fase controlada por difusión. En la fase controlada por dispersión, las matrices de la muestra usualmente tienen interacciones fuertes con los analitos, o hay caminos de difusión largos para que los analitos pasen a través de la matriz de la muestra. En este caso, la temperatura del disolvente y el tamaño de partícula pueden ser factores críticos para aumentar la eficiencia de extracción.

Aumentando la temperatura y/o reduciendo el tamaño de partícula se puede evitar que los tiempos de extracción sean excesivamente largos.

En matrices de muestra con control por solubilidad, las interacciones analito–matriz son bastante débiles y la velocidad de extracción depende fundamentalmente de la partición del analito entre la matriz y el fluido de extracción. En este caso, el rendimiento mejora usando renovaciones más frecuentes con disolvente de extracción fresco (Figura 3).

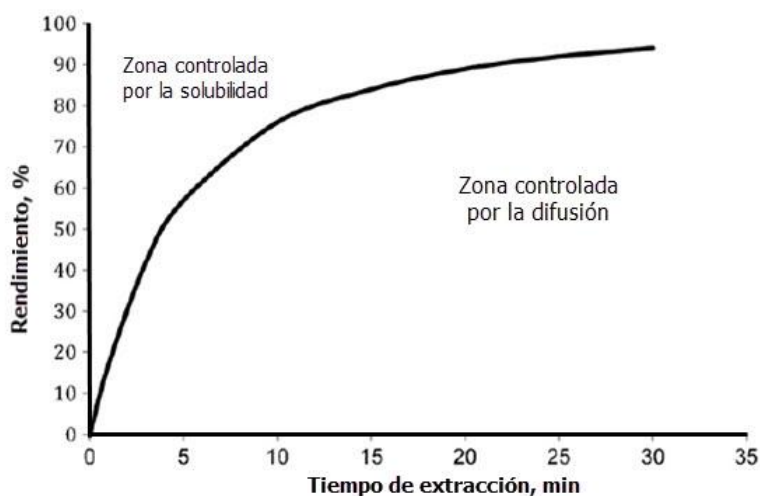


Figura 3. Rendimiento de extracción (%) vs tiempo de extracción (min)

PLE es útil para una amplia variedad de solutos, tanto polares como no-polares, siendo los factores que afectan a la extracción: el tipo de disolvente, tiempo de extracción, temperatura, tamaño de partícula y contenido en agua de la muestra. Las estrategias de optimización de estos factores se ilustran en la Figura 4 [24].

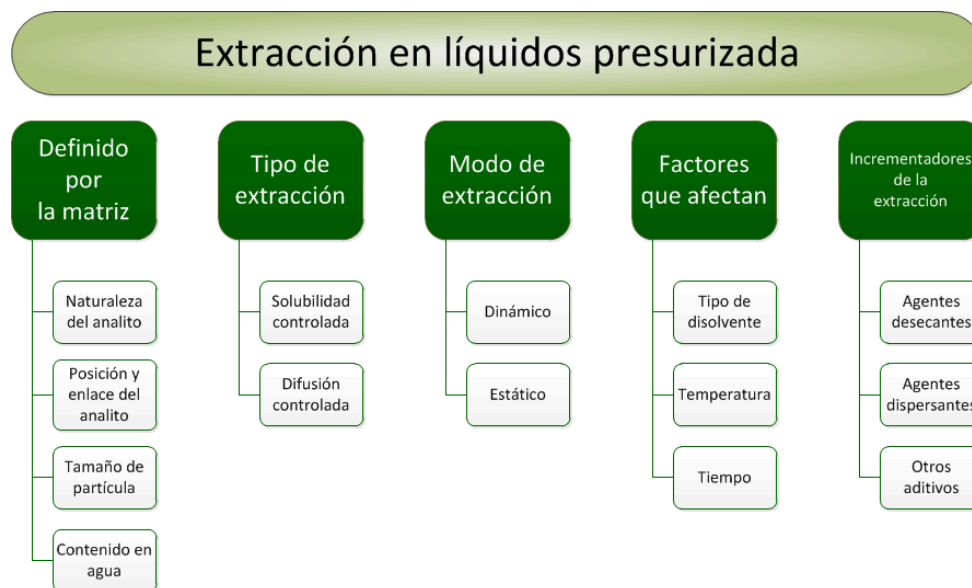


Figura 4. Factores que afectan a PLE y optimización de parámetros

C. Extracción en Agua Supercaliente (Super-Heated Water Extraction, SHWE). En los últimos años ha aumentado el interés en el uso del agua como disolvente para PLE con el objetivo de reducir o eliminar el uso de disolventes orgánicos [25]. Esta técnica utiliza agua en fase condensada entre 100 °C y el punto crítico. SHWE es más limpia, rápida, económica y respetuosa con el medio ambiente que los métodos convencionales. El agua es un disolvente único debido a su alto nivel de enlaces de hidrógeno, su elevado punto de ebullición y su alta constante dieléctrica y polaridad. Cuando la temperatura del agua aumenta (baja presión), la polaridad disminuye y, por tanto, la extracción se hace más selectiva. A 100 °C, puede actuar como un disolvente medio/no-polar. El mayor inconveniente de SHWE, particularmente para análisis de trazas, es que el extracto obtenido es una disolución acuosa diluida y se necesita una etapa posterior de concentración/extracción previa al análisis.

D. Extracción en Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE). La elección de un fluido supercrítico, usualmente dióxido de carbono, como disolvente de extracción permite una extracción más selectiva y proporciona cinéticas de reacción más rápidas que la mayoría de los líquidos [26]. Se puede

manipular el poder de solvatación del fluido cambiando la presión y/o temperatura y adicionando modificadores. Sin embargo, la adición de otros disolventes, tales como metanol, disminuye la selectividad y permite mayor co-extracción. Además de la reducción en el uso de disolventes orgánicos, el dióxido de carbono tiene la ventaja de que es económico, no-inflamable y respetuoso con el medio ambiente. Otra ventaja es que el disolvente (fluido supercrítico) es fácilmente eliminado de la matriz de la muestra después de la extracción reduciendo la presión. Uno de los mayores problemas con SFE es la robustez del método cuando se compara con otras técnicas.

E. Extracción Asistida por Microondas (Microwave-Assisted Extraction, MAE). MAE agita y calienta la muestra durante la extracción y permite obtener extracciones muy eficientes para muestras sólidas. Sólo es aplicable a compuestos estables térmicamente debido al aumento de la temperatura durante la extracción. Ya que los disolventes no-polares no absorben la energía de microondas, se debe utilizar al menos algún disolvente polar, tal como agua. Las principales aplicaciones de MAE son como alternativa a la extracción Soxhlet ya que se pueden obtener buenas eficiencias de extracción usando menos disolventes y menores tiempos de extracción. Como en la extracción Soxhlet, se requieren etapas posteriores de extracción o limpieza tal como SPE.

F. Extracción mediante Ultrasonidos (Ultrasonic Extraction, USE). De forma similar a MAE, se pueden utilizar los ultrasonidos (US) para mejorar la extracción. Se puede seleccionar el tipo de disolvente o mezcla para obtener la máxima eficiencia de extracción y selectividad requerida. Se pueden llevar a cabo varias extracciones simultáneamente y, como no se requiere equipo de laboratorio especializado, la técnica es relativamente económica comparada con la mayoría de los métodos de extracción más modernos. Un inconveniente de USE es que no resulta fácilmente automatizable y, al igual que MAE, no es apropiada para analitos volátiles. La presencia de agua en USE generalmente disminuye la eficiencia de

extracción y se requiere alguna preparación de la muestra. Sin embargo, tanto la selectividad como la capacidad de enriquecimiento de la muestra son limitadas, y por tanto, se requieren usualmente etapas de limpieza y/o concentración para la determinación de analitos traza en alimentos.

En esta Tesis Doctoral se han comparado las prestaciones, ventajas e inconvenientes de diferentes métodos de extracción de las muestras sólidas de alimentos como Extracción por Ultrasonidos, Extracción con Disolventes Orgánicos y Extracción Líquida Presurizada, y se ha seleccionado en cada caso la técnica que aportaba mayores ventajas.

2.2. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS

Una de las formas más básicas de técnicas de extracción o separación es la destilación. Esta técnica permite la separación de los componentes de una mezcla basada en las presiones de vapor relativas y los puntos de ebullición. La destilación en vacío se puede utilizar como una técnica de extracción para alimentos, pero consume mucho tiempo y requiere, a menudo, etapas posteriores de limpieza. Por tanto, la destilación se usa generalmente sólo de forma rutinaria para mezclas de puntos de ebullición elevados o disoluciones puras. El análisis de los constituyentes volátiles de los alimentos se lleva a cabo usualmente usando métodos de análisis de vapor, tales como espacio de cabeza o destilación de vapor.

Otras formas físicas de extracción incluyen liofilización, precipitación de proteínas, filtración y centrifugación, aunque estas se consideran a veces como técnicas de pre-tratamiento de muestra o limpieza. La mayoría de los métodos de extracción para líquidos están basados en la partición en una fase extractante inmisible y se pueden usar en extractos de muestra obtenidos de la extracción de sólidos.

Uno de los métodos más ampliamente utilizados es la Extracción en Disolventes o Extracción Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Extraction, LLE). Los analitos en disolución o las muestras líquidas se pueden extraer por partición directa con un disolvente inmiscible. LLE está basada en la solubilidad relativa de un analito en dos fases inmiscibles y es gobernada por el coeficiente del equilibrio de distribución/partición. La extracción de un analito se consigue por las diferencias en el poder solubilizante (polaridad) de las dos fases líquidas inmiscibles. LLE es tradicionalmente uno de los métodos de extracción más comunes, particularmente para compuestos orgánicos en matrices acuosas. Típicamente se utiliza un embudo de separación y las dos fases inmiscibles se mezclan por agitación y entonces se dejan separar. Para evitar las emulsiones, en algunos casos, se puede añadir sal y se realiza una centrifugación cuando es necesario. Alternativamente, se puede utilizar MSPD para evitar emulsiones. Se puede recoger cada fase para su análisis posterior. Para asegurar la extracción completa de un analito en la fase requerida, pueden ser necesarias varias extracciones sucesivas. El principal inconveniente de LLE es la necesidad de volúmenes grandes de disolventes orgánicos. También, debido a la selectividad limitada, particularmente para análisis al nivel de trazas, se necesitan etapas de limpieza o enriquecimiento/concentración previas al análisis instrumental.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado fundamentalmente la extracción con disolventes orgánicos para el tratamiento de las muestras líquidas de alimentos.

2.3. ANÁLISIS DE VITAMINAS EN ALIMENTOS

El análisis de las vitaminas en los alimentos es un gran desafío para los químicos analíticos dado que se asocia con problemas significativos. Muchos de estos problemas han sido eliminados gracias a los recientes avances en la tecnología y el desarrollo de nuevos enfoques analíticos [1]. Todos los antiguos

métodos biológicos utilizados para determinar o incluso demostrar la actividad biológica de las vitaminas, han sido en la actualidad reemplazados por métodos microbiológicos. También se han aplicado métodos físico-químicos, principalmente cromatograficos, GC y LC, para solucionar muchos problemas relacionados con el análisis de las vitaminas.

La mayoría de las vitaminas son sensibles a la luz y algunas se oxidan muy rápidamente. Por lo tanto, es necesario evitar la luz solar directa y la luz brillante y utilizar material de vidrio ámbar para prevenir la degradación. Dado que el calor también contribuye a la isomerización o a una posterior alteración de las vitaminas, debe evitarse el calor innecesario.

La vitamina A se utiliza como un nombre genérico para describir al retinol, sus ésteres y los correspondientes isómeros. Se encuentra principalmente en productos animales tales como leche, crema, mantequilla, queso, huevos, carne, hígado, riñón y aceite de hígado de bacalao. Por lo general, se encuentra como ésteres de ácidos grasos de cadena larga pero también como retinol. Los alimentos son enriquecidos normalmente con ésteres de retinol tales como acetato, palmitato o propionato utilizando formulaciones especiales que mejoran la estabilidad. La vitamina A y los correspondientes ésteres muestran un espectro de absorción característico, la posición del máximo depende del disolvente; en isopropanol es a 326 nm, en ciclohexano a 328 nm. El retinol tiene un coeficiente de absorción molar $\epsilon_{1\text{cm}}=1835$ en etanol y de 1826 en n-hexano. El retinol y sus ésteres son rápidamente destruidos por la luz, el oxígeno y los ácidos. Deben almacenarse en frascos ámbar sellados con gas inerte. Una Unidad Internacional (UI) corresponde a la actividad de 0,344 g de acetato de vitamina A puro cristalino; 0,300 μg de retinol o 0,550 μg de palmitato de retinol corresponden a 1 UI; 1 μg de retinol es equivalente a 3,333 UI de vitamina A [27].

La mayoría de los procedimientos de análisis utilizan una etapa de saponificación antes de la extracción con un disolvente orgánico adecuado. Las condiciones para la saponificación pueden variar, pero en general, la muestra se

saponifica preferentemente bajo nitrógeno utilizando una mezcla de hidróxido de potasio acuoso, etanol o metanol, agua y con la adición de un antioxidante como ácido ascórbico, pirogalol o butilhidroxitolueno (BHT). Principalmente pueden utilizarse dos modos de cromatografía (fase normal y fase reversa) para la cuantificación de la vitamina A. En algunos de los sistemas cromatográficos, se logra una separación entre el todo-*trans*-retinol y el 13-*cis*-retinol.

La vitamina E que se encuentra en la naturaleza abarca una serie de compuestos denominados tocoferoles y tocotrienoles. Estos compuestos tienen diferentes actividades biológicas y, por lo tanto, es importante que sean cuantificados individualmente. Entre las fuentes más ricas de vitamina E están los cereales, germen de cereales y la mayoría de las semillas oleaginosas, nueces y aceites a partir de ellos. También se encuentra en los vegetales con hojas (lechuga, espinaca, repollo, puerro), en la grasa animal y en la leche, mantequilla y queso. El representante más importante es α -tocoferol. En los alimentos procesados, la vitamina E puede ser suplementada como α -tocoferol o acetato de α -tocoferol. Los coeficientes de absorción molar en metanol tienen los siguientes valores: α -tocoferol, $\epsilon_{1\text{cm}}=76$ (292 nm); β -tocoferol, $\epsilon_{1\text{cm}}=89$ (296 nm); γ -tocoferol, $\epsilon_{1\text{cm}}=91$ (298 nm) y δ -tocoferol, $\epsilon_{1\text{cm}}=87$ (298 nm). El acetato de α -tocoferol es relativamente estable en atmósfera de oxígeno, es hidrolizado por la humedad en presencia de álcalis o ácidos fuertes liberando α -tocoferol, el cual es rápidamente oxidado por el aire.

El procedimiento más común para la determinación de tocoferoles incluye la saponificación alcalina de las muestras seguida por la extracción con un disolvente orgánico apropiado. Cualquier éster de α -tocoferol que pueda haberse agregado como un suplemento a los alimentos será convertido en α -tocoferol por este procedimiento. Se saponifica la muestra preferentemente bajo nitrógeno utilizando una mezcla de etanol o metanol, agua, un antioxidante tal como el ácido ascórbico, hidroquinona o BHT e hidróxido de potasio acuoso. Los tocoferoles son muy sensibles al oxígeno en un ambiente alcalino. Por lo tanto, el alcohol y el

antioxidante deberían agregarse a la muestra antes de la adición de la disolución de hidróxido de potasio necesario para la saponificación y procurándose la eliminación de todo el oxígeno del recipiente de reacción. El análisis puede llevarse a cabo por cromatografía en fase normal o en fase reversa. La detección se realiza preferentemente mediante fluorescencia debido a su mayor selectividad, así como también por los menores límites de detección obtenidos si se compara con UV.

La vitamina D de efecto antirraquítico se encuentra en diversas formas, las dos más importantes son la vitamina D₂, ergocalciferol, previamente conocida como calciferol y la vitamina D₃, colecalciferol. La vitamina D₂ se encuentra en pequeñas cantidades en los aceites de hígado de pescado y algunas esponjas. La vitamina D₃ está más ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra en cantidades relativamente grandes en los aceites de hígado de pescado, y en cantidades más pequeñas en pescados tales como arenque, caballa, salmón y sardina, en huevos, mantequilla y queso.

Las vitaminas D₂ y D₃ exhiben una absorción máxima a 265 nm en disoluciones alcohólicas. Los valores de la absortividad molar son: $\epsilon_{1\text{cm}}=475$ para vitamina D₂ (etanol) y $\epsilon_{1\text{cm}}=480$ para vitamina D₃ (etanol). Se destruyen relativamente rápido por acción de la luz, oxígeno y ácidos. Por lo tanto, deben almacenarse bajo nitrógeno en frascos sellados. Se define 1 UI como la actividad biológica correspondiente a la cantidad de 0,025 μg de vitamina D₂ o D₃ puras.

Las vitaminas D₂ y D₃ son extraídas de los alimentos mediante saponificación utilizando una disolución alcohólica de hidróxido de potasio seguida de una extracción en disolvente. La determinación en el extracto de la muestra se realiza mediante LC en fase normal seguida por LC en fase reversa analítica. Se usa un detector UV.

La vitamina K de efecto antihemorrágico se encuentra en una serie de formas. El miembro más importante del grupo es la vitamina K₁. Está presente en plantas verdes, vegetales verdes (repollo, espinaca), patatas, frutas, tomates y

también en aceites de hígado. El enriquecimiento de las fórmulas infantiles con vitamina K₁ ayuda a proteger a los recién nacidos contra la muerte por hemorragia. La vitamina K₁ exhibe absorción máxima en éter de petróleo a 242, 248, 260, 269 y 325 nm. Los valores correspondientes de $\epsilon_{1\text{cm}}$ son 396, 419, 383, 387 y 68. Se degrada lentamente por el oxígeno atmosférico y se destruye rápidamente por la luz. Es relativamente estable al calor, pero se descompone por álcalis.

Dado que la vitamina K₁ no es estable bajo condiciones alcalinas, el material lipídico por lo general presente en fórmulas infantiles y leche en polvo es eliminado por una digestión con lipasa y la vitamina es extraída con hexano. La determinación en la disolución del extracto de la muestra se realiza mediante LC en fase normal seguida por LC analítica en fase reversa. La detección se realiza mediante UV a 269 nm.

Las vitaminas del grupo B presentan buena solubilidad en agua y, por lo tanto, se han desarrollado métodos principalmente microbiológicos para su determinación. Algunas de las vitaminas del grupo B también pueden determinarse utilizando procedimientos LC o mediante métodos colorimétricos.

La tiamina existe en la naturaleza como tiamina, monofosfato de tiamina, difosfato de tiamina, trifosfato de tiamina y unida a las proteínas. Las principales fuentes de vitamina B₁ son los granos de los cereales, cáscara de arroz, germen de cereales, levaduras, clara de huevo, vegetales, frutas, patatas, huevos, leche, hígado y carne. Muestra un espectro de absorción característico en la región de 200 a 300 nm. En una disolución de ácido clorhídrico 0,1 N, muestra absorción máxima a 245 nm. En ausencia de luz y humedad, las sales de tiamina son relativamente estables al oxígeno atmosférico. La disolución ácida también es estable; sin embargo, se produce descomposición en disolución neutra o alcalina.

El método más ampliamente utilizado para la determinación de la vitamina B₁ incluye una hidrólisis ácida seguida por una defosforilación enzimática de los

ésteres y la cuantificación de la tiamina liberada. La detección en el extracto final se realiza mediante fluorimetría después de oxidar a tiocromo, que es un compuesto fluorescente.

Los compuestos activos de la vitamina B₁₂ presentan una estructura química complicada, el más conocido e importante es la cianocobalamina. La vitamina B₁₂ se encuentra sólo en material de origen animal y en los metabolitos de microorganismos. Las fuentes importantes son el hígado, riñón y yema de huevo. La disolución acuosa muestra una absorción máxima a 278, 361 y 550 nm. La cianocobalamina y sus disoluciones neutras o débilmente ácidas son relativamente estables al aire y calor pero son inestables frente a la luz y la radiación UV. La vitamina B₁₂ es sólo levemente estable a álcalis, ácidos fuertes y agentes reductores [27].

El procedimiento más utilizado a lo largo de esta Tesis Doctoral para la determinación del contenido total de las vitaminas ha sido la saponificación alcalina de las muestras. Cualquier éster que pueda haberse agregado como un suplemento a los alimentos se convirtió en la forma libre por este procedimiento. La saponificación de la muestra se ha llevado a cabo utilizando una mezcla de metanol, agua, un antioxidante tal como el ácido ascórbico e hidróxido de potasio acuoso.

Por otra parte, el método utilizado para la determinación de la vitamina B₁ incluye una hidrólisis ácida seguida por una defosforilación enzimática de los ésteres y la cuantificación de la tiamina liberada. Por el contrario, cuando se busca la determinación de todas las formas posibles de las vitaminas, así como de sus ésteres, se ha llevado a cabo la extracción con un disolvente orgánico apropiado.

3. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Con frecuencia, la preparación de la muestra es un área olvidada que durante años ha recibido mucha menor atención que la separación cromatográfica o las etapas de detección. Existen muchas analogías entre los métodos de preparación de la muestra y las separaciones analíticas y, frecuentemente, la etapa de preparación de la muestra puede considerarse como el primer plato teórico en el proceso de separación [28].

El concepto básico de método de preparación de muestra es convertir una matriz real de una muestra en un formato que sea adecuado para el análisis mediante una separación u otra técnica analítica. Esto se puede conseguir empleando una amplia variedad de técnicas, que deben tener en común los siguientes objetivos:

- Eliminar los interferentes potenciales (para la separación o las etapas de detección) de la muestra, con objeto de aumentar la selectividad del método.
- Aumentar la concentración del analito y, por tanto, la sensibilidad del ensayo.
- Si se necesita, convertir el analito en una forma más adecuada para la detección o separación.
- Proporcionar un método robusto y reproducible que sea independiente de las variaciones en la matriz de la muestra.

El control de calidad y la seguridad en la cadena alimentaria demandan una metodología apropiada que sea rápida y fácilmente transferible. No se puede olvidar la etapa de muestreo y hay que balancear la posibilidad de utilizar tamaños de muestra más pequeños con la necesidad de que la muestra para análisis sea representativa. Para análisis de alimentos en particular, las técnicas de muestreo

deben ser muy cuidadosas y cualquier porción o alícuota tomada para análisis debe ser representativa de la muestra original total. A veces, es posible utilizar tamaños de muestra pequeños, ya que con objeto de obtener los límites de detección tan bajos requeridos para análisis al nivel de trazas, a menudo se requieren tamaños de muestra relativamente grandes. Tamaños de muestra más grandes se traducen en la necesidad de técnicas de limpieza más eficientes y, por tanto, posiblemente costes superiores. Sin embargo, generalmente, el mayor tamaño de muestra utilizado para la extracción, conduce a resultados más precisos [29].

La optimización de la preparación de la muestra es necesaria no sólo para reducir el tiempo total del análisis sino también porque cada etapa añade una fuente potencial de error. Esto se hace incluso más crítico a las bajas concentraciones requeridas para análisis al nivel de ultratrazas, ya que una proporción significativa de la variabilidad de un método particular, como la reproducibilidad del análisis, disminuye cuando lo hace la concentración.

Con objeto de minimizar la incertidumbre en la preparación de la muestra, es necesario considerar diversos factores. Como estadísticamente la incertidumbre de un método está relacionada directamente con el número de etapas, una reducción en el número de etapas de un método reduce la incertidumbre. Por ejemplo, para compuestos orgánicos volátiles, se requiere la transferencia de los analitos a la fase vapor, posiblemente con una etapa de preconcentración, antes del análisis por GC. Una técnica de extracción más selectiva puede eliminar o reducir la limpieza requerida. El uso de técnicas automáticas también lleva a una reducción de la incertidumbre. Los métodos automáticos generalmente son más reproducibles que los métodos manuales y disminuirán el tiempo de preparación de la muestra que, a menudo, es la etapa más lenta en los procedimientos de análisis.

La obtención de una muestra apropiada es la primera etapa obvia de un procedimiento analítico [30]. El tratamiento de la muestra previo a la extracción es

a menudo determinante en el éxito del procedimiento de aislamiento del analito. Se han estudiado [31] varias combinaciones de tamizado, molienda o pulverización de muestras antes de la determinación de los elementos extractables. Otros autores estudian de forma general [32] los efectos del contenido de agua, temperatura, tiempo, estabilidad y concentración de la muestra. También se ha demostrado [33] que los patrones de partición entre solutos pueden cambiar con la liofilización de las muestras.

Casi todas las técnicas de extracción desarrolladas en los últimos 10–15 años tienen en común la miniaturización. Se ha discutido [34] la relación de los procedimientos de extracción miniaturizados para integrarlos en línea con los sistemas analíticos. Cuando se desarrollan los protocolos analíticos, una etapa clave es la determinación de la recuperación del analito para el método total y para cada procedimiento individual. Así, se establece [35] la diferencia entre el factor de recuperación y la recuperación aparente. También es importante considerar la dependencia de la calibración con la concentración de analito en la muestra y el efecto matriz.

Los límites de residuos legislados para contaminantes en los alimentos están disminuyendo a medida que los gobiernos y los consumidores demandan mejor calidad y estándares más altos, y esto lleva a la necesidad de metodologías más sensibles y útiles. Al mejorar los límites de detección, la evaluación del riesgo en la seguridad de los alimentos es mejor y más robusta, lo que se traduce en una protección mejor para el consumidor.

Los métodos de análisis deben ser suficientemente sensibles para alcanzar no sólo la cantidad de sustancias permitidas por los límites legislados, sino también para detectar sustancias prohibidas, especialmente para compuestos que pueden ser potencialmente genotóxicos o cancerígenos. La evaluación de los riesgos para la salud pública y la seguridad de los alimentos conlleva el empleo de datos fiables y la identificación inequívoca de un analito para que los datos o la evaluación de los riesgos no pueda ser cuestionada.

El uso de MS en análisis instrumental ha permitido la detección de un analito mediante la selección de iones específicos o transiciones. La necesidad de métodos rápidos y universales, que cubran un gran número de compuestos por debajo de los bajos niveles requeridos por la legislación, ha llevado al desarrollo de diferentes extracciones. Por ejemplo, el método QuEChERS para análisis de pesticidas [36] usa volúmenes más bajos de disolvente y poca o nula limpieza. Sin embargo, es todavía importante disponer de procedimientos buenos de extracción y preparación de la muestra, para métodos LC-MS en concreto [37-38].

También es particularmente importante considerar el impacto de los efectos de matriz sobre los sistemas de detección, tales como eficiencia de ionización, ruido del detector y límites de detección y cuantificación, como resultado directo de la preparación de la muestra. Esto es importante sobre todo para la determinación de contaminantes traza en matrices complejas, tales como alimentos [39-40]. El uso de una técnica de limpieza apropiada, como extracción en fase sólida, reduce significativamente las interferencias de la matriz y, por tanto, conduce a una mejora de la relación señal/ruido, permitiendo así la confirmación mediante el espectro de masas y una disminución en los límites de cuantificación. Los beneficios añadidos son que la limpieza de la muestra mejora los cromatogramas y generalmente disminuye el tiempo de mantenimiento del instrumento. Además, el aumento de sensibilidad (menor ruido) en la etapa de detección y la reducción de compuestos interferentes facilita la identificación inequívoca y la confirmación, lo que es particularmente importante cuando se investiga la presencia o ausencia de bajas concentraciones de un analito en matrices de alimentos.

Aunque se utiliza generalmente la cromatografía después de la extracción como técnica de separación, algunas técnicas cromatográficas pueden considerarse como métodos de preparación de muestra. Por ejemplo, la introducción de volúmenes de inyección grandes en una columna fría se puede utilizar como una técnica de preconcentración. Los métodos de fraccionamiento

por GC, LC o Cromatografía de Exclusión por Tamaños/Cromatografía de Permeación en Gel (GPC) se pueden utilizar como técnicas de limpieza. Estos métodos, en los que se recogen fracciones discretas y se transfieren indirecta o directamente al sistema analítico, se incluyen en el ámbito de los métodos hifenados.

4. DERIVATIZACIÓN

La derivatización se puede incorporar a los métodos analíticos para aumentar la volatilidad de un compuesto o para añadir grupos funcionales para mejorar el análisis instrumental. Ejemplos en análisis de alimentos incluyen la metilación de ácidos grasos, transesterificación de lípidos y sililación de carbohidratos. Aunque se han desarrollado numerosos métodos, sólo se usan unas pocas reacciones en análisis rutinarios. La derivatización también se puede llevar a cabo sobre fibras/recubrimientos antes, durante o después de extracciones por adsorción [41–42].

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la derivatización fluorescente para la determinación de tiamina y sus ésteres y benfotiamina. Se llevó a cabo la derivatización por oxidación química de la tiamina con ferricianuro a pH 13 para formar el tiocromo fluorescente. Así, se consigue mejorar la sensibilidad y selectividad de los procedimientos propuestos.

5. LA QUÍMICA VERDE EN EL LABORATORIO CROMATOGRÁFICO

La Química es un ingrediente indispensable en nuestras vidas. Es algo cercano e, incluso, entrañable cuando en nuestros labios se convierte en metáfora: algo poco natural «lleva química», pero si sintonizamos con alguien se atribuye a una «buena química», y al referirnos a algo genuino y excelente lo

calificamos de «químicamente puro». Pero la Química es mucho más que palabras. Le debemos una buena parte del bienestar de la sociedad actual y se prevé que este papel protagonista proseguirá en el futuro. Es obvio que todos los servicios ofrecidos por la química tienen un precio. A menudo es acusada de dañar al medio ambiente con procesos contaminantes y energéticamente poco eficientes.

Como consecuencia de estos agravios, se ha abierto paso la Química Verde (*Green Chemistry*), una forma de hacer química cuya prioridad es el respeto al medio ambiente. Ello no debe suponer procesos más costosos, por el contrario, se ha iniciado el camino hacia sistemas ecoeficientes, con ahorros significativos de recursos y energía, y con el resultado final de un menor gasto económico.

5.1. ¿QUÉ ES QUÍMICA VERDE?

La Química Verde reduce o elimina el uso o generación de sustancias peligrosas de los productos y procesos químicos, reduciendo sus impactos en la salud humana y el medio ambiente. Sus tecnologías abarcan todos los tipos de procesos químicos, incluyendo síntesis, catálisis, condiciones de reacción, separaciones, análisis y medida. Idealmente, una tecnología de Química Verde incorpora sus principios desde las primeras etapas del diseño de un nuevo producto o proceso [43]. En todas las disciplinas, el foco se centra en minimizar los riesgos y maximizar la eficiencia de cualquier proceso químico, reducir e, idealmente, eliminar la contaminación como medio para proteger la salud humana.

La Tabla 2 muestra los 12 principios de la Química Verde que proporcionan a los científicos e ingenieros un marco para diseñar nuevos materiales, productos, procesos y sistemas [44]. Tres temas dominan los 12 principios: residuos, riesgos (salud, medioambiental y seguridad) y energía.

Tabla 2. Los 12 Principios de la Química Verde [44]

Número	Principio
1	Prevenir la aparición de residuos
2	Maximizar la economía
3	Diseñar síntesis químicas menos peligrosas
4	Diseñar reactivos químicos y productos seguros
5	Usar disolventes y condiciones de reacción seguros
6	Aumentar la eficiencia energética
7	Usar materias primas renovables
8	Evitar derivados químicos
9	Usar catalizadores, no reactivos estequiométricos
10	Diseñar reactivos químicos y productos degradables
11	Analizar en tiempo real para evitar contaminación
12	Minimizar la posibilidad de accidentes

5.2. ¿QUÉ ES QUÍMICA ANALÍTICA VERDE?

Muchos, aunque no todos, de los 12 principios de la Química Verde se pueden aplicar directamente a la Química Analítica. De los indicados en la Tabla 2, los números 1, 5, 6, 8, 11 y 12 son los principios considerados como más relevantes para el analista [45]. La mayoría de las aplicaciones de la Química Verde en el mundo analítico implican el diseño de métodos analíticos que reducen o eliminan sustancias peligrosas. Estas sustancias pueden o no ser usadas en o generadas por el método [43].

En la discusión sobre la Química Analítica Verde, es importante su definición, dada por J. Namiesnik [46] y L.H. Lawrence [47]: "el uso de las técnicas de química analítica y las metodologías que reducen o eliminan disolventes, reactivos, preservativos y otros productos químicos que son peligrosos para la

salud humana o el medioambiente y que pueden permitir también análisis más rápidos y más eficientes energéticamente sin comprometer los criterios de rendimiento". El último prerequisite a menudo es el cuello de botella en el traspaso de los métodos existentes a métodos verdes.

Desafortunadamente, en el pasado, muchos métodos analíticos requerían el uso de grandes cantidades de productos químicos peligrosos para la preparación de la muestra y análisis. Por ejemplo, muchos métodos de extracción líquido-líquido usaban cantidades importantes de disolventes clorados, como diclorometano. Antes del análisis, el disolvente debía ser evaporado, liberando así vapores tóxicos a la atmósfera.

Por tanto, el objetivo de la Química Analítica Verde es usar procedimientos que generen menos residuos peligrosos, sean seguros y sean más respetuosos con el medio ambiente. En los últimos años han aparecido libros de texto [48–49] que deberían ayudar a educar mejor a los químicos analíticos actuales y futuros sobre el desarrollo de métodos más eco-amigables.

Estos principios de la Química Verde son también aplicables en el diseño de los métodos de preparación de muestras para análisis. La mayoría de las muestras de alimentos que se analizan por métodos instrumentales de separación son demasiado complejas, están demasiado diluidas o son incompatibles con el sistema cromatográfico, lo que impide su introducción directa. Se necesita preparar la muestra antes de su introducción en el sistema, mediante fraccionamiento, extracción o pre-separación. En consecuencia, existe gran interés en desarrollar nuevas técnicas de extracción rápidas y fiables para preparación de muestras para su análisis que mejoren las actuales [50].

Las técnicas modernas de preparación de la muestra ofrecen la posibilidad de automatización, son técnicas limpias y selectivas, tienen mayor rapidez y eficacia e, idealmente, son baratas, sencillas y sin disolventes tóxicos.

En los métodos tradicionales de extracción (por ejemplo, Soxhlet), el líquido en ebullición está en contacto con la muestra sólida y se produce lentamente la difusión del disolvente con un intercambio de energía poco eficaz y procesos estáticos o semi-estáticos. Como consecuencia, la extracción es lenta, poco selectiva y poco eficaz. Por el contrario, las nuevas técnicas de preparación de muestras de alimentos conducen a extracciones de sólidos con mayor rapidez y eficacia ya que utilizan fluidos supercríticos o líquidos a alta temperatura. También las extracciones de líquidos se producen con mayor rapidez y selectividad.

5.3. ¿QUÉ ES CROMATOGRAFÍA VERDE?

En el pasado, los analistas han dado poca importancia a los aspectos "verdes" de sus métodos cromatográficos [43]. Sólo cuando se han establecido regulaciones de seguridad, como con el uso de disolventes clorados y ciertos disolventes aromáticos (por ejemplo, benceno), se han sustituido por disolventes menos tóxicos. La escasez de acetonitrilo en 2008–2009 causó una conmoción y los cromatografistas comenzaron a pensar en minimizar su uso para LC en fase reversa [51], aunque más por razones prácticas y económicas, que por razones ecológicas.

Sin tener en cuenta el uso de disolventes y reactivos peligrosos e inflamables en la preparación de la muestra, el empleo de cantidades grandes de disolventes como fase móvil en análisis de LC en fase reversa representa el área más importante en la que podría impactar el laboratorio cromatográfico verde. Un LC analítico típico puede utilizar un litro de disolvente orgánico por día e incluso más si la automatización permite trabajar toda la noche.

El acetonitrilo es con diferencia el disolvente más usado en LC por sus características únicas tales como disolvente para un rango amplio de solutos, acidez baja, reactividad química mínima, bajo límite UV y compatibilidad con MS. Reducir el consumo de acetonitrilo es de lejos la primera opción en LC verde pero

los principios de ésta se aplican a otros disolventes orgánicos y aditivos. Como ejemplo, reemplazar el aditivo ácido trifluoroacético (TFA) que es citotóxico, corrosivo y persistente en el medio ambiente con ácido fórmico que tiene una toxicidad más baja y se descompone a CO₂ y H₂O [52].

De acuerdo con la guía de selección de disolventes verdes, agua, acetona, etanol y metanol se pueden considerar respetuosos medioambientalmente para aplicaciones LC.

Se debe seleccionar metanol sobre acetonitrilo cuando sea posible. Ambos disolventes muestran algo de toxicidad pero de mayor importancia en Química Verde es que los residuos de ambos ingredientes de la fase móvil se sometan a etapas especiales de tratamiento de residuos. El etanol tiene características similares al acetonitrilo y metanol con la característica favorable adicional de baja volatilidad dando una fase móvil de composición y almacenamiento más estable, mucha menor toxicidad y costes de eliminación menores (biodegradable). Los factores negativos del etanol son la elevada viscosidad de las mezclas etanol/agua y las regulaciones de control del etanol que hacen complicado su uso rutinario. La acetona tiene excelentes características solubilizantes y es muy miscible con un amplio rango de clases de disolventes, incluyendo agua. La acetona es poco usada en LC debido a su fuerte absorción en el UV en la región hasta 340 nm. La acetona, sin embargo, es aceptable cromatográficamente cuando se usa detección universal tal como índice de refracción (RID), dispersión de luz con evaporación (ELSD), descarga en corona (CAD) y MS.

En la actualidad, la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es el modo LC preferido para la separación de compuestos polares e ionizables. En HILIC, la separación se consigue primariamente por reparto entre una capa enriquecida con agua sobre la superficie de una fase estacionaria polar y una fase móvil que contiene un porcentaje elevado de un disolvente orgánico [53]. Aunque se han evaluado varios disolventes en HILIC, el acetonitrilo es el disolvente más genérico. Entre los aditivos utilizados, muchos de ellos son más compatibles con

MS que las reguladoras fosfato y borato. La inversión de los constituyentes de la fase móvil en HILIC (por ejemplo, elevadas concentraciones de agua y concentraciones bajas (o cero) de un constituyente orgánico) es otra alternativa para hacer HILIC más "verde" para el análisis de compuestos ionizables y polares.

Una de las posibilidades más inmediatas para reducir el uso de disolventes en cromatografía es disminuir el volumen de la columna, acortando su longitud y disminuyendo el diámetro interno. El uso creciente de MS como método de detección para LC es actualmente "más verde" que LC-UV ya que las dimensiones de las columnas son menores, la sensibilidad del instrumento mayor y presenta la imposibilidad de trabajar con grandes cantidades de vapores de disolvente. Un instrumento analítico de LC, equipado con una columna convencional LC (15 a 25 cm de longitud, 4,6 mm i.d., empaquetada con partículas de 5 μm) y que opera a un flujo usado comúnmente de 1 mL/min, genera bajo operación continua, cerca de 1,5 litros de disolvente cada día, lo que supone aproximadamente 500 litros de disolvente en un año, de los cuales típicamente el 50% es disolvente orgánico, en la mayoría de los casos acetonitrilo. Esta es una estrategia importante para reducir el consumo de disolventes LC. Parámetros relevantes relacionados con la columna para un menor consumo de disolventes incluyen reducción del diámetro interno, usar longitudes de columna más cortas y partículas más pequeñas [52].

Así, obviamente, la siguiente etapa es la miniaturización. Las columnas capilares con diámetros internos en el rango 100–300 μm han dado paso a una generación moderna de instrumentos optimizados para trabajar bajo condiciones de Cromatografía Líquida de Resolución Ultra-Alta (Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography, UHPLC). También se ha producido la posterior miniaturización a las nanocolumnas; estas columnas tienen diámetros internos de 50–75 μm e incluyen columnas LC-chip que hacen directamente de interfase con el sistema LC–MS nanospray [54]. La técnica nanoLC "verde" solo es válida con el uso de bombas de nanovelocidad de flujo (microfluidos). Con los verdaderos nanosistemas, el uso de disolventes es casi minúsculo (en el rango de unas pocas decenas de mililitros

al mes), lo que ya es un enfoque cromatográfico "verde". La miniaturización no sólo se refiere al uso del disolvente de la fase móvil sino que también se minimizan los requerimientos de masa de muestra y disolvente para la muestra.

Una forma obvia de reducir el consumo de disolventes sin pérdida de eficiencia es reducir la velocidad de flujo. Al pasar de una columna de 4,6 mm de i.d. que opera a 1 mL/min, a una columna de 2,1 mm, ésta debería operar a 0,21 mL/min. Esta ventaja significa una reducción del consumo de disolvente por un factor de 4,8 sin perjudicar la separación. La reducción del diámetro interno se acompaña a menudo de un aumento de sensibilidad. Esto es una consecuencia directa de la dilución reducida de los solutos en la fase móvil y la aparición de bandas más concentradas en el detector. Esta ganancia en sensibilidad se aprecia con el detector UV, de fluorescencia y MS. Una reducción del consumo de disolvente por miniaturización requiere ajustes en la instrumentación. Hay que minimizar los volúmenes extra-columna para controlar el ensanchamiento de banda pre- y post-columna. Esto incluye el inyector y volumen de la célula del detector y los volúmenes de todas las conexiones entre el inyector y detector. Además, hay que adaptar las bombas para que operen con microcolumnas.

Otra opción para disminuir el consumo de disolvente es aumentar la "productividad cromatográfica". Esto se consigue generalmente reduciendo el tamaño de partícula en combinación con una disminución de la longitud de la columna. Así, una columna con partículas de 5 μm y 15 cm de longitud daría aproximadamente 15.000 platos teóricos. Cuando se usan partículas de sub-2 μm , una columna de 5 cm de longitud es suficiente para obtener el mismo número de platos. Como la longitud de la columna se reduce por un factor de tres, el tiempo de análisis es, en primera instancia, reducido por el mismo factor. Sin embargo, las curvas de eficiencia *versus* velocidad de la fase móvil para columnas sub-2 μm son planas y se pueden aplicar velocidades de flujo elevadas sin pérdida de eficiencia. Al escoger partículas sub-2 μm se requieren adaptaciones instrumentales, ya que aumenta la presión de la columna. Cuando el tamaño de partícula es la mitad, la

presión aumenta por un factor de cuatro. La instrumentación debe ser capaz de operar a presiones elevadas. En el mercado hay una variedad de sistemas de UHPLC y están reemplazando gradualmente a la instrumentación LC convencional [52].

Otro punto de discusión es la velocidad de análisis, que a menudo se confunde con el ahorro de disolvente. La temperatura es una variable poderosa en LC para modificar la velocidad, selectividad, eficiencia y detectabilidad [55]. Operando a temperatura elevada, la viscosidad de la fase móvil disminuye y la difusión en la fase móvil se hace más rápida, disminuyendo el tiempo de análisis.

Si la velocidad no es importante y el tiempo de análisis a temperatura ambiente es aceptable, se puede reducir significativamente la cantidad de modificador orgánico en la fase móvil y, en algunos casos, se puede eliminar completamente, obteniendo fases móviles puramente acuosas [56]. La fuerza eluotrópica del agua en LC en fase-reversa aumenta drásticamente con la temperatura y a 200°C está próxima a la del acetonitrilo a temperatura ambiente.

Para establecer una técnica analítica verde, hay que tener en cuenta que los factores críticos a considerar son la sensibilidad del método, selectividad, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), velocidad, exactitud y precisión. La naturaleza del analito, la matriz y el método de generar una señal proporcional a la concentración de todos los analitos entran en juego cuando se desarrolla un método analítico con éxito. Durante el desarrollo de un método, debe tenerse en cuenta la consideración de su potencial verde. Idealmente, los métodos deben necesitar poca o ninguna preparación de la muestra, usar pocos reactivos químicos y desarrollarse en un ambiente totalmente acuoso, en lugar de requerir pretratamientos de la muestra tales como digestión ácida, extracción en disolventes, evaporación, reconstitución y derivatización. La mayoría de los métodos convencionales de LC no se ajustan a la primera categoría porque tanto la preparación de la muestra como la separación implican el uso de disolventes orgánicos, a veces en cantidades importantes.

Se han propuesto dos aproximaciones para cuantificar un método analítico verde. El perfil de criterios para estos métodos se ha basado en cuatro palabras clave: PBT (persistente, bioacumulativo y tóxico), peligroso, corrosivo y residuos. Se han usado los 12 principios de la Química Verde (Tabla 2) como guía para establecer este perfil.

Más recientemente, se ha propuesto un sistema simple para evaluar y comparar la limpieza de los métodos químicos [57]. El sistema incluye la energía como criterio y la categoría peligro se divide en salud, seguridad y peligro ambiental. Este criterio tiene en cuenta la cantidad de energía consumida por la instrumentación y el equipo usado en el método analítico. Así, entra en juego el tiempo requerido por el instrumento y la energía usada se expresa en kilowatios/hora. Este criterio verde se basa, por tanto, en la potencia consumida.

Los líquidos iónicos (ILs) han atraído una atención creciente en Química Analítica. Estos líquidos están compuestos generalmente de un catión grande (a menudo una sal de amonio o fosfato) y aniones inorgánicos más pequeños, de tal forma que la coordinación (atracción electrostática) entre los iones sea algo débil. Así, por debajo de 100 °C, estos ILs son líquidos con baja volatilidad, viscosidad y miscibilidad variables, buena estabilidad frente a la temperatura y conductividad electrolítica. Debido a su baja volatilidad, los ILs son considerados disolventes verdes.

Sin embargo, algunos ILs también son tóxicos, su biodegradabilidad es cuestionable, el reciclado no siempre es factible y son caros comparados con otros disolventes. Aunque los ILs han encontrado uso como fases estacionarias en GC y como aditivos en LC a niveles muy bajos [58], todavía no se ha tomado en serio su uso reemplazando al disolvente orgánico en LC. Tienen inconvenientes por su elevada viscosidad y alta absorción en el UV.

6. MINIATURIZACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA ANÁLISIS DE ALIMENTOS

La extracción selectiva de analitos está basada en las diferencias en sus propiedades químicas y físicas. Estas son típicamente el peso molecular, carga, solubilidad (hidrofobicidad), polaridad o diferencias en volatilidad. Existen numerosas técnicas de extracción de muestra, cada una de las cuales resulta apropiada para diferentes tipos de analitos y matrices [59].

A pesar de las técnicas avanzadas de separación e identificación, pocas veces es posible analizar alimentos sin manipulación. Las técnicas tradicionales para preparación de la muestra, basadas en la digestión húmeda con la adición de reactivos, consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de reactivos, que son caros, generan numerosos residuos, contaminan la muestra y pueden enriquecer los analitos [60].

Los métodos de preparación de muestra miniaturizados son las técnicas más atractivas para el pretratamiento de mezclas de muestras complejas previo al proceso cromatográfico, especialmente en sistemas de separación en microescala. Un acoplamiento efectivo en línea de preparación de muestra miniaturizada y separación en microcolumna permite obtener varias ventajas del sistema combinado, tales como [61]:

- (1) velocidad de análisis alta con gran eficiencia
- (2) coste de operación bajo debido a que no hay consumo de disolvente o es extremadamente bajo
- (3) desarrollo de un procedimiento analítico respetuoso con el medio ambiente, y
- (4) análisis altamente selectivo desarrollando sistemas diseñados para aplicaciones particulares.

Considerando las ventajas descritas y también los requerimientos recientes para los procesos analíticos, se deben estudiar la miniaturización de los métodos analíticos y la instrumentación para una gran variedad de aplicaciones, tales como análisis de alimentos, análisis medioambiental, análisis toxicológico y forense, y otras situaciones analíticas.

Las técnicas de microextracción representan un paso adelante en la miniaturización del laboratorio analítico y se pueden considerar como uno de los desafíos del trabajo analítico.

La diferencia entre las distintas técnicas se debe tanto a la naturaleza de las fases como al principio del equilibrio. Cuando el agente extractante es una fase sólida, como ocurre en la Microextracción en Fase Sólida (Solid-Phase Microextraction, SPME), el fenómeno de adsorción juega un papel importante y así el proceso está regido mayoritariamente por fuerzas intermoleculares entre el analito y la fase sólida extractante. La competición entre las dos fases por el analito es clara. Los puntos activos para la adsorción en la fase extractante atrapan al analito y el proceso de equilibrio sigue reglas diferentes a las que rigen entre fases líquidas, siguiendo las isothermas de adsorción. Así, el análisis se puede llevar a cabo por desorción térmica, cuando se usa GC.

El mismo concepto de adsorción rige para la interacción gas-sólido implicada en Microextracción en Fase Sólida en Espacio de Cabeza, HS-SPME. La temperatura es, en este caso, la variable esencial. La energía suministrada por el aumento de temperatura debe ser superior que la correspondiente a las fuerzas de interacción entre los analitos en la fase gas y la fase extractante sólida.

Cuando se usa una fase sólida, tienen lugar los fenómenos de adsorción y partición, mientras que la partición es el único proceso cuando están implicados dos líquidos, como en LPME. La partición está regida por la solubilidad. El analito se extrae en base a su solubilidad en la fase extractante. En consecuencia, la selección de la fase extractante debe realizarse considerando la polaridad de los

analitos, su tamaño molecular, y las interacciones físicoquímicas entre el analito y la muestra líquida y aquellas entre el analito y la fase extractante líquida. En esta situación, compiten dos fases líquidas por el analito. Al aumentar la solubilidad del analito en la fase líquida extractante, aumentará la eficiencia de extracción.

A pesar de estas similitudes y diferencias en los conceptos físico-químicos implicados en estos sistemas de microextracción y en la forma en que se aplica cada técnica, hay aspectos comunes a todas ellas para obtener eficiencias de extracción elevadas. Hay que tener en cuenta que todos estos conceptos y fenómenos ocurren entre sólo unas gotas de fases líquidas y mínimas cantidades de fases sólidas. Así se consigue la miniaturización del proceso analítico, manteniendo la elevada eficiencia del tratamiento de la muestra. Son ventajas adicionales la portabilidad, sostenibilidad y bajo precio, que hacen a las técnicas de microextracción muy atractivas para cualquier laboratorio.

En algunos casos, sólo están implicadas dos fases, como SPME o algunas técnicas LPME aplicadas en el modo de Inmersión Total (DI), mientras que están implicadas tres fases diferentes en el modo de Espacio de Cabeza (HS) o la Microextracción Líquido-Líquido-Líquido (LLLPMME).

La Tabla 3 ilustra las diferentes situaciones [62].

Tabla 3. Conceptos básicos de las técnicas de microextracción

Analito	Fase extractante	Técnica	Equilibrio	Fenómeno
Líquido	Sólido	SPME	Líquido-Sólido	Adsorción y partición
Gas	Sólido	HS-SPME	Líquido-Gas-Sólido	Adsorción y partición
Líquido	Líquido	LPME	Líquido-Líquido	Partición
Gas	Líquido	HS-LPME	Líquido-Gas-Líquido	Partición
Líquido	Líquido	LLLPMME	Líquido-Líquido	Partición

7. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA

La técnica LLE, basada en la transferencia del analito de la muestra acuosa a un disolvente inmiscible con agua, se emplea ampliamente para preparación de la muestra. LLE es una técnica versátil utilizada en muchos métodos analíticos estándar. A pesar de su amplio uso, se considera una técnica larga, tediosa y de operación en multietapas [63], en la que los problemas de formación de emulsiones dificultan la automatización. Aún más importante es que el uso de grandes cantidades de disolventes tóxicos influye en el análisis de trazas, produce problemas de salud al personal del laboratorio y origina residuos, no siendo respetuosa con el medio ambiente, añadiendo así un coste operacional extra para el tratamiento de los residuos.

La necesidad de reducir el uso de disolventes ha conducido al desarrollo de las técnicas LPME, también denominada Microextracción Líquido-Líquido (Liquid-Liquid Microextraction, LLME). Se trata esencialmente de una extracción líquido-líquido miniaturizada, en la cual se producen las particiones de los analitos entre la fase acuosa predominante y un volumen muy pequeño de un disolvente orgánico. Esta técnica fue introducida en 1996 [64] y posteriormente revisada por Wood y col. [65].

La LPME, y técnicas de microextracción relacionadas, usa cantidades mínimas de disolvente. Es rápida y económica, con mínima exposición a disolventes orgánicos tóxicos. LPME se lleva a cabo normalmente entre una pequeña cantidad de un disolvente inmiscible con agua y una fase acuosa conteniendo los analitos de interés. La fase aceptora puede ser introducida directamente o suspendida por encima de la muestra para extracción en espacio de cabeza. El volumen de la fase receptora está en el rango de microlitro o submicrolitro. De esta forma, se pueden obtener factores de enriquecimiento altos debido a la elevada relación volumen de muestra/volumen de fase aceptora [62].

La Figura 5 muestra una representación esquemática de los modos de extracción basados en LPME [66] con fase aceptora confinada.

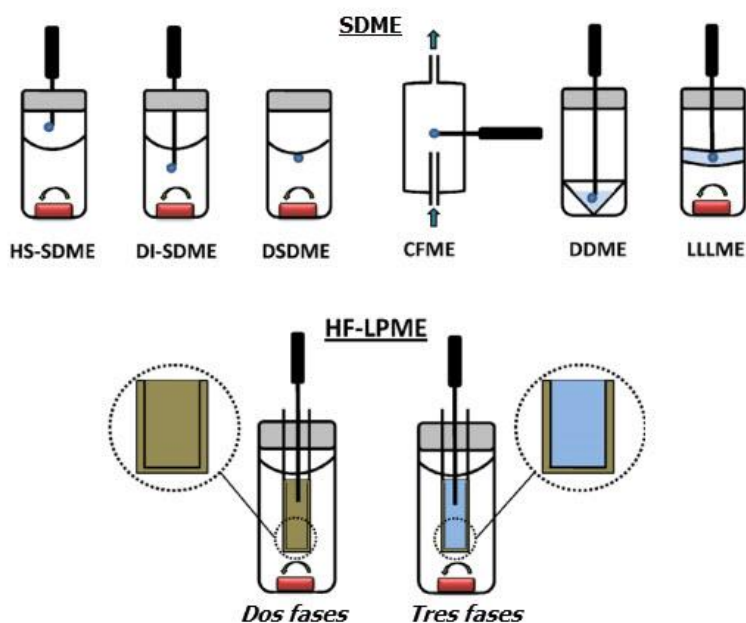


Figura 5. Representación esquemática de las tres categorías principales de LPME y sus diferentes modos operacionales

LPME ha encontrado un lugar importante en la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos de muestras de agua, debido a la simplicidad de la matriz y a que el procedimiento se puede aplicar directamente después de operaciones simples como filtración, centrifugación, ajuste del pH, etc.

Por el contrario, la complejidad de ciertas muestras de alimentos y su capacidad de degradación son inconvenientes que dificultan su aplicación en este área. De hecho, el uso de estas técnicas en análisis de alimentos requiere frecuentemente una etapa previa de extracción o limpieza, especialmente para muestras sólidas o semisólidas, seguida por una reconstitución adecuada en un medio acuoso en el que se pueda llevar a cabo el procedimiento LPME.

La microextracción se puede conseguir usando fases líquidas inmiscibles (microextracción con disolventes) o una membrana para separar las fases

aceptora-donadora (extracción con membranas). Las Figuras 6 y 7 muestran otros esquemas de la clasificación de estas técnicas [67] para aquellos casos en donde la fase aceptora se encuentra unida o confinada en un soporte o espacio reducido.

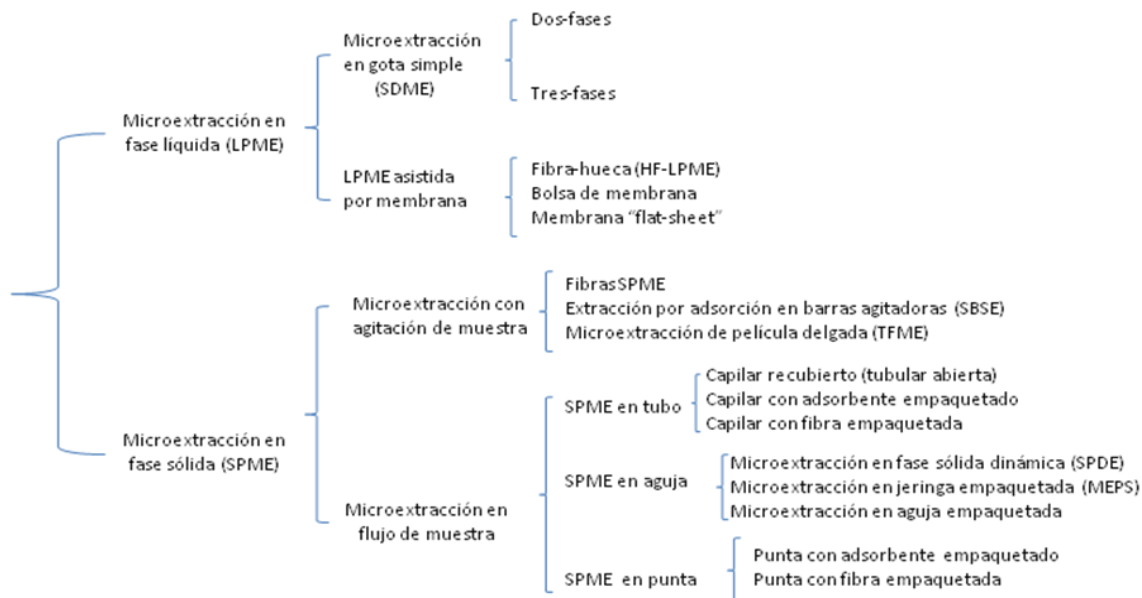


Figura 6. Clasificación de las técnicas de microextracción

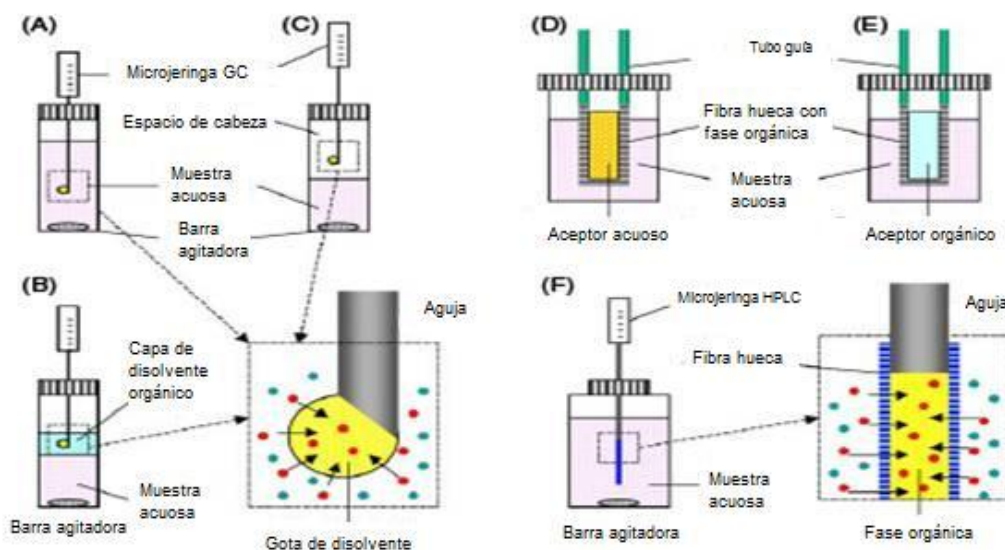


Figura 7. Técnicas de microextracción LPME y SDME: A, SDME por inmersión directa (dos-fases); B, SDME por inmersión directa (tres-fases); C, SDME en espacio de cabeza; D, HF-LPME en forma de U (tres-fases); E, HF-LPME en forma de U (dos-fases); F, HF-LPME en forma de barra (dos-fases)

Las dos metodologías principales que derivan de la microextracción con disolventes son [68]:

- Microextracción en Gota Simple (Single-Drop Microextraction, SDME) [64, 69-71], donde la fase aceptora es una microgota de un disolvente orgánico inmiscible con agua suspendido en una disolución acuosa donadora (sistemas de dos-fases).
- Microextracción usando películas de líquidos inmiscibles incluyendo Microextracción Líquido-Líquido (sistemas de dos-fases) [71] y Microextracción Líquido-Líquido-Líquido usando re-extracción (sistemas de tres-fases) [72-73].

LPME asistida con Membranas puede utilizar una Fibra Hueca (HF), una Bolsa de Membrana o un Módulo de Membrana de Hoja Plana (Figura 7) [67]. Las técnicas desarrolladas se pueden dividir en dos categorías principales [74]:

- Técnicas de membrana porosa, donde las disoluciones a ambos lados de la membrana están en contacto físico a través de los poros de una membrana.
- Técnicas de membrana no porosa, donde la membrana forma una fase separada (polimérica o líquida) entre las disoluciones donadora y aceptora.

El uso de membranas presenta las ventajas de elevada selectividad, formación de extractos limpios y alto grado de enriquecimiento. Así se facilita el análisis de trazas reduciendo adicionalmente el consumo de disolventes.

Para evitar los efectos de memoria se han utilizado fibras huecas hidrofóbicas porosas impregnadas con una fase orgánica [75]. El método resultante también se considera una evolución de los métodos de microextracción con disolventes, ya que protege el sistema de microgota y/o ayuda a la formación de películas de líquido inmiscibles [76-77].

Se pueden utilizar dos modos de muestreo en LPME: dos-fases y tres-fases. En el modo LPME de dos-fases, el analito se extrae de una muestra acuosa (fase

donadora) a través de un disolvente inmiscible con agua inmovilizado en los poros de la fibra hueca y relleno del disolvente orgánico (fase aceptora) (Figura 8) [68].

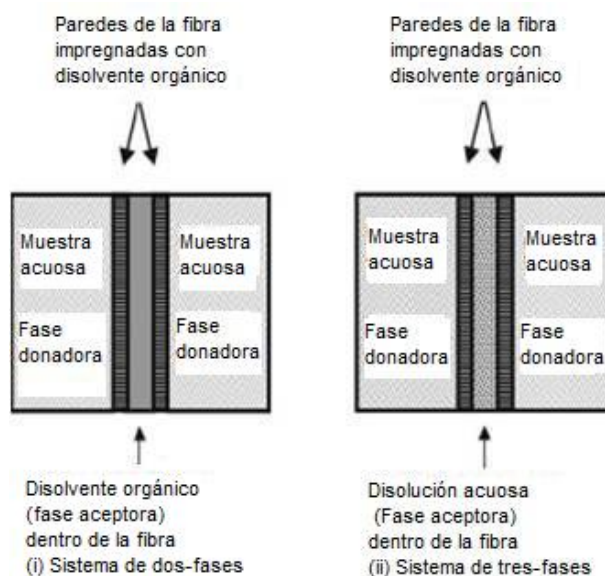
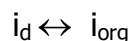


Figura 8. Sección de la fibra hueca en el interior de la muestra acuosa durante (i) LPME dos-fases y (ii) LPME tres-fases

El proceso de extracción de dos-fases LPME para un analito i se puede ilustrar de la siguiente forma [68]:



y se caracteriza por la relación de distribución $K_{org/d}$, que se define como la relación de concentraciones del analito i en la fase orgánica y la donadora en condiciones de equilibrio.

El éxito de LPME en dos-fases requiere relaciones de distribución grandes para los analitos. Tales valores $K_{org/d}$ corresponden a compuestos moderadamente o altamente hidrofóbicos conteniendo grupos ácidos o básicos, o compuestos neutros de hidrofobicidad similar. Debe mencionarse que en LPME en dos-fases, el extracto final es una fase orgánica, compatible con técnicas analíticas como GC o LC [78].

En el modo de muestreo LPME en tres-fases, el analito i se extrae de una disolución acuosa (fase donadora) a través del disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra hueca (fase orgánica) a otra fase acuosa (fase aceptora) presente en el interior del lumen de la fibra hueca (Figura 8). La fase orgánica en este caso sirve como una barrera entre las disoluciones acuosas aceptora y donadora, previniendo la mezcla de estas dos fases. El modo de muestreo de tres-fases se combina usualmente con sistemas LC o electroforesis capilar (CE), ya que la fase aceptora es acuosa.

Globalmente, el proceso de extracción LPME de tres-fases para el analito i se puede ilustrar como sigue:



El proceso LPME de tres-fases se caracteriza por $K_{org/d}$ y $K_{a/org}$, que son las relaciones de distribución en el equilibrio entre la fase orgánica y la fase donadora, y entre la disolución aceptora y la fase orgánica, respectivamente.

La relación de distribución global $K_{a/d}$ entre la fase aceptora y la donadora se puede escribir como:

$$K_{a/d} = K_{org/d} \times K_{a/org}$$

El ajuste de la composición de las fases donadora y aceptora es crítica para el éxito de LPME de tres-fases. Se pueden conseguir relaciones grandes $K_{a/d}$ ($\gg 1$) cuando los analitos en la fase aceptora se convierten por reacciones, tales como protonación o complejación [79], en especies que tendrán muy poca afinidad por la fase orgánica. De esta forma, se previene la re-extracción de los analitos de la disolución aceptora a la donadora. Así, el sistema de tres-fases también extraerá compuestos ácidos o básicos que tengan una relación $K_{org/d}$ baja y un valor $K_{a/org}$ alto, manteniendo el requerimiento de una relación de distribución global grande. Esto es muy importante, porque el rango de aplicabilidad de LPME se puede extender a analitos ionizables que tengan bajo $K_{org/d}$ cambiando simplemente del modo de muestreo LPME de dos-fases a tres-fases.

Una etapa crucial en la optimización del método para ambos modos LPME de dos-fases y de tres-fases es la selección del disolvente orgánico. En general, hay que probar diversos disolventes inmiscibles con agua que difieran en polaridad y solubilidad en agua. También es posible usar una mezcla de disolventes orgánicos. La selección final del disolvente orgánico se debe basar en varias consideraciones. En primer lugar, debe tener una baja solubilidad en agua para prevenir la disolución en la fase acuosa, y una baja volatilidad, que evitará la evaporación del disolvente durante la extracción. Cuando se usa el modo LPME de dos-fases, el disolvente orgánico debería proporcionar alta solubilidad para los analitos y, cuando se acopla a GC, también debería tener un comportamiento GC excelente. En el modo LPME de tres-fases, el disolvente debería asegurar valores altos de $K_{org/d}$ y, más importante, para $K_{a/org}$. Finalmente, el disolvente debe tener una polaridad similar a la de la fibra de polipropileno para ser inmovilizado fácilmente en sus poros. La impregnación con el disolvente es muy importante en LPME, ya que la extracción ocurre en la superficie del disolvente inmovilizado.

Los volúmenes de las fases donadora y aceptora deberían seleccionarse teniendo en cuenta varias consideraciones. En general, tanto en los sistemas LPME de dos-fases como de tres-fases, la sensibilidad del método se puede incrementar disminuyendo la relación de volúmenes de la fase aceptora a la donadora. Sin embargo, se debe ajustar el volumen de la disolución aceptora usada para la extracción dependiendo de la técnica analítica acoplada a LPME. Por ejemplo, en contraste con GC y CE, en el instrumento LC son fácilmente inyectables volúmenes de muestra en el rango 10–25 μL , así se debe analizar la fase aceptora total, proporcionando potencialmente límites de detección más bajos.

La transferencia de masa es un proceso dependiente del tiempo y su velocidad se reduce cuando el sistema se acerca a las condiciones de equilibrio. Si la extracción es exhaustiva o es una técnica de pre-concentración, solamente se alcanza el equilibrio después de la exposición de la disolución aceptora a la muestra durante un período de tiempo largo. Para la optimización del método es,

por tanto, importante establecer los perfiles de tiempo de extracción de los compuestos, así como el tiempo después del cual se alcanza el equilibrio. Aunque los tiempos de exposición más largos a la disolución aceptora generalmente hacen aumentar la eficiencia de extracción, no siempre resulta práctico utilizar tiempos de extracción muy largos. A menudo se escogen tiempos de muestreo que sean menores que el tiempo total del cromatograma, para asegurar una alta frecuencia de muestreo. Sin embargo, cuando se trabaja en el tramo constante de los perfiles del tiempo de extracción, se obtiene una mayor precisión. En estudios en que se utilizan tiempos de muestreo grandes, se asegura la frecuencia de muestreo alta mediante la extracción simultánea de un gran número de muestras.

7.1. MICROEXTRACCIÓN EN GOTA SIMPLE

El uso de una gota simple como colector de analitos en Química Analítica se inicia con el trabajo de Dasgupta en la década 1990s [80] y un trabajo posterior sobre un sistema de extracción gota-a-gota miniaturizado [64]. El grupo de Cantwell fue el primero en desarrollar técnicas de Microextracción en Gota Simple directamente compatibles con análisis cromatográfico [69, 81]. He y Lee introdujeron el uso de una jeringa GC en una técnica llamada Microextracción en Fase Líquida Dinámica [71]. Ma y Cantwell desarrollaron la Microextracción de Gota Simple de tres-fases con el uso de una membrana líquida y una microgota acuosa de disolución aceptora [73]. Liu y Lee desarrollaron una técnica de Microextracción de Flujo Continuo compatible con GC [82].

La extensión de SDME al análisis en espacio de cabeza se desarrolló en los primeros años 2000 independientemente por Przyjazny y col. [83-84], Jeannot y col. [85] y Vickackaite y col. [86]. Se utilizaron disolventes orgánicos con altos puntos de ebullición como 1-octanol o n-hexadecano para la determinación de analitos volátiles o semivolátiles. HS-SDME permitió obtener mayor estabilidad de la gota, evitar problemas de contaminación de la gota o pérdidas por matrices de

muestras "sucias", y en algunos casos proporcionó velocidades de extracción mayores comparadas con los métodos de inmersión directa. Se han revisado los últimos desarrollos de SDME en 2002 [70] y, más recientemente, en 2007 [87] y 2010 [88]. También se ha publicado recientemente un libro detallando la teoría y práctica de SDME y otros métodos relacionados [89]. Se han introducido muchas aplicaciones que se recogen en varias revisiones [70, 87, 90-91]. En el desarrollo de métodos SDME [92] se utilizan disolventes orgánicos que son inmiscibles con el agua y compatibles con GC [93].

SDME implica la extracción de contaminantes orgánicos en el espacio de cabeza o una disolución de muestra acuosa en una microgota de un disolvente aceptor orgánico inmiscible con agua, comúnmente unos pocos microlitros, que se suspenden en la punta de una microjeringa. A diferencia de las fibras, las gotas se renuevan en cada extracción y es un método elegante para evitar la disponibilidad limitada de recubrimientos de las fibras, ya que se puede usar una gran variedad de disolventes [94]. El campo de aplicaciones se ha extendido incluso a la determinación de compuestos organometálicos. A pesar de ser un método virtualmente libre de disolventes, económico, rápido y simple para la extracción y/o preconcentración de analitos, se le han atribuido frecuentemente problemas con la estabilidad de la gota y falta de sensibilidad. Para evitar estos inconvenientes se ha desarrollado la HF-LPME.

SDME es una técnica de microextracción en fase líquida muy popular y es considerada la técnica básica de LPME. Las razones para esta popularidad son que es económica, no necesita equipo especial, es fácil de operar y casi libre de disolventes. En la práctica, en esta técnica se suspende una gota (típicamente 1 a 3 μL) de un disolvente extractante orgánico en la punta de una jeringa de precisión, y se expone a la muestra durante un tiempo dado y a una temperatura. Después de la extracción, la gota se retrae y se transfiere al instrumento analítico. La Figura 9 muestra los principios básicos del muestreo por SDME [62].

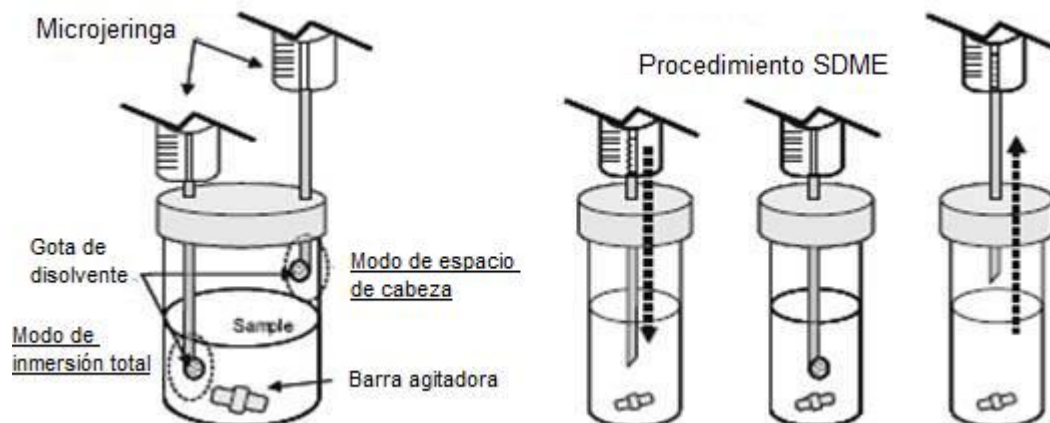


Figura 9. Configuración básica para SDME y etapas de la extracción

Una limitación adicional en el acoplamiento con LC es que los volúmenes de extracción usados típicamente en SDME son demasiado bajos para la inyección directa en sistemas de LC convencional, así se necesita una dilución posterior de la muestra, que puede disminuir la sensibilidad. La introducción de UPLC que usa volúmenes de inyección en el rango de pocos-microlitros abre la puerta para la hifenación apropiada [95].

Entre las ventajas potenciales de SDME, una ampliamente reconocida es la posibilidad de derivatización. A pesar de ello, hay pocas publicaciones sobre extracción y derivatización en SDME [96] y derivatización en-gota [97]. No sólo se ha utilizado derivatización en-gota, sino también derivatización en-jeringa después de la extracción SDME [98].

El tiempo requerido para alcanzar el equilibrio en SDME puede variar de segundos a horas, dependiendo del grado de agitación, volúmenes de las fases, área de contacto interfacial y constante de distribución del equilibrio. Para evitar tiempos de análisis excesivos, SDME se lleva a cabo a menudo bajo condiciones de no-equilibrio (control cinético).

7.2. MICROEXTRACCIÓN EN GOTA SUSPENDIDA DIRECTAMENTE

Se ha desarrollado un nuevo método de muestreo llamado Microextracción en Gota Suspendida Directamente (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME) [99]. En esta técnica, se libera una microgota de disolvente en la superficie de una muestra acuosa inmiscible mientras se agita con una barra agitadora situada en el fondo de la muestra. Después de algún tiempo, la microgota de disolvente es retraída con una jeringa y analizada. Bajo condiciones de agitación apropiadas, la gota suspendida puede permanecer en una posición superior-central de la muestra acuosa. Ya que DSDME se basa en un sistema de microgota sencilla estable en sí misma, no se requieren equipos especiales u otro material de soporte como fibras huecas. Otras ventajas incluyen facilidad de operación, estar libre de contaminación cruzada, rapidez para alcanzar el equilibrio de extracción, y la posibilidad de combinación con varios instrumentos analíticos. DSDME es un método de pre-tratamiento prometedor para el análisis rápido de componentes traza en matrices complejas.

Este procedimiento adopta un campo de flujo con rotación simétrica creado por una barra de agitación situada en el fondo de una célula de muestra cilíndrica para conseguir una microgota de disolvente suspendida en la parte central superior de la muestra acuosa. Así, se forma un sistema de microgota sencilla estable en sí misma, fácil de operar y controlar. Además, la rotación de la microgota alrededor de un eje simétrico puede producir reciclado interno e intensificar la transferencia de masa en el interior de la gota [100].

El diseño experimental de DSDME, mostrado en la Figura 10 (a), es económico y fácil de ensamblar. La célula de la muestra es un bote cilíndrico largo con una tapa. La barra de agitación usada puede ser una barra o de tipo elipsoide. Debe ser más corta que el diámetro interno de la célula de la muestra, y más pesada que la muestra acuosa. Para controlar la temperatura se utiliza una camisa de agua que rodea la célula de la muestra. En DSDME, el disolvente orgánico

escogido debe tener una solubilidad en agua muy baja para evitar la disolución en la muestra acuosa, y también debe tener baja presión de vapor para prevenir pérdidas durante la extracción.

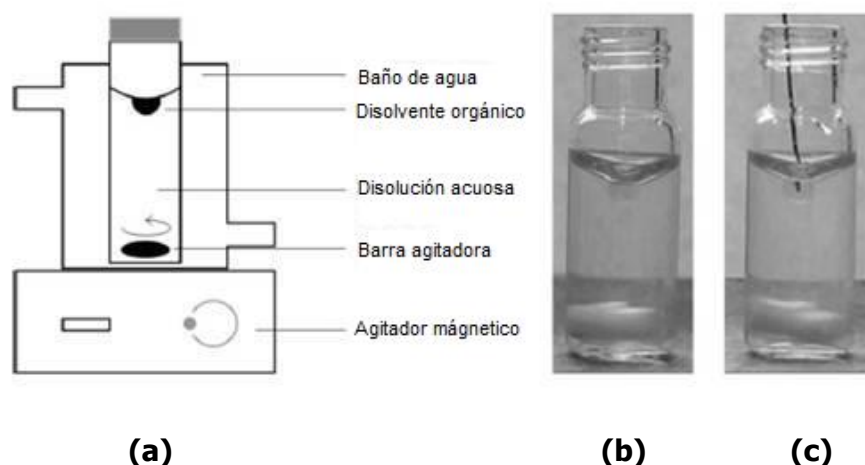


Figura 10. Esquemas de la microextracción de gota directamente suspendida: (a) dispositivo; (b) proceso de extracción; (c) durante el muestreo

Brevemente, el procedimiento DSDME es el siguiente:

- Se usa una célula de muestra cilíndrica con un tapón de rosca (el tamaño depende del volumen de la muestra acuosa (V_a)).
- Se coloca una barra agitadora recubierta de PTFE en la célula. Se añade 1 mL de la muestra acuosa (la concentración de analito es C_a^0) en la célula de la muestra. Se pone en marcha el agitador magnético y se ajusta la velocidad de agitación deseada (N).
- Se inyecta el disolvente (V_{org}) con una microjeringa.
- Se quita la tapa y se ajusta la aguja de la microjeringa justo por encima del nivel del líquido. Se recoge el disolvente sobre el centro de la superficie del líquido cuidadosamente, y entonces empieza el tiempo. Hay que mantener la tapa cerrada durante la extracción.

- Cuando pasa el tiempo (t), se quita la tapa y se inserta la aguja de la microjeringa en la gota del disolvente, se recoge cuantitativamente el microextracto con rapidez y se transfiere al cromatógrafo para el análisis del analito en el microextracto (C^0), como muestra la Figura 10 (c).

7.3. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO

7.3.1. PRINCIPIOS BÁSICOS

Una variación reciente de LPME llamada Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME) fue descrita por Rezaee y Berijani [101–102] en 2006 y consiste en la generación de microunidades de volumen de fase aceptora por el seno de la fase dadora a fin de aumentar la superficie de contacto y con ello reducir el tiempo de transferencia de fase. En este método, se inyecta una mezcla de un disolvente extractante (inmiscible en la fase dadora) y un disolvente dispersante (miscible en las fases dadora y aceptora) en una muestra acuosa. Al quedarse desprovisto el disolvente extractante del agente dispersante por su solubilidad en la fase dadora se provoca la formación de microgotas de fase aceptora inmiscibles con la dadora. Esto permite una transferencia de fases muy rápida ya que la superficie de contacto es infinitamente superior a aquellos casos en donde la fase aceptora se encuentra confinada. La mezcla se centrifuga y las finas gotas de la fase extractante sedimentan en el fondo del vaso (Figura 11) [103]. Normalmente esta técnica se ha aplicado sobre todo a muestras de agua, ya que para análisis de alimentos es necesaria una extracción inicial y/o posterior limpieza.

Cuando se inyecta rápidamente la mezcla de la fase extractante y dispersante en la muestra, se produce una gran turbulencia. Este régimen turbulento da lugar a un reparto casi homogéneo de pequeñas gotas, que se dispersan a través de la muestra acuosa. Las gotas emulsificadas tienen una gran

área interfacial, de forma que el equilibrio se alcanza rápidamente y la extracción es independiente del tiempo. Esta es la principal ventaja del método. La naturaleza del emulsificador (disolvente dispersante) también puede tener influencia en la distribución del tamaño de gota, el tamaño de gota medio y en la viscosidad de la emulsión [104]. Una vez que se produce la extracción, la disolución turbia se centrifuga. El disolvente extractante se deposita en el fondo del vaso de extracción y se inyecta, con o sin tratamiento posterior, en el sistema cromatográfico [62].

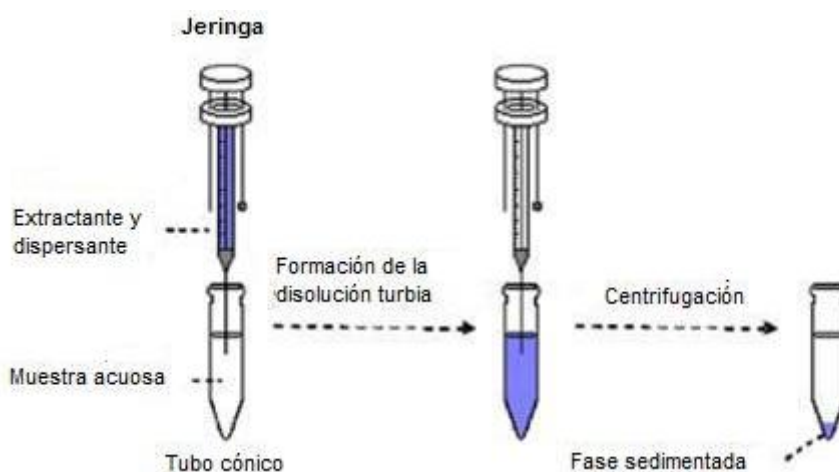


Figura 11. Representación esquemática del procedimiento DLLME

Las dos etapas de DLLME se ilustran en la Figura 12 [105].

1. Inyección de una mezcla apropiada de disolventes extractante y dispersante en la muestra acuosa conteniendo los analitos. En esta etapa, el disolvente extractante es dispersado en la muestra acuosa como gotas muy finas, que se enriquecen con los analitos. Debido a la gran área superficial entre el disolvente extractante y la muestra acuosa, se alcanza rápidamente el estado de equilibrio y la extracción es independiente del tiempo.
2. A continuación, se centrifuga la disolución turbia. Después de la centrifugación, se determinan los analitos en la fase sedimentada mediante instrumentos analíticos.

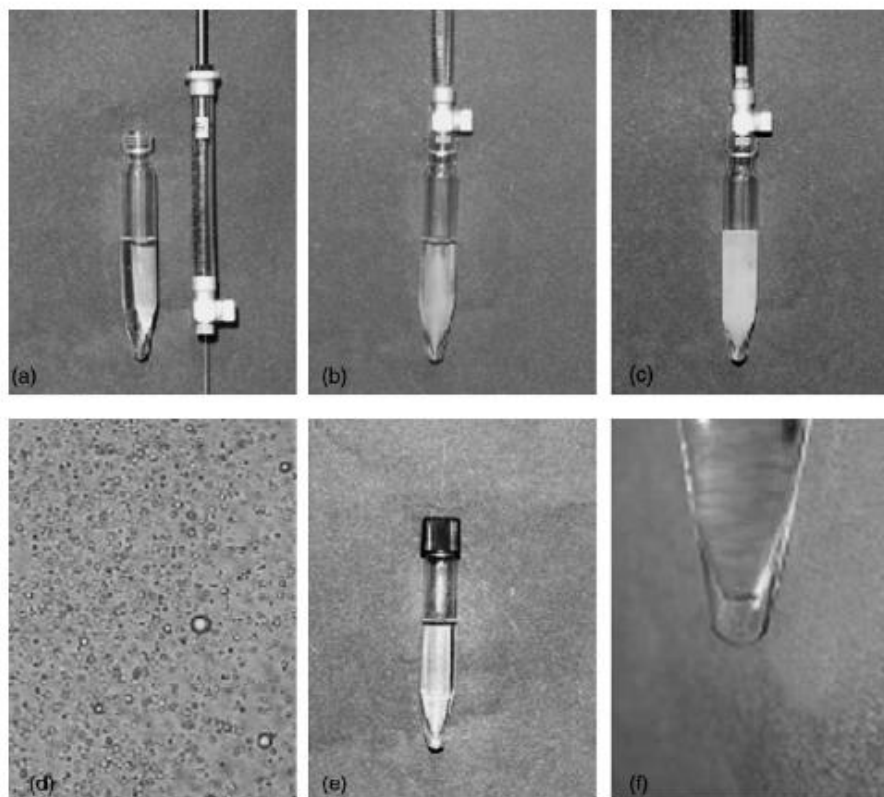


Figura 12. Fotografía de las diferentes etapas de DLLME: (a) antes de la inyección de la mezcla del disolvente dispersante (acetona) y el disolvente extractante (C_2Cl_4) en la disolución de la muestra, (b) inicio de la inyección, (c) final de la inyección, (d) fotografía al microscopio óptico, magnitud 1000 (que muestra las partículas finas de C_2Cl_4 en el estado turbio), (e) después de la centrifugación y (f) vista aumentada de la fase sedimentada

Las dispersiones líquido-líquido juegan un papel esencial en los procesos de separación y los sistemas de reacción. Esto se debe a que la gran área interfacial debida a la dispersión facilita la transferencia de masa y velocidad de reacción [106]. El volumen de fase aceptora recuperado tras la centrifugación se puede trasladar a multitud de técnicas analíticas de detección.

En DLLME, a diferencia de SDME, la jeringa no se usa como soporte de la gota durante el proceso de extracción sino para la colección e inyección del extracto, evitando así problemas tales como la deslocalización de la gota. En un principio puede dar la impresión de que esta técnica está limitada a un pequeño

número de extractantes, que deben extraer eficientemente los analitos de interés, ya que pocos disolventes cumplen las condiciones requeridas, esto es, tener mayor densidad que el agua, formar una disolución turbia estable y ser sacados fácilmente del fondo del vial cónico después de la centrifugación. Sin embargo, recientemente, la aparición de nuevos disolventes y el empleo de otros menos densos que el agua ha ampliado ostensiblemente su campo de aplicación. Por otro lado, si bien esta técnica de microextracción parece difícil de automatizar, se ha propuesto el empleo de procesos DLLME en sistema de flujo utilizando absorbentes de la fase aceptora en línea.

7.3.2. PARÁMETROS QUE AFECTAN EN DLLME

En DLLME, los factores que afectan a la eficiencia de extracción son los siguientes:

- (1) disolvente extractante,
- (2) disolvente dispersante,
- (3) volumen del disolvente extractante, y
- (4) volumen del disolvente dispersante.

La selección de un disolvente extractante apropiado es el parámetro más importante para el proceso DLLME. La elección final se debe hacer después de comparar sus diferentes propiedades físicas para conseguir buena sensibilidad, precisión y selectividad. Los disolventes orgánicos se seleccionan en base a su densidad mayor que el agua, la capacidad de extracción de compuestos de interés, formar una disolución turbia estable, tener baja solubilidad en agua y buen comportamiento cromatográfico. Los hidrocarburos halogenados tal como clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetileno se seleccionan usualmente como disolventes extractantes debido a su elevada densidad.

En la selección del disolvente dispersante es esencial su miscibilidad tanto en el disolvente extractante como en la fase acuosa. Normalmente se seleccionan como disolventes dispersantes, acetona, metanol y acetonitrilo.

El volumen del disolvente extractante tiene un efecto importante en el factor de preconcentración (PF) o enriquecimiento. Aumentando el volumen del disolvente extractante, aumenta el volumen de la fase sedimentada obtenida por centrifugación, lo que implica una disminución del PF. Por tanto, el volumen óptimo del disolvente extractante debe asegurar tanto altos PFs como volumen suficiente de la fase sedimentada para el posterior análisis después de la centrifugación. Se necesitan una relación fase extractante/muestra baja y una alta relación de distribución, K , definida como la relación de concentraciones del analito en el extractante y la fase acuosa en el equilibrio, para conseguir elevados factores de enriquecimiento (esto es, relación entre la concentración de analito en la fase extractante y la concentración inicial en la disolución de la muestra) y eficiencias de extracción. Por tanto, el parámetro K , que depende en gran medida del tipo y naturaleza de la fase extractante, es una variable clave; así, es necesario enfatizar las diferentes fases extractantes que se pueden usar, teniendo en cuenta las propiedades físicas, tales como punto de ebullición, presión de vapor, solubilidad en agua, densidad, viscosidad, tensión superficial, momento dipolar y constante dieléctrica.

El volumen del disolvente dispersante afecta directamente a la formación de la disolución turbia (agua/disolvente dispersante/disolvente extractante), el grado de dispersión del disolvente extractante en la fase acuosa y, por tanto, la eficiencia de extracción. La variación del volumen de disolvente dispersante cambia el volumen de la fase sedimentada. Así, es necesario cambiar los volúmenes de los disolventes dispersante y extractante simultáneamente para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada. El volumen útil del disolvente dispersante para que se forme bien la disolución turbia depende del volumen tanto de la fase acuosa como del disolvente extractante.

En DLLME, los factores más importantes que afectan al volumen de la fase sedimentada son:

- (a) solubilidad del disolvente extractante en agua,
- (b) volumen de la disolución de la muestra,
- (c) volumen del disolvente dispersante, y
- (d) volumen del disolvente extractante.

Desde el punto de vista experimental, para obtener el volumen de la fase sedimentada deseado, deben hacerse algunas pruebas experimentales antes del inicio del experimento principal. En primer lugar, se calcula la solubilidad del disolvente extractante en la fase acuosa. Entonces, debido al aumento de la solubilidad del disolvente extractante en presencia del disolvente dispersante, hay que hacer algunos ensayos para calcular el volumen exacto de la fase sedimentada que se obtendría usando un volumen determinado de disolventes extractante y dispersante.

Los disolventes orgánicos son, en la actualidad, las fases extractantes más usadas con la metodología ya descrita. En términos generales, la elección de un disolvente orgánico adecuado se basa en el principio "semejante disuelve a semejante" (*similia similibus solvuntur*), aunque es aconsejable tener en cuenta las propiedades físicas de los disolventes orgánicos de acuerdo con la metodología de microextracción (y el modo seleccionado) aplicada.

Los líquidos iónicos de temperatura ambiente (RTILs) son alternativas interesantes a los disolventes orgánicos debido a sus propiedades físico-químicas únicas, que dependen de la naturaleza y tamaño de sus constituyentes catiónicos y aniónicos. Estas propiedades incluyen presión de vapor muy pequeña, buena estabilidad térmica, viscosidad variable, miscibilidad con disolventes acuosos y orgánicos y fase de extracción respetuosa con el medio ambiente. Por tanto, son útiles en las técnicas LPME, además de en LLE y SPME [107].

Muy recientemente, Shemirani y col. han desarrollado una modificación de la DLLME llamada Microextracción por Agregación Inducida por Frio (Cold-Induced Aggregation Microextraction, CIAME) [108]. El procedimiento implica la adición de un líquido iónico, un surfactante no-iónico y un reactivo derivatizante, si es necesario, a una muestra acuosa colocada en un tubo de centrífuga de fondo cónico. La disolución del IL en la muestra se consigue por calentamiento del tubo de centrífuga en un baño termostatado.

Después de esto, el tubo de centrífuga se coloca en un baño de hielo y, al igual que en DLLME, se obtiene una disolución turbia. El procedimiento posterior es similar al de DLLME. Se puede emplear el efecto del ion común por adición de otro IL para disminuir la solubilidad de la fase extractante, debido a la naturaleza salina de los ILs. Por tanto, se necesitan dos ILs diferentes para llevar a cabo la extracción de los analitos en muestras con alto contenido de sal.

Comparado con DLLME, CIAME usa ILs en lugar de disolventes orgánicos como fases extractantes, evitando así el uso de un disolvente dispersante. No obstante, esta metodología introduce varias etapas antes de la centrifugación, por tanto, consume más tiempo y, debido a la elevada viscosidad de los ILs, se necesita la adición a la muestra de un surfactante no-iónico como agente anti-agregante ya que los ILs se adhieren a la pared del tubo después de la centrifugación.

7.3.3. ECUACIONES BÁSICAS

En DLLME, el área superficial entre el disolvente extractante y la fase acuosa es infinitamente grande. Por tanto, la transferencia de los analitos de la fase acuosa a la fase extractante es rápida. Por consiguiente, el estado de equilibrio se alcanza rápidamente.

El factor de enriquecimiento (EF) se define como la relación de la concentración de analito en la fase sedimentada (C_{sed}) y la concentración inicial de analito (C_0) en la muestra:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0} \quad (1)$$

C_{sed} se obtiene a partir de una gráfica de calibrado.

La recuperación de la extracción (ER) se define como el porcentaje de la cantidad total de analito (n_0), extraída a la fase sedimentada (n_{sed}):

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \quad (2)$$

$$ER = \left(\frac{V_{sed}}{V_{aq}} \right) PF \times 100 \quad (3)$$

donde V_{sed} y V_{aq} son los volúmenes de la fase sedimentada y la disolución de la muestra, respectivamente.

7.3.4. HIBRIDACIÓN DE DLLME CON OTRAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

DLLME se ha aplicado ampliamente para muestras medioambientales de aguas pero sólo en los últimos años su uso se ha extendido a otros campos como el análisis de alimentos o el análisis de drogas en matrices complejas como fluidos biológicos. Debido a la interacción de los componentes de la matriz en este tipo de muestras con disolventes orgánicos, es más difícil obtener una fase sedimentada útil para la inyección en instrumentos analíticos tales como GC o LC. Para obtener una fase sedimentada útil, se necesita la dilución o el pretratamiento de la muestra.

La popularidad de DLLME en el campo de preparación de la muestra en química analítica se confirma por el continuo crecimiento del número de trabajos publicados sobre la técnica en los últimos 6 años (Figura 13) [109].

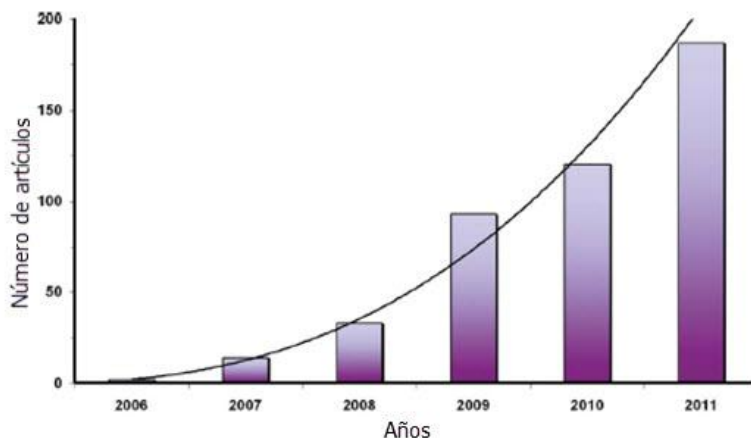


Figura 13. Evolución del número de publicaciones sobre técnicas DLLME [109]

Cuando se utiliza el procedimiento DLLME, la determinación de los analitos se lleva a cabo habitualmente usando diferentes técnicas de detección espectroscópicas atómicas y moleculares, de forma individual o combinadas con una técnica de separación (Figura 14) [109]. Las técnicas espectroscópicas más populares son Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (FAAS) y Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS), así como tecnologías hífenadas tales como GC-MS, LC-MS y LC-UV. DLLME también se ha aplicado acoplada a técnicas relacionadas con la espectrofotometría UV-vis [110].

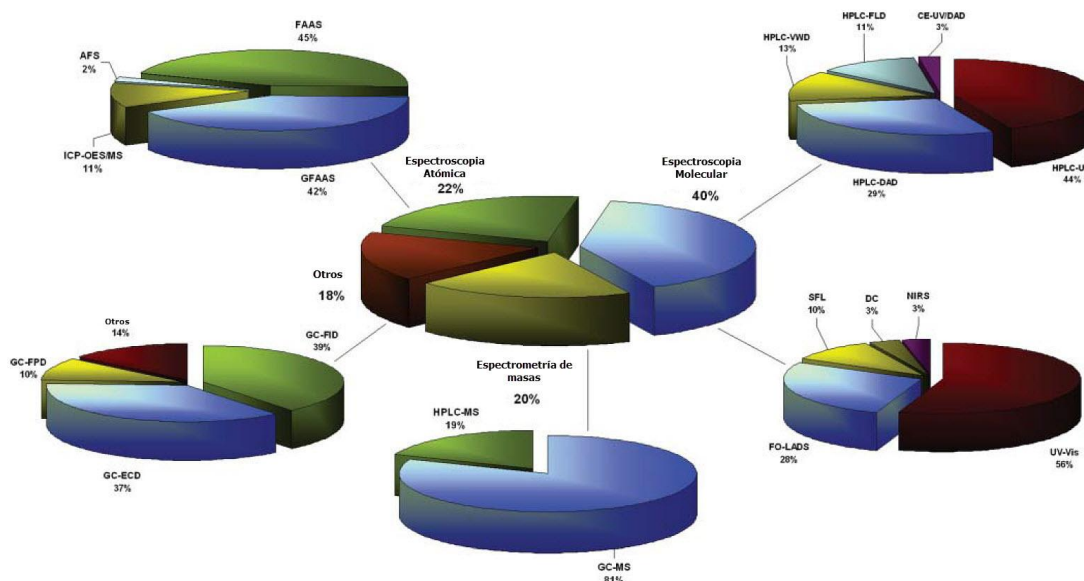


Figura 14. Acoplamiento de DLLME a técnicas de detección [109]

7.3.4.1. DLLME combinado con GC

Ya que en DLLME se usan generalmente disolventes inmiscibles con el agua, la técnica preferida para el análisis de los extractos es GC. La versatilidad de DLLME–GC está en relación a la variedad de aplicaciones en muchas áreas. Para las muestras con compuestos fuertemente polares y no volátiles, que no son apropiadas para análisis por GC, es necesario utilizar una derivatización para aumentar la volatilidad de los analitos. La aplicación de DLLME acoplada con reacciones de derivatización proporciona una técnica de derivatización y extracción en una sola etapa, simplificando en gran medida las etapas de operación y disminuyendo el tiempo de análisis.

7.3.4.2. DLLME combinado con LC

En general, LC es una técnica de separación y cuantificación ampliamente usada y muy versátil. Es importante que el disolvente orgánico extractante seleccionado para DLLME sea compatible con la fase móvil de LC. Sin embargo, los hidrocarburos halogenados tales como clorobenceno, tetracloruro de carbono, cloroformo y tetracloroetileno, seleccionados usualmente como disolventes extractantes en DLLME, no son compatibles con la fase móvil de LC en fase reversa, debido a su alta densidad, y se necesita una etapa extra para evaporar el disolvente antes del análisis final.

7.3.4.3. DLLME combinado con AAS

La mayoría del trabajo realizado en DLLME se ha focalizado a compuestos orgánicos, pero también se han hecho intentos para extender el procedimiento a analitos inorgánicos. La Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS) necesita microcantidades de la muestra para análisis. Por tanto, se puede obtener un sistema único mediante la combinación de DLLME y ETAAS. En este método, se añade un agente quelatante a la disolución de la muestra a fin de formar una especie neutra con el ión metálico. Entonces, se lleva a cabo DLLME usando los disolventes extractante y dispersante apropiados.

7.3.4.4. DLLME combinada con SPE

SPE es una técnica usada ampliamente para preparación de la muestra que permite el aislamiento de analitos seleccionados, usualmente de fases gaseosas o líquidas. Las principales ventajas de SPE son el enriquecimiento de trazas (preconcentración), simplificación de la matriz (limpieza de la muestra) e intercambio de medio. Sin embargo, DLLME no es útil para matrices complejas (tales como disoluciones altamente salinas). La combinación de ambas técnicas permite el análisis de muestras complejas [105].

7.3.4.5. DLLME combinada con SFO

DLLME utiliza disolventes extractantes tales como clorobenceno, cloroformo, tetraclorometano y disulfuro de carbono, que tienen mayor densidad que el agua y son tóxicos desde la perspectiva medioambiental. El modo de Microextracción en Fase Líquida basado en la Solidificación de la Gota Orgánica Flotante (LPME-SFO) [33-34] no emplea un soporte específico como la punta de la aguja de una microjeringa o una fibra hueca para la microgota debido al uso de disolventes orgánicos con baja densidad y punto de fusión apropiado. Además, la gota extractante se puede recoger fácilmente por solidificación a baja temperatura. Sin embargo, el tiempo de extracción es algo largo, lo que no puede satisfacer la demanda de análisis rápidos. La combinación de DLLME y LPME-SFO elimina los problemas mencionados. La gran superficie de contacto entre la muestra y las gotas del extractante acelera la transferencia de masa, tan rápida como en DLLME, y acorta el tiempo de extracción como en LPME-SFO. En DLLME-SFO, se pueden usar disolventes extractantes de menor toxicidad. La gota flotante extractante se solidifica y se colecta en la superficie de la disolución para análisis [105].

7.3.4.6. DLLME combinada con SFE

A pesar de las diversas ventajas de DLLME, no es útil para la extracción de compuestos de muestras sólidas y se necesitan etapas extra de preparación de la muestra, lo que conlleva el consumo de volúmenes grandes de disolventes

orgánicos tóxicos. A veces, se necesitan procesos de secado y filtrado, que también consumen mucho tiempo. También, a veces, es imposible llevar a cabo la extracción de analitos de matrices complejas. Se ha adoptado la extracción en fluidos supercríticos como un medio para extraer diferentes sustancias de matrices sólidas. En SFE-DLLME, los disolventes colectores tales como metanol y acetonitrilo en SFE se pueden usar como disolvente dispersante en DLLME. Después de llevar a cabo SFE y coleccionar los analitos extraídos en el disolvente dispersante, se añade un volumen adecuado del disolvente extractante en el disolvente colector. Finalmente, se inyecta la mezcla en la disolución acuosa. Las otras etapas son similares al método DLLME. SFE-DLLME permite obtener PF altos para determinar compuestos orgánicos en muestras sólidas y puede eliminar la necesidad de evaporar el disolvente colector al final de SFE. La vaporización del disolvente orgánico es un proceso que consume tiempo y emisión del disolvente a la atmósfera, lo que no es correcto medioambientalmente. La resolución de SFE-DLLME tiene un gran potencial en el análisis de compuestos orgánicos traza en muestras sólidas reales [105].

7.3.5. APLICACIONES DE DLLME

La técnica resulta una herramienta apropiada para el análisis de muestras con una matriz relativamente simple, tal como muestras acuosas. Sin embargo, recientemente han aparecido publicaciones relativas al análisis de otras muestras, tales como alimentos, frutas y verduras, así como a muestras biológicas, medioambientales y técnicas (Figura 15) [109]. A pesar de sus ventajas incuestionables, DLLME también presenta inconvenientes. El más serio con la técnica convencional es la necesidad de usar disolventes con densidad mayor que la del agua, especialmente disolventes clorados tóxicos. Además, la centrifugación se considera la etapa que consume más tiempo de DLLME. Además, otras dificultades derivan de la necesidad de usar un gran exceso de disolvente dispersante.

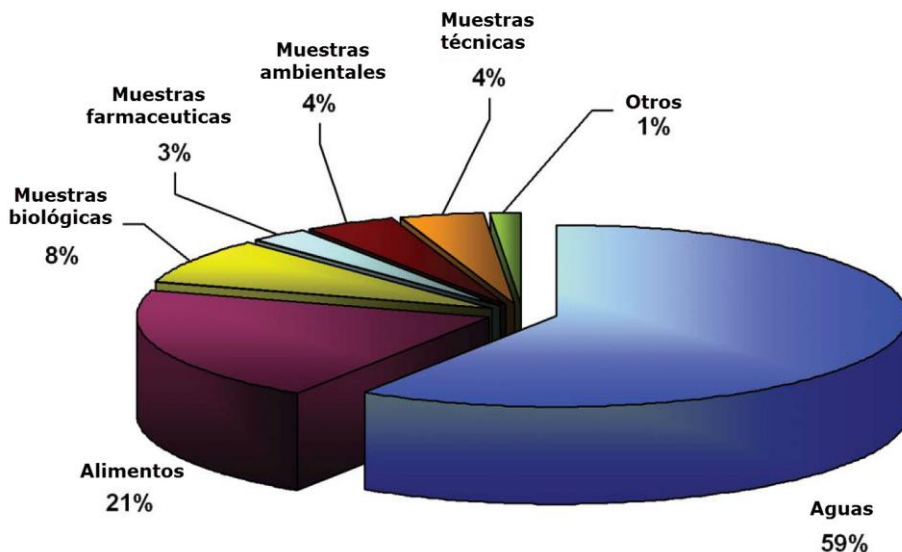


Figura 15. Aplicaciones de DLLME en el análisis de muestras reales [109]

Las dificultades de la DLLME convencional han llevado a los investigadores a buscar soluciones alternativas. Como resultado, se han desarrollado en un tiempo muy corto nuevos modos y técnicas derivadas, que incluyen las siguientes:

1. Microextracción Dispersiva Líquido-Líquido con Líquidos Iónicos (IL-DLLME), que permite reemplazar los disolventes clorados extractantes tóxicos [107]. La extracción se consigue por mezcla intensa o agitación manual, llevando a cabo una etapa de calentamiento-enfriamiento, usando un disolvente dispersante o por adición de otro líquido iónico, o como consecuencia de la formación del disolvente *in situ* o con la ayuda de ultrasonidos.
2. DLLME-SFO, que combina las ventajas de ambas técnicas [33-34]. Sin embargo, el uso de esta forma de extracción tiene un inconveniente, ya que el disolvente extractante debe tener un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente (en el rango de 10-30°C).
3. Técnicas que permiten el uso de disolventes extractantes de densidad menor que el agua, basados en el uso de dispositivos de extracción especiales [111] o

en el uso de un disolvente auxiliar para ajustar la densidad de la mezcla de disolventes.

4. Técnicas enfocadas a la automatización de DLLME basadas en Inyección en Flujo y la técnica de Inyección Secuencial [112].
5. Microextracción–Emulsificación Asistida por Ultrasonidos (USAEME) y Microextracción Asistida por Vortex (VALLME) [113].

7.4. MICROEXTRACCIÓN-EMULSIFICACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

Los métodos LPME han sido ampliamente utilizados por el bajo consumo de disolventes orgánicos, la simplicidad del dispositivo experimental y los elevados factores de enriquecimiento. Sin embargo, el tiempo de extracción largo, la inestabilidad de la microgota y, a veces, la baja precisión son algunas desventajas de estos métodos.

Para evitar este inconveniente, se han desarrollado dos técnicas basadas en el uso de los ultrasonidos, la Extracción por Emulsificación Asistida por Ultrasonidos (Ultrasound–Assisted Emulsification Extraction, USAEE) [114] y la Microextracción–Emulsificación Asistida por Ultrasonidos (Ultrasound–Assisted Emulsification Microextraction, USAEME) [115]. Estas técnicas se han desarrollado usando un sistema heterogéneo de dos fases líquidas inmiscibles, en las que los efectos fundamentales de los ultrasonidos son la fragmentación de una de las fases para formar una emulsión de microgotas que aumentan la superficie de contacto entre ambos líquidos. La mayor ventaja de ambas técnicas es la elevada eficiencia de extracción que se consigue en un corto período de tiempo.

El uso de la energía ultrasónica en varias etapas del proceso analítico (por ejemplo, aislamiento, extracción líquido–líquido, formación de suspensiones, emulsificación o filtración) proporciona muchas ventajas [116]. La emulsificación asistida por ultrasonidos fue descrita por Wood y Loomis en 1927 [117]. El

mecanismo aceptado más ampliamente se basa en el efecto de la cavitación, que es crucial para desarrollar el proceso. La implosión de burbujas generadas por cavitación produce ondas intensas en el líquido de alrededor y la formación de chorros líquidos de alta velocidad, que pueden causar la disrupción de las gotas en la vecindad de las burbujas que colapsan. Estos factores con un efecto favorable en la cavitación en líquidos mejoran generalmente la emulsificación reduciendo el tamaño de las gotas en la fase dispersada después de la disrupción.

El efecto beneficioso de la asistencia por ultrasonidos a la emulsificación y sus mecanismos han sido objeto de una extensa investigación y de interés creciente en el proceso. De hecho, se han propuesto numerosos métodos donde la emulsificación con ultrasonidos es una etapa clave en la determinación de los analitos. Los ultrasonidos también facilitan los procesos de aislamiento y extracción [116]. Así, la implosión de burbujas formadas durante la aplicación de ultrasonidos produce la rápida compresión adiabática de los gases y vapores en las burbujas o cavidades y, como resultado, se producen una temperatura y presión muy eficientes. El aumento de temperatura aumenta la solubilidad de los analitos en la disolución extraída y facilita su difusión desde la matriz de la muestra al exterior; por otra parte, el aumento de presión facilita la penetración del extractante en la matriz de la muestra y la transferencia de la matriz a la fase líquida [118].

El equipo para extracción por ultrasonidos consta usualmente de un baño ultrasónico comercial o una sonda. Se ha demostrado mediante estudios comparativos que la sonda produce extracción más eficiente que el baño ultrasónico [119]. La Figura 16 muestra el dispositivo experimental utilizado [114].

Estas dos aplicaciones de la energía ultrasónica (emulsificación y extracción) se pueden combinar en una etapa sencilla para la extracción simultánea de compuestos polares y no-polares de una muestra sólida poniéndola en contacto con dos extractantes de polaridad diferente. Las pequeñas gotas en la microemulsión pueden actuar como microextractores con una elevada superficie de transferencia de masa, favoreciendo así la cinética de la extracción de la fase

dispersada. Después de la transferencia de masa, las dos fases pueden ser separadas para su análisis posterior por adición de sal o centrifugación, aunque se prefiere esta última para evitar la presencia de sustancias extrañas en el extracto.

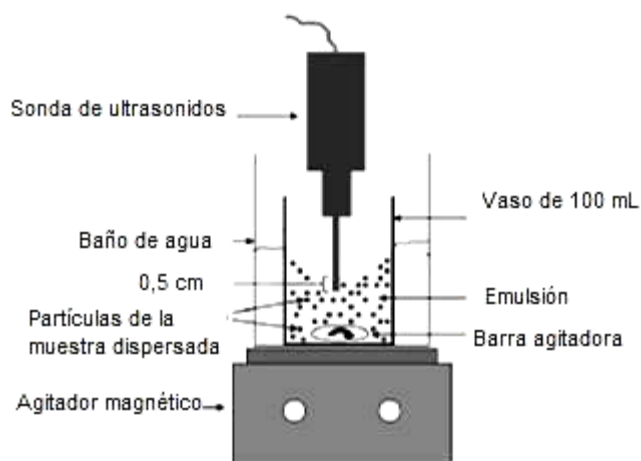


Figura 16. Dispositivo experimental para extracción-emulsificación asistida por ultrasonidos

La mezcla de dos líquidos inmiscibles para obtener una emulsión requiere casi invariablemente la ayuda de energía; además, la emulsión resultante usualmente es inestable. La estabilidad es especialmente baja para las dispersiones líquido-líquido con área interfacial alta. A este respecto, el uso de aditivos tales como emulsificadores permite crear fácilmente medios dispersados finamente. La clase más común de emulsificadores son los surfactantes, que debido a su estructura se adsorben fácilmente en la interfase entre las dos fases, ayudando a estabilizar las gotas de la fase dispersada de una emulsión.

La presencia de la muestra puede mejorar notablemente la estabilidad de las emulsiones. Las condiciones de trabajo restrictivas se refieren a la cantidad de muestra y la relación muestra/volumen de extractante de la siguiente forma:

- (1) cantidad de muestra, como una función del poder agitador para mantener el sólido en la suspensión,

- (2) volumen de la fase líquida suficiente para mantener las partículas de la muestra en suspensión y evitar el contacto entre la sonda ultrasónica y la barra magnética. Por otra parte, para asegurar la formación total de la emulsión, el volumen de la fase líquida no debe exceder el nivel al cual el agitador dispersa las partículas.

Como se puede comprobar en la Figura 17, el diámetro de las gotas metanol-agua (fase dispersada) formadas en el proceso de emulsificación se encuentra en el rango 1–15 μm [114]. Se forma una emulsión estable desde el principio de la extracción; por tanto, si la grasa extraída de la matriz actúa como estabilizador, es suficiente una pequeña cantidad para estabilizar la emulsión.

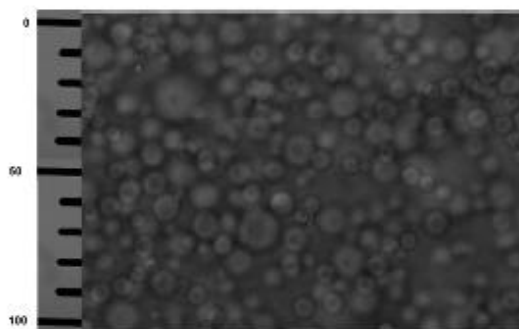


Figura 17. Microgotas formadas durante la emulsificación vistas en un microscopio de luz. Cada división de la escala corresponde a 10 μm

Por tanto, las mayores ventajas de USAEME son:

- (1) La elevada área de contacto entre la muestra sólida y la fase dispersada como consecuencia de la emulsificación asistida por ultrasonidos y la elevada área superficial de las pequeñas gotas polares, que actúan como unidades de microextracción y facilitan la extracción de los compuestos con elevada eficiencia.
- (2) La temperatura y presión localizadas altamente efectivas generadas por cavitación, que favorecen la cinética de la extracción sólido-líquido.

El grupo de Yamini [120] ha propuesto la técnica USAEME basada en la aplicación de disolventes orgánicos de baja densidad. En un baño de agua de ultrasonidos se introducen viales de vidrio conteniendo una muestra acuosa. Se añade un micro-volumen de disolvente orgánico inyectándolo lentamente con una microjeringa en la muestra. Entonces se recoge el micro-volumen del disolvente orgánico flotante sobre la superficie de la muestra acuosa (Figura 18). El método propuesto es una técnica de microextracción eficiente, rápida, simple y económica que puede ser un complemento para DLLME. USAEME también se puede usar para disolventes orgánicos más densos que el agua. El uso de un disolvente dispersante en DLLME se traduce en eficiencias de extracción más bajas.

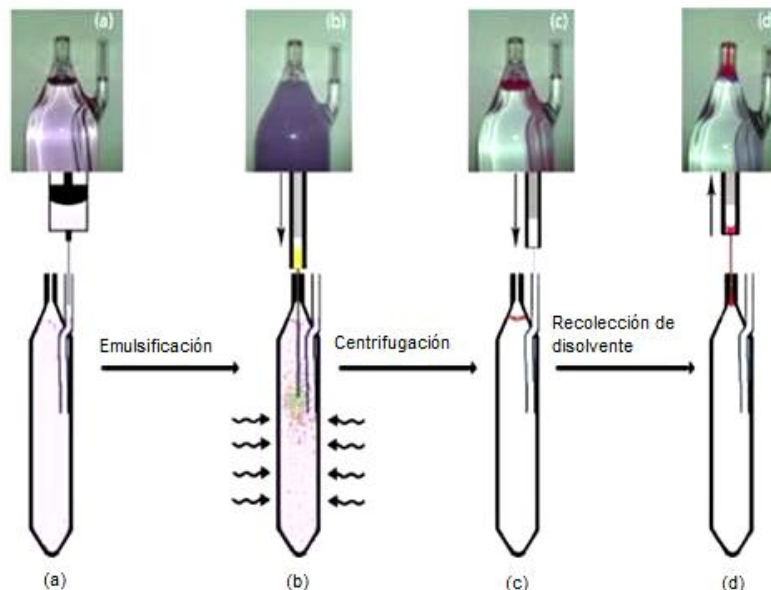


Figura 18. Representación esquemática de USAEME aplicando disolventes orgánicos de baja densidad. (a) Disolución de la muestra acuosa en el vial de vidrio diseñado para la emulsificación; (b) inyección simultánea y emulsificación de 14 μL de tolueno en la muestra acuosa; (c) adición de unos pocos microlitros de agua al vial; y (d) colección del tolueno en el tubo capilar en la cabeza del vial

El procedimiento USAEME proporciona muchas ventajas tales como factores de enriquecimiento excelentes, simplicidad, estabilidad, facilidad de operación, bajo costo y consumo de disolventes orgánicos. Los tiempos requeridos para la emulsificación están en el rango de 5–10 min, significativamente mayores que los

tiempos necesarios para dispersar un disolvente orgánico en el método DLLME. Además, tanto en USAEME como en DLLME debido a la dificultad de la colección de microvolúmenes del disolvente orgánico flotante, el disolvente extractante seleccionado debe ser más denso que la muestra acuosa [101, 115]. Muchos disolventes incluyendo alcanos, alcoholes, éteres, cetonas y acetatos son menos densos que el agua y su aplicación en métodos USAEME y DLLME será problemática.

Hay diferentes factores que afectan a los procesos de emulsificación y extracción. Algunos de estos factores son la selección de un disolvente de extracción útil, la duración del tiempo de centrifugación, la fuerza iónica, el volumen del disolvente extractante, la temperatura de emulsificación–extracción y, desde luego, el tiempo de equilibrio.

La selección del disolvente extractante es de gran importancia. Hay que considerar algunos factores, como son: baja solubilidad en agua, ser capaz de extraer los analitos de interés y ser compatible con la instrumentación analítica a utilizar. Muchos de los disolventes con estas características tienen menor densidad que el agua. La menor viscosidad del tolueno en comparación con otros disolventes produce una emulsificación rápida y más eficiente. Sin embargo, la mayor presión de vapor del tolueno comparado con otros disolventes es la única desventaja de este disolvente extractante. Por tanto, para prevenir la evaporación, es importante conservar el disolvente extractante en un congelador si el intervalo de tiempo entre la extracción y el análisis GC es mayor que 20 min.

Se requiere la centrifugación para romper la emulsión y acelerar el proceso de separación de fases. Al aumentar el tiempo de centrifugación, el volumen del disolvente colectado aumenta y, posteriormente, para tiempos largos, el volumen disminuye debido a la evaporación.

La influencia de la fuerza iónica se ha utilizado universalmente en los métodos SPME y LLE. La adición de sal a una muestra analítica puede aumentar potencialmente la recuperación del analito en los procedimientos de

microextracción. Por otra parte, las ondas de ultrasonidos pueden ser absorbidas y dispersadas en un medio viscoso como energía calorífica; así, el proceso de cavitación se puede retraer reduciendo el fenómeno de emulsificación [121]. La existencia y estabilidad de gotas finas de tolueno en el agua salina y la adhesión de algunas gotas a las paredes de los viales de vidrio después de la centrifugación pueden ser razones para la menor eficiencia de colección del tolueno en agua salina.

El efecto del volumen del disolvente extractante debe ser estudiado para conseguir la máxima eficiencia de extracción y una colección apropiada de la gota flotante.

También hay que considerar la influencia de la temperatura de emulsificación–extracción. La temperatura puede tener un efecto sobre el fenómeno de emulsificación y también sobre el coeficiente de distribución y la transferencia de masa del analito. En algunos métodos de microextracción, debido al efecto limitante de la transferencia de masa, la influencia de la temperatura sobre la eficiencia de extracción es considerable. En USAEME, la superficie de contacto entre el disolvente orgánico y la muestra acuosa es muy grande y no es un efecto limitante causado por una transferencia de masa lenta. Esto muestra claramente que la temperatura de emulsificación no afecta a la eficiencia de extracción.

El tiempo de equilibrio se define como el intervalo de tiempo desde el inicio de la emulsificación y su final justo antes de la centrifugación. Es frecuente en USAEME que el tiempo de equilibrio no tenga un efecto significativo sobre la eficiencia de extracción. Esto se debe a que la superficie de contacto entre el disolvente extractante y la muestra acuosa es infinitamente más grande y el estado de equilibrio se alcanza en unos pocos segundos, mucho más rápidamente que en otros métodos de extracción.

En esta Tesis Doctoral se han comparado diferentes técnicas de microextracción, SDME, DSDME, DLLME y USAEME, para la determinación de los distintos grupos de vitaminas. La técnica que ha proporcionado los mejores resultados en cuanto a rapidez, sensibilidad y selectividad ha sido DLLME.

8. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La Extracción en Fase Sólida implica una partición líquido-sólido, donde la fase extractante es un adsorbente sólido y se ha utilizado extensamente para eliminar y concentrar trazas de materiales orgánicos de muestras líquidas o disoluciones. Se dispone de una gran variedad de adsorbentes usando diferentes mecanismos para la extracción/retención de analitos. Hennion ha publicado un review que cubre el desarrollo del método, acoplamiento con LC y todos los tipos de adsorbentes SPE [122] y en un review de 2002 [60] se presentan algunos ejemplos del uso de SPE en análisis de alimentos.

Se dispone de un amplio intervalo de adsorbentes que incluyen fases enlazadas C₈ y C₁₈ sobre sílice, resinas poliméricas (poliestireno/divinil benceno), Florisil (silicato de magnesio activado), adsorbentes polares tal como alúmina, carbón activo, sílice y ciano y amino-enlazados. También se pueden enlazar grupos funcionales iónicos, tales como ácido carboxílico o grupos amino, a sílice o adsorbentes poliméricos, para crear adsorbentes de intercambio iónico. Estas diferentes fases permiten utilizar interacciones basadas en adsorción, enlaces de hidrógeno, interacciones polares y no-polares, intercambio catiónico o aniónico o exclusión por tamaños. Uno de los inconvenientes de SPE es que el empaquetamiento debe ser uniforme para evitar mala eficiencia y que los sistemas automáticos pueden tener problemas de reproducibilidad. La matriz de la muestra también puede dificultar la habilidad del adsorbente para extraer el analito debido a la competición para la retención.

Las técnicas de extracción por absorción se basan en el equilibrio de distribución entre la matriz de la muestra y una fase líquida no-miscible. Las matrices son fundamentalmente acuosas y la fase no-miscible (por ejemplo, polidimetilsiloxano, PDMS) se encuentra a menudo recubriendo un soporte sólido. Los analitos son extraídos desde la matriz a la fase extractante no-miscible. A diferencia de las técnicas de adsorción (tales como SPE), donde los analitos se enlazan en los sitios activos sobre la superficie, es importante el volumen total de la fase de extracción.

La extracción de los analitos depende del coeficiente de partición de los solutos entre las fases. Se puede utilizar el coeficiente de distribución octanol-agua (K_{ow}) como indicador de la extracción de un analito dado (Figura 19) [123]. Los métodos de extracción por adsorción han sido revisados por Baltussen y col. [124].

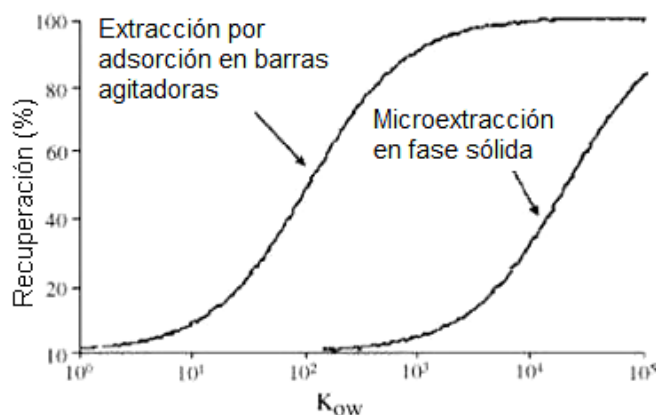


Figura 19. Recuperación de analitos en extracción por adsorción. La recuperación para los solutos es función del coeficiente de partición octanol-agua, K_{ow} para SPME (muestra 10 mL, fibra 100 μ m PDMS) y para SBSE (muestra 10 mL, barra agitadora 10 mm \times 0,5 mm PDMS)

8.1. MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La Microextracción en Fase Sólida es una técnica de preparación libre de disolventes que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta con una fase

estacionaria apropiada unida con una microjeringa modificada. La técnica fue desarrollada originalmente por Pawliszyn y colaboradores [125] en 1990 y posteriormente se han escrito varios libros sobre la técnica [126–128].

SPME es esencialmente un proceso en dos etapas: la primera, la partición de los analitos entre la matriz de la muestra, que puede ser una muestra líquida o un vapor en el espacio de cabeza, y el recubrimiento de la fibra, y entonces, la desorción del extracto concentrado de la fibra al instrumento analítico, usualmente GC, donde los componentes de la muestra son desorbidos térmicamente. La fibra también puede ser extraída (desorbida) en un eluyente de LC usando un modo estático o dinámico y hay varias interfases disponibles comercialmente [129-130].

Generalmente, la extracción SPME de los analitos de la matriz es una técnica de extracción no exhaustiva pero es una técnica de equilibrio. Se obtiene la máxima sensibilidad en el equilibrio, sin embargo, no es necesario alcanzar este punto y, en su lugar, se pueden llevar a cabo las extracciones durante un período definido de tiempo [131]. La temperatura de extracción, el tiempo y la agitación de la muestra deben ser optimizadas para cada aplicación [132] y las condiciones de operación deben ser consistentes. Además, en SPME el volumen de fase estacionaria enlazado a la fibra es limitado, lo que puede conllevar una extracción incompleta y limita la capacidad de enriquecimiento de la muestra.

Los efectos de matriz pueden ser importantes y generalmente la cuantificación requiere el uso de estándares conteniendo la matriz o el empleo del método de adiciones estándar. También hay que considerar la posibilidad de emplear un estándar interno marcado isotópicamente. La presencia de elevadas concentraciones de componentes de la matriz u otros compuestos puede originar enlaces competitivos y se pueden producir desplazamientos y errores potenciales.

Se dispone de una gran variedad de fibras, con espesor y polaridades diferentes [132–133]. Sin embargo, la mayoría de las aplicaciones en análisis de alimentos utilizan SPME en espacio de cabeza, ya que debido a la naturaleza

compleja de las matrices de alimentos, la inmersión directa en SPME puede ser difícil. La fibra puede dañarse o las proteínas pueden adsorberse irreversiblemente a la fibra, cambiando sus propiedades y dejándola inservible para más de una muestra. Una alternativa para muestras sucias es proteger la fibra situándola en el interior de una membrana hueca de celulosa, ésta puede tener un efecto añadido de exclusión por tamaño (por ejemplo, sólo permite pasar a los compuestos con pesos moleculares <1000 Da difundiendo a través de la membrana). Sin embargo, usando esta técnica se necesita un tiempo de extracción mucho más largo [134], y se puede producir el bloqueo de la membrana con muchas matrices de alimentos.

Las mayores ventajas de la extracción SPME comparada con la extracción con disolventes son la reducción en el uso de disolventes, la combinación de muestreo y extracción en una única etapa y la habilidad para tratar con muestras de tamaños más pequeños. También presenta una elevada sensibilidad y puede utilizarse para analitos polares y no-polares en un amplio rango de matrices, pudiendo acoplarse con GC y LC. Algunos inconvenientes de SPME incluyen variaciones entre análisis y falta de robustez de los recubrimientos de las fibras.

8.2. EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN CON BARRAS AGITADORAS

La Extracción por Adsorción con Barras Agitadoras (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE) fue desarrollada por Baltussen y col. [135] para superar la capacidad limitada de extracción de las fibras SPME. Se recubre una barra agitadora de vidrio con una fina capa potencialmente adsorbente enlazada (PDMS) para conseguir una gran área superficial de fase estacionaria, alcanzando una mayor relación entre fases y así una recuperación y una capacidad superiores.

La transferencia del analito al exterior de la barra se consigue por desorción térmica en GC, o elución con un disolvente en LC. Al igual que en SPME, la barra agitadora también se puede utilizar para muestras con componentes volátiles y

semi-volátiles en el espacio de cabeza por encima de la muestra, Extracción por Adsorción en Espacio de Cabeza, HSSE.

La mayor ventaja de SBSE es que se pueden conseguir factores de concentración muy elevados. Sandra [136] afirma que se pueden obtener PF muy altos para analitos con coeficientes de distribución octanol-agua superiores a 100. La técnica se puede usar para matrices complejas líquidas o semi-sólidas y, por tanto, tiene potencial para muchas aplicaciones en análisis de alimentos.

Inicialmente sólo se disponía del recubrimiento de PDMS, haciendo la técnica más útil para analitos no-polares en medio acuoso. Sin embargo, esta técnica se puede utilizar para compuestos más polares usando derivatización. Para mejorar la recuperación de analitos más polares, se han descrito "twisters de dos fases", que combinan tanto absorción como adsorción [137] para SBSE y HSSE. Estas barras agitadoras consisten en tubos cortos de PDMS cerrados en ambos extremos con imanes, con una cavidad interna que está empaquetada con carbón activo como adsorbente. Se ha comprobado que mejoran la recuperación de compuestos volátiles y/o polares cuando se comparan con las barras de agitación convencionales de PDMS. Las aplicaciones de SBSE en análisis de alimentos están aumentando, pero debido a las limitaciones de la fase PDMS, están limitadas todavía a matrices de alimentos no-grasas y a analitos no-polares o semi-polares.

La cantidad de analito extraído en SPME es proporcional al volumen de la fase extractante, así la sensibilidad del método se puede mejorar aumentando el volumen de la fase extractante [95]. En general, se considera que SBSE es superior a SPME en términos de sensibilidad y exactitud para la determinación de niveles traza en matrices complejas. Recientemente se ha publicado un review sobre SBSE para componentes volátiles y semivolátiles de matrices biológicas [138].

Un inconveniente de SBSE es la etapa de desorción, ya que como el analito está adsorbido en la barra agitadora recubierta no puede desorberse directamente

en el puerto de inyección del equipo GC. Por tanto, el analito debe ser reextraído en un disolvente adecuado, lo que añade una etapa adicional al método analítico completo, o hay que usar una unidad especialmente diseñada de desorción térmica. Esta unidad de desorción es, en general, una instrumentación relativamente sofisticada debido a problemas con volumen muerto grande; posteriormente, la barra agitadora debe ser transferida manualmente a la unidad de desorción. Esto puede originar una pérdida parcial de la sensibilidad ganada con el uso de la gran superficie del adsorbente.

9. NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS

La Nanotecnología es el estudio de la manipulación de la materia a escala atómica y molecular. Constituye una de las tendencias científicas más importantes en el presente siglo pues sus aplicaciones cubren campos tan variados como la biotecnología, farmacia, electrónica, instrumentación científica, fabricación industrial, nuevos materiales, etc. En este último campo, la Nanotecnología se ocupa del desarrollo de materiales de tamaño entre 1 y 100 nm.

La palabra "Nanotecnología" es usada extensivamente para definir las ciencias y técnicas que se aplican al nivel de nanoescala, trabajando y manipulando las estructuras moleculares y sus átomos. Una definición adecuada es la siguiente: la Nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia (propiedades y explotación de fenómenos) a nano escala [139].

Cuando se manipula la materia a la escala tan minúscula de átomos y moléculas, aparecen fenómenos y propiedades totalmente nuevas. Por lo tanto, los científicos utilizan la nanotecnología para crear materiales, aparatos y sistemas novedosos y poco costosos con propiedades únicas.

Estas nuevas estructuras con tamaño atómico, tales como nanotubos de carbono, o pequeños instrumentos para el interior del cuerpo humano pueden introducirnos en una nueva era.

Existe un gran consenso en que la nanotecnología nos llevará a una segunda revolución industrial en el siglo XXI, supondrá numerosos avances para las industrias y nuevos materiales con propiedades extraordinarias (materiales más fuertes que el acero pero con sólo el 10% de su peso), aplicaciones informáticas con componentes mucho más rápidos o sensores moleculares capaces de detectar y destruir células cancerígenas en partes delicadas del cuerpo humano como el cerebro, entre otras aplicaciones [139]. Muchos progresos de la nanociencia estarán entre los grandes avances tecnológicos que cambiarán el mundo.

9.1. LAS NANOPARTÍCULAS EN EL PROCESO ANALÍTICO

Actualmente, más del 50% de las aplicaciones analíticas basadas en la Nanotecnología se refieren al empleo de nanopartículas. Las mismas están implicadas en los denominados "sistemas analíticos nanotecnológicos", definidos como aquellos que aprovechan las propiedades excepcionales de la nanomateria en el ámbito químico-analítico. Su empleo tiene como objetivo explotar características de la nanomateria (ópticas, eléctricas, térmicas, magnéticas, químicas, entre otras) para el desarrollo de nuevos métodos, o mejorar las propiedades de los ya existentes [139].

Las nanopartículas pueden ser incorporadas generalmente al proceso analítico de las siguientes formas:

1. Como tales, manteniendo su identidad individual o formando cúmulos [140].
2. Enlazadas químicamente sobre una superficie [141].
3. Incorporadas a un sólido inerte, que en su conjunto, se usa en la fabricación de electrodos.

4. Funcionalizadas con compuestos inorgánicos, orgánicos y bioquímicos para incrementar su solubilidad [142] o hacerlas biocompatibles [143].

El papel de las nanopartículas en el proceso analítico es muy variado y depende de su naturaleza y estado. Se usan fundamentalmente para el tratamiento de las muestras y en separaciones cromatográficas y electroforéticas. Se expone a continuación el papel que pueden jugar las nanopartículas en diferentes etapas del proceso analítico, de acuerdo con el Prof. Valcárcel [139].

9.1.1. PURIFICACIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE ANALITOS

El empleo de las nanopartículas como sorbentes reversibles ha sido una de las aplicaciones más notables hasta ahora gracias a sus propiedades químicas superficiales. Las ventajas que comportan las nanopartículas como sorbentes sobrepasan las de los sorbentes tradicionales. Sin embargo, existen varios problemas relacionados con su uso que han sido poco abordados o directamente soslayados en algunas publicaciones.

En primer lugar, la pureza y homogeneidad de las nanopartículas tanto adquiridas comercialmente como sintetizadas en el laboratorio, puede dar lugar a falta de reproducibilidad en los porcentajes de retención de los distintos analitos.

En segundo lugar, su tendencia a aglomerarse disminuye drásticamente su superficie específica, disminuyendo su capacidad de retención.

Por último, el proceso retención/elución de analitos en la superficie de la nanopartícula no es, a veces, completamente reversible.

Para su uso con la técnica de extracción en fase sólida, se han desarrollado microcolumnas empaquetadas con nanotubos de carbono [144], cuyos sitios activos han de retener el analito de manera específica.

Sin embargo, su eficiencia y reproducibilidad se ha visto limitada por su elevada tendencia a la agregación; por ello, es necesario potenciar la dispersión de

estas nanopartículas o inmovilizarlas sobre soportes inertes para lograr una mayor efectividad [145].

9.1.2. SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS

Se han empleado nanopartículas como nanotubos de carbono para mejorar la selectividad en las separaciones cromatográficas y por electroforesis capilar.

Generalmente, estas nanopartículas actúan como fases estacionarias o pseudo-estacionarias en columnas tubulares para GC y LC, que son empaquetadas con diferentes geometrías (longitud y diámetro) con o sin una amplia variedad de grupos funcionales.

Estas columnas funcionalizadas pueden adecuarse según su afinidad y selectividad para las separaciones de una amplia diversidad de analitos.

9.1.3. OTRAS APLICACIONES

El empleo de nanopartículas para mejorar la detección electroquímica y óptica es un área de intensa investigación y desarrollo en la Química Analítica actual. Entre ellas, se han utilizado eficazmente los nanotubos, aunque las nanopartículas más usadas son las de tipo metálico como las de oro y nanocristales metálicos semiconductores, denominados puntos cuánticos (quantum dots).

Estas nanopartículas se han usado en la fabricación de nuevos macro/microelectrodos, que presentan ventajas sustanciales, tales como una elevada superficie específica, baja resistencia a la transmisión electrónica y elevada capacidad de adsorber o enlazar químicamente numerosas biomoléculas y compuestos químicos. Esto hace de las nanopartículas un material atractivo para mejorar con nitidez las determinaciones analíticas electroquímicas clásicas [146].

La espectroscopia analítica también se ha beneficiado con la implicación de nanopartículas en el proceso de detección debido a sus excepcionales propiedades ópticas. Así, su conjunción con la espectroscopia de absorción UV-visible facilita la detección/determinación de trazas metálicas [147].

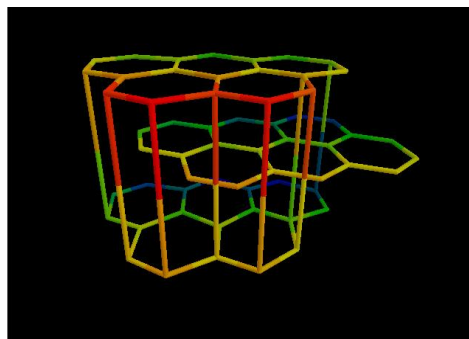
Pero quizás sea en el ámbito de la fluorescencia en el que las nanopartículas han tenido mayor impacto gracias a los puntos cuánticos, que ofrecen una elevada fluorescencia nativa con bandas de emisión muy estrechas, lo que les hace especialmente adecuados para el desarrollo de sensores ópticos [148–149].

Además, los puntos cuánticos, adecuadamente funcionalizados, se han revelado como unos excelentes marcadores para el diagnóstico a través de imágenes en vivo como, por ejemplo, de células cancerígenas [150].

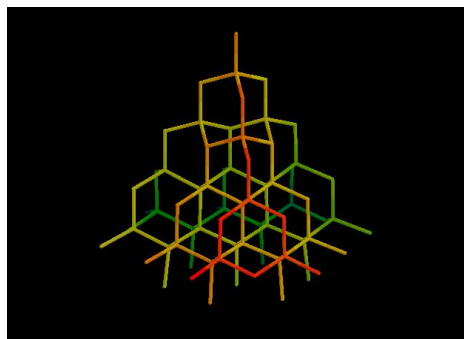
9.2. NANOESTRUCTURAS DE CARBONO

El carbono ha sido un material ampliamente utilizado por el hombre y, entre sus diversos usos, se ha empleado para obtener energía y ha sido clasificado según sus diferentes formas alotrópicas. Algunas de las nanoestructuras de carbono se muestran representadas en la Figura 20.

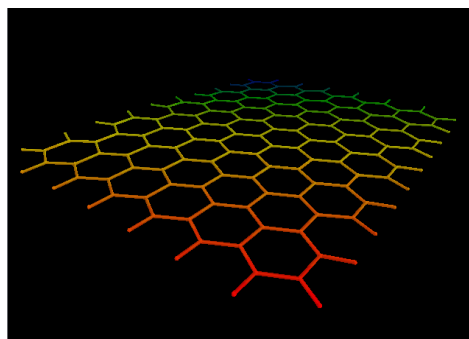
La verdadera revolución de la química del carbono tuvo lugar a partir del último cuarto del siglo pasado [139] cuando empezaron a estudiarse en profundidad las primeras "nanoestructuras de carbono", como los nanodiamantes (1983), los fullerenos (descubiertos por casualidad en 1985), las nanocebollas de carbono (1992) y en 1993 los conocidos como "nanotubos de carbono" (CNT). Posteriormente, fueron sintetizadas estructuras en forma de nanoconos y nanocuernos (1999) y se llevó a cabo el aislamiento del grafeno (2004).



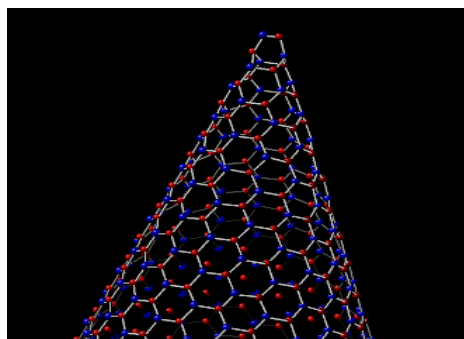
GRAFITO



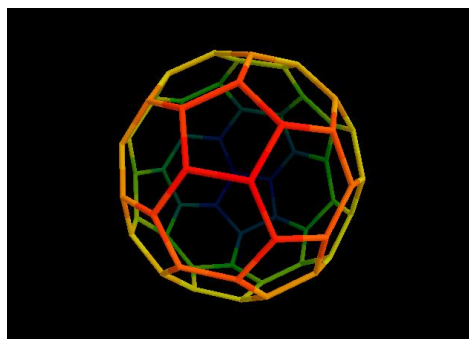
DIAMANTE



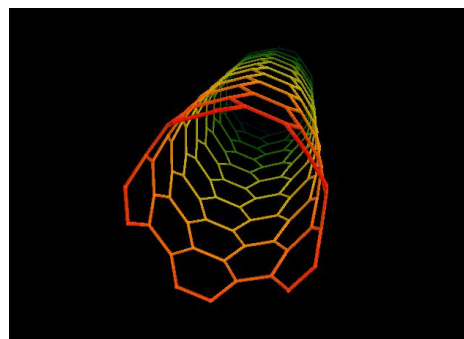
GRAFENO



NANOCONO



FULLERENO



NANOTUBO

Figura 20. Representación gráfica de algunas de las nanoestructuras de carbono

9.2.1. CLASIFICACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE CARBONO

La Figura 21 presenta una clasificación de las nanoestructuras de carbono basada en criterios estructurales. Sin embargo, ésta no es la única clasificación existente para las nanopartículas de carbono. Las mismas pueden clasificarse atendiendo a las dimensiones de su estructura. Así, se habla de cero dimensiones (0D) en los cúmulos puntuales de diamantes y los fullerenos, de una dimensión (1D) en los nanotubos de carbono, de dos dimensiones (2D) en el grafeno y de tres dimensiones (3D) en el diamante y la fullerita.

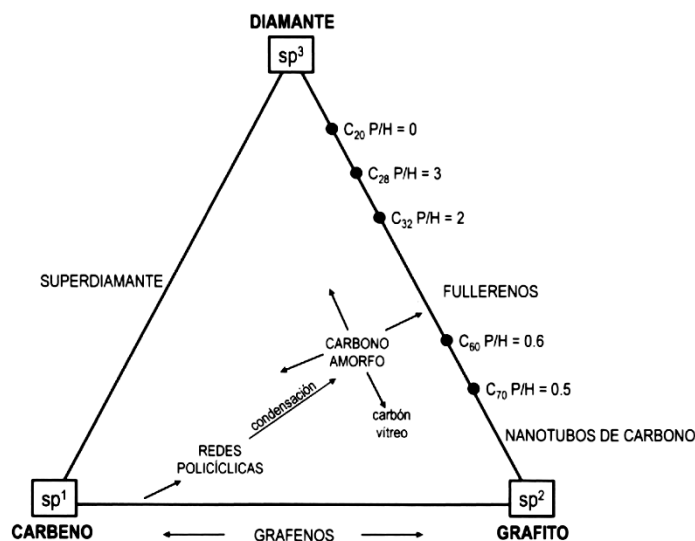


Figura 21. Representación esquemática de las tres formas de carbono con un número entero de hibridación atómica (sp^3 , sp^2 , sp^1) y alguna de las formas intermedias. En algunos casos se incluye la relación P/H [139]

Existen otras dos clasificaciones importantes. Una de ellas está basada en la configuración espacial de anillos pentagonales y hexagonales y la relación numérica de ambos (relación P/H), propuesta por Cataldo [151]. Finalmente, hay otra clasificación más sencilla basada en la naturaleza de los enlaces de los carbonos de los materiales según su variedad de formas alotrópicas existentes [152]. Según esta última clasificación, las diferentes nanoestructuras de carbono podrán clasificarse entre las estructuras con hibridación sp^1 (carbano), sp^2 (grafito)

y sp^3 (diamante) de la manera que se muestra en la Figura 21.

Las propiedades generales de las nanoestructuras de carbono son muy diferentes a las de las partículas de carbono a escala macro/micrométrica. Las características químicas, ópticas, eléctricas, térmicas, magnéticas, etc. se exaltan notablemente en esta zona nanométrica. De aquí la gran versatilidad en el cambio de las propiedades de los materiales de carbono según su cambio de estructura. Así, el grafito (2D) se comporta como un buen metal, el diamante (3D) es un aislante, mientras que los fullerenos son puntos cuánticos y los nanotubos de carbono una varilla cuántica (1D). Los grafenos, fullerenos y nanotubos de carbono tienen la característica de poseer todos los átomos de carbono conjugados con simetrías moleculares excepcionales. Por esta razón, muestran propiedades electrónicas, fotónicas, magnéticas y mecánicas diferentes respecto a las tradicionales formas alotrópicas de los materiales carbonosos, y estas diferencias son la base de un gran número de aplicaciones científicas y tecnológicas.

A continuación, se presenta una descripción muy resumida de las distintas nanoestructuras de carbono más relevantes, enfatizando sus características estructurales y sus propiedades [139].

1. Grafeno

El grafeno es una lámina plana de un átomo de grosor compuesta por hexágonos con átomos de carbono en los vértices con hibridación sp^2 . Su estructura es en forma de panal de abeja (Figura 22). Es uno de los materiales con mayor relación superficie/masa. Si el panel se enrolla en forma cilíndrica se obtienen tanto nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT), como de pared múltiple (MWNT) si se enrollan varios paneles. Si el panel tiene pentágonos (defectos) en vez de hexágonos, deja de ser plano y, si la proporción de pentágonos es suficientemente alta, la curvatura puede llegar a forma esférica o elipsoide, como en el caso de los fullerenos y nanocebollas de carbono.

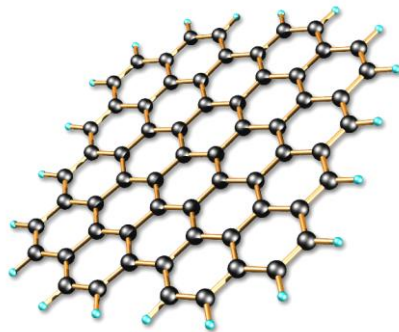


Figura 22. Representación gráfica de la estructura del grafeno

Dentro de sus propiedades pueden destacarse:

- Elevada conductividad térmica.
- Elevada resistencia mecánica. Es considerado uno de los materiales más duros conocidos.
- Elevada movilidad electrónica y baja conductividad.
- Elevada opacidad a la transmisión de la luz a pesar de su escaso espesor.

Se ha propuesto su empleo como sensores de gases, transistores y componentes de circuitos integrados, entre otros.

2. Fullerenos

Están formados por redes tridimensionales de átomos de carbono que adoptan diferentes estructuras geométricas, a diferencia del grafito que forma también redes, pero planas. La más conocida es la del C_{60} en la que 60 átomos de carbono se distribuyen formando una estructura similar a la de un balón de fútbol, razón por la que también se le conoce con el nombre de futboleno (*buckminsterfullereno*). Un fullereno C_{60} es una molécula orgánica de 60 átomos de carbono que se encuentran formando una esfera de alrededor de 1 nm de diámetro con 12 pentágonos (P) y 20 hexágonos (H) distribuidos simétricamente

(Figura 23). La presencia de pentágonos en su estructura le confiere la curvatura respecto al grafeno. En su caso la relación P/H es 0,6.

Aunque el fullereno C_{60} es el más conocido, existe una amplia variedad de moléculas que pueden considerarse una familia y que difieren en forma y número de pentágonos y hexágonos. Por ejemplo, el C_{20} , el fullereno más pequeño, tiene 12 pentágonos y no tiene hexágonos. El fullereno C_{70} tiene más hexágonos (P/H= 0,5) que el C_{60} y su forma se parece más a un balón de rugby que al de fútbol. Además se han descrito fullerenos de 72, 76, 84 e incluso más de 100 átomos de carbono.

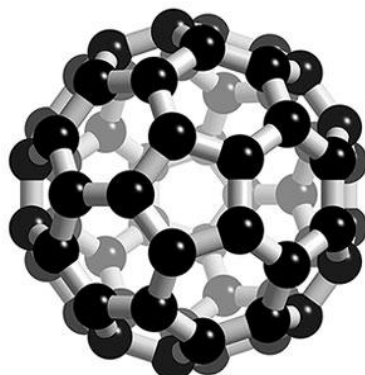


Figura 23. Los fullerenos son la tercera forma más estable del carbono, tras el diamante y el grafito

Una subfamilia de los fullerenos la constituyen sus respectivos derivados, que incluyen radicales orgánicos sobre su superficie. Esto amplía enormemente su aplicación al cambiar sus propiedades (ej. solubilidad, formación de quelatos, etc.).

La solubilidad de los fullerenos es escasa en la mayoría de los disolventes. Sus propiedades de mayor repercusión en Nanotecnología han sido la resistencia calorífica y la superconductividad. Recientemente, se han usado en Nanomedicina como portadores de antibióticos específicos enlazados químicamente para combatir infecciones bacterianas y como agentes antimicrobiológicos.

En relación con su toxicidad, la conclusión más relevante ha sido que no hay evidencias hasta ahora de que produzcan efectos nocivos, en especial por lo que al C_{60} se refiere.

3. Nanocebollas de carbono

Las nanocebollas de carbono (carbon nanooions, CNOs) son nanopartículas de 20–100 nm de diámetro compuestas de varias capas concéntricas de fullerenos (Figura 24) y son consideradas una versión esférica de los nanotubos de carbono de pared múltiple, que se explicarán más adelante.

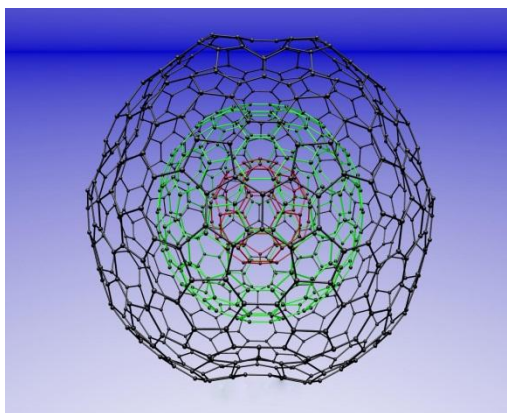


Figura 24. Nanocebolla de carbono de tres capas compuesta por C₆₀, C₂₄₀ y C₅₄₀

Las nanocebollas de carbono son muy insolubles y su reactividad química es moderadamente baja. Las hay de varios tamaños y se puede llevar a cabo la funcionalización química de las más pequeñas [153], lo que supone un gran avance para la química de estas nanoestructuras multicapa de carbono.

En contraste con otras nanopartículas de carbono, sus posibilidades no han sido todavía muy desarrolladas, aunque sus dos aplicaciones más relevantes en la actualidad son su capacidad lubricante y empleo para terapias contra el cáncer.

4. Nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono, CNTs, (Figura 25) han tenido las aplicaciones más variadas entre las nanoestructuras de carbono. La literatura sobre nanotubos de carbono es muy abundante y crece de forma exponencial, demostrando un extraordinario interés por parte de científicos y tecnólogos. De hecho, gracias al amplio desarrollo de su investigación, hoy en día la producción industrial de los nanotubos de carbono ha conducido al abaratamiento en su adquisición.

Los nanotubos están compuestos por átomos de carbono bajo una estructura cilíndrica de dimensiones nanométricas en diámetro (1–30 nm) y nano/micrométricas en longitud (10³ - varios μm).

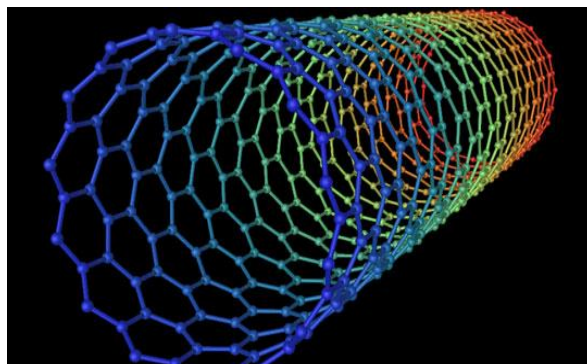


Figura 25. Simulación por ordenador de un nanotubo de carbono

Estas estructuras se dieron a conocer por primera vez en 1991 [154] y se obtuvieron por aplicación de una descarga eléctrica entre dos electrodos de grafito, de forma similar al procedimiento utilizado para sintetizar fullerenos. Con esta técnica se consiguen nanotubos multipared, aunque se pueden conseguir del tipo monopared insertando un metal en el ánodo. El rendimiento en nanotubos es muy bajo y se obtienen cantidades importantes de otras formas de carbono. Un procedimiento alternativo de obtención se basa en la deposición química en fase vapor. En este caso, el material de inicio no es grafito sino un hidrocarburo y un metal que se utiliza como catalizador formando diminutas partículas que actúan como semilla para el crecimiento longitudinal del tubo.

Se ha empleado con frecuencia ferroceno ya que es un hidrocarburo que incorpora el catalizador (Figura 26), un átomo de hierro por molécula. Los vapores del hidrocarburo caliente son arrastrados por un gas no reactivo que los lleva hasta un horno donde se forman los nanotubos. También puede emplearse el láser para vaporizar una pieza de grafito generando nanotubos de una sola pared. Cualquiera de estos métodos conduce inevitablemente a la formación de impurezas de carbono amorfo, fullerenos, nanopartículas de carbono, partículas de catalizador metálico, etc.

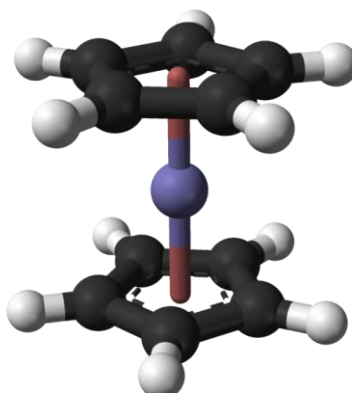


Figura 26. El ferroceno es un compuesto organometálico de fórmula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$

Si se tiene en cuenta que el tipo de enlace en los nanotubos es sp^2 , se puede imaginar que la estructura surge del enrollamiento de una lámina de grafito como la que puede verse en la Figura 27.

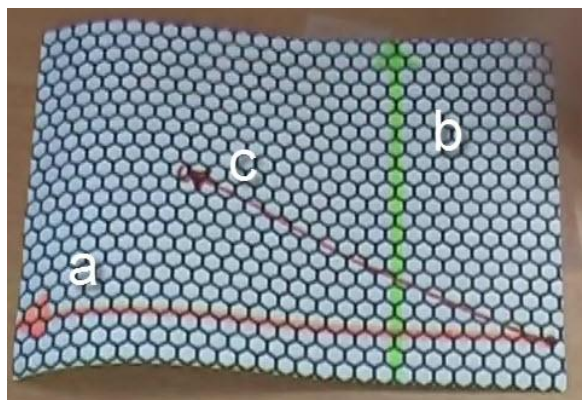


Figura 27. Diferentes direcciones de enrollamiento de una superficie de grafito para explicar las distintas propiedades de los nanotubos

Dependiendo de la dirección en la que se produzca el enrollamiento, los átomos de carbono se disponen en forma de zig-zag (a), sillón (b), o en una mezcla de ambos (c). Los dos primeros casos son aquirales y conducen a propiedades metálicas, mientras que la última, quiral [155], conduce a comportamiento de semiconductor.

Los nanotubos de carbono tienen una hibridación entre sp^2 (diamante) y sp^3 (grafito), al igual que los fullerenos, aunque están más cercanos a la sp^2 (Figura 28). Algunos autores los consideran dentro de la familia de los fullerenos, aunque sus características y propiedades son muy diferentes.

Actualmente existe una amplia variedad de CNTs cuyas propiedades difieren bastante entre sí. Incluso, según se trate de nanoestructuras que sólo poseen carbonos, o que tengan además, derivados covalentes o no covalentes, hace que sus propiedades sean muy diferentes. Se pueden destacar elevada conductividad, resistencia mecánica, estabilidad química y superficie específica. Estas propiedades dependen del número de paredes del nanotubo. También cambian dependiendo de la dirección de enrollamiento de una imaginaria lámina de grafeno desde la que se obtendría el nanotubo, la estructura abierta o cerrada de los extremos del nanotubo, homogeneidad estructural y la relación longitud/diámetro.

Los nanotubos pueden estar en forma aislada y formando racimos o paquetes. Esto cambia sustancialmente sus características fisicoquímicas y limita sus aplicaciones. Su tendencia a la agregación es un aspecto desfavorable en este material. Como veremos más adelante, es importante resaltar el empleo de los nanotubos de carbono como herramienta analítica para el tratamiento de la muestra, en técnicas analíticas de separación e instrumentación.

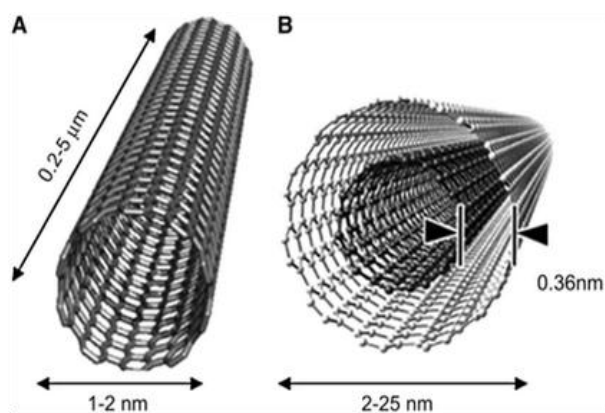


Figura 28. (A) Nanotubo de pared simple (SWCNT) y (B) Nanotubo de paredes concéntricas múltiples (MWCNT)

5. Nanoconos y nanocuernos de carbono

Este tipo de nanoestructuras cónicas (Figura 29) difieren entre sí en la forma de los extremos. Pueden ser considerados una variedad de nanotubos de carbono o como estado intermedio de los enrollamientos de láminas de grafeno hacia la formación de fullerenos. Los anillos pentagonales en la estructura del grafeno original le confieren la curvatura cónica, manteniendo el resto de la estructura con hexágonos.

Los nanoconos tienen una longitud que oscila entre 300 y 800 nm, diámetro máximo de 1 μm en la base del cono y grosor de pared de 20 a 50 nm. Los nanocuernos tienen una longitud variable semejante a la de los nanotubos, con un diámetro creciente desde 1–2 nm en la punta a 4–5 nm en su extremo más ancho.

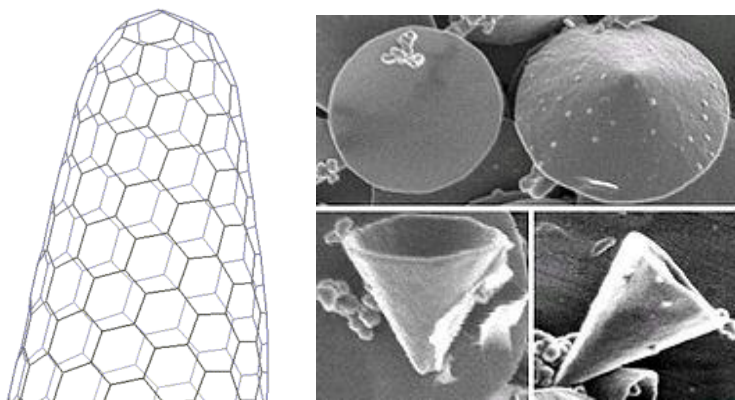


Figura 29. Estructura cónica de característica de los nanoconos y nanocuernos (nanoconos deformados) y fotografía al microscopio electrónico de los nanoconos

Al igual que los nanotubos de carbono, las nanoestructuras cónicas también pueden formar agregados esféricos y su reactividad química no difiere sustancialmente de la de sus homólogos de nanotubos, ni tampoco difieren las propiedades de sus derivados. Sin embargo, la aparición más tardía de las nanoestructuras cónicas, en contraste a la aparición de los nanotubos, hace que sus aplicaciones nanotecnológicas sean más reducidas. No obstante, en el ámbito analítico, se han utilizado con éxito como sorbentes en procesos de tratamiento de muestra por extracción en fase sólida [156].

6. Nanodiamantes

Los "nanodiamantes" son, como indica su nombre, diamantes con diámetros a escala nanométrica (Figura 30) y obtenidos por distintos procedimientos. Uno de los más utilizados consiste en la detonación, en un recinto cerrado y en atmósfera inerte, de explosivos clásicos como el TNT. El hollín resultante, conteniendo los nanodiamantes, es sometido a purificación para separar el grafito que rodea las nanopartículas de interés.

El campo de las aplicaciones nanotecnológicas de los nanodiamantes (específicamente en nanomedicina) es muy extenso y variado dependiendo de sus propiedades. Estas últimas cambian significativamente según el estado de agregación.

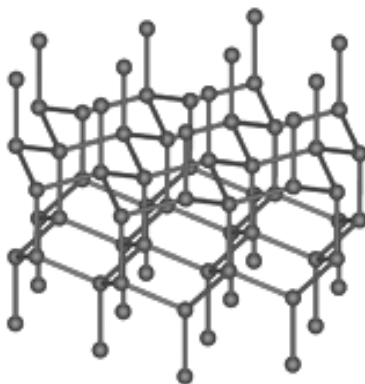


Figura 30. Estructura de un nanodiamante

9.2.2. NANOESTRUCTURAS DE CARBONO COMO HERRAMIENTAS ANALÍTICAS

Las nanoestructuras de carbono poseen diversas características que brindan interesantes posibilidades para su empleo en el proceso analítico desde el punto de vista químico o bioquímico.

Como se describió anteriormente, la aplicación más importante de las nanopartículas está basada en sus propiedades de sorción. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas de carbono, se aprecia claramente, además, una

extensa aplicación en el desarrollo de biosensores y sensores basados en transistores de efecto de campo (FET).

En efecto, debido a sus excelentes propiedades eléctricas, los CNTs pueden ser usados para desarrollar sensores eléctricos en los que las nanopartículas actúan como intermediarios en la reacción de transferencia de electrones con especies electroactivas [157–158]. Las propiedades de adsorción de los CNTs permiten la adherencia de las biomoléculas (ej. anticuerpos, cofactores o enzimas) facilitando el proceso redox a través de la inmovilización de los analitos sobre la superficie del electrodo.

Aunque los CNTs son estructuras inertes, sus propiedades eléctricas dependen en gran parte de los efectos de transferencia de carga y de la incorporación de determinadas moléculas en su superficie.

Los electrodos tipo CNT–FET se han utilizado como detectores de gases, ya que la estructura electrónica de las moléculas a ser detectadas y que están cerca de los nanotubos (semiconductores) producen cambios en la conductividad eléctrica de los mismos [159–160]. De esta manera, estos electrodos se han utilizado para la identificación de NH_3 , CO y CO_2 [161].

De todas maneras, es claro que la aplicabilidad de los electrodos de CNT–FET será limitada cuando los analitos posean una energía de adsorción baja o una deficiente transferencia de carga hacia estas nanopartículas.

Las propiedades especiales e inusuales de las nanopartículas de carbono han creado un gran interés por su utilización en una amplia variedad de procesos analíticos. Existe un buen número de nanopartículas de carbono con propiedades especiales que aún no han sido aprovechadas desde el punto de vista analítico.

El desarrollo de estas nuevas "herramientas analíticas" dependerá de nuevas síntesis y procesos de purificación de las nanopartículas. La tendencia actual es la combinación de las nanopartículas de carbono con otros nuevos materiales (por ejemplo, los puntos cuánticos o los líquidos iónicos) para que

puedan ser aprovechables en electroquímica. Las capacidades de absorción de estos nuevos e interesantes materiales y sus propiedades mejoradas, ayudarán a desarrollar nuevos instrumentos de análisis que simplificarán el proceso analítico.

9.2.3. PROPIEDADES DE LAS NANOESTRUCTURAS DE CARBONO

Entre las propiedades de las nanoestructuras de carbono, podemos destacar las siguientes:

Propiedades superficiales. La superficie específica (relación superficie/volumen) de las nanopartículas es muy alta, lo que favorece la reactividad química de las mismas, especialmente relevante en el caso de los CNTs. Sin embargo, su tendencia a la agregación, es una importante limitación para su empleo como herramientas para el proceso analítico.

Reactividad química. La reactividad superficial de las nanopartículas con un gran número de radicales orgánicos e inorgánicos es alta. Su derivatización da como resultado nanoestructuras de carbono funcionalizadas que poseen amplias posibilidades para ser usadas como herramientas analíticas. De igual manera, la formación de enlaces no covalentes con una gran variedad de moléculas de carácter aromático hace de las nanopartículas, herramientas muy explotadas para procesos de adsorción en el tratamiento de muestras.

Propiedades físicas. Las características físicas de las nanopartículas son también claves para su empleo como herramientas analíticas. Así, como ya se ha comentado, sus propiedades eléctricas (conductividad) las hacen muy utilizadas en electroquímica analítica y otras técnicas gracias a sus propiedades ópticas, magnéticas y térmicas.

9.2.4. EMPLEO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE CARBONO PARA EL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

En la actualidad, la mayoría de las aplicaciones de las nanoestructuras de carbono para el tratamiento de la muestra han sido orientadas hacia su empleo como sorbentes. Se han utilizado principalmente fullerenos y nanotubos de carbono en metodologías analíticas como filtración, en extracciones líquido-líquido y líquido-gas y en sistemas de extracción en fase sólida [139].

A la hora de seleccionar el tipo de nanopartícula hay que considerar algunos factores que afectan a su reactividad: estado de agregación, superficie y grado de aromaticidad, derivatización, quiralidad superficial (especialmente para separaciones enantioméricas) y tipo de enlace entre la nanopartícula de carbono y el analito.

Desde el punto de vista analítico, las aplicaciones desarrolladas en el ámbito de la filtración con nanomembranas de partículas de carbono son escasas [139]. Sin embargo, es un campo prometedor de aplicación en la Nanotecnología de membranas de filtración selectivas para una variedad de fines, todos ellos de gran repercusión industrial, económica y social, ya que superan en ventajas a las membranas actualmente en uso. El papel de los nanotubos de carbono en estas membranas puede compararse al que tienen las proteínas en las membranas celulares. Además, el carácter superconductor de los nanotubos de carbono permite el empleo de una diferencia de potencial, que puede facilitar tanto el flujo como las separaciones.

La bibliografía señala que los MWCNTs dispersos en una disolución acuosa de tensioactivo contribuyen muy positivamente como pseudo-fases coadyuvantes en la técnica de extracción líquido-líquido [139]. Se ha demostrado una mayor eficiencia si los MWCNTs están estabilizados en una disolución de tensioactivo respecto a los que están simplemente en suspensión [162–163].

9.2.5. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CON NANOPARTÍCULAS DE CARBONO

Como proceso de separación, la SPE es una alternativa atractiva en relación a la tradicional extracción líquido-líquido, ya que evita el empleo de grandes volúmenes de disolventes (generalmente orgánicos) para tal fin.

Si bien el carbón activo ha sido utilizado como sorbente para SPE desde hace tiempo, presenta como inconvenientes la baja selectividad y la mala reproducibilidad de la separación debido a la falta de homogeneidad del material. También se ha utilizado el carbono gráfico, que es más puro y homogéneo mejorando las prestaciones analíticas, pero manteniendo el inconveniente de su escasa selectividad. El descubrimiento y asequibilidad comercial de las nanoestructuras de carbono, como los fullerenos y los nanotubos de carbono, principalmente, ha supuesto una auténtica revolución en este ámbito, pues disminuyen los inconvenientes de las formas tradicionales de carbono como sorbentes.

La Tabla 4 muestra el empleo de algunas nanoestructuras de carbono para la separación de analitos mediante SPE [139]. Puede apreciarse la variedad de analitos, muestras y técnicas analíticas que se han utilizado con este tipo de materiales.

Los CNTs son alótropos del carbono con una nanoestructura cilíndrica y no deben confundirse con fibra de carbono. Se han construido nanotubos con una relación longitud:diámetro de hasta $10^9:1$ [164], significativamente más grande que cualquier otro material. Los extremos de un nanotubo se cierran con una estructura similar a la del fullereno. Deben su nombre a su pequeño tamaño ya que su diámetro puede ser de unos pocos nanómetros (aproximadamente 1/50000 veces la anchura de un cabello humano), mientras que la longitud puede ser de hasta 18 centímetros. Los tubos se unen entre sí por fuerzas de van der Waals.

Tabla 4. Algunos ejemplos del uso de fullerenos y nanotubos de carbono como fases sorbentes en SPE y SPME [139]

Nano-estructura	Técnica de extracción	Dispositivo de extracción	Tipo de muestra	Analito	Técnica para la determinación
Fullereno C ₆₀	SPE	Minicolumna	Agua	BTEXs	GC-MS
Fullereno C ₆₀	SPE	Minicolumna	Agua	Trazas de plomo	AAS
Fullereno C ₆₀	SPE	Minicolumna	Harina de trigo	Cobalto	ETAAS
Fullereno C ₆₀	SPME	Fibra	Agua	BTEXs, Naftalenos, Acido Ftalico, Diésteres	GC-FID
MWCNTs	SPE	Cartucho	Agua	Bisfenol A, 4-n-nonilfenol, 4-tert-octilfenol	HPLC-FD
MWCNTs	SPE	Minicolumna	Huevo y carne de cerdo	Sulfonamidas	HPLC-UV
MWCNTs	SPE	Cartucho	Carne de cerdo	Barbitúricos	GC-MS
MWCNTs	SPE	Cartucho	Agua	Diclorodifenil-tricloroetano	HPLC-UV
MWCNTs	SPE	Minicolumna	Agua	Cadmio, Manganeso y Níquel	ICP-AES
MWCNTs	SPME	Fibra	Muestras ambientales y de alimentos	Retardadores de llama	GC-ECD

Como consecuencia de su estructura, los CNTs presentan las siguientes propiedades:

- 1) Ligereza, alta resistencia a la tracción, conductividad térmica, estabilidad y resistencia muy elevadas.
- 2) Se deforman irreversiblemente bajo fuerte tensión.
- 3) Pueden ser muy conductores (aproximadamente 1000 veces más conductores que el cobre) o semiconductores.
- 4) Bajo alta presión y debido a las fuerzas de van der Waals, los nanotubos

pueden unirse en forma de hilos muy fuertes debido a la parcial conversión de enlaces sp^2 en enlaces sp^3 .

- 5) Son insolubles en agua, aunque el empleo de tensioactivos [165], introducción de grupos funcionales en la pared o tratamientos oxidantes [166] pueden aumentar su solubilidad.
- 6) Son inertes químicamente excepto cuando se funcionalizan.

La aplicación de los CNTs en Química Analítica ha sido objeto de varias revisiones [139,145,146,157,158,166]. Su empleo como sorbentes en SPE tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos es un campo importante de aplicación de los mismos que se ha desarrollado bastante en los últimos cinco años. Como sorbentes presentan buenas características físico-químicas con elevada área superficial, posibilidad de establecer interacciones π - π y buena resistencia química y mecánica, lo que los hace adecuados para materiales no polares (en el caso de CNT no funcionalizados) y para compuestos polares (CNT funcionalizados) [139].

En sus dos modalidades de pared simple y multipared, los nanotubos de carbono fueron descubiertos después que los fullerenos. Por ello sus aplicaciones como sorbentes fueron publicadas años después.

En cuanto a la comparación de la capacidad sorbente de ambos tipos de nanoestructuras de carbono podemos concluir que los CNTs tienen, además de una gran superficie específica, la gran ventaja de poseer una densidad electrónica superficial (aromaticidad) muy elevada, por lo que la tendencia a la reactividad covalente (formación de derivados) y no covalente (proceso de adsorción) está muy potenciada.

Por su parte, los fullerenos tienen una aromaticidad reducida, por lo que la sorción de moléculas orgánicas, especialmente las de tipo aromático, está muy desfavorecida. De esta característica se deriva su gran insolubilidad en agua que, en principio, favorece su empleo como fases sorbentes.

La primera aplicación en este contexto fue el empleo de CNTs para eliminar dioxinas [167]. En un cartucho comercial relleno de CNTs, Cai et al. [168] evaluaron su adecuación para la preconcentración de bisfenol A, 4-nonilfenol y 4-ter-octilfenol en muestras de agua. Los resultados obtenidos se compararon con los de experimentos paralelos con el sorbente más empleado (RP-C₁₈) y demostraron que los CNTs son mucho más eficientes para la extracción de compuestos polares.

Posteriormente, se han aplicado los nanotubos de carbono para la separación previa a la determinación de sulfonamidas [169], atracina [170], pesticidas [171], herbicidas de sulfonilurea [172], barbitúricos [173], DDT [174] y antidepresivos [175] en diferentes tipos de muestras.

El mayor inconveniente del empleo de los CNTs como sorbentes en SPE, como ya hemos comentado, es consecuencia de las características que les confiere la gran tendencia a la agregación, que disminuye drásticamente su superficie específica activa disminuyendo su capacidad para retener moléculas (capacidad adsorbente). En ocasiones, estos agrupamientos de la fase estacionaria disminuyen la porosidad del empaquetamiento originando efectos de sobrepresión en los sistemas de flujo continuo.

Otro inconveniente radica en las retenciones no específicas que suelen darse en los intersticios superficiales y que conllevan una disminución en la selectividad. Si bien en algunas situaciones las absorciones intersticiales pueden ser superiores y tomadas en cuenta, éstas suelen ser poco precisas y difíciles de reproducir. Ello implica que deben seguirse diversas estrategias experimentales para minimizar los efectos negativos de la formación de cúmulos de CNTs [139].

Dentro de estas estrategias para evitar la formación de agregados al momento de diseñar los dispositivos de SPE y SPME se pueden nombrar como relevantes:

- 1) Tratar de utilizar empaquetamientos más planos de los CNTs. En ocasiones

este tipo de empaquetamiento (ancho y plano) ha resultado más efectivo que los tradicionales empaquetamientos cilíndricos habituales de las minicolumnas [144].

- 2) Para el caso de aislamiento selectivo de proteínas, utilización de configuraciones planas para realizar la SPE, como el empleo de capas finas de CNTs funcionalizados con cloruro de polidialildimetilamonio [176].
- 3) En extracciones líquido-líquido resulta aconsejable utilizar un tensioactivo en disolución para estabilizar las nanopartículas en el medio micelar.
- 4) Tratar los CNTs generalmente mediante oxidación con ácidos inorgánicos como HNO_3 o H_2SO_4 . En este caso se originan derivados hidroxilados y carboxilados, lo que permite ampliar su campo de aplicación.
- 5) Para evitar los problemas de empaquetamiento y sobrepresión de las minicolumnas se pueden inmovilizar los derivados carboxilados de CNTs sobre micropartículas como esferas de vidrio de poro controlado [141].

En comparación con el uso de los fullerenos, en los últimos años los nanotubos de carbono han tenido un amplio desarrollo y una clara ventaja como fases sorbentes, debido a su relativamente mayor y aventajada superficie. Existe unanimidad entre los investigadores en que los nanotubos poseen mejores prestaciones que los fullerenos. En particular, los MWCNTs son claramente mejores que los SWNTCs.

De la bibliografía se pueden obtener excelentes revisiones sobre el empleo de los CNTs para la determinación de especies orgánicas [139,146,157,158,166,177].

En esta Tesis Doctoral, se ha abordado la especiación de cobalaminas por cromatografía líquida utilizando extracción en fase sólida con nanotubos de carbono multipared como adsorbentes, cuya superficie interacciona con los anillos benceno

de los compuestos aromáticos. Debido a sus características ventajosas –alta capacidad de adsorción, buena estabilidad térmica y amplio rango de pH de aplicación– los CNTs proporcionan una superficie activa para la adsorción/desorción de moléculas orgánicas.

La preconcentración en los MWCNTs se basa en la retención de los analitos introduciendo la muestra en línea en el sistema de mini–columna. Se ha usado dimetilsulfóxido para eluir las vitaminas retenidas para el análisis por LC.

Se han optimizado las condiciones experimentales del dispositivo de flujo continuo, que afecta al procedimiento de enriquecimiento, tales como el tipo y cantidad de nanotubos, el volumen, pH y velocidad de flujo de la disolución de la muestra, y el eluyente y su volumen.

10. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS MINIATURIZADAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA

Todas las técnicas consideradas están muy establecidas y se pueden aplicar con éxito a un amplio espectro de analitos a diferentes concentraciones y en diferentes matrices. La comparación directa de las técnicas es, por tanto, muy difícil, porque es casi imposible encontrar muestras similares o analitos que permitan la comparación. Así, se presenta un resumen de las principales características de las técnicas de microextracción descritas.

La Tabla 5 resume las principales ventajas e inconvenientes de algunas técnicas discutidas [62]. Otra comparación de las diferentes técnicas de microextracción se puede encontrar en [67].

Tabla 5. Ventajas e inconvenientes de las técnicas miniaturizadas		
Técnica	Ventajas	Inconvenientes
SPME	<p>Rápida, simple, libre de disolventes, sensible y eficiente</p> <p>Compatible con GC-FID, GC-MS, etc</p> <p>Compatible con LC-UV, LC-MS, etc</p> <p>Calibración lineal, amplio rango de analitos</p> <p>Tamaño pequeño, útil para muestreo portátil</p> <p>Consistente, datos cuantificables a concentraciones muy bajas</p> <p>Económico</p> <p>Numerosas fases diferentes (selectividad)</p> <p>Modos de HS y DI</p>	<p>Tiempo de vida de las fibras</p> <p>Temperatura de operación recomendada relativamente baja (240–280 °C)</p> <p>Inestabilidad e hinchamiento en disolventes orgánicos (limitación LC)</p> <p>Calibración con las mismas disoluciones y/o muestras</p> <p>Rotura de la fibra</p> <p>Stripping de los recubrimientos</p> <p>Doblado de la aguja (caro)</p> <p>Falta de enlace químico apropiado de la fase estacionaria</p> <p>Recubrimiento de la superficie y espesor alto de las fibras convencionales</p>
SDME	<p>Económico</p> <p>No se requiere equipo especial</p> <p>Fácil de operar</p> <p>Casi libre de disolventes</p> <p>Versátil (se pueden usar muchos disolventes)</p> <p>Posibilidad derivatización in situ/ complejación</p> <p>Modos DI y HS</p>	<p>Inestabilidad de la gota (algunos experimentos fallan)</p> <p>Precisión media</p> <p>Superficie de la gota limitada</p>
DLLME	<p>Se requiere poca cantidad de muestra</p> <p>Versátil</p>	<p>Se necesitan tres disolventes</p> <p>Hay que aplicar centrifugación</p>
HFLPME	<p>Estabilidad mayor del disolvente orgánico (soportado sobre los poros de la membrana)</p> <p>Económico</p> <p>Alto potencial automatización/miniaturización</p> <p>Alta versatilidad y selectividad (sistemas de tres-fases y dos-fases)</p> <p>Analitos orgánicos e inorgánicos</p> <p>Relaciones de concentración altas</p> <p>Modos DI y HS</p> <p>Mayor tiempo de muestreo y temperatura que SDME (velocidad de evaporación menor)</p> <p>Muy útil para propósitos de limpieza</p> <p>Acoplamiento con GC, HPLC, CE, etc.</p> <p>Derivatización in-situ posible</p>	<p>Efectos de memoria cuando se reusan las membranas</p> <p>Pre-acondicionamiento de membranas</p> <p>Precisión media en modo manual</p> <p>Mayoría de estudios en modo estático (resolución limitada)</p>

11. TÉCNICAS HIFENADAS. APLICACIONES EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Uno de los campos más fascinantes del desarrollo instrumental en MS es la hifenación: el acoplamiento en línea de varias técnicas a MS [178]. Aparte de las combinaciones obvias de GC o LC con MS, se han descrito una gran variedad de combinaciones diferentes. La idea clave en la hifenación es la ganancia significativa en la relación señal–ruido, y así la mejora en el límite de detección, que se puede conseguir con los métodos multidimensionales, concepto que fue desarrollado por Yost y col. (Figura 31) [179].

Mientras en hifenación la respuesta o señal conseguida disminuye con el número creciente de acoplamientos o dimensiones, el ruido (químico) disminuye incluso más rápidamente debido al aumento de selectividad, lo que mejora la relación señal–ruido. Otro hecho importante es la posibilidad de evitar pérdidas de muestra y contaminación de la misma por el tratamiento en línea en comparación con las combinaciones no en línea.

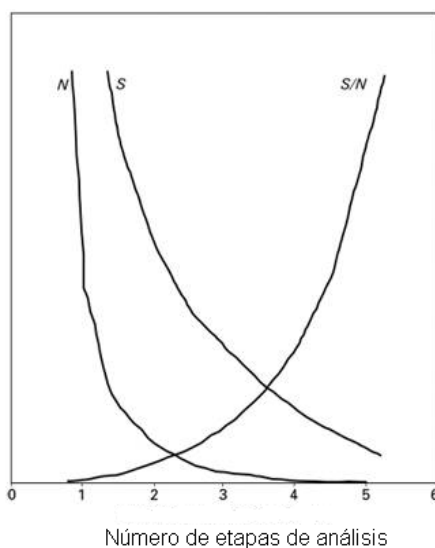


Figura 31. Hifenación de técnicas analíticas. Variación de la señal S , el ruido N y la relación señal/ruido (S/N) con el número de etapas analíticas

En principio, se puede discriminar entre varias aproximaciones de la hifenación, dependiendo de los objetivos principales:

1. Técnica de separación en línea acoplada a MS, por ejemplo, GC-MS y LC-MS.
2. Pretratamiento de la muestra en línea en combinación con una técnica de separación acoplada a MS.
3. Técnicas de separación multidimensional en línea acopladas a MS.
4. Técnica de separación acoplada en línea a estrategias de detección múltiple, una de las cuales es MS.

Obviamente, también es posible una combinación de estas estrategias.

A continuación, se van a estudiar algunos ejemplos de estas hifenaciones [178].

11.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TANDEM

La primera técnica hifenada a considerar es la combinación en línea de MS y MS, es decir, Espectrometría de Masas en Tandem (MS-MS). Se han descrito una variedad de combinaciones de analizadores de masas diferentes, incluyendo cuadrupolo y analizadores de sector magnético como MS1, y cuadrupolo, analizadores de sector magnético, de trampa de iones y de tiempo de vuelo como MS2. También son ampliamente usados los instrumentos como triple-cuadrupolo para MS-MS, como sistemas únicos o con introducción de la muestra vía sonda de inserción de sólidos o por análisis por inyección en flujo o por combinación en línea con GC o LC. En el modo más común, el modo ion-producto, MS1, se utiliza para seleccionar un ion precursor con un m/z particular de la variedad de iones generados en la fuente de iones. Los iones de masa seleccionados son disociados vía colisiones con un gas inerte en una célula de colisión y, a continuación, se analizan las masas de los iones-producto por MS2. En esta hifenación, MS1 puede

ser considerado como una técnica de separación, mientras que MS2 opera como un analizador de masas y detector convencional. Así, frecuentemente se han señalado las analogías entre MS–MS y GC–MS (Figura 32).

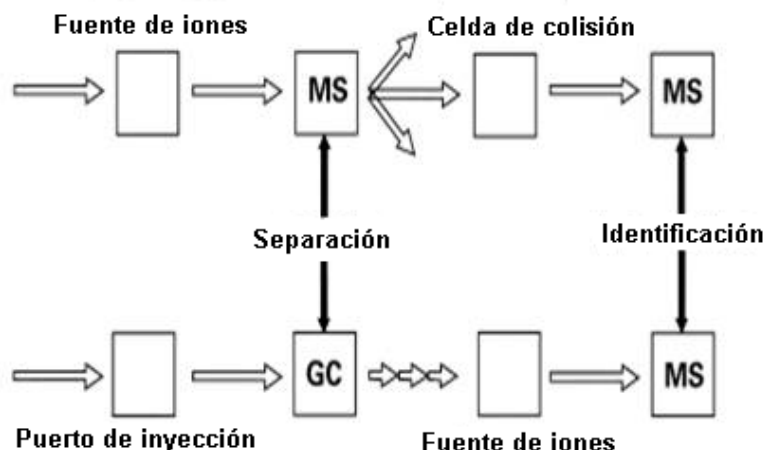


Figura 32. Comparación esquemática de MS–MS y GC–MS

Muchas veces no se requiere una separación cromatográfica con una combinación MS–MS, dada la excelente selectividad que se puede conseguir. Sin embargo, generalmente sí se requiere alguna separación, al menos en el análisis de muestras de origen biológico o medioambiental, con el objeto de evitar la contaminación rápida de la fuente de iones y para reducir y/o evitar los efectos de supresión de iones del analito, por ejemplo, en ESI.

Se utiliza muy ampliamente MS–MS en combinación con métodos de separación cromatográfica, especialmente LC. La razón obvia para ello es el uso frecuente de técnicas de ionización suaves en LC–MS, como ESI y APCI. MS–MS permite obtener información estructural adicional así como información de la masa molecular. LC–MS–MS en línea es el método de elección normalmente en bioanálisis cuantitativo, para estudios farmacológicos pre-clínicos durante el desarrollo de drogas en industrias farmacéuticas. En estos estudios, el instrumento opera en el modo de Monitorización de Reacción–Selectiva (Selective–Reaction Monitoring, SRM), seleccionando un ion precursor particular en MS1 y

seleccionando y detectando uno o más iones producto en MS2. La excelente selectividad, el alto nivel de certeza en la identificación, y la posibilidad de usar estándares internos marcados isotópicamente estables, son argumentos importantes para el uso de SRM en este tipo de aplicaciones de rutina.

11.2. HIFENACIÓN EN LÍNEA CROMATOGRAFÍA–ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La combinación en línea de una técnica de separación cromatográfica (GC, LC, Cromatografía de Capa Fina (TLC), Electroforesis Capilar de Zona (CZE) y Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC)) con MS permite la caracterización por espectrometría de masas de los componentes de mezclas complejas después de la separación con mínima o ninguna pérdida de muestra. Es especialmente útil en la identificación de componentes minoritarios o traza que son difíciles de colectar por fraccionamiento del eluyente de la columna o que podrían ser perdidos fácilmente.

GC–MS juega un papel importante en muchas áreas de aplicación, incluyendo la caracterización de componentes en petróleo y productos derivados y en aceites esenciales, la identificación y cuantificación de compuestos de interés medioambiental, y una gran variedad de otros microcontaminantes o componentes esenciales en diferentes áreas, como el análisis de alimentos. Además, GC–MS es importante en el análisis de compuestos de interés farmacológico, forense y/o toxicológico, incluyendo drogas, anestésicos, esteroides, hormonas del crecimiento y drogas de abuso [180].

LC–MS se aplica en campos complementarios, donde los analitos no son determinables por GC–MS. LC–MS se aplica así en la identificación y cuantificación de pesticidas, herbicidas, surfactantes y colorantes en muestras ambientales, en análisis de alimentos, en la identificación de drogas durante su desarrollo, sus productos de degradación y metabolitos, en bioanálisis cuantitativo de drogas y

compuestos relacionados en tejidos biológicos y fluidos, en la caracterización de productos naturales, así como de compuestos endógenos. Además, LC–MS juega un papel importante en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de MS, vía ESI–MS y ESI–LC–MS para el análisis de biomacromoléculas como péptidos, proteínas y fragmentos de ADN. También se ha utilizado frecuentemente la combinación en línea de TLC y MS [181].

11.3. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LÍNEA

Con el desarrollo de las tecnologías LC–MS, la combinación en línea con varios sistemas de pretratamiento de la muestra ha recibido mucha atención. Los tratamientos en línea de la muestra deben estar enfocados a evitar pérdidas de muestra y contaminación de la misma durante las distintas etapas del procedimiento analítico no en línea. Además, el proceso en línea facilita enormemente el procedimiento completo de automatización, acelerando así el análisis.

El sistema más ampliamente utilizado y que ha permitido obtener mayor éxito es la extracción en fase sólida en línea en combinación con LC–MS. En todos estos sistemas automáticos, los constituyentes de la muestra de una cierta polaridad son atrapados en un cartucho corto conteniendo material de relleno de LC en fase reversa. El cartucho se lava con agua para eliminar los constituyentes hidrofílicos de la muestra. A continuación, los analitos de interés se desorben y se transfieren a la columna LC para la separación. Estas estrategias SPE sirven tanto para el pretratamiento de la muestra como para la preconcentración del analito. Además, SPE también se puede aplicar en una combinación en línea con GC–MS.

Junto con SPE, se han combinado otros métodos de pretratamiento de la muestra con GC–MS, LC–MS o MS–MS directamente, por ejemplo, introducción de muestra con membranas en línea, microextracción en fase sólida, extracción en fluidos supercríticos y diálisis con membranas.

Se han descrito una variedad de procedimientos de pretratamiento de la muestra para la hifenación en línea CZE–MS, incluyendo isotacoforesis capilar, electrodiálisis, electroextracción líquido–líquido y SPE sobre discos.

11.4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN MULTIDIMENSIONAL

Las técnicas de separación multidimensional se han desarrollado con diferentes objetivos tales como aumentar la capacidad de los picos y/o mejorar la resolución para la separación de muestras muy complejas, disminuyendo el tiempo de análisis, y mejorar la detección de los componentes traza. Se han descrito y acoplado a MS tanto los métodos GC–GC, LC–GC y LC–LC como varias otras combinaciones multidimensionales que implican CZE o SFC. En la mayoría de los casos, la aproximación multidimensional comprende una combinación de dos columnas cromatográficas, bien conteniendo dos fases estacionarias diferentes (para GC y LC), o desarrolladas con dos fases móviles diferentes (sólo LC). La muestra se inyecta en la primera columna. Parte del cromatograma es atrapado en una columna o transferido directamente, y después analizado en la segunda columna, que se hifena a un MS. La Figura 33 muestra un dispositivo típico para LC–LC–MS [178].

La combinación en línea LC–LC–MS se ha investigado por numerosas razones. Además de las ventajas generales de las técnicas de separación multidimensionales, especialmente la mejora en la selectividad, hay un interés especial en la posibilidad de llevar a cabo LC–LC con dos composiciones diferentes de la fase móvil. De esta forma, es posible evitar problemas de incompatibilidad de la fase móvil debida al uso de constituyentes de la fase móvil no volátiles. Posteriormente, se ha demostrado que el uso de la segunda etapa de separación MS–MS se podría evitar: el eluyente de la columna de atrapamiento puede ser introducido directamente en el sistema MS–MS, operando en el modo SRM. Este sistema permite resolver el problema de la incompatibilidad de la fase móvil.

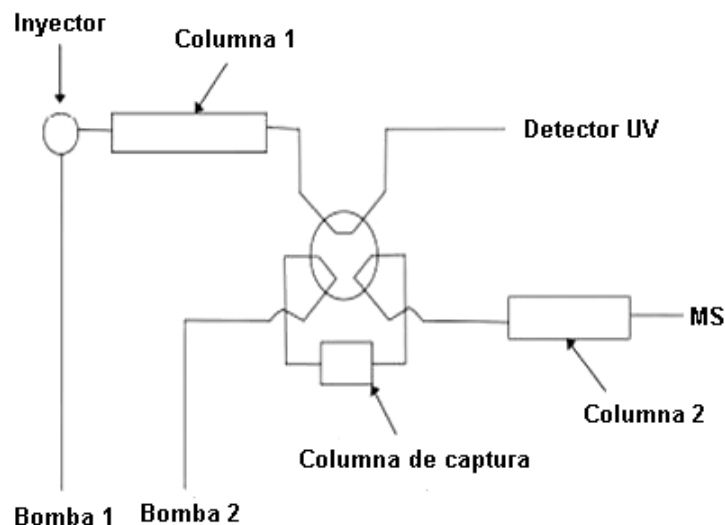


Figura 33. Diagrama esquemático para un sistema acoplado en columna LC–LC–MS

11.5. ESTRATEGIAS DE DETECCIÓN MÚLTIPLE

Los problemas analíticos de dificultad creciente que deben ser resueltos han dado un ímpetu importante al desarrollo de técnicas hífenadas, especialmente en las estrategias de detección multidimensional.

El desarrollo de técnicas de separación adecuadas para el análisis de muestras complejas a menudo es complicado, independientemente de si el interés radica en la determinación de un único compuesto presente al nivel de trazas, o en la caracterización y la elucidación estructural de la mayoría de los componentes de la muestra. Las técnicas de separación multidimensional se han desarrollado para conseguir la separación de los componentes de muestras muy complejas.

MS es una técnica extremadamente poderosa para la identificación y la elucidación estructural de componentes desconocidos. La sensibilidad de MS como técnica universal en este área es excepcional.

Sin embargo, en muchos casos la información obtenida de MS no es suficiente para permitir la identificación sin ambigüedad de compuestos

desconocidos. Además, en ciertas áreas aplicadas es obligatorio identificar los componentes con un nivel tan alto de seguridad que se requieren resultados independientes con una segunda técnica además de MS, como para el screening de impurezas en productos farmacéuticos o en el análisis de alimentos.

Se pueden conseguir niveles mejorados de seguridad en la identificación y elucidación estructural usando estrategias de detección múltiple. Aunque se puede conseguir la detección con una variedad de detectores vía análisis múltiple de la muestra con sistemas equipados con diferentes detectores, hay un interés creciente en la necesidad de sistemas que permitan el uso de detectores múltiples acoplados a un sistema único de separación analítica.

Esto es especialmente importante en dos áreas, que son el análisis de muestras muy complejas, donde las estrategias de detección múltiple acopladas a un sistema sencillo de adquisición de datos y procesado puede en gran medida facilitar la interpretación de los datos, y, en segundo lugar, en el análisis de una gran cantidad de muestras, donde la minimización del tiempo de análisis es de suma importancia.

Se han descrito varios sistemas de detección dual o múltiple implicando MS. Con respecto a esto, hay que recordar que el espectrómetro de masas es un detector destructivo. Por tanto, el MS debe ser el detector final en una serie. La combinación con otro detector destructivo, por ejemplo, un detector de ionización de llama, es posible sólo después de la bifurcación (split) del eluyente de la columna, mientras que el acoplamiento en línea con un detector no destructivo, por ejemplo, un detector de absorbancia UV, es posible sólo cuando este detector no origina demasiado ensanchamiento del pico cromatográfico.

En algunos casos, el segundo detector no destructivo se utiliza en paralelo mejor que en serie, ya que las sensibilidades de ambos detectores son muy diferentes, o para evitar la pérdida de resolución cromatográfica debida al ensanchamiento de pico excesivo por el primer detector en serie.

Las estrategias de detector dual más ampliamente aplicadas son aquellas que combinan MS con otra técnica espectrométrica, con objeto de obtener información estructural complementaria.

Se han usado dos tipos de detectores espectrométricos en una combinación en línea con GC-MS, infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y espectrometría de emisión atómica (AED). Ambos FT-IR y AED se usan en paralelo con el MS, es decir, después de una bifurcación.

La combinación GC-AED-MS no está todavía disponible comercialmente. La especificidad frente a elementos de AED puede ser de gran ayuda para identificar clases particulares de compuestos en muestras complejas, como en screening medioambiental.

El AED suministra información sobre la presencia de ciertos elementos, tales como halógenos, nitrógeno o fósforo, en los picos cromatográficos detectados. Esto facilita la búsqueda de picos relevantes así como la interpretación de los espectros de masas de compuestos particulares en un cromatograma complejo. Además, el AED puede proporcionar una determinación casi exacta de la composición elemental, excluyendo así la necesidad de determinación de la masa exacta mediante instrumentos muy caros de sector magnético. Además, se puede aplicar GC-AED-MS en el análisis de compuestos organometálicos, como compuestos organomercuriales y organoestaño.

La disponibilidad de detectores de flujo no destructivos para LC, como detectores de absorbancia UV y fluorescencia, permite la aplicación de sistemas de detección dual en LC-MS. Mientras que la información adicional de la detección UV a una longitud de onda fija generalmente es limitada, la disponibilidad de detectores eficientes y suficientemente sensibles de barra de diodos UV permite la adquisición en línea de los espectros UV así como los espectros de masas (Figura 34).

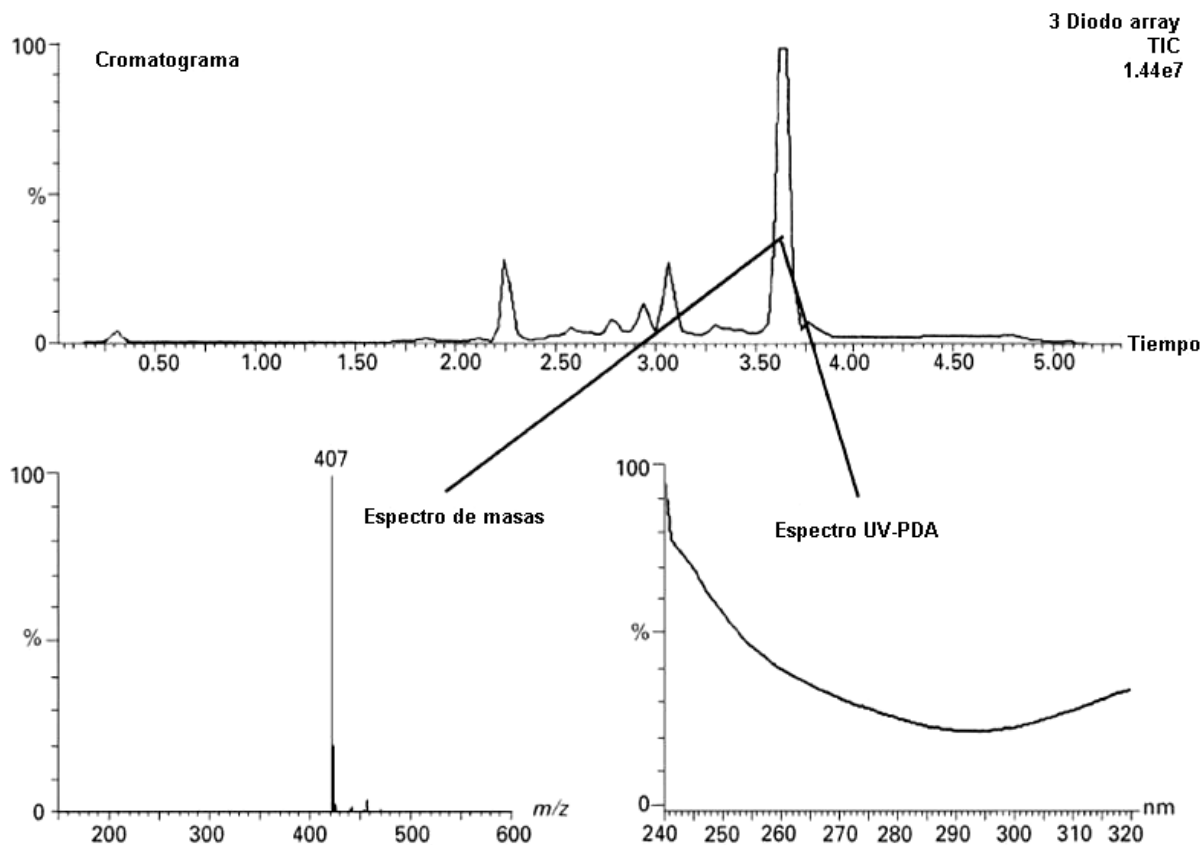


Figura 34. Un ejemplo de resultados típicos de un dispositivo LC-UV-DAD-MS para detección dual de compuestos separados

Aunque la información estructural disponible de un espectro UV es generalmente limitada, especialmente en una mezcla de disolventes no definida durante la elución en gradiente, se puede usar con éxito la combinación en línea para facilitar la identificación cuando se dispone de librerías apropiadas de espectros UV. La combinación del tiempo de retención en un sistema LC bien definido, la coincidencia del espectro UV, y la masa molecular (y posible información estructural) de MS son especialmente útiles para confirmar la identidad. Además, una característica excelente de los sistemas UV-DAD en combinación con un software apropiado es el cálculo de la pureza de los picos, basado en cambios del espectro UV durante el pico cromatográfico. Este hecho puede ser de mucha ayuda para establecer los perfiles de las impurezas mediante

LC–UV–DAD–MS. Aunque el uso de FT–IR en combinación con LC adquiere una importancia creciente, la combinación en línea de FT–IR y MS todavía no se aplica con frecuencia. Sin embargo, se ha introducido la combinación en línea de LC–MS y Resonancia Magnética Nuclear (RMN) como una herramienta importante para la identificación de impurezas, productos de degradación, y/o metabolitos de productos farmacéuticos.

11.6. HIFENACIÓN CROMATOGRAFÍA DE GASES–ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Una de las hifenaciones más poderosas es GC–MS. La Figura 35 muestra el esquema de un instrumento GC–MS completo [182].

La muestra se inyecta en un GC capilar y el efluente pasa a la entrada de un MS de cuadrupolo. La fuente fragmenta e ioniza entonces las moléculas, se analiza su masa y se detectan con el multiplicador de electrones. En GC–MS, el espectrómetro de masas barre repetidas veces las masas durante el experimento cromatográfico.

El sistema de datos puede analizar los datos de diversas maneras. En primer lugar, se puede sumar la abundancia de iones en cada espectro y representar la gráfica en función del tiempo para obtener un cromatograma iónico total. Esta gráfica es similar a un cromatograma convencional.

También es posible seleccionar y ver el espectro de masas a un tiempo particular del cromatograma para identificar la especie cuya elución ocurre a dicho tiempo.

Por último, es posible seleccionar un valor de m/z y monitorizarlo durante el experimento cromatográfico, técnica conocida como monitorización de iones seleccionados.

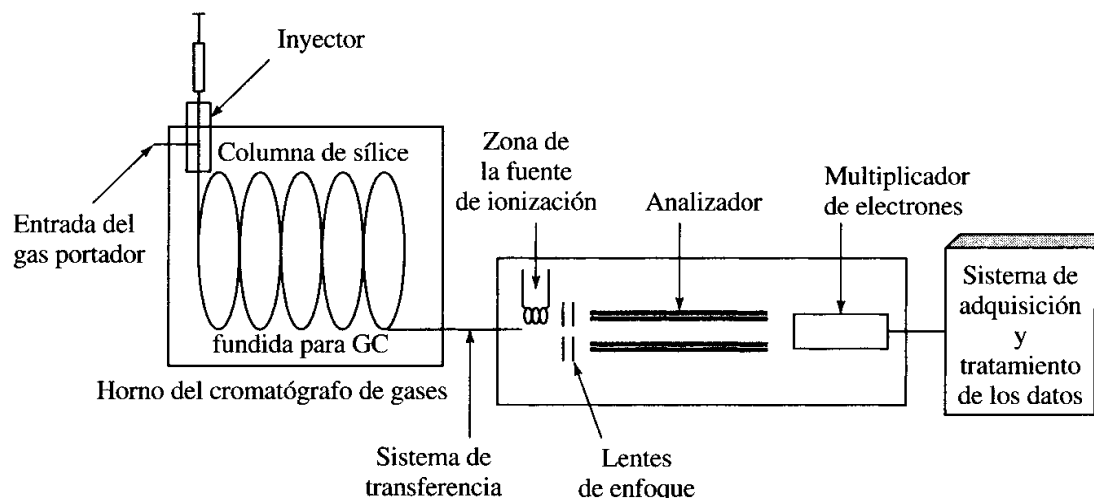


Figura 35. Esquema de un GC de columna abierta/espectrómetro de masas

En las dos últimas décadas, la espectrometría de masas se ha convertido en una herramienta indispensable en muchas áreas de aplicación de la química analítica.

Ya en los años 1980s, MS llegó a ser rápidamente la técnica preferida de detección e identificación para muchos estudios al nivel de trazas en GC capilar, siendo las principales áreas de interés la petroquímica, la química medioambiental y la agroalimentaria.

En la década de 1990s, esta tendencia continuó y, en la actualidad, GC-MS tiene una posición insustituible, especialmente después de la introducción de los instrumentos de trampa de iones, que permiten la operación altamente selectiva MS-MS, y, más recientemente, la técnica extremadamente rápida (aunque más cara) de la Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo (Time-of-Flight, TOF-MS), que es indispensable para estudios en el campo de GC o GC-GC [178].

12. LA HIBRIDACIÓN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA–ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Es necesario reconocer la rápida y creciente importancia de la espectrometría de masas –con propósitos de detección, identificación y/o confirmación y cuantificación– especialmente cuando se combina con técnicas cromatográficas en línea. La revista científica *Journal of Chromatography A* publica regularmente números especiales titulados “*Mass Spectrometry: Innovation and Application*” dedicados a reviews o trabajos regulares sobre actividades de investigación relacionadas con MS [183–189].

La cromatografía líquida es muy efectiva en la separación de compuestos no–volátiles y estables térmicamente. Desafortunadamente, la falta de detectores LC sensibles y selectivos, ha limitado el amplio uso de esta técnica en el análisis de los alimentos. Este inconveniente se ha resuelto combinando LC con MS [190]. La creciente aplicación de LC–MS en este campo ha estado ligada con el desarrollo y evolución de MS. Hace dos décadas, no se disponía de una interfase apropiada de LC con MS porque este acoplamiento no se consideraba natural. LC–MS combina un instrumento que opera en fase condensada con otro que opera bajo vacío. En la actualidad, este problema ha sido resuelto con las fuentes de Ionización a Presión Atmosférica (Atmospheric Pressure Ionization, API), que han convertido LC–MS en un método ideal y ampliamente usado para el análisis de los alimentos debido a su gran especificidad, sensibilidad y eficiencia [191]. Las técnicas API son compatibles con los sistemas eluyentes de fase–reversa, considerando el uso de disolventes volátiles y aditivos en la separación cromatográfica y manteniendo las ventajas de LC [192–194].

La investigación en el acoplamiento de LC y MS se inició en los primeros años de la década de 1970. En los siguientes 20 años, se enfocó casi toda la atención en resolver los problemas de la interfase y la construcción de nueva tecnología. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de los investigadores en LC–MS se centran en la aplicación de las técnicas disponibles comercialmente en su

campo de interés. Los problemas tecnológicos en la interfase parecen haber sido resueltos, y de la gran variedad de interfases desarrolladas a lo largo de los años permanecen básicamente dos, ionización por electrospray e ionización química a presión atmosférica, siendo ambas técnicas de ionización a presión atmosférica [195]. Con ESI y APCI, se ha desarrollado LC-MS en estrategias analíticas en muchas áreas aplicadas, como análisis ambiental, desarrollo de drogas en la industria farmacéutica, análisis de residuos de drogas veterinarias, caracterización de productos naturales y caracterización de biomoléculas como péptidos, proteínas, oligosacáridos, lípidos y oligonucleótidos [196].

12.1. SEPARACIONES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

El modo cromatográfico más utilizado para separar especies orgánicas mediante LC-MS es la fase reversa (reversed-phase, RPLC), usando o no pares de iones. En RPLC, se separan especies de polaridad media, polares y compuestos iónicos de acuerdo a las diferencias en hidrofobicidad para la partición entre una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar. La mayoría de las fases estacionarias se basan en sílice que ha sido modificada químicamente con cadenas octadecilo (C_{18} o ODS) u octilo (C_8 o OS). También se puede usar aminopropil, cianopropil o fenil silica para separaciones en fase-reversa.

La combinación directa de LC con MS reduce los problemas en la separación cromatográfica debido a la selectividad de las masas y los patrones de fragmentación diferenciados. Sin embargo, la separación cromatográfica puede ser crucial en algunos casos, y está relacionada directamente con el gran número de diferentes fases estacionarias disponibles. Esto facilita la solución de muchos problemas de separación seleccionando simplemente fases estacionarias apropiadas con diferente selectividad para permitir las separaciones de analitos polares o mejorar la forma de los picos de compuestos básicos. También se han introducido nuevas alternativas a las fases enlazadas alquil no-polares

convencionales; las más populares son las fases encapsuladas e incrustadas. Son modificaciones de la fase tradicional C₁₈, con la adición de un grupo funcional no-polar o polar, usualmente un grupo amida o carbámico, bien en (incrustado) o al final (encapsulado) de la cadena alquilo, modificando así la selectividad en comparación con las fases convencionales enlazadas alquilo [191].

Como fases móviles, los disolventes más comunes usados en LC-API-MS son agua, metanol, acetonitrilo y mezclas de los anteriores, mediante elución por gradiente. Las disoluciones reguladoras incorporadas a la fase móvil deben ser volátiles para evitar problemas con la interfase MS. Las más usadas son las de ácido acético, ácido fórmico, acetato amónico, formiato amónico o amoníaco [197]. Los reactivos formadores de pares de iones tales como ácido heptafluorobutírico, tributilamina o trietilamina se añaden a la fase móvil para mejorar el comportamiento cromatográfico y la forma de los picos de las moléculas ionizadas en disolución.

La fase móvil es importante para obtener una buena separación cromatográfica, pero también afecta a la ionización del analito y la sensibilidad del MS [198]. La cantidad de modificadores orgánicos puede aumentar o disminuir la eficiencia de ionización dependiendo de la interfase. La eficiencia del proceso de electrospray depende de la conductividad y la tensión superficial del líquido nebulizado. Cuando la conductividad es demasiado alta (disoluciones acuosas) es difícil producir un spray estable y vaporizar las gotas formadas por la acción del alto voltaje y el gas nebulizador. Puesto que la tensión superficial del agua es mucho mayor que la tensión superficial del metanol o acetonitrilo, la sensibilidad es reducida cuando se usa más del 70-80 % de la fase móvil acuosa. La relación acuosa-orgánica es más significativa cuando se trabaja a velocidades de flujo más altas ya que hay más disolvente para nebulizar y vaporizar. Un contenido de disolvente orgánico muy alto puede también disminuir la sensibilidad, especialmente si no se usa ningún aditivo, ya que la conductividad del disolvente orgánico puro es demasiado baja. Un pequeño porcentaje de agua en la fase móvil

ayuda a la formación de gotas. Comúnmente, porcentajes más altos de modificador orgánico mejoran la ionización en ESI y la empeoran en APCI. Aunque la química de disoluciones no es tan crítica en APCI como en ESI, hay que considerar las propiedades del disolvente. Los disolventes próticos, tales como metanol, mejoran la ionización positiva. La adición de reguladoras volátiles, tales como formiato amónico-ácido fórmico o ácido acético-acetato amónico, proporcionan el aumento de iones en analitos básicos. Son compatibles a concentración de 10 a 20 mM. El pH de la fase móvil determina el estado de ionización de los analitos, cuando se trabaja con ácidos, bases o especies anfóteras y, por tanto, afecta a la respuesta en LC-API-MS. El pH de la fase móvil también determina la selectividad cromatográfica para compuestos ionizables [191].

Se ha usado la cromatografía líquida de intercambio iónico para separar especies iónicas. La mayoría de las columnas tienen un material de empaquetamiento con grupos ácido sulfónico (intercambio catiónico fuerte o SCX). La necesidad de sales fuertes, contraiones y reguladoras añaden complicaciones adicionales.

12.2. DESARROLLOS EN LAS INTERFASES PARA LC-MS

Los sistemas LC-MS se basan casi exclusivamente en interfases API de "ionización débil", como son APCI y ESI. Para compuestos de polaridad moderada a alta, ESI constituye la técnica de ionización más importante en MS acoplada a LC para el análisis de compuestos orgánicos (<1000 Da) [199]. APCI es más útil para compuestos no iónicos de peso molecular moderado. La ionización química ocurre en el estado vapor para formar el ion $[M+H]^+$. La aguja de descarga en corona en la fuente APCI produce un haz de electrones, que ioniza el disolvente de la fase móvil. Sin embargo, ha surgido la Fotoionización a Presión Atmosférica (Atmospheric-Pressure Ionization, APPI) como una nueva técnica de ionización.

Están disponibles una amplia variedad de diseños de fuentes API. Una fuente API consta de cinco partes:

- (1) el dispositivo de introducción del líquido,
- (2) la región de fuente de iones a presión atmosférica, donde se generan los iones por ionización ESI, APCI u otros medios,
- (3) la apertura de muestreo de iones,
- (4) la interfase a presión atmosférica a alto-vacío: la región de transición, y
- (5) el sistema de iones-óptico, donde los iones generados en la fuente son enriquecidos y transportados hacia el analizador de masas de alto vacío.

La Figura 36 muestra un diagrama esquemático de una fuente API [195]. Mediante el intercambio del lateral derecho, es posible cambiar fácilmente entre ESI y APCI.

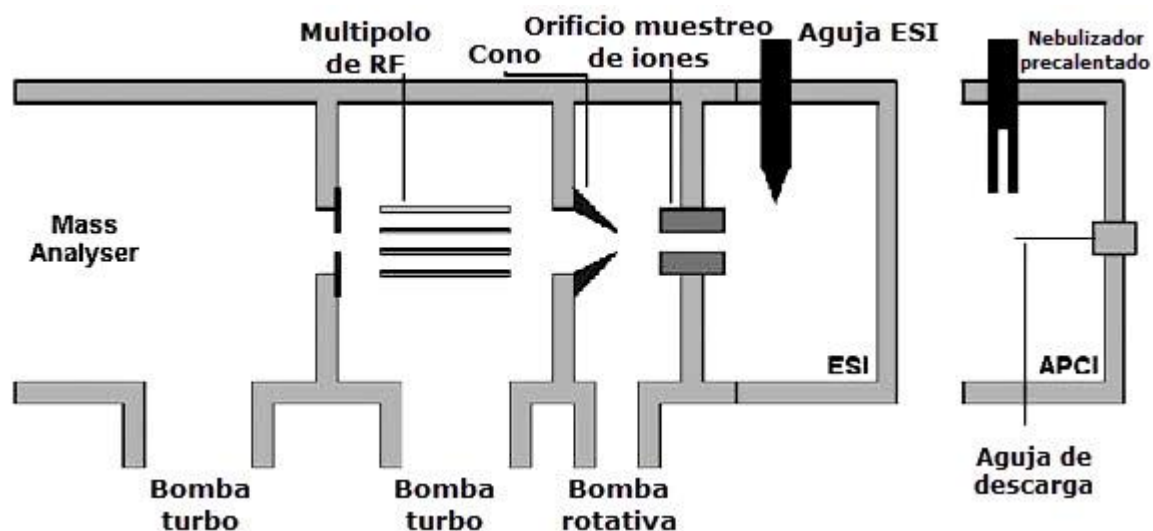


Figura 36. Diagrama esquemático de una fuente API para LC-MS. El intercambio del lateral derecho permite cambiar entre ESI y APCI.

El principio operacional de la mayoría de interfases API y diseños generales de fuente de iones es el siguiente [196]. El efluente de la columna de LC (o cualquier otro flujo líquido) es nebulizado en una región de fuente de iones a

presión-atmosférica. La nebulización se lleva a cabo (1) neumáticamente, es decir, en el nebulizador-calentado APCI, (2) por medio de la acción de un campo eléctrico fuerte, es decir, en ESI, o (3) por una combinación de ambos, es decir, en ESI por spray de iones (ion-spray) o asistido-neumáticamente (pneumatically-assisted). Los iones son producidos a partir de las gotas evaporadas, o por reacciones ion-molécula en fase gaseosa, o por la desorción, evaporación o desolvatación suave de iones a partir de estas gotas. Los iones generados, junto con el vapor del disolvente y el gas del baño de nitrógeno, son muestreados por una apertura de muestreo de iones en una primera etapa de bombeo. La mezcla del gas, vapor del disolvente e iones se expande supersónicamente en esta región de baja presión. El núcleo de la expansión se muestrea por una boquilla en una segunda etapa de bombeo, conteniendo los iones enfocados y dispositivos de transferencia para transportar de forma óptima los iones al analizador de masas.

Desde el punto de vista del vacío, no es importante si se nebuliza una velocidad de flujo de líquido alta o baja, porque el orificio de muestreo actúa como una restricción fija entre la región a presión atmosférica y la primera etapa de muestreo. Desde el punto de vista de MS, no es importante si los iones son generados por ESI o APCI, aunque pueden ser necesarias variaciones de voltaje ligeramente diferentes en las ópticas de los iones debido a algunas diferencias en las energías cinéticas de los iones.

En la mayoría de los sistemas ESI comerciales (asistidos neumáticamente), se usa una aguja coaxial ESI, construida de acero inoxidable, o un capilar interno de sílice fundida para introducir la muestra y un capilar externo de acero inoxidable para introducir el gas nebulizador nitrógeno. La nebulización del líquido se debe a la acción combinada de la aplicación de un campo eléctrico grande resultante de una diferencia de potencial de 3–5 kV entre la aguja ESI y un contraelectrodo circundante, y la nebulización neumática. El disolvente emergente de la aguja se rompe en hilos finos que, posteriormente, se desintegran en pequeñas gotas. Estas gotas cargadas se reducen debido a la evaporación del líquido. Como

resultado, la distancia entre las cargas sobre la superficie se hace más y más pequeña, llevando a una desintegración de gotas electrohidrodinámica inducida por el campo o explosión Coulomb. Esto da como resultado la formación de microgotas altamente cargadas. De las microgotas, aparecen iones en la fase gaseosa, debido a la emisión o desorción de iones preformados de la superficie de la gota (modelo de evaporación de iones) o debido a la desolvatación suave de iones preformados (modelo de carga-residuo) [200–201]. Esta secuencia de eventos que lleva a la formación de iones en fase gaseosa en ionización por electrospray se muestra en la Fig. 37.

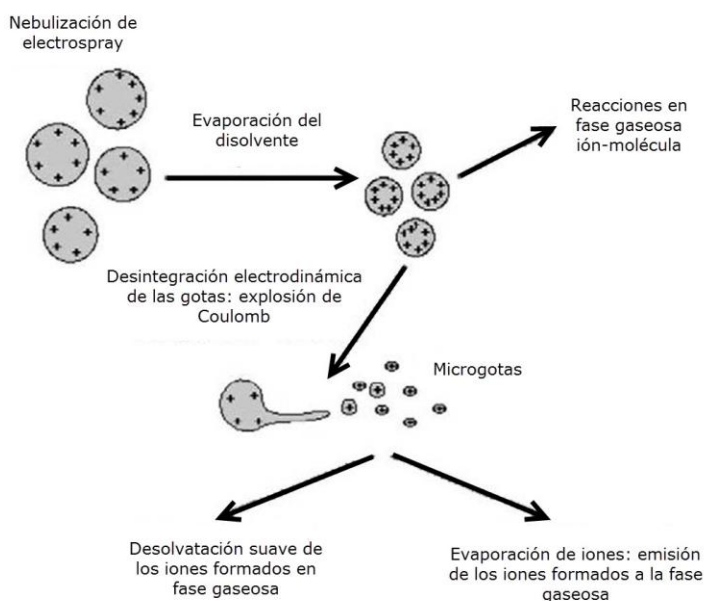


Figura 37. Secuencia de eventos que conduce a la formación de iones en ionización por electrospray

En una interfase APCI con nebulizador caliente, el efluente de la columna es nebulizado en un tubo vaporizador caliente (350–500 °C), donde se produce la evaporación casi completa del disolvente. La mezcla gas-vapor entra en una fuente de iones a presión atmosférica, donde se inicia la ionización del analito por una aguja de descarga de corona. El vapor del disolvente actúa como un gas reactivo.

Hay algunas reglas básicas para seleccionar el modo de ionización y la interfase [191].

Una característica de la especificidad de LC-MS es su habilidad para simplificar, o incluso eliminar, la preparación de la muestra y así la separación cromatográfica permite conseguir mayor frecuencia de muestreo. A pesar de esto, la complejidad de la muestra y el número de compuestos que co-eluyen con los analitos generan un problema muy importante en LC-MS, las interferencias de la matriz. Estas interferencias son causadas por los coextractantes presentes en la muestra inyectada, que pueden causar aumento o supresión de la señal de los analitos [202]. El efecto matriz se relaciona con la fuente de ionización y es atribuido a la influencia de los componentes de la matriz en los procesos de ionización en las interfases API, causando un efecto positivo o negativo en la cantidad de iones formados a partir de los analitos.

Estos efectos dependen fuertemente del compuesto, y son también más pronunciados con ESI y con APCI y, en menor extensión, con APPI porque en la última interfase, la ionización de los analitos depende de la energía de ionización del analito más que de su afinidad por los protones como en las dos primeras. Este fenómeno puede comprometer la exactitud de los resultados analíticos en el análisis de trazas de muestras complejas. Sin embargo, el mecanismo exacto del fenómeno de interferencias de la matriz no es bien conocido, dando lugar a diferentes teorías sobre el origen del efecto matriz. Estos efectos provocan que la respuesta de un analito en un disolvente puro varíe significativamente en la matriz de una muestra. Esto se puede comprobar fácilmente comparando la respuesta obtenida de una disolución estándar y de una muestra pre-tratada fortificada (fortificación post-extracción).

Hay dos formas generales para eliminar el efecto matriz en análisis cuantitativo. En primer lugar, se pueden eliminar los constituyentes de la muestra responsables de los efectos matriz. Esto implicaría mejorar el pre-tratamiento de la muestra y/o la separación cromatográfica (eficiencia y/o resolución). Aunque esto

en principio sería lo mejor, puede ser difícil de conseguir, especialmente en análisis de multiresiduos, donde pueden estar implicadas una variedad de interferencias. Alternativamente, se puede reducir o eliminar la influencia que tienen los efectos matriz sobre la exactitud y/o precisión del método. Esto se puede conseguir mediante: cambio a otro método de ionización, cambio de la composición de la fase móvil, y/o uso de estandarización adecuada. En muchos casos, se pueden combinar ambas posibilidades para conseguir resultados cuantitativos. Sin embargo, la forma más fácil de eliminar el fenómeno de supresión/aumento por la matriz, sin ninguna limpieza de la muestra laboriosa y/o separación cromatográfica complicada, es aplicar una técnica de calibración apropiada que compense el efecto matriz.

Los efectos matriz en LC-API-MS pueden ser compensados con [199]:

- Dilución de la muestra para diluir los componentes de la matriz.
- El uso de un estándar marcado isotópicamente.
- Cambiando la selectividad de la columna cromatográfica.
- Examinando el modo positivo y negativo. El modo negativo es menos propenso a sufrir efectos matriz.
- Probar otras fuentes.

La adquisición de datos en MS se puede llevar a cabo de distintos modos. Cada uno de los modos presenta unas características que lo hacen idóneo para un objetivo concreto. Los modos de adquisición que se pueden aplicar son:

- *Barrido de todos los iones (full scan)*. En este modo de adquisición, todas las moléculas que se ionizan en la interfase llegan al detector. Se realiza el barrido de iones con el cuadrupolo y se obtiene un espectro de barrido total o *full scan*.

- *Adquisición de un ion seleccionado (Single Ion Monitoring, SIM)*. La adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ion, que es seleccionado en el cuadrupolo.

12.3. DESARROLLOS EN ANALIZADORES DE MASAS PARA LC–MS

El analizador de masas se considera el corazón del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos es función de la relación masa/carga (m/z) y es el que establece la diferencia entre los distintos analizadores. El interés en la aplicación de las técnicas LC–MS ha estimulado significativamente los desarrollos y mejoras en la tecnología de los analizadores de masas.

En el diseño de los analizadores de MS se distinguen como los más populares: Cuadrupolo (Quadrupole, Q), Trampa de Iones Cuadrupolar (Quadrupole Ion Trap, QIT), Trampa de Iones Lineal (Linear Ion Trap, LIT), Resonancia de Ion–Ciclotrón (Ion Cyclotron Resonance, ICR), Sector Magnético y Tiempo de Vuelo (Time–of–Flight, TOF).

La capacidad de un analizador se evalúa de forma general en base a las siguientes características: rango de masas, resolución de masa, eficiencia de transmisión de iones, exactitud de masa, rango dinámico de linealidad, velocidad de barrido y sensibilidad. Por otro lado, otros factores que también determinan la elección de un instrumento u otro son su adaptabilidad y coste económico.

El cuadrupolo ha sido el analizador más común en los laboratorios hasta hace pocos años. La razón es que los cuadrupolos ofrecen un buen compromiso con el rango de masas (de 40 a 4000 amu), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad a un precio razonable. Consta de cuatro barras metálicas en posiciones paralelas. Cada par de barras opuestas están conectadas juntas eléctricamente y entre un par de barras y el otro se aplica un voltaje de radio frecuencia (RF). Entonces se superpone un voltaje de corriente continua (DC) al voltaje RF. Los iones viajan a través del cuadrupolo entre las barras. Sólo los iones con un cierto valor de m/z alcanzan el detector para una relación dada de voltajes, los otros iones tienen trayectorias inestables y colisionarán con las barras. Esto permite la selección de un ion particular, o el

barrido variando los voltajes. En el experimento de barrido completo (full-scan), los componentes DC y RF se aplican a una relación constante, y los iones que entran de la fuente de iones pueden pasar a través de las barras sucesivamente. Para una combinación específica de DC y RF, sólo puede pasar a su través un rango muy pequeño de m/z , cuyo tamaño determina la resolución del instrumento. Esto puede traducirse en baja sensibilidad, que hace este modo inapropiado para determinar compuestos al nivel de trazas en la muestra.

La sensibilidad es mucho mayor en el modo de iones seleccionados (SIM) del cuadrupolo. En este caso, los potenciales DC y RF se mantienen constantes, así sólo pasa a su través una relación m/z específica. También se puede saltar entre diferentes voltajes, para permitir detectar secuencialmente más de una relación m/z . Sin embargo, un inconveniente de este modo es que sólo se puede medir un número limitado de iones para cada compuesto, porque ESI y APCI se han diseñado para llevar a cabo un proceso de ionización débil que conduce a un espectro de masas con sólo unos pocos iones. La fragmentación escasa de las moléculas se traduce en especificidad deficiente porque frecuentemente se observan interferencias isobáricas (compuestos con la misma relación m/z) en los extractos de matrices complejas como los alimentos.

Los instrumentos de cuadrupolo simple usualmente están limitados a medir especies intactas generadas por la fuente de ionización, lo que se traduce en una pérdida de selectividad. Este analizador de masas ha sido el más utilizado durante muchas décadas porque es relativamente barato, robusto, particularmente sensible en modo SIM e ideal para aplicaciones de determinación de trazas. Sin embargo, la ausencia de iones fragmentados o los iones fragmentados que provienen de compuestos diversos que coeluyen en el mismo pico en LC-MS, hacen difícil la asignación de estructuras (similarmente, el análisis cuantitativo en modo SIM podría ser complicado cuando contribuyen interferencias isobáricas a los picos cromatográficos).

En un instrumento de cuadrupolo simple, operando con una fuente ESI o APCI, se puede aumentar la selectividad cuando se induce la fragmentación en la región de la fuente de iones aumentando el voltaje. Este proceso es conocido como Disociación por Colisión Inducida (Collision Induced Dissociation, CID). Este procedimiento se refiere a la activación de los iones en la región entre la fuente de iones y el analizador, en la cual se puede iniciar la fragmentación por colisiones con moléculas de gas residual a presiones intermedias ("in-source CID"). Los iones fragmentados generados se pueden utilizar para la elucidación limitada de estructuras o con propósitos de confirmación. Las aplicaciones típicas de los cuadrupolos simples, cuando se debe cumplir el criterio EU (2002/657/EC) u otro relacionado, incluyen barrido y cuantificación. Sin embargo, un cuadrupolo triple o una trampa de iones debería utilizarse también con propósitos de confirmación [191].

El diseño de diferentes interfases LC-MS para permitir un proceso de ionización suave que conduce a un espectro de masas con solo unos pocos iones hace que, la mayoría de las veces, no sean suficientes para reconocer y cuantificar todos los analitos de interés en la muestra. Progresivamente, por tanto, se han desarrollado otros analizadores de masas para ayudar a resolver problemas analíticos.

Estos analizadores de masas recientemente introducidos se han dividido en dos grupos diferentes [191]: el primer grupo comprende técnicas de alta resolución, tales como TOF-MS, y el segundo grupo incluye técnicas capaces de llevar a cabo Espectrometría de Masas en Tándem, tales como Cuadrupolo Triple (Triple Quadrupole, QqQ), QIT o el híbrido Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (Quadrupole Time-of-Flight, QqTOF). El poder de estas nuevas tecnologías proporciona información estructural para la identificación de compuestos desconocidos, aumenta la especificidad de identificación de los analitos a determinar y consigue alta sensibilidad para determinación de trazas.

MS–TOF lineal es muy simple. Consta sólo de una región de aceleración de iones, un tubo chimenea y un detector. En teoría, todos los iones sufren la misma diferencia de potencial durante la aceleración y, en consecuencia, tienen la misma energía cinética al principio del tubo chimenea, y así las diferentes velocidades dependen de sus masas. Por tanto, su tiempo de llegada al detector es proporcional a su masa y pueden alcanzar el detector en orden de masa creciente. La mayor deficiencia de un instrumento TOF lineal simple es su insuficiente resolución de masas, resultante de las variaciones en el tiempo de vuelo de los iones que tienen igual m/z . Como resultado, los instrumentos TOF modernos emplean normalmente reflectrones para aumentar la resolución.

TOF tiene la habilidad de registrar un número ilimitado de compuestos porque opera en modo de barrido completo. Las medidas de masa exacta son casi específicas y universales para todos los analitos, sea cual sea la instrumentación usada, haciendo posible desarrollar librerías comparables a las ya existentes para GC–MS. En este sentido, UPLC–TOF–MS es una técnica muy efectiva y conveniente para el desarrollo de estrategias de screening y para análisis rutinarios de masa exacta [203]. Otra característica importante de los instrumentos TOF–MS es su gran sensibilidad en el modo de adquisición de barrido completo.

Los instrumentos LC–TOF–MS presentan varias ventajas. El gran rango de masas que pueden ser analizadas (con un TOF lineal) y la elevada transmisión de iones consigue la detección casi-simultánea de todos los iones, lo que se traduce en análisis de elevada sensibilidad del espectro total (TOF–MS no es un instrumento de barrido). Estas características hacen que este instrumento sea muy útil en aplicaciones cualitativas tales como la identificación de compuestos no analitos y/o compuestos desconocidos, en los cuales se requiere la adquisición del espectro de masas completo. Además, LC–TOF–MS ofrece una mejora en la selectividad debido al alto poder de resolución junto con la capacidad para suministrar cromatogramas de masa exacta (rango de masas 1 Da), que permite la

identificación de las masas de las interferencias con los analitos que tienen la misma masa nominal e igual tiempo de retención cromatográfico [191].

Otro desarrollo importante es la Trampa de Iones Tri-dimensional [38–39]. Un QIT consiste en un anillo electrodo cilíndrico al cual se aplica el campo cuadrupolo, y dos electrodos terminales (end-cap) (Figura 38). Uno de ellos contiene agujeros para la introducción de electrones o iones en la trampa, mientras que el otro tiene agujeros para que los iones salgan fuera de la trampa hacia el multiplicador de electrones. En sistemas LC–MS, los iones son generados en una fuente de iones externa. Los iones son introducidos en la trampa en modo pulsado y almacenados allí. En la trampa está presente un baño de gas helio (0,1 Pa) para estabilizar las trayectorias de los iones. La adquisición de un espectro de masas por medio de una trampa de iones con una fuente de iones externa requiere un número de etapas consecutivas:

- El número de iones que pueden ser almacenados en la trampa de iones sin afectar la resolución de masas y la exactitud está limitada debido a los efectos espacio–carga.
- Se aplica un voltaje RF apropiado al electrodo anillo para atrapar y acumular iones con valores de m/z por encima de un valor de corte (cut–off) de masa menor.
- En este momento, se pueden llevar a cabo diferentes experimentos MS. En el modo de barrido completo, iones de diferentes m/z son eliminados consecutivamente de la trampa hacia el detector externo haciendo una rampa del voltaje RF en el electrodo anillo.
- Alternativamente, todos los iones excepto el m/z seleccionado pueden ser eliminados de la trampa para llevar a cabo SIM. El voltaje RF en el electrodo anillo es adaptado para almacenar los iones de los m/z seleccionados antes de que sean eliminados al detector. En una trampa de iones, el uso de SIM no conduce a una ganancia significativa en S/N, porque no se consigue ganancia en la medida del ion seleccionado.

- En ambos casos, el procedimiento termina por un pulso RF para eliminar todos los iones de la trampa y prepararla para la secuencia siguiente de eventos.

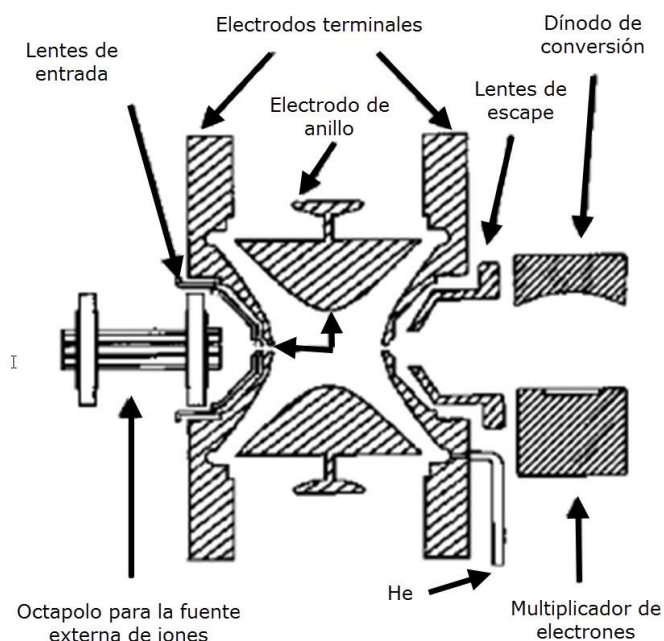


Figura 38. Espectrómetro de masas de trampa de iones con fuente de ionización externa

Un punto importante es el ciclo "duty", que debe ser lo más alto posible. Los iones son inyectados en la trampa de iones durante un período limitado de tiempo. Durante el tiempo que lleva adquirir el espectro MS y volver a las condiciones iniciales, se pierden los iones producidos en la fuente de iones. Para un sistema API-IT-MS, el ciclo "duty" puede definirse desde un punto de vista práctico como la relación del número de iones inyectados en la trampa de iones y el número total de iones que entran.

12.4. APLICACIONES DE LC-MS EN CONTROL DE ALIMENTOS

El uso de detectores poderosos de espectrometría de masas en combinación con cromatografía líquida ha jugado un papel vital para resolver muchos

problemas relacionados con la seguridad alimentaria. La legislación básica en diferentes países del mundo y, en especial, en la Unión Europea favorece el uso de LC-MS. Los últimos avances y novedades en MS han permitido progresar en el control de los alimentos, consiguiendo una mejora de la seguridad alimentaria y los estándares de calidad, así como en el desarrollo de métodos multi-residuo de gran-escala y la identificación de compuestos desconocidos [203].

Durante la última década, la seguridad alimentaria ha ganado en importancia debido a un número de incidentes que han recibido mucha publicidad en todo el mundo [204]. Para superar estas sospechas, los gobiernos de distintos países han aumentado la legislación relativa a la seguridad alimentaria [205–206]. Para afrontar estos problemas, LC-MS, tradicionalmente una parte importante del laboratorio médico, encuentra un mercado en crecimiento en la seguridad alimentaria [207] y es particularmente útil para el análisis de contaminantes de los alimentos, ya que proporciona una gran cantidad de información acerca de mezclas complejas, permitiendo el screening, confirmación y cuantificación de cientos de componentes con un análisis [208–209].

Se ha utilizado QqQ para barrido y confirmación de contaminantes de los alimentos y residuos. La mayoría de los análisis se han realizado, debido a su elevada sensibilidad y selectividad, en el modo SRM, de QqQ-MS-MS. También se ha considerado como muy útil, la técnica TOF-MS para el control rutinario de los alimentos ya que las técnicas TOF pueden registrar un espectro exacto full-scan a través del rango de adquisición y han resultado una herramienta excelente para la identificación y confirmación inequívoca de contaminantes de los alimentos. Recientemente, los espectrómetros MS-MS introducidos, que poseen ambas características, tales como QqLIT, LTQ o Q-trap, QqTOF, FTICR-MS y LTQ-Orbitrap, han permitido el desarrollo de varios métodos nuevos para la detección de contaminantes [203].

La Decisión de la Comisión 2002/657/EC [210] es probablemente el documento clave de la legislación a consultar por los laboratorios analíticos en

control de seguridad alimentaria. Esto incluye definiciones y descripciones como veracidad (trueness), recuperación (recovery), repetitividad (repeatability), robustez (ruggedness) y requerimientos detallados para detección MS e identificación de sustancias. Aunque detalla los criterios de rendimiento (performance) y otros requerimientos para análisis de contaminantes de los alimentos y residuos en productos de alimentos animales, esta Decisión se ha aplicado en muchos casos, en los cuales no se han establecido criterios (por ejemplo para un número de nuevos contaminantes emergentes). Los límites máximos de residuos, MRLs y/o MRPLs, establecidos determinan la sensibilidad requerida y, generalmente, obligan para mejorar los límites de detección.

En esta Tesis Doctoral se ha trabajado con múltiples hifenaciones, de las cuales resumimos las siguientes como las más importantes:

- Pretratamiento de la muestra SPE–MWCNT en combinación con LC
- Pretratamiento de la muestra DLLME en combinación con LC
- Separación en línea acoplada a detectores UV y de fluorescencia: LC–UV y LC–FI
- Separación en línea acoplada a espectrometría de masas: LC–MS
- Estrategias de separación en línea acoplada a detectores múltiples, uno de los cuales es MS: LC–UV–MS y LC–FI–MS
- Nuevos progresos en la integración de múltiples acoplamientos en–línea e hifenación de técnicas de preparación de muestra y analíticas en un solo proceso, como PLE–DLLME–LC–UV–APCI–MS.

13. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

La teoría y metodología de los Diseños Experimentales de Matriz Ortogonal (Orthogonal Array Experimental Designs, OAD) como método quimiométrico para la optimización de procedimientos analíticos ha sido descrita en detalle [211–214].

OAD es una estrategia de optimización efectiva que se puede usar para asignar factores experimentales en un trial de series de experimentos [215].

Las ventajas de OAD sobre otros diseños experimentales existentes son las siguientes:

- (1) OAD hace hincapié en un valor característico promedio cercano al valor objetivo más que a un valor entre ciertos límites especificados,
- (2) OAD es sencillo y fácil de aplicar a muchas situaciones experimentales, lo que hace de él una herramienta simple y poderosa,
- (3) se puede usar para reducir rápidamente el alcance de un proyecto de investigación a partir de datos ya existentes,
- (4) el método OAD permite el análisis de muchos parámetros diferentes sin una cantidad excesivamente elevada de experimentación. De esta forma, permite identificar los parámetros clave que pueden tener mayor efecto sobre las características de rendimiento, así se pueden llevar a cabo posteriores experimentos sobre estos parámetros e ignorar los parámetros que tengan un efecto pequeño.

La principal desventaja del método OAD es que los resultados obtenidos sólo son relativos y no indican exactamente qué parámetro tiene el mayor efecto sobre el valor de rendimiento característico.

El método OAD ha sido criticado en la bibliografía por la dificultad en encontrar las interacciones entre parámetros [216].

Los procedimientos analíticos se pueden optimizar utilizando OAD basados en el método Taguchi [216–219]. Así, todos los factores múltiples pueden ser considerados de forma conjunta por un diseño de matriz ortogonal balanceado de acuerdo con el número de parámetros, llevando a cabo experimentos basados en el OAD, analizando los datos, identificando las condiciones óptimas y realizando experimentos de confirmación con los niveles optimizados para todos los parámetros.

Hay que considerar la influencia de los factores sobre la respuesta media y la relación señal–ruido. La relación señal–ruido se calcula como la respuesta más alta (higher-is-better):

$$S / N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right)$$

donde n es el número de repeticiones e y_i son los valores de las respuestas experimentales obtenidas para cada trial.

Posteriormente, se lleva a cabo un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para establecer cuáles de los parámetros diseñados afectan de forma significativa al procedimiento óptimo y sus porcentajes de contribución, calculando la suma de las desviaciones al cuadrado, la media al cuadrado y el valor de F . A partir de las relaciones de varianza calculadas F , se puede deducir cuáles son los factores considerados en el diseño experimental que son estadísticamente significativos al nivel de confianza del 95% (en aquellos casos en que el valor de F calculado sea mayor que el valor crítico). La contribución del error residual a la variabilidad de la señal indica la bondad del experimento diseñado. Por tanto, a partir de los porcentajes de contribución se puede deducir cuál es el factor más importante. Se aplican entonces las condiciones optimizadas para el método analítico.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado tanto procedimientos de optimización univariantes como procedimientos multivariantes y, en ambos casos, se han obtenido buenos resultados analíticos.

14. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H.D. Belitz, W. Grosch, *Química de los alimentos*, 2ª ed. en español, de la 4ª original, Editorial Acribia (1997).
- [2] O.R. Fennema, *Química de los alimentos*, 2ª ed., Editorial Acribia (2000).
- [3] G.F.M. Ball, *Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability*, Taylor and Francis, USA (2006).
- [4] A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, J.F. Van Boclaer, *Modern chromatographic analysis of vitamins*, 3rd Ed., Marcel Dekker, New York (2000).
- [5] C.J. Bates, *Vitamins: fat and water soluble: analysis*, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. R.A. Meyers, Ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2001).
- [6] M. Juárez, A. Olano, F. Morais (Eds.), *Alimentos funcionales*, Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid (2005).
- [7] M.J. Playne, L.E. Bennett, G.W. Smithers, *Functional dairy foods and ingredients*, *Aust. J. Dairy Technol.* 58 (2003) 242–264.
- [8] A. Schieber, F.C. Stintzing, R. Carle, *By-products of plant food processing as a source of functional compounds — recent developments*, *Trends Food Sci. Technol.* 12 (2001) 401–413.
- [9] T.F. Slater, G. Block, *Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview*, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 189–196.
- [10] G. Williamson, *Protective effects of fruits and vegetables in the diet*, *Nutr. Food Sci.* 1 (1999) 6–10.

- [11] J. Aranceta, L. Serra, Guía de alimentos funcionales, Sociedad Española de Nutrición Comunitaria SENC (2001).
- [12] Commision Directive 1996/5/EC, of 16 February 1996 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children (1996).
- [13] U.S. Food and Drug Administration, Pesticide analytical manual, vol. I Multiresidue methods, third ed., U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC (1994).
- [14] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, *J. Chromatogr. A* 1153 (2007) 36–53.
- [15] V. Di Stefano, G. Avellone, D. Bongiorno, V. Cunsolo, V. Muccilli, S. Sforza, A. Dossena, L. Drahos, K. Vekey, Applications of liquid chromatography–mass spectrometry for food analysis, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 74–85.
- [16] V.I. Valsamaki, V.I. Boti, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion, *Anal. Chim. Acta* 573–574 (2006) 195–201.
- [17] S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion, *J. Chromatogr. A* 475 (1989) 353–361.
- [18] S.A. Barker, Matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115–127.
- [19] E.M. Kristenson, L. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Recent advances in matrix solid-phase dispersion, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96–111.
- [20] M.D. Luque de Castro, L.E. García-Ayuso, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 1–10.

- [21] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1–17.
- [22] A. Mustafa, C. Turner, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 8–18.
- [23] J. Pawliszyn, Sample preparation: Quo Vadis?, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2543–2558.
- [24] V. Camel, Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls, *Analyst* 126 (2001) 1182–1193.
- [25] R.M. Smith, Superheated water: the ultimate green solvent for separation science, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 419–421.
- [26] R.M. Smith, Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 83–115.
- [27] G.F.M. Ball, *Fat-soluble vitamin assays in foods analysis*, London, Elsevier Applied Science (1988).
- [28] R.M. Smith, Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3–27.
- [29] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, Quality assurance in the analyses of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 63 (1980) 1344–1354.
- [30] D.E. Raynie, Modern extraction techniques, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3997–4004.
- [31] T. Wickstrom, G. Ogner, G. Remedios, Effects of different pretreatments (sieving, milling, and grinding) on quality of determination of Kjeldahl

- nitrogen, pH, and extractable elements in forest, *Soils Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 35 (2004) 369–384.
- [32] C. McIntyre, C. McRae, Proposed guidelines for sample preparation and ESI-MS analysis of humic substances to avoid self-esterification, *Org. Geochem.* 36 (2005) 543–553.
- [33] T. Hjorth, Effects of freeze-drying on partitioning patterns of major elements and trace metals in lake sediments, *Anal. Chim. Acta* 526 (2004) 95–102.
- [34] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Miniaturization in sample treatment for environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119–140.
- [35] L. Cuadros-Rodríguez, E.M. Almansa-López, A.M. García-Campana, A. González-Casado, F.J. Garrido-Frenich, J.L. Martínez-Vidal, Setting up of recovery profiles: A tool to perform the compliance with recovery requirements for residue analysis, *Talanta* 66 (2005) 1063–1072.
- [36] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 86 (2003) 412–431.
- [37] P. Zollner, A. Leitner, D. Berner, M. Kleinova, J. Jodlbauer, B.X. Mayer, W. Lindner, Improving LC-MS/MS analyses in complex food matrices, Part I - sample preparation and chromatography, *LC–GC Eur.* 16 (2003) 163–171.
- [38] T. Sangster, Seminar presentation, The “Nuts and Bolts” of sample preparation. A joint Chromatographic society and RSC meeting (2005).
- [39] F. Calbiani, M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, L. Pistara, I. Zagnoni, Development and in-house validation of a liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry method for the simultaneous

- determination of Sudan I, Sudan II, Sudan III and Sudan IV in hot chilli products, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 123–130.
- [40] C.K. Ng, N. Tanaka, M. Kim, S.L. Yap, A rapid and sensitive analysis method of Sudan red I, II, III&IV in tomato sauce using ultra performance LC MS/MS, Waters application note, Waters, Milford (2005).
- [41] G. Theodoridis, G.J. de Jong, Solid-phase microextraction: A new tool in contemporary bioanalysis, *Adv. Chromatogr.* 43 (2005) 231–271.
- [42] E.E. Stashenko, J.R. Martínez, Derivatization and solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 553–561.
- [43] R.E. Majors, D. Raynie, The greening of the chromatography laboratory, *LCGC North America*, 29(2) (2011).
- [44] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green chemistry: Theory and practice*, Oxford University Press, New York (1998).
- [45] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young, Green analytical methodologies, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2695–2708.
- [46] J. Namiesnik, Green analytical chemistry – Some remarks, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 151–153.
- [47] L.H. Lawrence, <http://www.ChemistsHelpingChemists.org/>.
- [48] M. Koel, M. Kaljurand, *Green analytical chemistry*, Royal Society of Chemistry, London (2010).
- [49] M. de la Guardia, S. Armenta, *Green analytical chemistry*, Vol. 57: Theory and practice, Elsevier, Amsterdam (2010).
- [50] M.D. Luque de Castro, J.L. Luque García, *Acceleration and automation of solid sample treatment*, Elsevier, The Netherlands (2002).
- [51] R.E. Majors, The continuing acetonitrile shortage: how to combat it or live with it, *LCGC North America* 27(6) (2009) 458–471.

- [52] P. Sandra, G. Vanhoenacker, F. David, K. Sandra, A. Pereira, Green chromatography (Part 1): Introduction and liquid chromatography, LCGC Europe, 23(5) (2010).
- [53] A.J. Alpert, Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds, J. Chromatogr. 499 (1990) 177–196.
- [54] G.O. Staples, H. Naimy, H. Yin, K. Kileen, K. Kraiczek, C.E. Costello, J. Zaia, Improved hydrophilic interaction chromatography LC/MS of heparinoids using a chip with postcolumn makeup flow, Anal. Chem. 82 (2010) 516–522.
- [55] G. Vanhoenacker, P. Sandra, Retention and selectivity can thus be altered by changing the analysis temperature, J. Sep. Sci. 29 (2006) 1822–1835.
- [56] K. Hartonen, M.L. Riekkola, Liquid chromatography at elevated temperatures with pure water as the mobile phase, Trends in Anal. Chem. 27 (2008) 1–14.
- [57] D. Raynie, J.L. Driver, 13th Green Chemistry and Engineering Conference, Washington, DC (2009).
- [58] S.A. Shamsi, N.D. Danielson, Review: Utility of ionic liquids in analytical separations, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1729–1750.
- [59] S. Mitra (Ed.), Sample preparation techniques in analytical chemistry, Wiley-Interscience, New Jersey (2003).
- [60] P.L. Buldinia, L. Riccib, J.L. Sharma, Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, J. Chromatogr. A 975 (2002) 47–70.
- [61] Y. Saito, K. Jinno, Miniaturized sample preparation combined with liquid phase separations, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 53–67.

- [62] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809–833.
- [63] US Environmental Protection Agency, SW-846, Test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods, US GPO, Washington, DC, USA, 3rd Ed. (1986).
- [64] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817–1821.
- [65] D.C. Wood, J.M. Miller, I. Christ, Miniaturized approaches to conventional liquid–liquid extraction, *LC–GC Eur.* 17 (11) (2004) 573–579.
- [66] M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Pérez, M.A. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, Liquid phase microextraction applications in food analysis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7415–7437.
- [67] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339–364.
- [68] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in liquid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565–574.
- [69] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235–239.
- [70] E. Psillakis, N. Kalogerakis, Developments in single-drop microextraction, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 54–74.
- [71] Y. He, H.K. Lee, Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634–4640.

- [72] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3912-3919.
- [73] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single drop, *Anal. Chem.* 71 (1999) 388-393.
- [74] J. Jönsson, L. Mathiasson, Membrane extraction in analytical chemistry, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 495-507.
- [75] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-Liquid-Liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650-2656.
- [76] T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: Comparison with conventional liquid-liquid extraction, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 3-17.
- [77] G. Shen, H.K. Lee, Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides, *Anal. Chem.* 74 (2002) 648-654.
- [78] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Uglund, T. GrPnhaug, Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 3-11.
- [79] L. Zhao, L. Zhu, H.K. Lee, Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 239-248.
- [80] S. Liu, P.K. Dasgupta, Liquid droplet. A renewable gas sampling interface, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2042-2049.

- [81] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [82] W. Liu, H.K. Lee, Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4462–4467.
- [83] A. Przyjazny, J.F. Austin, A.T. Essenmacher, *Proceedings of the 6th Polish Conference on Analytical Chemistry*, vol. 2, Gliwice, Poland, July 9–14, p. 135 (2000).
- [84] A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 143–153.
- [85] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, Headspace solvent microextraction, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651–5654.
- [86] A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, Headspace extraction of alcohols into a single drop, *Analyst* 126 (2001) 1674–1677.
- [87] L. Xu, C. Basheer, H.K. Lee, Developments in single-drop microextraction, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 184–192.
- [88] M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, Single drop microextraction—Development, applications and future trends, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2326–2336.
- [89] J.M. Kokosa, A. Przyjazny, M.A. Jeannot, *Solvent Microextraction—Theory and Practice*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ (2009).
- [90] D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis, *J. Biochem. Biophys. Met.* 70 (2007) 195–228.
- [91] D.A. Lambropoulou, I.K. Konstantinou, T.A. Albanis, Recent developments in headspace microextraction techniques for the analysis of environmental contaminants in different matrices, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 70–96.

- [92] R. Batlle, C. Nerín, Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 29–35.
- [93] J. Romero, P. López, R. Batlle, C. Nerín, Strategies for single-drop microextraction optimisation and validation: Application to the detection of potential antimicrobial agents, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 24–29.
- [94] C. Dietz, J. Sanz, C. Cámara, Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 183–192.
- [95] R. Batlle, P. López, C. Nerín, C. Crescenzi, Active single-drop microextraction for the determination of gaseous diisocyanates, *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 155–160.
- [96] N. Li, C.H. Deng, X.Y. Yin, N. Yao, X.Z. Shen, X.M. Zhang, Gas chromatography–mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization, *Anal. Biochem.* 342 (2005) 318–326.
- [97] C.H. Deng, N. Li, L. Wang, X.M. Zhang, Development of gas chromatography–mass spectrometry following headspace single-drop microextraction and simultaneous derivatization for fast determination of short-chain aliphatic amines in water samples, *J. Chromatogr. A* 1131 (2006) 45–50.
- [98] M. Saraji, M. Bakhshi, Determination of phenols in water samples by single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and gas chromatography–mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 30–36.
- [99] L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, Directly suspended droplet microextraction, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 259–264.

- [100] P.S. Ayyaswamy, S.S. Sadhal, L.J. Huang, Effect of internal circulation on the transport to a moving drop, *Int. Commun. Heat. Mass.* 17 (1990) 689–702.
- [101] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
- [102] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 1–9.
- [103] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 1–15.
- [104] L.L. Schramm, *Emulsions, foams, and suspensions. Fundamentals and applications*, Willey-VCH, Weinheim, Germany (2005).
- [105] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342–2357.
- [106] B. Takahiko, K. Fumio, N. Susumu, T. Katsuroku, Study of drop coalescence behaviour for liquid–liquid extraction operation, *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 5385–5391.
- [107] J.F. Liu, J.A. Jonsson, G.B. Jiang, Application of ionic liquids in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20–27.
- [108] M. Baghdadi, F. Shemirani, Cold-induced aggregation microextraction: a novel sample preparation technique based on ionic liquids, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 56–63.

- [109] V. Andruch, I.S. Balogh, L. Kocúrová, J. Sandrejová, Five years of dispersive liquid–liquid microextraction, *Applied Spectrosc. Rev.* 48 (2013) 161–259.
- [110] V. Andruch, L. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Škrliková, Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques, *Microchem. J.* 102 (2012) 1–10.
- [111] M.A. Farajzadeh, S.E. Seyedi, M.S. Shalamzari, M. Bamorowat, Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvent lighter than water, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3191–3200.
- [112] V. Andruch, C.C. Acebal, J. Škrliková, H. Sklenárová, P. Solich, I.S. Balogh, F. Billes, L. Kocúrová, Automated on-line dispersive liquid–liquid microextraction based on a sequential injection system, *Microchem. J.* 100 (2012) 77–82.
- [113] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid–liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, *Talanta* 80 (2010) 2057–2062.
- [114] J.A. Pérez-Serradilla, F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6767–6774.
- [115] J. Regueiro, M. Llompарт, C. García-Jares, J.C. García-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27–38.
- [116] M.D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Analytical applications of ultrasound*, Elsevier, Amsterdam (2006).
- [117] R.W. Wood, A.L. Loomis, The physical and biological effects and discussed for the first time, *Phil. Mag.* 4 (1927) 417–436.

- [118] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Ultrasound: a powerful tool for leaching, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41–47.
- [119] P.C. Aleixo, D.S. Junior, A.C. Tomazelli, I.A. Rufino, H. Berndt, F.J. Drug, Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 329–337.
- [120] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, M. Rezaee, M. Ghambarian, Ultrasound-assisted emulsification microextraction method based on applying low density organic solvents followed by gas chromatography analysis for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6673–6679.
- [121] T.J. Mason, J.P. Lorimer, *Applied sonochemistry: Uses of power ultrasound in chemistry and processing*, Wiley VCH Verlag GmbH, Weinheim (2002).
- [122] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3–54.
- [123] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, Comprehensive profiling of drugs of abuse in biological fluids by stir-bar sorptive extraction-thermal desorption capillary gas chromatography-mass spectrometry, *LC–GC Eur.* 16 (2003) 410–417.
- [124] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, Sorptive sample preparation-a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3–22.
- [125] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [126] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction: Theory and practice*, Wiley, New York (1997).
- [127] S.A.S. Wercinski, *Solid phase microextraction: a practical guide*, Marcel Dekker, New York (1999).

- [128] J. Pawliszyn, Applications of solid phase microextraction, RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1999).
- [129] H. Lord, J. Pawliszyn, Microextraction of drugs, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 17–63.
- [130] Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, Y. Morishima, Y. Kiso, K. Jinno, Miniaturized solid-phase extraction as a sample preparation technique for the determination of phthalates in water, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 81–86.
- [131] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, Applications of solid-phase microextraction in food analysis, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35–62.
- [132] Supelco, Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions, Supelco Bulletin 923, Bellefonte, PA (2005).
- [132] L. Pillonel, J.O. Bosset, R. Tabacchi, Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review, *Lebens.-Wissen. Technol.* 35 (2002) 1–14.
- [133] W. Wardencki, M. Michulec, J. Curylo, A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis, *Int. J. Food Sci. Technol.* 39 (2004) 703–717.
- [134] Z.Y. Zhang, J. Poerschmann, J. Pawliszyn, Direct solid phase microextraction of complex aqueous samples with hollow fibre membrane protection, *Anal. Commun.* 33 (1996) 219–221.
- [135] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737–747.
- [136] B. Tienpont, F. David, A. Stopforth, P. Sandra, Comprehensive profiling of drugs of abuse in biological fluids by stir-bar sorptive extraction-thermal

- desorption capillary gas chromatography-mass spectrometry, *LC-GC Eur.* 16 (2003) 5–13.
- [137] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, Dual-phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 9–16.
- [138] H.A. Soini, K.E. Bruce, D. Wiesler, F. David, P. Sandra, M.V. Novotny, Stir bar sorptive extraction: a new quantitative and comprehensive sampling technique for determination of chemical signal profiles from biological media, *J. Chem. Ecol.* 31 (2005) 377–392.
- [139] M. Valcárcel Cases, *Las nanoestructuras de carbono en la nanociencia y nanotecnología analíticas*, Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Madrid (2010).
- [140] G.J. Nusz, S.M. Marinakos, A.C. Curry, Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod, *Anal. Chem.* 80 (2008) 984–989.
- [141] B. Suarez, B.M. Simonet, S. Cardenas, M. Valcárcel, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 203–207.
- [142] B. Suarez, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Separation of carbon nanotubes in aqueous medium by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1128 (2006) 282–289.
- [143] R. Ellen, H. Goldman, T. Uyeda, A. Hayhurst, H. Mattoussi, Luminescent biocompatible quantum dots: a tool for immunosorbent assay design, *Meth. Molec. Bio.* 374 (2007) 207–227.

- [144] B. Suarez, B. Santos, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Solid-phase extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the determination of tetracyclines residues in surface water by using carbon nanotubes as sorbent material, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 127–132.
- [145] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34–43.
- [146] M. Trojanowicz, Analytical applications of carbon nanotubes: a review, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 480–489.
- [147] J.S. Lee, M.S. Han, C.A. Mirkin, Colorimetric detection of mercuric ion (Hg^{2+}) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles, *Angew. Chem. (Int. Ed.)* 46 (2007) 4093–4096.
- [148] J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *Trends. Anal. Chem.* 25 (2006) 207–218.
- [149] C.Y. Zhang, H.C. Yeh, M.T. Kuroki, T.H. Wang, Single-quantum-dots-based DNA nanosensors, *Nat. Mater.* 4 (2005) 826–831.
- [150] A.M. Smith, S. Nie, Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots, *Analyst* 129 (2004) 672–677.
- [151] F. Cataldo, The impact of a fullerene-like concept in carbon black science, *Carbon* 40 (2002) 157–162.
- [152] R.B. Heimann, S.E. Evsyukov, Y. Koga, Carbon allotropes: a suggested classification scheme based on valence orbital hybridization, *Carbon* 35 (1997) 1654–1658.
- [153] A.S. Rettenbacher, M.W. Perpail, L. Echegoyen, J. Hudson, D.W. Smith, Radical addition of a conjugated polymer to multi-layer fullerenes (carbon nano-onions), *Chem. Mater.* 19 (2007) 1411–1417.

- [154] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56–58.
- [155] J.L. Delgado, M.A. Herranz, N. Martín, Nanoestructuras de carbono: Un nuevo desafío científico. *An. Quim.* 103 (2007) 5–13.
- [156] J.M. Jiménez Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Evaluation of carbon as sorbent material for solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5626–5633.
- [157] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Role of carbon nanotubes in analytical science, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4788–4797.
- [158] A. Merkoci, Carbon nanotubes in analytical sciences, *Microchim. Acta* 152 (2006) 157–174.
- [159] H. Dai, Carbon nanotubes: opportunities and challenges, *Surf. Sci.* 500 (2002) 218–241.
- [160] J. Riu, A. Maroto, F.X. Rius, Nanosensors in environmental analysis, *Talanta* 69 (2006) 288–301.
- [161] O.K. Varghese, P.D. Kichambre, D. Gong, K.G. Ong, E.C. Dickey, C.A. Grimes, Gas sensing characteristics of multi-wall carbon nanotubes, *Sens. Actuators B* 81 (2001) 32–41.
- [162] C. Carrillo-Carrión, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Surfactant coated nanotubes as pseudophases in liquid-liquid extraction, *Analyst* 132 (2007) 551–559.
- [163] C. Carrillo-Carrión, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Liquid-liquid extraction/headspace/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene, (o-, m-, p-)xylene and styrene in olive oil using surfactant-coated carbon nanotubes as extractant, *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 1–7.

- [164] X. Wang, Q. Li, J. Xie, Z. Jin, J. Wang, Y. Li, K. Jiang, S. Fan, Fabrication of ultralong and electrically uniform single-walled carbon nanotubes on clean substrates, *Nano Letters* 9 (2009) 3137–3141.
- [165] S. López-Feria, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Surfactant-coated carbon nanotubes for the liquid-liquid extraction of phthalates and other migrants in virgin olive oils, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 737–746.
- [166] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, B. Suárez, Present and future applications of carbon nanotubes to analytical science, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1783–1790.
- [167] R.Q. Long, R.T. Yang, Carbon nanotubes as superior sorbent for dioxin removal, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 2058–2059.
- [168] Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou. Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol and 4-tert-octylphenol, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2517–2521.
- [169] G.Z. Fang, J.X. He, S. Wang, Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 12–17.
- [170] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, G. Liu, Q. Shi, J. Wang, Determination of atrazine and sinazine in environmental water samples using multiwalled carbon nanotubes as the adsorbents for preconcentration prior to HPLC with diode array detector, *Talanta* 68 (2006) 1309–1315.
- [171] Q. Zhou, Y. Ding, J. Xiao, Simultaneous determination of cyanazine, chlorotoluron and chlorbenzuron in environmental water samples with SPE multiwalled carbon nanotubes and LC, *Chromatographia* 65 (2007) 25–30.

- [172] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, Comparison of multiwalled carbon nanotubes and a conventional absorbent on the enrichment of sulfonylurea herbicides in water samples, *Anal. Sci.* 23 (2007) 189–192.
- [173] H. Zhao, L. Wang, Y. Qiu, Z. Zhou, W. Zhong, X. Li, Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of three barbiturates in pork by ion trap gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC/MS/MS) following microwave assisted derivatization, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 399–406.
- [174] Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang, Using multiwalled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent to determine dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace level in water samples by high performance liquid chromatography with UV detection, *J. Chromatogr. A* 1125 (2006) 152–158.
- [175] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Combined use of carbon nanotubes and ionic liquid to improve the determination of antidepressants in urine samples by liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1139–1145.
- [176] Z. Du, Y. Yu, J. Wang, Selective isolation of acidic proteins with a thin layer of MWCNTs functionalized with polydiallyldimethylammonium chloride, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 937–946.
- [177] L.M. Ravelo-Pérez, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, Carbon nanotubes: solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2618–2641.
- [178] W.M.A. Niessen, Hyphenated techniques, Applications of in mass spectrometry, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 843–849 (2004).

- [179] H.O. Brotherton, R.A. Yost, Rapid screening and confirmation for drugs and metabolites in racing animals by tandem mass spectrometry, *Am. J. Veter. Res.* 45 (1984) 2436–2440.
- [180] F.G. Kitson, B.S. Larsen, C.N. McEwen, *Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide*, London, Academic Press (1996).
- [181] W.M.A. Niessen, *Liquid chromatography–Mass spectrometry*, 2nd edn., New York, Marcel Dekker (1998).
- [182] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Fundamentos de química analítica*, 8ª Ed., Thomson (2005).
- [183] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part I, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 1.
- [184] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part II, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 1.
- [185] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part III, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 1.
- [186] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part IV, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [187] G.W. Somesen, W.M.A. Niessen, Mass spectrometry: innovation and application. Part V, Capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 1.
- [188] M. Holčapek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VI, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3907.
- [189] M. Holčapek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VII, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 1-2.

- [190] M. Careri, F. Bianchi, C. Corradini, Recent advances in the application of mass spectrometry in food-related analysis, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 3–64.
- [191] C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography-mass spectrometry, in Y. Picó (Ed.), *Food toxicants analysis*, Elsevier (2007).
- [192] Y. Picó, G. Font, J.C. Moltó, J. Mañes, Pesticide residue determination in fruit and vegetables by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 153–173.
- [193] E.T. Furlong, I. Ferrer, P.M. Gates, J.D. Cahill, E.M. Thurman, in I. Ferrer, E.M. Thurman (Eds.), *Liquid chromatography/mass spectrometry, MS/MS and time of flight MS: Analysis of emerging contaminants*, American Chemical Society, Washington DC, p. 175 (2003).
- [194] A.C. Hogenboom, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, The role of column liquid chromatography–mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 331–354.
- [195] W.M.A. Niessen, Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 413–436.
- [196] W.M.A. Niessen, in: *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*, 2nd ed, Chromatographic Science Series, Vol. 79, Marcel Dekker, New York (1999).
- [197] L.H. Levine, J.L. Garland, J.V. Johnson, HPLC/ESI-Quadrupole ion trap mass spectrometry for characterization and direct quantification of amphoteric and nonionic surfactants in aqueous samples, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2064–2071.
- [198] E.M. Thurman, I. Ferrer, D. Barceló, Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5441–5449.

- [199] M. Farré, L. Kantiani, M. Petrovic, S. Pérez, D. Barceló, Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 86–99.
- [200] R.B. Cole (Ed.), *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*, Wiley Interscience, New York (1997).
- [201] B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross, *Applied electrospray mass spectrometry*, Marcel Dekker, New York (2002).
- [202] J. Hajslova, J. Zrostlikova, Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 181–197.
- [203] A.K. Malik, C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4018–4040.
- [204] S.J. Lehotay, K. Mastovska, A. Amirav, A.B. Fialkov, P.A. Martos, A.D. Kok, A.R. Fernández-Alba, Identification and confirmation of chemical residues in food by chromatography-mass spectrometry and other techniques, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1070–1090.
- [205] J.L.C.M. Dorne, J.L.C.M. Dorne, L.R. Bordajandi, B. Amzal, P. Ferrari, P. Verger, Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 695–707.
- [206] R. Zeleny, F. Ulberth, P. Gowik, J. Polzer, L.A. van Ginkel, H. Emons, Developing new reference materials for effective veterinary drug-residue testing in food-producing animals, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 927–936.

- [207] J.E. Hobbs, A. Fearn, J. Spriggs, Incentive structures for food safety and quality assurance: an international comparison, *Food Control* 13 (2002) 77–81.
- [208] O. Nuñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, LC–MS/MS analysis of organic toxics in food, *TrAC – Trends Anal. Chem.* 24 (2007) 683–703.
- [209] Y. Picó, G. Font, M.J. Ruiz, M. Fernández, Control of pesticide residues by liquid chromatography-mass spectrometry to ensure food safety, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 917–960.
- [210] Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun.* L 221 (2002) 8.
- [211] W.G. Lan, M.K. Wong, N. Chen, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 1. Two-level design and its application in microwave dissolution of biological samples, *Analyst* 119 (1994) 1659–1667.
- [212] W.G. Lan, M.K. Wong, N. Chen, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 2. Four-level design and its application in microwave dissolution of biological samples, *Analyst* 119 (1994) 1669–1675.
- [213] W.G. Lan, M.K. Wong, K.K. Chee, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 3. Five-level design and its application in a polarographic reaction system for selenium determination, *Analyst* 120 (1995) 273–279.
- [214] W.G. Lan, K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 4. Mixed-level design and its application to the high-performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Analyst* 120 (1995) 281–287.

- [215] J. Wu, H.K. Lee, Orthogonal array designs for the optimization of liquid–liquid–liquid microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 182–190.
- [216] R.K. Roy, *A primer on Taguchi method*, Van Nostrand Reinhold, New York (1990).
- [217] D.C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, Wiley, New York (1997).
- [218] G. Taguchi, *System of experimental designs*, vols. 1–2, Kraus, New York (1987).
- [219] P.J. Ross, *Taguchi techniques for quality engineering*, McGraw-Hill, New York (1988).



CAPÍTULO I

LOS NANOTUBOS DE CARBONO MULTIPARED
COMO ADSORBENTES EN EXTRACCIÓN EN FASE
SÓLIDA PARA LA ESPECIACIÓN DE
COBALAMINAS EN ALIMENTOS MARINOS POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA

En general, las vitaminas hidrosolubles consisten en derivados o derivados sustituidos de azúcares (vitamina C), piridina (niacina, vitamina B₆), purinas y pirimidinas (vitamina B₂, vitamina B₁), complejos aminoácidos-ácidos orgánicos (ácido fólico, biotina, ácido pantoténico) y un complejo porfirina-nucleótido (vitamina B₁₂).

El uso de LC ha tenido un impacto definitivo en el análisis de vitaminas hidrosolubles, especialmente para algunas como B₁, B₂ y C, siendo aplicada rutinariamente en un gran número de laboratorios. Debido a la existencia de diferentes vitámeros, las vitaminas del grupo B presentan un problema de análisis más complejo. Son determinadas frecuentemente utilizando los métodos microbiológicos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) que, dependiendo del procedimiento de preparación de la muestra, pueden o no medir las diferentes formas de vitaminas existentes. Los métodos químicos también presentan la limitación anterior. LC ofrece ventajas importantes en el análisis de vitaminas, siendo la técnica de fase reversa con formación de pares iónicos la más utilizada para la determinación de las vitaminas del grupo B. También se ha empleado la técnica de fase reversa sin formación de pares iónicos con problemas de baja reproducibilidad en los tiempos de retención de algunas vitaminas.

La vitamina B₁₂, que tiene una estructura muy compleja, es un nutriente esencial para las células. Las cobalaminas son corrinoideas con un núcleo formado por cuatro anillos pirrolidina y un átomo de cobalto coordinado con cuatro átomos de nitrógeno. La quinta posición de coordinación está ocupada por una estructura de tipo nucleótido, mientras que la sexta posición puede estar ocupada por un número de diferentes grupos funcionales. En su forma aislada más común, la vitamina contiene un grupo ciano, siendo ésta conocida como cianocobalamina, también existe como forma natural la que contiene un grupo hidroxilo (hidroxicobalamina). En su estado funcional, cuando es el grupo prostético de un

número de enzimas, puede tener un grupo metilo (metilcobalamina) o un residuo 5'-desoxiadenosil (5'-desoxiadenosil-cobalamina) en la sexta posición. La Figura I.1 muestra las estructuras de las diferentes formas de vitamina B₁₂.

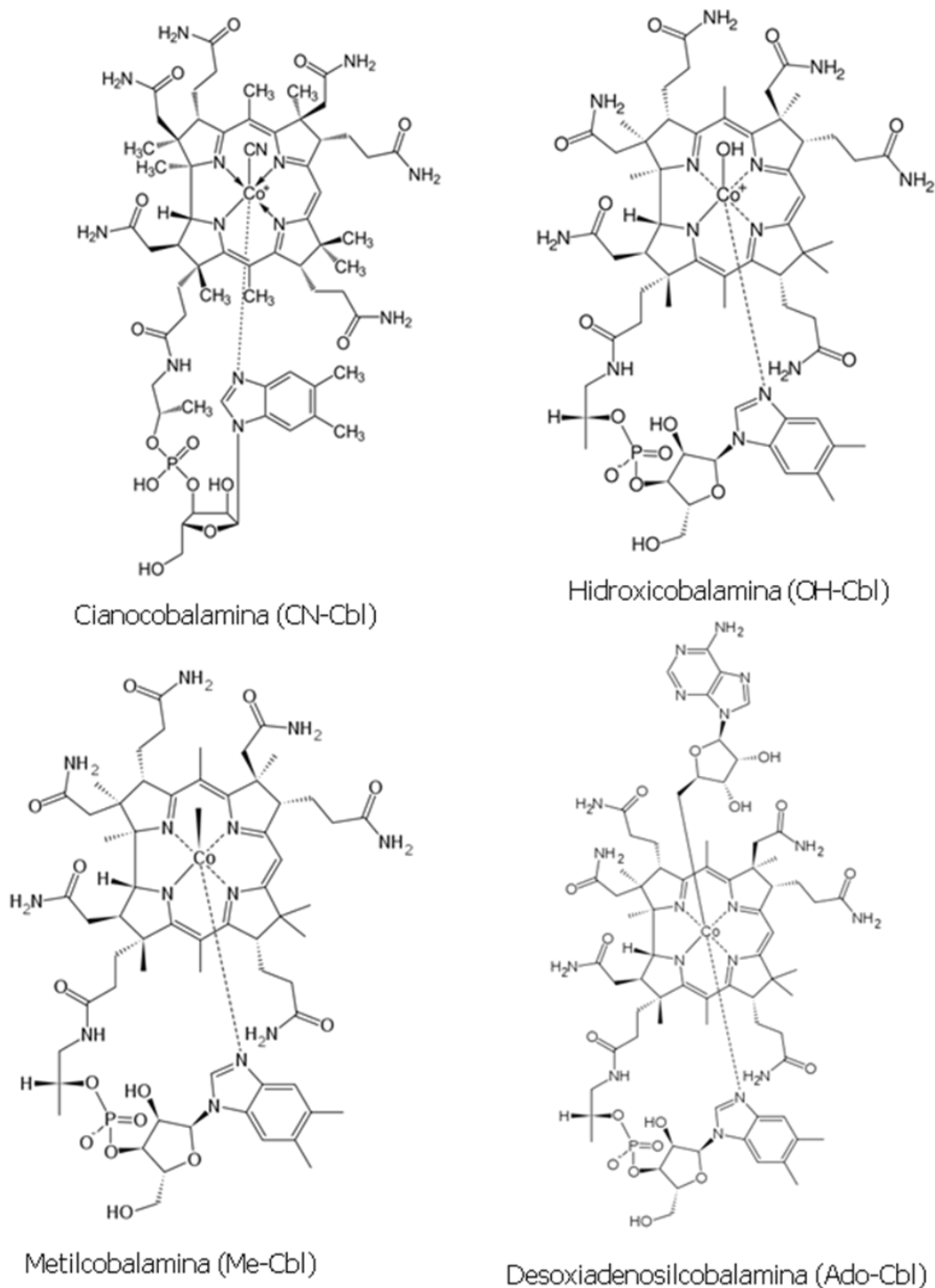


Figura I.1. Distintas formas de la vitamina B₁₂

En este Primer Capítulo de la Tesis Doctoral, se aborda la separación cromatográfica de cuatro cobalaminas naturales o coenzimas, cianocobalamina (vitamina B₁₂, CN-Cbl), hidroxicobalamina (vitamina B_{12a}, OH-Cbl), 5'-desoxiadenosilcobalamina (coenzima B₁₂, Ado-Cbl) y metilcobalamina (Me-Cbl), que difieren en la estructura de su ligando axial superior, utilizando un detector DAD.

Todas las cobalaminas exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible y los correspondientes espectros se muestran en la Figura I.2.

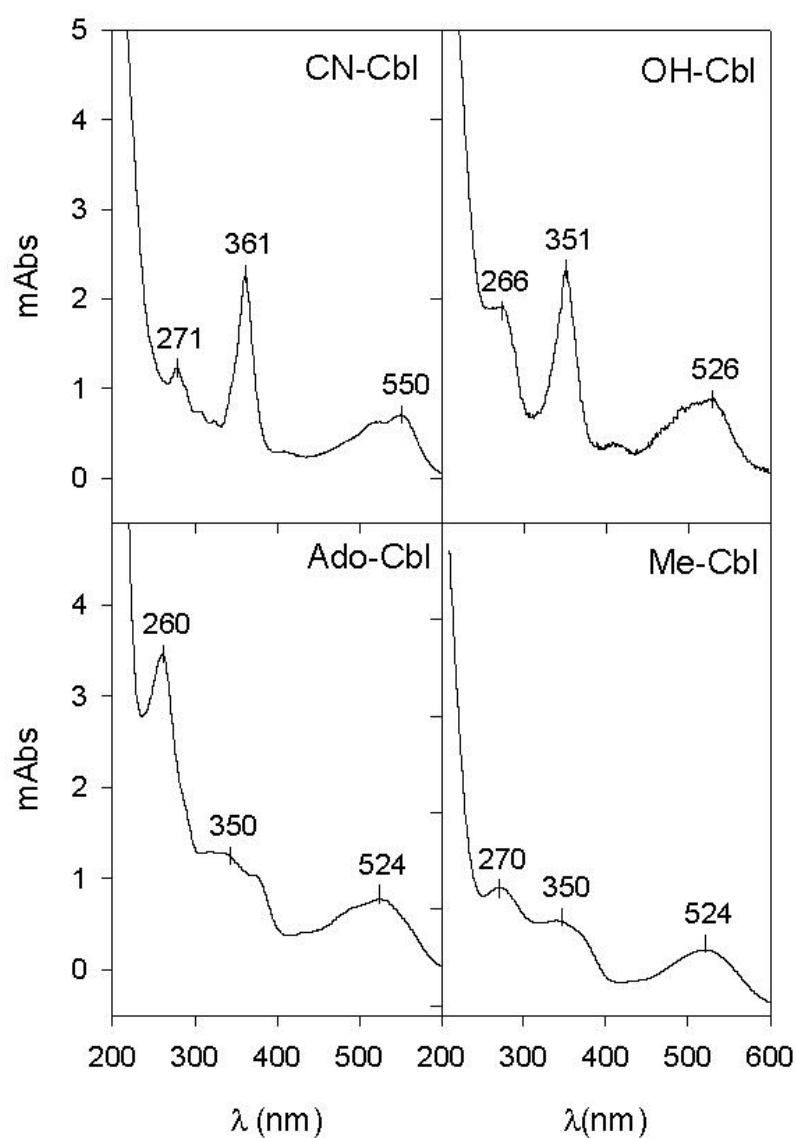


Figura I.2. Espectros de absorción UV-visible de las cobalaminas

La Tabla I.1 resume los máximos de absorción UV–visible para los distintos compuestos.

Tabla I.1. Máximos de absorción UV-visible de las cobalaminas

Compuesto	Longitud de onda máxima, nm*
CN–Cbl	361, 271, 550
OH–Cbl	351, 266, 526
Ado–Cbl	260, 350, 524
Me–Cbl	270, 350, 524

*En orden decreciente de absortividad molar

La preconcentración es una etapa importante en el proceso analítico para las determinaciones a nivel de trazas y se han desarrollado una variedad de técnicas de pretratamiento de las muestras. Los procedimientos de extracción en fase sólida resultan una herramienta eficiente usando un gran número de materiales.

El uso de nanopartículas con diferentes formas tales como esferas, nanotubos, nanocebollas y nanocuernos construidas de diferentes materiales es una de las técnicas más prometedoras en química analítica [1–2]. El uso de adsorbentes basados en carbono en la etapa de tratamiento de la muestra incluyendo nanodiamantes, fullerenos C60, nanocebollas, nanotubos de carbono, nanocuernos de carbono, nanofibras de carbono, anillos de nanotubos y nanotúbulos se ha hecho muy popular en las décadas recientes, como han revisado Valcárcel y col. [3–7].

Los nanotubos de carbono (CNTs) incluyen láminas de grafeno de pared sencilla y capas multi–pared [3] cuya superficie interacciona con los anillos benceno de los compuestos aromáticos. Debido a sus características ventajosas —

alta capacidad de adsorción, buena estabilidad térmica y amplio rango de pH de aplicación—los CNTs proporcionan una superficie activa para la adsorción/desorción de moléculas orgánicas y se han propuesto para la preconcentración y prepurificación de una gran variedad de analitos en SPE [8].

El término vitamina B₁₂ se usa para describir un grupo de compuestos cobalamina, que son nutrientes esenciales para las células y exhiben actividad contra la anemia perniciosa [9]. Las cobalaminas existen en los alimentos en sus formas libres, así como enlazadas a proteínas, y los niveles típicos varían de 3 a 250 ng g⁻¹ [10]. La deficiencia en vitamina B₁₂ se puede contrarrestar con una dieta balanceada. Los principales alimentos que contienen la vitamina son de origen animal como carne y productos lácteos, mientras que los vegetales contienen vitaminas en cantidades muy reducidas. Entre los alimentos marinos, son ricos en vitamina B₁₂ el salmón, sardina, atún y los moluscos. Las cantidades de esta vitamina en moluscos es tan alta que es comparable a la de vacuno; las almejas y otros moluscos están entre los alimentos con niveles más altos. La retención del cobalto de la dieta depende de su forma química. La acumulación del complejo Co–cobalamina con preferencia sobre las especies de cobalto inorgánico podrían explicar las concentraciones medidas en los organismos marinos. Así, es muy interesante la especiación química para explicar la acumulación de cobalto y la biodisponibilidad en organismos marinos [11].

Se han utilizado los métodos LC para la determinación de cianocobalamina en presencia de otras vitaminas hidrosolubles [9]. Sin embargo, son escasos los procedimientos para la especiación de las diferentes cobalaminas. Se ha llevado a cabo la detección usando espectrofotometría [12–19], fluorescencia [20], AAS [21, 22], ICP–MS [10, 23–28], MS [29, 30], y análisis radiométrico [31–34].

En este Primer Capítulo de la Tesis, se lleva a cabo la preconcentración usando un procedimiento SPE miniaturizado basado en un dispositivo de flujo continuo con una mini–columna rellena con CNTs para la retención cuantitativa de cuatro cobalaminas naturales o coenzimas: CN–Cbl, OH–Cbl, Ado–Cbl y Me–Cbl.

Una vez retenidas, las especies fueron eluidas con un pequeño volumen de un disolvente apropiado antes del análisis por LC en fase reversa con detector de diodos y usando una fase estacionaria con un ligando basado en grupos amida y el encapsulante de trimetilsililo, que proporciona buenos resultados para la especiación de las cobalaminas sin tener que recurrir a la técnica de pares iónicos.

La preconcentración en los MWCNTs se basa en la retención de los analitos introduciendo la muestra en línea en el sistema de mini-columna. Se ha usado dimetilsulfóxido para eluir las vitaminas retenidas para el análisis por LC. Se han optimizado las condiciones experimentales del dispositivo de flujo continuo, que afecta al procedimiento de enriquecimiento, tales como el tipo y cantidad de nanotubos, el volumen, pH y velocidad de flujo de la disolución de la muestra, y el eluyente y su volumen.

Para la detección, se usó un dispositivo de diodos y se obtuvo buena resolución con una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo-disolución reguladora fosfatada y mediante elución por gradiente. Se demostró la especificidad utilizando las características de retención y los espectros UV y comparando el índice de pureza de los picos con disoluciones de los estándares comerciales. Se obtuvieron valores satisfactorios para la linealidad, precisión, recuperación y sensibilidad. Los límites de detección variaron de 0,35 a 30 ng mL⁻¹.

El método se aplicó satisfactoriamente a la determinación de las cobalaminas en alimentos marinos. La extracción de la muestra se llevó a cabo con una disolución reguladora usando una sonda ultrasónica. La validez del procedimiento se evaluó analizando un material de referencia certificado.

La elección de la fase estacionaria en LC es una cuestión muy compleja y depende de diversos factores, como las características y la complejidad de la muestra, así como del tipo de separación elegido. La cromatografía en fase reversa utiliza fases enlazadas hidrofóbicas. Los rellenos de fase enlazada más

normalmente usados son: octilsililo ($-\text{Si}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_3$) y octadecilsililo ($-\text{Si}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{16}-\text{CH}_3$). De todos ellos, probablemente el más corriente en la actualidad es el que utiliza grupos octadecilsililo, llamado fase ODS. Normalmente, las cadenas cortas (C-8) ofrecen una mejor selectividad frente a compuestos moderadamente polares; en tanto que la fase ODS (C-18) proporciona una mayor retención.

Las muestras iónicas, especialmente compuestos básicos como son las vitaminas hidrosolubles que estamos estudiando, pueden interactuar con los grupos silanol de las columnas basadas en sílice. Esto puede llevar a un aumento de la retención, ensanchamiento de las bandas e irreproducibilidad entre columnas. Generalmente es deseable minimizar estas interacciones silanol eligiendo de forma adecuada las condiciones experimentales.

Las interacciones silanol se pueden reducir seleccionando una columna diseñada para muestras básicas. Los grupos silanol libres (no enlazados a puentes de hidrógeno) generalmente están presentes en concentraciones bajas. Sin embargo, como ya se ha indicado, estos silanoles libres pueden provocar un efecto negativo en la retención de solutos básicos debido a su naturaleza muy ácida. Los empaquetamientos de sílice con la mayor concentración de grupos silanol germinales o asociados favorecen considerablemente la cromatografía de compuestos básicos. Los empaquetamientos de fase reversa basados en sílice se fabrican mediante enlace covalente del organosilano o depositando una capa orgánica polimérica sobre la superficie del soporte. La mayoría son empaquetamientos en los que reaccionan los organosilanos superficiales.

Muchos fabricantes han intentado que la superficie de sílice reaccione completamente con el silano. Sin embargo, debido al impedimento estérico de los ligandos de fase enlazada, todos los grupos silanol de la superficie no pueden reaccionar. Cuando la longitud de la cadena del silano aumenta, el porcentaje de grupos silanol que reaccionan disminuye. Incluso con el silano más pequeño (trimetil o C_1), casi el 50% de los grupos silanol permanecen sin reaccionar sobre la superficie. Estos grupos están localizados bajo una "sombra" de ligandos silano

orgánicos pero todavía son capaces de ejercer una atracción electrostática con solutos apropiados.

Algunos fabricantes de columnas con fases enlazadas de sílice (C_8 o C_{18}) usan un proceso llamado "endcapping" o encapsulado para conseguir la reacción total de la superficie del soporte de sílice. El encapsulado consiste en la reacción subsiguiente del empaquetamiento enlazado con un pequeño silano tal como trimetilclorosilano o dimetildiclorosilano. Esto aumenta el recubrimiento del soporte por reacción de algunos grupos silanol residuales para minimizar las interacciones no deseadas con los solutos. Sin embargo, el encapsulado no puede evitar completamente las desventajas del soporte de sílice ácido.

Las vitaminas del grupo B presentan características básicas y, por tanto, originaban picos muy ensanchados cuando se empleó una columna C_{18} con los grupos silanol libres. En consecuencia, se seleccionó un empaquetamiento de columna diseñado para la separación de compuestos básicos. Este relleno (RP-Amida C_{16}) presenta un ligando con grupos amida y un encapsulante de trimetilsililo. Así pues, sus características serían:

Ligando: $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_3\text{NHCO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

Encapsulante: $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$

En estas condiciones los grupos silano residuales están minimizados y debe ser posible la separación de las vitaminas sin que los analitos sufran interacciones no deseadas con ellos.

En consecuencia, para la separación de las vitaminas hidrosolubles que constituyen los tres primeros capítulos de esta Tesis, hemos seleccionado como fase estacionaria un relleno de RP-Amida C_{16} de $5\ \mu\text{m}$ que presenta un ligando con grupos amida y un encapsulante de trimetilsililo. La columna utilizada es de acero inoxidable y sus dimensiones son 15 cm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la vitamina B₁₂, que han sido publicados en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for the speciation of cobalamins in seafoods by liquid chromatography

Analytical and Bioanalytical Chemistry 401 (2011) 1393–1399

DOI 10.1007/s00216-011-5158-1

Published in the special issue Euroanalysis XVI (The European Conference on Analytical Chemistry) with guest editor Slavica Ražić. Belgrade (Serbia), 11-15 Septiembre 2011.

La dirección url para esta publicación es:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00216-011-5158-1>

ABSTRACT

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) were evaluated as potential adsorbents for miniaturized solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. The adsorption capacity of this sorbent was applied to assess the speciation of four cobalamins representing the various forms of vitamin B₁₂. The preconcentration on the MWCNTs was based on the retention of analytes by introducing the sample on-line into the minicolumn system. Dimethylsulfoxide was used to elute the retained vitamins for liquid chromatographic analysis. The experimental conditions of the continuous flow device which affect the enrichment procedure, such as the type and amount of nanotubes, the volume, pH and flow-rate of the sample solution, and the eluent and its volume were optimized. For detection purposes a diode-array device was used and good resolution was obtained with a mobile phase acetonitrile-phosphate buffer and gradient elution. Specificity was demonstrated by the retention characteristics and UV spectra, and by comparing the peak purity index with commercial standards. Linearity, precision, recovery and sensitivity were satisfactory. Detection limits ranged from 0.35 to 30 ng mL⁻¹. The method was successfully applied to the determination of cobalamins in seafoods, which were extracted from the sample with a buffer solution using an ultrasonic probe. The reliability of the procedure was checked by analyzing a certified reference material.

Keywords: Multi-walled carbon nanotubes • Solid-phase extraction • Liquid chromatography • Speciation • Cobalamins • Seafoods

INTRODUCTION

Preconcentration is an important step in the analytical process for trace level determination, and a variety of sample pretreatment techniques have been developed. Solid phase extraction (SPE) procedures have provided an efficient tool using a large number of materials. The use of nanoparticles (NPs) with various shapes such as spheres, nanotubes, nanohorns and nanocages made of different

materials is among the most promising techniques for application in analytical chemistry [1-2]. The use of carbon-based adsorbents in the sample treatment step including nanodiamonds, fullerene C₆₀, nano-onions, carbon nanotubes, carbon nanohorns, carbon nanofibers, nanotube rings and nanotubules has become popular during recent decades, as reviewed by Valcárcel et al. [3-7]. Carbon nanotubes (CNTs) include single-walled (SWNT) and multi-walled (MWNT) layers of graphene sheets [3] whose surface interacts with the benzene ring of aromatic compounds. Because of their advantageous characteristics – high adsorption capacity, good thermal stability and wide pH range of application - CNTs provide an active surface for the adsorption/desorption of organic molecules and have been proposed for preconcentration and prepurification of a wide variety of analytes in SPE [8].

The term vitamin B₁₂ is used to describe compounds of the cobalamin group, which are essential nutrients for cells and exhibit anti-pernicious anaemic activity. The complex structure includes a corrin nucleus formed of four merged pyrrolidine rings and a cobalt atom coordinated with four nitrogen atoms. The fifth co-ordination position is occupied by a nucleotide-like structure, while the sixth position may be occupied by a number of different groups. In its normally isolated form, the vitamin contains a cyano group, hence the name cyanocobalamin (vitamin B₁₂, CN-Cbl), although hydroxocobalamin also exists as a natural form (vitamin B_{12a}, OH-Cbl). In its functional state, when it is the prosthetic group of a number of enzymes, it may have a methyl group (methylcoenzyme B₁₂, Me-Cbl) or a 5'-deoxyadenosyl residue (5'-deoxyadenosylcobalamin or coenzyme B₁₂, Ado-Cbl) in the sixth position [9]. Cobalamins exist in foodstuffs in their free forms as well as bound to proteins and typical levels range from 3 to 250 ng g⁻¹ [10]. Vitamin B₁₂ deficiency may be counteracted by a balanced diet. The main foods containing vitamin B₁₂ of animal origin are meat and dairy products, while vegetables contain the vitamin in very reduced amounts. Among marine organisms, salmon, sardine, tuna and mollusc are rich in vitamin B₁₂. The amount of this vitamin in mollusc is so high that is comparable to beef, and clams and other molluscs are among the foods containing the highest levels. Retention of cobalt from the diet depends of its

chemical form. The accumulation of the Co-cobalamin complex in preference to inorganic cobalt species could explain the concentrations measured in marine organisms. Thus, chemical speciation could be of interest to explain cobalt accumulation and the bioavailability in marine organisms [11].

Liquid chromatographic (LC) methods have been used for the determination of cyanocobalamin in the presence of other soluble vitamins [9]. However, procedures for the speciation of the different cobalamins are scarcer. Detection has been carried out using spectrophotometry [12-19], fluorescence [20], atomic absorption spectrometry [21-22], inductively coupled plasma-mass spectrometry [10, 23-28], mass spectrometry [29-30] and radiometric analysis [31-34].

In the present study, preconcentration was achieved using a miniaturized SPE procedure based on a continuous flow device with a minicolumn filled with CNTs, for the quantitative retention of four natural cobalamins or coenzymes, CN-Cbl, OH-Cbl, Ado-Cbl and Me-Cbl. Once retained, the species were eluted with a small volume of a suitable solvent prior to analysis by reversed-phase LC with diode-array detection and using an amide-based stationary phase involving a ligand with amide groups and the endcapping of trimethylsilyl, which provided good results for cobalamin speciation without using the ion-pairing technique. The procedure has been applied to the determination of cobalamins in seafoods such as molluscs. The use of a certified reference material allowed the reliability of the procedure to be verified.

MATERIALS AND METHODS

INSTRUMENTATION

The LC system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature with a flow-rate of 1 mL min⁻¹. The solvents were degassed using an on-line membrane system (Agilent 1100, G1379A). The diode array and multiple wavelength detector was an Agilent 1100 (G1315C) operating at three wavelengths: 265 nm for Ado-Cbl and Me-Cbl,

351 nm for OH-Cbl, and 361 nm for CN-Cbl. The analytical column used for the reversed-phase technique was a Discovery RP-AmideC₁₆ (15 cm x 0.46 cm x 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Aliquots of 20 µL were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA).

For the preconcentration step, a Gilson Minipuls 3 peristaltic pump (Gilson, Villiers-Bel, France) was used to maintain the flow. The minicolumn was constructed using a 3 cm length x 0.4cm i.d. glass tube for low pressure flow. The ends were closed by inserting a section of the upper end of one micropipette tip, which was cut off and by means of a small amount of quartz wool. The minicolumn was filled by weighing and packing 13 mg of Nanocyl MWCNTs. To connect the micropipette tips of the minicolumn to the flow-injection system, silicone tubes were used. When food samples were treated, each SPE column was used only once.

To filter the samples, Econofilter 25 nylon filter (0.45 µm) (Agilent) was used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge and an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain) were used. The ultrasonic processor UP 200 H (Dr. Hielscher, Germany) was used to extract cobalamins from the samples.

REAGENTS

Acetonitrile (ACN) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was LC grade. Doubly distilled water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). The 10 mM potassium dihydrogenphosphate solution was prepared from the commercial product (Panreac, Barcelona, Spain). Other reagents were potassium hydroxide, phosphoric acid (Panreac) and dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma). Stock solutions (1000 µg mL⁻¹) of CN-Cbl, OH-Cbl, Ado-Cbl and Me-Cbl were prepared by dissolving 10 mg of the commercial products (Fluka, Madrid, Spain), without previous purification, in 10 mL of water. These were kept in dark bottles at 4°C and working standard solutions were prepared by dilution with the phosphate buffer on the same day of use.

MWCNTs with an average diameter of 9.5 nm and average length of 1.5 μm were produced by the catalytic chemical vapor deposition (CCVD) process and were supplied by Nanocyl (NC3100, Nanocyl, Belgium).

SAMPLES AND CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Several samples of mussels, clams and cockles, both fresh and canned, were obtained from local fishmongers and manufacturers. The whole animals were removed from their shells, washed and cut into small pieces. The reliability of the procedure was assessed using a reference material, pig's liver CRM 487, supplied by the Community Bureau of Reference, BCR (Belgium).

PROCEDURE

All operations were performed in subdued light. Aliquots (2 g) of the wet samples were weighed into polypropylene tubes and 5 mL of the 10 mM potassium dihydrogenphosphate buffer (pH 5) was added. The suspension was homogenized by using an ultrasonic processor for 1 min and centrifuged at 6000 rpm for 10 min. Then, the supernatant was diluted up to 10 mL in a calibrated flask using the buffer and filtered through a 0.45 μm nylon chromatographic filter. For the preconcentration step, a continuous flow system was used. The minicolumn was packed with 13 mg of nanotubes and conditioned by passing 30 mL of water and 30 mL of 10 mM phosphate buffer (pH 5) at a flow-rate of 1 mL min^{-1} . A volume of 10 mL of sample or standard aqueous solution was pumped through the column at a flow-rate of 1 mL min^{-1} to retain the analytes. Then, the column was inverted and cobalamins were eluted in the opposite direction by pumping 400 μL of DMSO through the bottom of the column at a flow-rate of 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. The first volume of 100 μL was discarded and the following 300 μL were collected for injection in the LC. To avoid cross contamination, the column was washed between samples or standards using 600 μL of DMSO and 3 mL of phosphate buffer at 1 mL min^{-1} .

Aliquots of 20 μL were injected into the chromatograph. Calibration was performed by the same procedure and the certified reference sample was analyzed in the same way.

RESULTS AND DISCUSSION

OPTIMIZATION OF THE CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The Discovery RP-AmideC₁₆ stationary phase is suitable for the separation of basic compounds because it prevents the interaction of vitamins with the silanol groups due to the endcapping of trimethylsilyl. This permits the residual silanol groups to react more strongly. Thus, the RP-AmideC₁₆ column was used to optimize cobalamins separation.

A mixture of ACN and a potassium dihydrogenphosphate buffer was selected as the mobile phase to avoid ionization of cobalamins. The flow-rate was 1 mL min⁻¹. The influence of the ACN proportion on the retention factors of cobalamins in the 0-30% v/v range was studied using 10 mM KH₂PO₄ (pH 5) as the aqueous phase. The organic solvent was necessary to elute all the cobalamins and a higher percentage was necessary for eluting both coenzymes. Furthermore, the addition of ACN also influenced the width of the peaks, which markedly decreased when the percentage of organic solvent increased. For concentrations of ACN higher than 15%, the analytes OH-Cbl and CN-Cbl eluted together and near the void time, overlapping with the matrix peak. Thus, a 15:85 v/v ACN:buffer mixture was selected to study the influence of pH using 10 mM potassium dihydrogenphosphate buffers at pH values ranging between 4 and 7. The best separation was obtained at pH 7, which also provided narrower peaks. When the influence of the potassium dihydrogenphosphate concentration at pH 7 was studied, no significant variations in retention were observed and a 10 mM concentration was chosen.

Cobalamins could not be separated using the isocratic mode since the optimal mobile phase for separating OH-Cbl and CN-Cbl using 10% v/v ACN, took

an excessively long time to elute Ado-Cbl, while Me-Cbl was not eluted at all. When 20% *v/v* ACN was used, Me-Cbl was eluted from the column but the rest of cobalamins eluted together at the void time. Consequently, a gradient elution technique was tried in an attempt to achieve good peak resolution and to shorten the total analysis time. Several gradients with different ranges and profiles were tried and the best results were obtained using the following program: separation started with an initial isocratic step using a mobile phase of 10 mM KH₂PO₄ (pH 7) – ACN (92:8, *v/v*) for 7 min followed by a linear gradient to 87:13 (*v/v*) buffer:ACN in 0.1 min, this mixture being held for 6 min. Then, a second linear gradient to 82:18 (*v/v*) buffer:ACN was run in 0.1 min, this mixture being held for 7 min. Finally, the initial conditions were re-established in 1 min and held for 15 min. The flow-rate was 1 mL min⁻¹. The chromatographic profile obtained using this gradient program is shown in Figure 1. The elution order and the retention characteristics were: 1, OH-Cbl (*t_R*=7.3 min; *k*=3.5); 2, CN-Cbl (*t_R*=11.4 min; *k*=6.0); 3, Ado-Cbl (*t_R*=12.9 min; *k*=7.0) and 4, Me-Cbl (*t_R*=20.1 min; *k*=11.4). Values for the separation factor were between 1.2 and 1.7, while resolution was in the 1.5-5.7 range. Thus, cobalamins were eluted as narrow and non-tailed peaks using the Discovery AmideC₁₆ column.

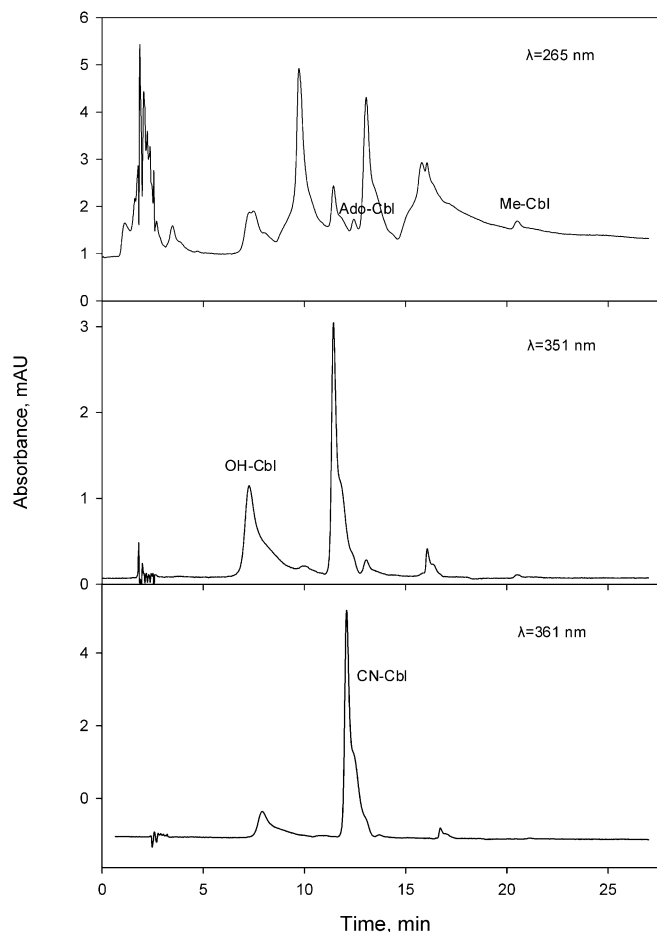


Fig. 1 Chromatographic profile using the amide-based column and the recommended elution program. Flow-rate, 1 mL min^{-1} ; injected sample (containing 200 ng mL^{-1} of each cobalamin), $20 \text{ }\mu\text{L}$.

OPTIMIZATION OF THE PRECONCENTRATION STEP WITH NANOTUBES

A continuous flow system was used for the preconcentration step. The minicolumn was prepared by weighing 13 mg of the MWCNTs which were conditioned by passing 30 mL of water followed by 30 mL of 10 mM KH_2PO_4 buffer (pH 5) at a flow-rate of 1 mL min^{-1} . This column was included in a flow manifold comprising a peristaltic pump and a valve for selecting the channels. This device permitted retention of the sample, elution of the analytes and also regeneration of the column. To avoid cross contamination between samples, the column was washed with 600 μL of DMSO and 3 mL of 10 mM KH_2PO_4 buffer (pH 5) at 1 mL min^{-1} .

The enrichment procedure might be influenced by several experimental conditions, such as the type of CNT, the volume, pH and flow-rate of the sample solution, and the eluent and its volume, all of which must be optimized. Different types of CNT, including SWCNT, MWCNT and fullerene C₆₀, were tested for packing a 3 cm long x 0.4 cm i.d. glass minicolumn and best results were obtained using MWCNTs. When using column dimensions of lower diameter, high pressure was produced. The amount of CNT packing was optimized to avoid the formation of aggregates, which would collapse the column. CNTs were suspended in ethanol and submitted to ultrasounds for 5 min to avoid the formation of aggregates. Then, the best performance was obtained using 13 mg.

The sample volume must be as large as possible in order to achieve a high enrichment factor. Different volumes between 5 and 20 mL of a sample which was spiked at a fixed concentration before homogenization were used and the recoveries of the four cobalamins were determined. The recoveries were steady in the range 10-20 mL, and lower when the volume was reduced. As a result, a sample volume of 10 mL was selected. Several acidic and basic media were assayed to achieve the quantitative retention of cobalamins in the column. A mixture of standard solutions was used to study the influence of pH in the 3-8 range. When the pH values were acidic or basic, retention of cobalamins decreased. Maximum retention was achieved at pH 5. Similar results were obtained when using the samples.

A study was carried out into the influence of the sample flow-rate on retention by passing a 10 mL sample at different flow values (0.5, 0.75, 1.0 and 1.5 mL min⁻¹) and using 500 µL of DMSO at 100 µL min⁻¹ as the elution solvent. The recoveries were slightly higher for the lower flow-rates. However, a compromise value of 1 mL min⁻¹ was selected to decrease the total analysis time.

The selection of the organic solvent used as eluent plays the most important role in the desorption efficiency. Consequently, four solvents (ethyl acetate, methylisobutylketone, tetrahydrofurane and dimethylsulphoxide) were compared, with an elution volume of 500 µL. The experimental results demonstrated that

DMSO gave higher elution efficiency than the other organic solvents for all four cobalamins.

Furthermore, the volume of DMSO may also affect the elution efficiency, so this was optimized in the 100-500 μL range to find the required volume which could quantitatively elute all the analytes retained in the MWCNT-packed column. For this experiment, a 10 mL sample solution spiked with the cobalamins was passed through the column. Then, different volumes of DMSO were flowed and collected for LC injection. The results concluded that the best efficiencies were obtained for OH- and CN-Cbl when using 300 μL , while higher volumes were necessary for the co-enzymes. To avoid sensitivity losses as a result of high volumes or increased pressure in the whole system, the retention and elution steps can be carried out in opposite directions [7]. Thus, a new experiment was made inverting the column after the adsorption of the analytes, elution being performed by passing the solvent through the bottom of the column in an opposite direction to that of retention. The experimental results showed that higher recoveries for the analytes were obtained by discarding the first 100 μL and collecting the following 300 μL for injection into the LC. This possibility, which permits the retention and elution to be carried out in different direction, was also applied by Suárez et al. [35]. The effect of elution flow-rates of between 20 and 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ was also studied and best results were obtained at a DMSO flow-rate of 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, as the eluent had sufficient time to penetrate the packed MWCNTs thus releasing the analytes.

The possibility of cross contamination between samples was studied by passing a sample solution through the column and eluting with 600 μL of DMSO. Then, a washing step was included by passing successive aliquots of 100 μL DMSO and injecting them. The experimental results showed that the signals for the analytes were appreciable until a total volume of 600 μL of organic solvent was used as washer. The solvent was passed at flow-rates of 0.5 and 1.0 mL min^{-1} and signals were very similar in both cases. Thus, a flow-rate of 1.0 mL min^{-1} was selected for the washing step to accelerate to whole analytical process.

The possible benefit of including, before desorption of cobalamins, a cleaning step by means of an inert gas to eliminate the matrix residues was also

studied. For this purpose a smooth flow of nitrogen was used for 5 and 10 min after passing the sample solution through the column. However, the signals decreased and, consequently, this step was discarded.

To summarize, it was possible to pass 10 mL of sample through the MWCNT column and to concentrate it into a 300 μL fraction, which implied a preconcentration factor close to 33.

CALIBRATION AND MATRIX EFFECT

Calibration graphs were performed by the external standard technique following linear regression analysis by plotting concentration (ng mL^{-1}) against peak area. Table 1 shows the equations obtained for the calibration graphs and the regression coefficients at the optimal wavelength for each compound. The precision of the method was demonstrated by repetitive analyses, calculating the average relative standard deviation (RSD) for ten replicate injections of the same sample at three levels in the entire working range, at low concentrations, middle and high. The detection limits were calculated on the basis of three times the standard deviation of the ordinate of the regression line for the standards. The values are also given in Table 1.

The presence of a matrix effect was studied by comparing the standard additions calibration graphs for different mollusc samples with the slopes of aqueous standards obtained in the same way by passing 10 mL of the solution through the column. A statistical study concluded that there were significant differences between the slopes at the 95 % confidence level so that calibration requires standard additions. The validation, including repeatability, linearity range and LOD evaluation was also checked for the matrix samples. The RSD values were similar to those for aqueous standards. However, LOD values and linearity ranges were lower and dependent on the different matrices.

Table 1 Calibration graphs for cobalamins

Cobalamin	λ (nm)	Intercept	Slope (mL ng ⁻¹)	Correlation coefficient	Linearity (ng mL ⁻¹)	DL (ngmL ⁻¹)	RSD (%)
OH-Cbl	351	-1.66±0.58	0.106±0.003	0.9995	50-1000	16	7.9 (50)
CN-Cbl	361	2.31±0.04	0.346±0.010	0.9997	1-1000	0.35	7.3 (2)
Ado-Cbl	265	-0.51±0.18	0.0312±0.002	0.9918	50-1000	17	12.4 (50)
Me-Cbl	265	-0.73±0.15	0.0157±0.001	0.9943	100-1000	29	13.8 (100)

Values into brackets indicate the concentration level in ng mL⁻¹

ANALYSIS OF MARINE FOODS AND A CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

An extraction step was assessed using a buffer solution to release cobalamins from the marine samples. All operations with samples and standards were carried out under subdued light. The efficiency of the extraction was evaluated by recovery studies using the standard addition technique and by analysis of a certified reference material. The recovery study was carried out by fortifying two samples (canned clam and mussel) at two concentration levels corresponding to approximately two and ten times the quantification limits. The recoveries varied from 76 to 102 % with an average recovery \pm S.D. (n=32) of 92 ± 6 .

The chromatographic procedure was applied to the determination of the cobalamins in different samples. The chromatographic peaks were identified by comparing the retention data obtained for the sample, the standards and the sample spiked with the standards under identical conditions and using the photodiode array detector to continuously measure the UV-visible spectrum while the solute passed through the flow-cell. Good agreement was found when the

absorption spectra of the different peaks obtained for the standards and the samples were compared. The criteria used to confirm the purity of the peaks were the peak purity curve, which is based on the similarity between the spectrum at the top of the target peak and the spectra at each point on that peak and the ratio between chromatograms obtained using two wavelengths, the purity of the target peak being displayed as a chromatogram ratio. These values indicate that the purity of the peaks was satisfactory.

Table 2 shows the results obtained for the cobalamin contents in the different mollusc seafood samples. The only species found was the natural cobalamin CN-Cbl, while no OH-Cbl or the coenzymes Ado-Cbl and Me-Cbl were identified in any of the samples above the detection limits.

Table 2 Cyanocobalamin contents in mollusc seafoods

Seafood	CN-Cbl ^a , ng g ⁻¹
Canned clam	396 ± 28
Canned cockle	95.4 ± 7.7
Canned Chilean clam	69.7 ± 7.2
Canned mussel	170 ± 13
Fresh clam	38.6 ± 3.7
Fresh cockle	20.2 ± 1.9
Fresh mussel	340 ± 27

^a Mean ± expanded uncertainty, $n=3$

The reliability of the method was further established by using a certified reference material, pig's liver (CRM 487). The certified value for the total vitamin B₁₂ content was 1.12 ± 0.09 and the value found was 1.21 ± 0.1 µg g⁻¹. Such data also confirm the efficiency of the extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous cobalamins from the animal samples.

CONCLUSION

An MWCNT-packed minicolumn coupled with LC was found to be an excellent alternative for the analysis and speciation of cobalamins at trace level. The miniaturized preconcentration procedure based on a continuous flow device allowed good sensitivity to be obtained and very low quantities of solvent were needed, the procedure resulting environmentally friendly. The reliability of the method was verified using a certified reference material. The extraction of cobalamins is very simple because it is based on the use of an ultrasonic treatment and validation of the method permitted its application to the speciation of cobalamins thus reducing the sample preparation time and allowing the reliable control and screening of fresh and canned seafoods.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish MICINN (Project CTQ2009-08267/BQU)) and to Fundación Séneca (Comunidad Autónoma de la Región de Murcia, Project 15217/PI/10) for financial support. M. Bravo Bravo also acknowledges a fellowship from Fundación Séneca

REFERENCES

1. Gogotsi Y (2006) *Nanomaterials Handbook*, CRC Taylor and Francis, Boca Ratón, FL
2. Simón de Dios A, Díaz-García ME (2010) *Anal Chim Acta* 666:1-22
3. Valcárcel M, Simonet BM, Cárdenas S, Suárez B (2005) *Anal Bioanal Chem* 382:1783-1790
4. Valcárcel M, Cárdenas S, Simonet BM (2007) *Anal Chem* 79:4788-4797
5. Valcárcel M, Cárdenas S, Simonet BM, Moliner-Martínez Y, Lucena R (2008) *Trends Anal Chem* 27:34-43

6. Jiménez-Soto JM, Moliner-Martínez Y, Cárdenas S, Valcárcel M (2010) *Electrophoresis* 31:1681-1688
7. Lucena R, Simonet BM, Cárdenas S, Valcárcel M (2011) *J Chromatogr A* 1218:620-637
8. Cserhádi T (2009) *Biomed Chromatogr* 23:111-118
9. Kumar SS, Chouhan RS, Thakur MS (2010) *Anal Biochem* 398:139-149
10. Yanes EG, Miller-Ihli J (2004) *Spectrochim Acta Part B* 59:891-899
11. Nolan CV, Fowler SW, Teyssie JL (1992) *Mar Ecol Prog Ser* 88:105-116
12. Jacobsen DW, Green R, Quadros EV, Montejano YD (1982) *Anal Biochem* 120:394-403
13. Binder M, Kolhouse JF, Van Horne KC, Allen RH (1982) *Anal Biochem* 125:253-258
14. Stupperich E, Steiner I, Rühlemann M (1986) *Anal Biochem* 155:365-370
15. Djalali M, Gueant JL, Lambert D, El Kholty S, Saunier M, Nicolas JP (1990) *J Chromatogr Biomed Appl* 94:81-91
16. Ford SH, Gallery J, Nichols A, Shambee M (1991) *J Chromatogr* 537:235-247
17. Lambert D, Adjalla C, Felden F, Benhayoun S, Nicolas JP, Guéant JL (1992) *J Chromatogr* 608:311-315
18. Astier A, Baud FJ (1995) *J Chromatogr B, Biomed Appl* 667:129-135
19. Viñas P, López-Erroz C, Balsalobre N, Hernández-Córdoba M (2003) *Chromatographia* 58:5-10
20. Pakin C, Bergaentzlé M, Aoudé-Werner D, Hasselmann C (2005) *J Chromatogr A* 1081:182-189
21. Viñas P, Campillo N, López-García I, Hernández-Córdoba M (1996) *Anal Chim Acta* 318:319-325
22. Viñas P, Campillo N, López-García I, Hernández-Córdoba M (1996) *Chromatographia* 42:566-570
23. Chassaigne H, Lobinski R (1998) *Anal Chim Acta* 359 :227-235
24. Chassaigne H, Szpunar J (1998) *Analisis* 26:M48-M51
25. Lobinski R, Pereiro IR, Chassaigne H, Wasik A, Szpunar J (1998) *J Anal Atom Spectrom* 13:859-867

26. Makarov A, Szpunar J (1999) *J Anal At Spectrom* 14 :1323-1327
27. Acon BW, McLean JA, Montaser A (2001) *J Anal Atom Spectrom* 16:852-857
28. Yanes EG, Miller-Ihli NJ (2004) *Spectrochim Acta Part B: Atom Spectrosc* 59B:883-890
29. Chassaigne H, Vacchina V, Lobinski R (2000) *TrAC Trends Anal Chem* 19:300-313
30. Fred C, Haglund J, Alsberg T, Rydberg P, Minten J, Tornqvist M (2004) *J Sep Sci* 27:607-612
31. Anes JM, Beck RA, Brink JJ, Goldberg RJ (1994) *J Chromatogr B, Biomed Appl* 660:180-185
32. Kelly RJ, Gruner TM, Sykes AR (2005) *Biomed Chromatogr* 19:329-333
33. Kelly RJ, Gruner TM, Furlong JM, Sykes AR (2006) *Biomed Chromatogr* 20:806-814
34. Hannibal L, Axhemi A, Glushchenko AV, Moreira ES, Brasch NE, Jacobsen DW (2008) *Clin Chem Lab Med* 46:1739-1746
35. Suárez B, Santos B, Simonet BM, Cárdenas S, Valcárcel M (2007) *J Chromatogr A* 1175:127-132



CAPÍTULO II

MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-
LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE TIAMINA
EN ALIMENTOS

La vitamina B₁ o tiamina contiene un núcleo pirimidina y uno tiazol enlazados por un puente metileno. La tiamina funciona en el organismo en forma de coenzima tiaminpirofosfato. Las estructuras de la tiamina y el tiaminpirofosfato se muestran en la Figura II.1.

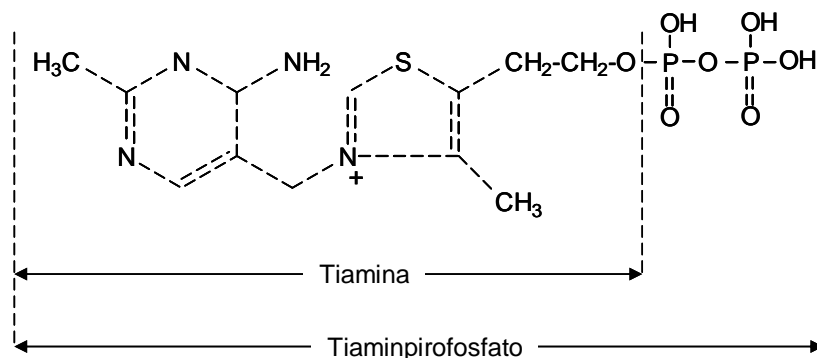


Figura II.1. Estructura de la tiamina y el tiaminpirofosfato

La conversión de la tiamina a su forma de coenzima es llevada a cabo por la tiamina difosfoquinasa; el adenosintrifosfato (ATP) es el donador de pirofosfato (PP). Se han sintetizado antimetabolitos para la tiamina que inhiben a esta enzima. Los más importantes son la neopiritiamina (pirtiamina) y la oxitiamina.

La tiamina está prácticamente desprovista de efectos farmacológicos cuando se administra a las dosis terapéuticas habituales. Las vitaminas del complejo B funcionan en muchas reacciones esenciales del metabolismo intermediario. El fosfato de tiamina, la forma fisiológicamente activa de la tiamina, funciona en el metabolismo de los carbohidratos como una coenzima en la descarboxilación de α -cetoácidos como piruvato y α -cetoglutarato, así como en la utilización de pentosa en la derivación de hexosa monofosfato, para aprovechar sus nutrientes. En la deficiencia de tiamina, hay alteraciones de la oxidación de los α -cetoácidos y se ha utilizado un incremento de la concentración sanguínea de piruvato como uno de los signos diagnósticos del estado de deficiencia. El requerimiento de tiamina se

relaciona con el índice metabólico y es mayor cuando los carbohidratos constituyen la fuente de energía. Este hecho tiene importancia práctica en pacientes sometidos a alimentación parenteral y que, así, reciben una porción sustancial de las calorías en forma de dextrosa. Estos individuos deben recibir una dosis grande de la vitamina.

Las necesidades para el adulto son de 1–2 mg por día. Como es una sustancia clave del metabolismo de los carbohidratos, las necesidades aumentan al ingerir carbohidratos. La vitamina B₁ se halla ampliamente distribuida en las plantas, tanto en el pericarpio como en el germen de cereales (trigo), en las levaduras, hortalizas, legumbres y patatas; también abunda en la carne de cerdo y vacuno, en el pescado y los huevos, así como en los órganos animales (hígado, riñón, cerebro y corazón). La leche humana y de vaca contienen asimismo vitamina B₁. De especial importancia como aporte de tiamina ha de citarse el pan integral y las patatas. Se localiza ante todo en las envolturas más externas de los cereales, produciéndose graves pérdidas según el grado de extracción de la harina del trigo o al descascarillar el arroz. La Tabla II.1 muestra los alimentos que contienen niveles más altos de tiamina.

Tabla II.1. Alimentos ricos en tiamina o vitamina B₁

Alimentos	Tiamina ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Levadura de cerveza (desezada)	120
Germen de trigo	20
Carne de cerdo	6,6
Salvado	6,5
Copos de avena	5,9
Lentejas (secas)	4,3
Arroz integral	4,1
Huevo entero	3,1
Visceras y despojos cárnicos	3,1

La deficiencia grave de tiamina conduce al padecimiento denominado beriberi. Esto se debe al consumo de dietas que constan de arroz descascarillado en países de Asia, que tienen deficiencia de la vitamina; sin embargo, en Europa y América del Norte, la deficiencia de tiamina se observa más a menudo en alcohólicos, aunque los enfermos con insuficiencia renal crónica bajo diálisis, y quienes reciben alimentación parenteral total, también pueden estar en riesgo. La enfermedad se manifiesta por afectación del sistema nervioso y periférico y del sistema cardiovascular, debilidad muscular, pérdida de reflejos, confusión, coma, llegando incluso a la muerte. En los niños existe una forma fulminante, con vómitos, cianosis, convulsiones y muerte por insuficiencia cardíaca. Si la carencia no es tan radical, se manifiesta en forma de trastornos cardiovasculares (brazos y piernas "dormidos", sensación de opresión en el pecho, etc.), alteraciones neurológicas o psíquicas (cansancio, pérdida de concentración, irritabilidad o depresión).

La estabilidad de la tiamina en disolución acuosa es relativamente pequeña. Depende del pH, la temperatura, la fuerza iónica y la presencia de iones. La forma ligada a enzimas es menos estable que la forma libre. Los nucleófilos fuertes, como por ejemplo, el HSO_3^- y OH^- producen la degradación rápida a 5-(2-hidroxietil)-4-metiltiazol, 2-metil-4-amino-5(metilsulfónico)-pirimidina y 2-metil-4-amino-5-hidroximetil-pirimidina, como muestra la Figura II.2.

La descomposición térmica de la vitamina, que produce la fragmentación en derivados del tiazol y pirimidina, participa en la formación del aroma de carne de algunos alimentos al ser calentados. Son importantes para este aroma los productos derivados del tiazol, del furano, tiofeno, dehidrotiofeno y H_2S .

Los oxidantes fuertes, como el peróxido de hidrógeno y el ferricianuro potásico forman tiocromo fluorescente, reacción que se emplea para la determinación de la tiamina.

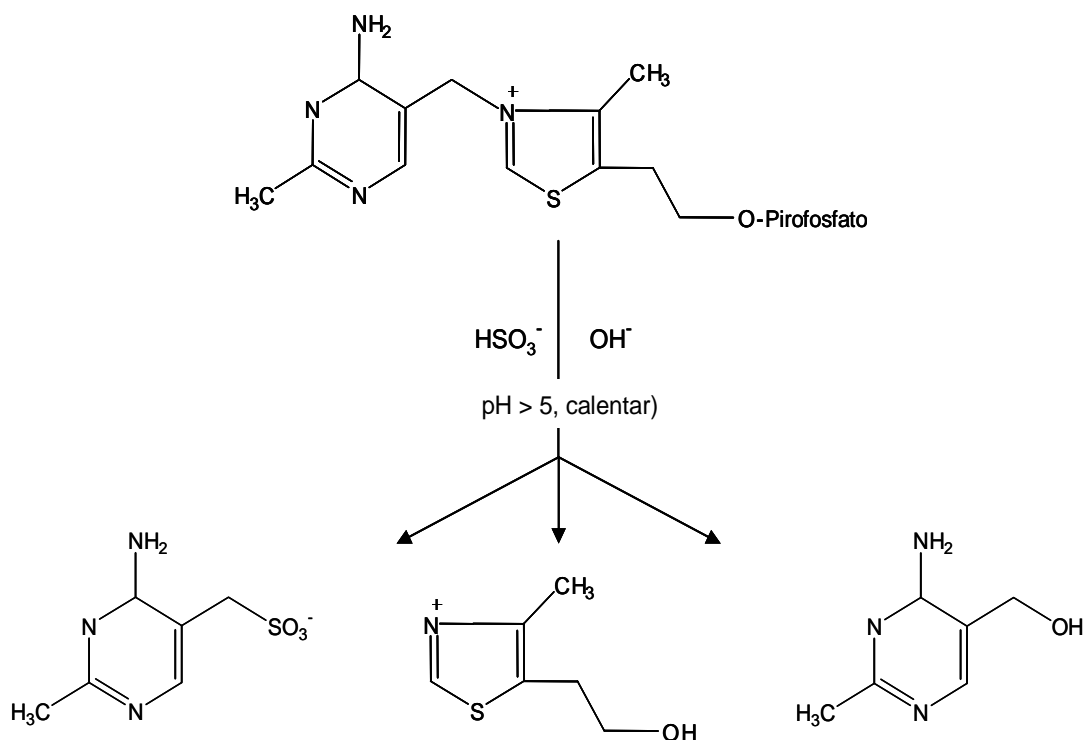


Figura II.2. Degradación rápida de la tiamina

Los compuestos más estrechamente relacionados con la tiamina son sus ésteres mono-, di- y trifosfato. Precisamente la muy numerosa presencia natural y la importancia biológica de los ésteres de la tiamina, han hecho que se preste mucha menor atención a los análisis de otros compuestos de estructura similar a la tiamina. Sin embargo, se pueden encontrar fuentes naturales de análogos estructurales no fosfatados de la vitamina B₁. Algunos compuestos con actividad en vitamina B₁ tal como el disulfuro de tiamina pueden estar presentes en varios extractos de origen biológico. Muchos antagonistas de la tiamina han sido utilizados para estudios metabólicos. La detección y determinación de potenciales metabolitos de la tiamina tiene también gran importancia.

La principal forma de la tiamina en productos animales es el éster pirofosfato, pero en materiales vegetales está presente en gran cantidad en forma

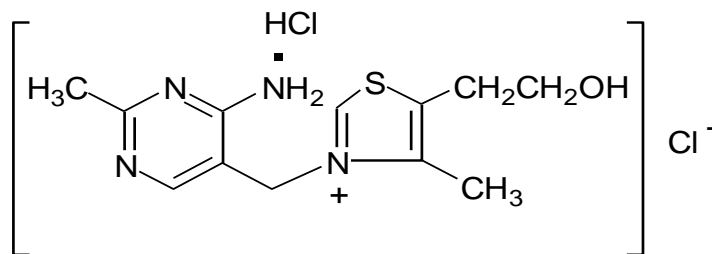
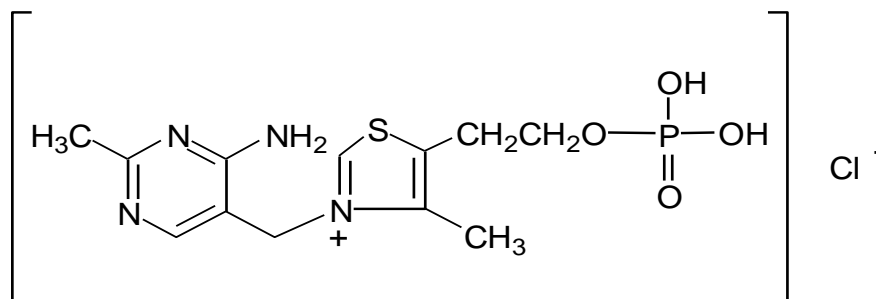
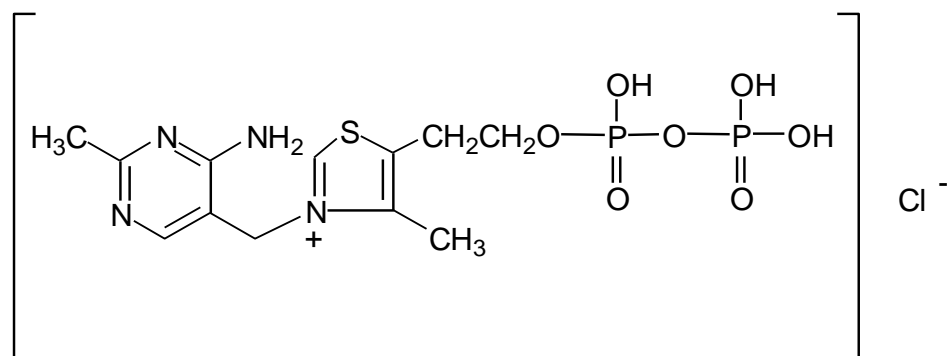
libre. Otros ésteres fosfatados también pueden estar presentes en pequeñas cantidades en muestras biológicas. Los métodos cromatográficos generalmente producen resultados que concuerdan con los obtenidos por el método fluorimétrico recomendado por la AOAC. Sin embargo, la técnica LC es más rápida y más conveniente.

La primera etapa del análisis es la preparación de la muestra. La tiamina está, en alguna extensión, enlazada a las proteínas y normalmente se lleva a cabo una hidrólisis ácida suave (la tiamina se destruye con el calor en medio alcalino) para liberarla de las proteínas. Esto se suele hacer en un autoclave con ácido sulfúrico o clorhídrico 0,1 M durante aproximadamente 30 minutos.

Si los ésteres fosfatados están presentes deben convertirse en la forma libre mediante tratamiento con una enzima con actividad fosfatasa, tal como takadiastasa, a pH entre 4 y 4,6. En el caso de materiales vegetales, la takadiastasa tiene la función adicional de hidrolizar el almidón presente en la muestra y acelerar así la etapa de filtración. Para la extracción a partir de carne y productos cárnicos, se ha utilizado papaina además de takadiastasa.

A menudo es necesario llevar a cabo una purificación posterior de las muestras antes de proceder al análisis por LC; para esta etapa se utilizan minicolumnas desechables conteniendo normalmente relleno de fase reversa.

El Segundo Capítulo de la Tesis Doctoral aborda el estudio y determinación de la tiamina (T), monofosfato de tiamina (TP) y pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa (TPP), por lo que, a continuación, se describen con más detalle sus principales características. Las fórmulas químicas de estos compuestos se muestran en la Figura II.3.

**Tiamina****Monofosfato de tiamina****Pirofosfato de tiamina****Figura II.3.** Estructuras químicas de la tiamina y sus ésteres

Todos ellos exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible y los correspondientes espectros se muestran en la Figura II.4.

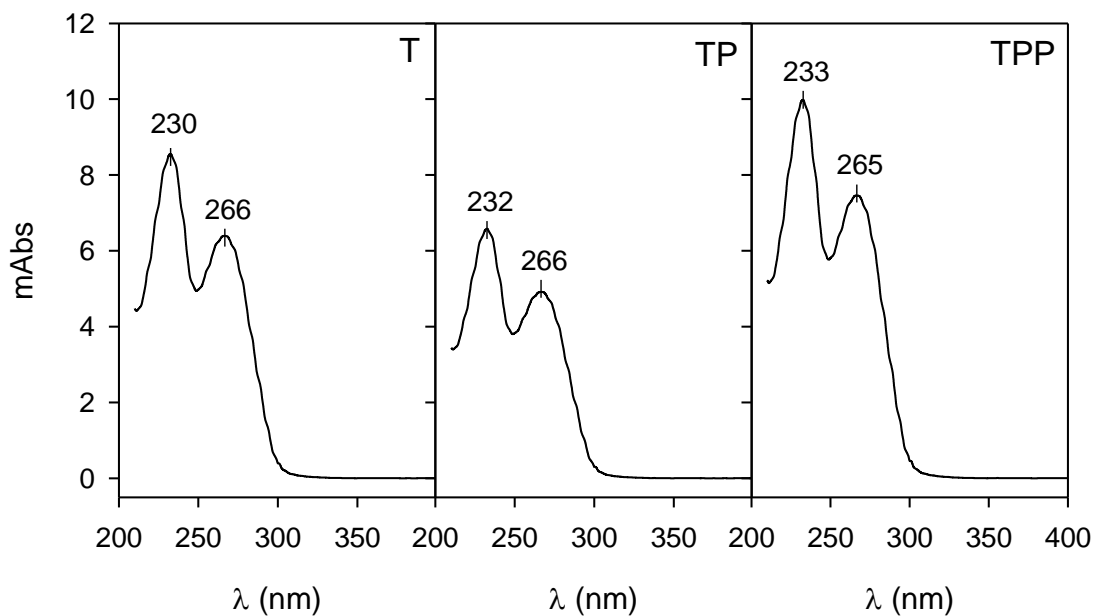


Figura II.4. Espectros de absorción UV–visible de la tiamina y sus ésteres

La Tabla II.2 resume los máximos de absorción UV-visible para los distintos compuestos.

Tabla II.2. Máximos de absorción UV–visible de la tiamina y sus ésteres

Compuesto	Longitud de onda máxima (nm*)
T	230, 266
TP	232, 266
TPP	233, 265

*En orden decreciente de absortividad molar

En los alimentos, la tiamina se encuentra en su forma libre o como los ésteres mono- y pirofosfato enlazados a proteínas [1]. Hay un interés renovado en la determinación de la vitamina debido a la popularidad que están adquiriendo los

alimentos enriquecidos o los suplementos dietéticos, en los cuales se añaden las vitaminas usualmente en una forma química simple.

La tiamina no se puede diferenciar de sus ésteres por las técnicas analíticas usuales tales como el método fluorimétrico propuesto por la AOAC [2]. Es importante conocer la especiación de la tiamina debido a las diferentes actividades y estabilidades que presentan sus ésteres. Esta especiación normalmente se lleva a cabo por LC [3]. Se han propuestos diversos procedimientos para la determinación de tiamina en alimentos usando cromatografía en fase reversa o de pares iónicos [4–43], y también se han publicado varios artículos de revisión [44–47].

La detección se ha llevado a cabo por espectrofotometría UV para muestras que contienen cantidades suficientes de tiamina, mientras que se ha usado una reacción de derivatización fluorescente basada en la oxidación de tiamina a tiocromo o MS cuando se deben determinar concentraciones pequeñas.

Los métodos emergentes para matrices de alimentos tienden hacia técnicas eficientes y miniaturizadas que cumplan las prioridades de la química verde con respecto al medio ambiente a través del uso de procesos químicos que no produzcan residuos y que usen cantidades pequeñas de disolventes seguros para disolver o extraer los analitos [48].

Las técnicas de microextracción [49–50] representan una forma relevante para la miniaturización del laboratorio analítico [51]. La extracción selectiva de los compuestos está basada en las diferencias en sus características físicas y químicas. LPME incluye varias técnicas miniaturizadas basadas en la extracción de los analitos en una fase líquida usando cantidades muy pequeñas de disolventes orgánicos [52]. DLLME es un método de extracción muy simple y rápido, basado en el uso de un sistema de disolventes ternario, que se ha aplicado a la extracción y preconcentración tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos a partir de muestras acuosas [52–54]. El bajo consumo de tiempo y disolventes orgánicos son las dos ventajas principales de esta técnica, que se ha incluido en el grupo de

procedimientos de química limpia. La bibliografía recoge un procedimiento propuesto para la determinación de tiamina usando DLLME sin separación cromatográfica [55].

En el Capítulo II de la Tesis, se ha evaluado un procedimiento miniaturizado basado en DLLME acoplado a LC con detección fluorescente para la preconcentración y determinación de tiamina. Se llevó a cabo la derivatización por oxidación química de la tiamina con ferricianuro 5×10^{-5} M a pH 13 para formar el tiocromo fluorescente.

Para DLLME, se inyectó rápidamente 0,5 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) conteniendo 90 μ L de tetracloroetano (disolvente extractante) en 10 mL de la disolución de la muestra conteniendo el tiocromo derivatizado y cloruro sódico al 24% (m/v), formándose entonces una disolución turbia. La separación de fases se llevó a cabo por centrifugación y se sometió un volumen de 20 μ L de la fase sedimentada al análisis por LC.

La fase móvil fue una mezcla de 90% (v/v) de una disolución reguladora de KH_2PO_4 10 mM (pH 7) y 10% (v/v) de acetonitrilo a 1 mL min^{-1} . Se usó una fase estacionaria amida constituida por un ligando con grupos amida y el encapsulante de trimetilsililo. La especificidad, linealidad, precisión, recuperación y sensibilidad fueron satisfactorios. La gráfica de calibrado se obtuvo por el método de adiciones estándar y fue lineal entre 1 y 10 ng mL^{-1} . El límite de detección fue $0,09 \text{ ng mL}^{-1}$. La selectividad del método se evaluó a partir de la ausencia de picos interferentes al tiempo de retención de la tiamina para cromatogramas blanco de muestras no fortificadas. Se obtuvo una RSD de 3,2% para una disolución estándar conteniendo 5 ng mL^{-1} de tiamina.

Los ésteres monofosfato de tiamina y pirofosfato de tiamina también se pueden determinar sometiendo la muestra a sucesivos tratamientos ácido y enzimático.

El método se aplicó a la determinación de tiamina en diferentes alimentos tales como cerveza, levadura de cerveza, miel y alimentos infantiles incluyendo fórmulas infantiles, yogur líquido, cereales y purés. Para el análisis de las muestras sólidas, se aplicó una etapa previa de extracción basada en una hidrólisis ácida con ácido tricloroacético. La validez del procedimiento se chequeó analizando un material de referencia certificado, hígado de cerdo (CRM 487). El valor obtenido fue $8,76 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de tiamina, que está en concordancia excelente con el valor certificado, $8,6 \pm 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que han sido publicados en la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 403 (2012) 1059–1066

DOI 10.1007/s00216-012-5804-2

Published in the special issue Euroanalysis XVI (The European Conference on Analytical Chemistry) with guest editor Slavica Ražić. Belgrade (Serbia), 11-15 Septiembre 2011.

La dirección url para esta publicación es:

<http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-5804-2>

ABSTRACT

A miniaturized dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) procedure coupled to liquid chromatography (LC) with fluorimetric detection was evaluated for the preconcentration and determination of thiamine (vitamin B₁). Derivatization was carried out by chemical oxidation of thiamine with 5×10^{-5} M ferricyanide at pH 13 to form fluorescent thiochrome. For DLLME, 0.5 mL of acetonitrile (dispersing solvent) containing 90 μ L of tetrachloroethane (extraction solvent) was rapidly injected into 10 mL of sample solution containing the derivatized thiochrome and 24% (w/v) sodium chloride, thereby forming a cloudy solution. Phase separation was carried out by centrifugation, and a volume of 20 μ L of the sedimented phase was submitted to LC. The mobile phase was a mixture of a 90% (v/v) 10 mM KH₂PO₄ (pH 7) solution and 10% (v/v) acetonitrile at 1 mL min⁻¹. An amide-based stationary phase involving a ligand with amide groups and the endcapping of trimethylsilyl was used. Specificity, linearity, precision, recovery and sensitivity were satisfactory. Calibration graph was carried out by the standard additions method and was linear between 1-10 ng mL⁻¹. The detection limit was 0.09 ng mL⁻¹. The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the thiamine elution time for blank chromatograms of unspiked samples. A relative standard deviation of 3.2% was obtained for a standard solution containing thiamine at 5 ng mL⁻¹. The esters thiamine monophosphate and thiamine pyrophosphate can also be determined by submitting the sample to successive acid and enzymatic treatments. The method was applied to the determination of thiamine in different foods such as beer, brewer's yeast, honey and baby foods including infant formulas, fermented milk, cereals and purees. For the analysis of solid samples, a previous extraction step was applied based on an acid hydrolysis with trichloroacetic acid. The reliability of the procedure was checked by analyzing a certified reference material, pig's liver (CRM 487). The value obtained was $8.76 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ thiamine, which is in excellent agreement with the certified value, $8.6 \pm 1.1 \mu\text{g g}^{-1}$.

Keywords: Dispersive liquid-liquid microextraction • Liquid chromatography • Fluorimetric derivatization • Thiamine • Thiamine phosphate • Foods

INTRODUCTION

The water-soluble B group vitamins include many compounds of different chemical structure and biological roles, which are essential for the health of adults and, especially, children. In foodstuffs, thiamine (vitamin B₁) occurs in its free form or as the mono- and pyrophosphate esters bound to proteins. Thiamine pyrophosphate, the physiologically active form of thiamine, functions as a coenzyme in the carbohydrate metabolism. Although it is extremely widespread in small amounts, only a few foodstuffs, generally those that are rich in carbohydrate, can be regarded as good sources. Examples are legume seeds and the germ of cereal grains, cereal products, vegetables, meat, and milk products [1]. There is renewed interest in vitamin measurement due to the popularity of fortified foods or dietary supplements, in which vitamins are usually added in a single chemical form.

Thiamine cannot be differentiated from its esters by the usual analytical techniques such as the fluorimetric method proposed by the AOAC [2]. It is important to know the speciation of thiamine because of the different activities and stabilities of the thiamine esters, a task usually accomplished by liquid chromatography [3]. Procedures for the determination of thiamine in foods using reversed-phase or ion pair chromatography [4-43] have been proposed, and several reviews have also been published [44-47]. Detection has been carried out by UV spectrophotometry for samples that contain sufficient amounts of thiamine, while a fluorescence derivatization reaction based on the oxidation of thiamine to thiochrome or mass spectrometry has been used to determine small concentrations.

Emerging methods for food matrices tend towards efficient and miniaturized techniques that share the priorities of green chemistry with respect to the environment through the use of chemical processes that do not produce residues

and which use low amounts of safe solvents for dissolving or extracting analytes [48].

Microextraction techniques [49-50] represent a relevant way for the miniaturization of the analytical laboratory [51], the selective extraction of compounds being based on differences in their physical-chemical characteristics (molecular weight, charge, solubility, polarity and volatility). Liquid-phase microextraction (LPME) includes several miniaturized techniques based on the extraction of analytes in a liquid phase using very low amounts of organic solvents [52]. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a very simple and rapid extraction method, based on the use of a ternary component solvent system, which has been applied to the extraction and preconcentration of both organic and inorganic compounds from aqueous samples [52-54]. The low consumption of time and organic solvents are two of the main advantages of this technique, which can be included in the group of clean chemistry procedures. A procedure has been proposed for the determination of thiamine using DLLME without chromatographic separation [55].

In the present study, a miniaturized sample treatment procedure based on DLLME coupled to a reversed-phase LC technique using an amide-based stationary phase is proposed for determining thiamine (T), thiamine monophosphate (TMP) and thiamine pyrophosphate (TPP). Detection was performed by precolumn fluorescence derivatization using a system involving the oxidation to the corresponding highly fluorescent thiochromes. The procedure was applied to the determination of thiamine and its esters in different type of foods: beer, brewer's yeast, honey and baby foods including infant formulas, fermented milk, cereals and purees. The main significance of this work is that, at the best of our knowledge, this is the first time that these vitamins have been determined using green chemistry principles avoiding the use of high amounts of solvents and the generation of residues coupled to liquid chromatography.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

T, TMP and TPP were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Individual stock solutions of the compounds ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in pure water and stored in darkness at $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Working standard solutions were freshly prepared in pure water and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Alkaline phosphatase (ALKP) from *Bovine intestinal mucosa*, (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10 mM trisbuffer (pH 7.4), and takadiastase from *Aspergillus oryzae* (Fluka) was used solid. Potassium ferricyanide, sodium hydroxide, potassium dihydrogen phosphate and phosphoric acid (85%) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and Merck (Darmstadt, Germany). Chromatographic quality carbon tetrachloride, tetrachloroethane dichloromethane, chloroform, undecanone, undecanol, decanol, acetone, acetonitrile and methanol were obtained from Sigma. Water used was previously purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

INSTRUMENTATION

The LC system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature with a flow-rate of 1 mL min^{-1} . The solvents were degassed using an on-line membrane system (Agilent 1100, G1379A). The fluorescence detector was an Agilent FLD (Agilent 1100, G1321A) operating at an excitation wavelength of 375 nm and an emission wavelength of 438 nm. The analytical column used for the reversed-phase technique was a Discovery RP-AmideC₁₆ (15 cm x 0.46 cm x 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Aliquots of 20 μL were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA).

To filter the samples, Econofilter 25 nylon filters (0.45 μm) (Agilent) were used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge was used at the maximum speed supported by the conical glass tubes, 4000 rpm. The ultrasonic

processor UP 200 H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany) was used for the hydrolysis step. A laboratory-made system built in the Central Laboratory Service of the University of Murcia, consisting of a drilled block equipped with an electronic temperature control system, was used to heat the tubes for hydrolysis.

SAMPLES

The samples were different type of foods rich in thiamine (beer, brewer's yeast, honey and baby foods including infant formulas, fermented milk, cereals and purees). The method was validated using a reference material, pig's liver CRM 487 supplied by the Community Bureau of Reference, BCR (Belgium).

All operations were performed in subdued light. The beer samples were diluted with water in a 1:1 proportion (5 mL beer and 5 mL water) and directly submitted to extraction. The honey samples were prepared by weighing 1 g and diluting up to 10 mL with water. For the analysis of solid samples, a previous extraction step was applied based on an acid hydrolysis by weighing different amounts of sample (0.1 g of brewer's yeast, 2 g of fermented milk, 0.2 g of infant formula or cereals) and adding 4 mL water and 2 mL of 3% m/v trichloroacetic acid. After mixing for 15 min, the mixture was centrifuged for 10 min at 6000 rpm and the supernatant was diluted up to 10 mL with water and filtered.

ENZYMATIC HYDROLYSIS

Samples were submitted to successive acid and enzymatic hydrolysis steps, as described by the analytical methods committee [44]. Amounts of 0.1-2 g were weighed into an amber 15 mL screw cap glass tube with conical bottom and 6 mL of 0.1 M hydrochloric acid was added. The suspension was homogenized by using an ultrasonic processor for 30 s (40% amplitude, 0.5 cycles) and then heated at 90 °C for 30 min. When the suspension was cold, the pH was adjusted to 7 using 1 M sodium hydroxide and 25 units of ALKP were added. The sample was incubated in a block with magnetic stirring at 55 °C for 2 h in the absence of light. Then, 1 mL of

50% (w/v) trichloroacetic acid was added and the mixture was again heated at 90 °C for 10 min. The sample was cooled and centrifuged at 4000 rpm for 10 min. For carrying out the derivatization reaction, the supernatant was made up to 10 mL with water and a 2 mL of 2 M sodium hydroxide solution (pH 13) and 50 μ L of 0.01 M potassium ferricyanide were added for derivatization and subsequently DLLME-LC. The certified reference sample was analyzed in the same way but using the enzyme takadiastase (0.02 g at pH 4) following the procedure proposed by the BCR.

DLLME PROCEDURE

For DLLME, a 10 mL aliquot of the standard or the sample was placed in a 15-mL screw cap glass tube with conical bottom. For carrying out the derivatization reaction, volumes of 2 mL of a 2 M sodium hydroxide solution (pH 13) and 50 μ L of 0.01 M potassium ferricyanide were added and the mixture was vortex shaken. Sodium chloride was added to reach a 24% m/v concentration. Then, 0.5 mL of acetonitrile (dispersing solvent) containing 90 μ L of tetrachloroethane (extraction solvent) was rapidly injected into the sample solution using a micropipette, and the mixture was again gently shaken manually for several seconds. A cloudy solution consisting of very fine droplets of tetrachloroethane dispersed into the sample solution was formed, and the derivatized thiochromes were extracted into the fine droplets. After centrifugation for 1 min at 4000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (volume about 40 μ L). Twenty microlitres of the sedimented phase were removed with a microsyringe and injected into the LC. The calibration curve was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area versus thiamine concentration in ng mL^{-1} using six levels in duplicate experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

DERIVATIZATION REACTION

The oxidation of thiamine to thiochrome is a very efficient, simple and fast derivatization reaction giving a highly fluorescent derivative. An alkaline medium is needed for the reaction, and the pH effect was studied in the 6-13 range using a sodium hydroxide solution. The sensitivity continuously increased up to pH 13 (obtained by adding 2 mL of 2 M NaOH solution), which was selected. When the influence of the oxidant concentration was studied, the fluorescence increased to reach a maximum up to 2×10^{-4} - 7×10^{-4} M and decreased for higher concentrations; a 5×10^{-4} M concentration was selected.

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

Thiamine and its esters have an ionic character and can interact with the silanol groups of the conventional ODS columns. Separation using the amide-based stationary phase with the endcapping of trimethylsilyl is advantageous with respect to other reversed-phases because the peaks are much narrower and column life is longer due to the simplicity of the mobile phase, avoiding the need for ion-pairing reagents. The optimal composition of the mobile phase was studied using several phosphate buffers at pH values ranging between 4 and 8, and phosphate concentrations in the 10-50 mM range. The addition of acetonitrile was assayed to decrease vitamin retention. The best separation was achieved using a mixture of 90% v/v 10 mM KH_2PO_4 buffer (pH 7) and 10% v/v acetonitrile. The flow-rate was 1 mL min^{-1} .

DLLME PARAMETERS

The parameters affecting the DLLME procedure, such as the type and volume of both the extraction and disperser solvents, salt addition and

centrifugation time, were optimized. For this purpose, 10 mL of an aqueous solution or a sample containing a thiamine concentration of about 100 ng mL^{-1} and the derivatized reagents were submitted to DLLME, and a $20 \text{ }\mu\text{L}$ aliquot of the settled phase was injected into the LC.

The extraction solvent must have high extraction capability, a higher density than water, low solubility in water and good chromatographic behaviour. Thus, carbon tetrachloride (CCl_4), chloroform (CHCl_3), dichloromethane (CH_2Cl_2) and 1,1,2,2-tetrachloroethane ($\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$) were assayed using $100 \text{ }\mu\text{L}$ of the extraction solvent and 0.5 mL acetone as the disperser solvent. The sedimented phase was not discernible when using dichloromethane due to its high solubility in water. Fig. 1A shows the results obtained. The best extraction efficiency was obtained using tetrachloroethane as extraction solvent.

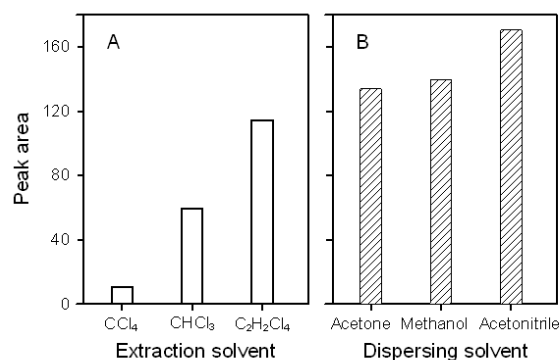


Fig. 1 Influence of different extraction solvents (A) and disperser solvents (B) on the extraction of thiochrome by DLLME. Concentration of thiamine, 100 ng mL^{-1}

The influence of the $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ volume was studied in the 40 to $120 \text{ }\mu\text{L}$ range. Peak areas increased with increasing extraction solvent volumes in the range 40 - $90 \text{ }\mu\text{L}$. On further increasing the volume of the extraction solvent, the peak areas decreased as a consequence of dilution, and so $90 \text{ }\mu\text{L}$ was selected. The volume of the sedimented phase was $40 \pm 10 \text{ }\mu\text{L}$ after extraction and centrifugation, which means a preconcentration factor close to 250.

The disperser solvent must be miscible in the extraction solvent and the aqueous phase. Acetone, methanol and acetonitrile were assayed by rapidly injecting 0.5 mL of each disperser containing $90 \text{ }\mu\text{L}$ of $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ into the aqueous

solution. The extraction efficiency was highest when using acetonitrile (Fig. 1B) and this was therefore selected.

The volumes assayed for the disperser solvent were 0.25-2 mL, containing in all cases the extraction solvent volume at the previously optimized value. The extraction efficiency increased up to 0.5 mL and then decreased with higher volumes, as the solubility of thiochrome probably increases in water, and so the extraction efficiency decreases. Highest sensitivity was attained with 0.5 mL of acetonitrile.

Sodium chloride was added to the aqueous phase to increase its ionic strength, thus reducing the solubility of thiochrome and increasing the solubility in the organic phase. The effect of the amount of sodium chloride on the extraction efficiency was studied between 0 and 24% m/v. The peak area increased with increasing salt concentration in all the range studied and a 24% m/v concentration was selected.

Extraction time in DLLME is defined as the time between injecting the mixture of disperser and extraction solvents and before starting the centrifugation step. As expected, no differences in sensitivity were attained in the interval 30 s – 5 min, demonstrating that DLLME is practically time-independent, one of its most important advantages. Therefore, the mixture was shaken for a few seconds and then centrifuged, the centrifugation step being the most time-consuming. Nevertheless, the centrifugation time and speed necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase were evaluated. The centrifugation time was varied between 1-4 min and extraction efficiency continuously decreased with longer times, and a time of 1 min is recommended. The centrifugation speed was modified in the 1000-6000 rpm range and sensitivity increased up to 4000 rpm, decreasing for higher values. Thus, the maximum speed recommended for the glass conic tubes used, 4000 rpm, was selected.

COMPARISON WITH OTHER LPME PROCEDURES

The preconcentration procedure using DLLME was compared with other LPME methods. Thus, the use of directly suspended drop microextraction

(DSDME), in which a symmetrical rotated flow field is created by a stir bar placed on the bottom of a cylindrical vessel containing the sample solution was assayed. For this, a 10 mL sample solution containing the derivatized thiochrome was stirred until a vortex was obtained. Then, 100 μL of an extraction solvent (undecanone, 1-undecanol or decanol) were incorporated, and the mixture stirred for 30 min. The organic phase was removed with a microsyringe and an aliquot of 20 μL was injected into the LC. Best results were obtained using 1-undecanol but the extraction efficiency was lower and the extraction time longer than when using DLLME. The ultrasound assisted emulsification microextraction (USAEME) technique was also tried using a 10 mL aliquot containing the derivatized thiochrome to which 100 μL of the extraction solvent (1-undecanol or tetrachloroethane) were added and the mixture submitted to an ultrasonic probe for 2 min. A solution consisting of very fine droplets of tetrachloroethane dispersed into the sample solution was formed. After centrifugation for 1 min at 4000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube and an aliquot was injected into the LC. However, the volume of organic solvent recovered in these conditions was too low, and the USAEME technique was also discarded. DLLME was confirmed to be the most suitable LPME technique for the purpose here reported. Sample throughput was about 4 samples h^{-1} and was very favourable compared with the other LPME systems.

OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS

For the determination of free thiamine in food samples, it must be released from the proteic bindings. For this, a step of hot acid digestion using trichloroacetic acid was chosen because this does not destroy the phosphate esters. However, for the extraction of total thiamine, acid digestion was followed by enzymatic hydrolysis to achieve dephosphorylation of the phosphate esters using alkaline phosphatase (ALKP), which is a [hydrolase enzyme](#) responsible for removing [phosphate](#) groups from many types of molecules. Finally, trichloroacetic acid was added to precipitate the proteins. The parameters influencing the hydrolysis, such

as pH, concentration of enzyme and substrate, and both temperature and time of the incubation step, were optimized.

As can be seen in Fig. 2A, the hydrolysis was more effective at pH 7 for both substrates, TMP and TPP. The optimal enzyme concentration was studied between 5 and 30 units, and the sensitivity continuously increased throughout the range studied for TMP, while a maximum value was obtained for TPP using 25 units (Fig. 2B). When the effect of substrate concentration was analyzed (Fig. 2C), the signal increased for higher concentrations of both TMP and TPP; however, linearity was also achieved for concentrations lower than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The incubation temperature was varied in the 30-70 °C range and, as shown in Fig. 2D, the signals were higher for both esters up to 55 °C after which they rapidly decreased, and so this value was chosen. Finally, the incubation time was also seen to be an important factor affecting enzymatic hydrolysis. The effect of this variable was studied between 1 and 8 h (Fig. 2E), a time of 2 h being selected as a compromise between the maximum signal and the total analysis time.

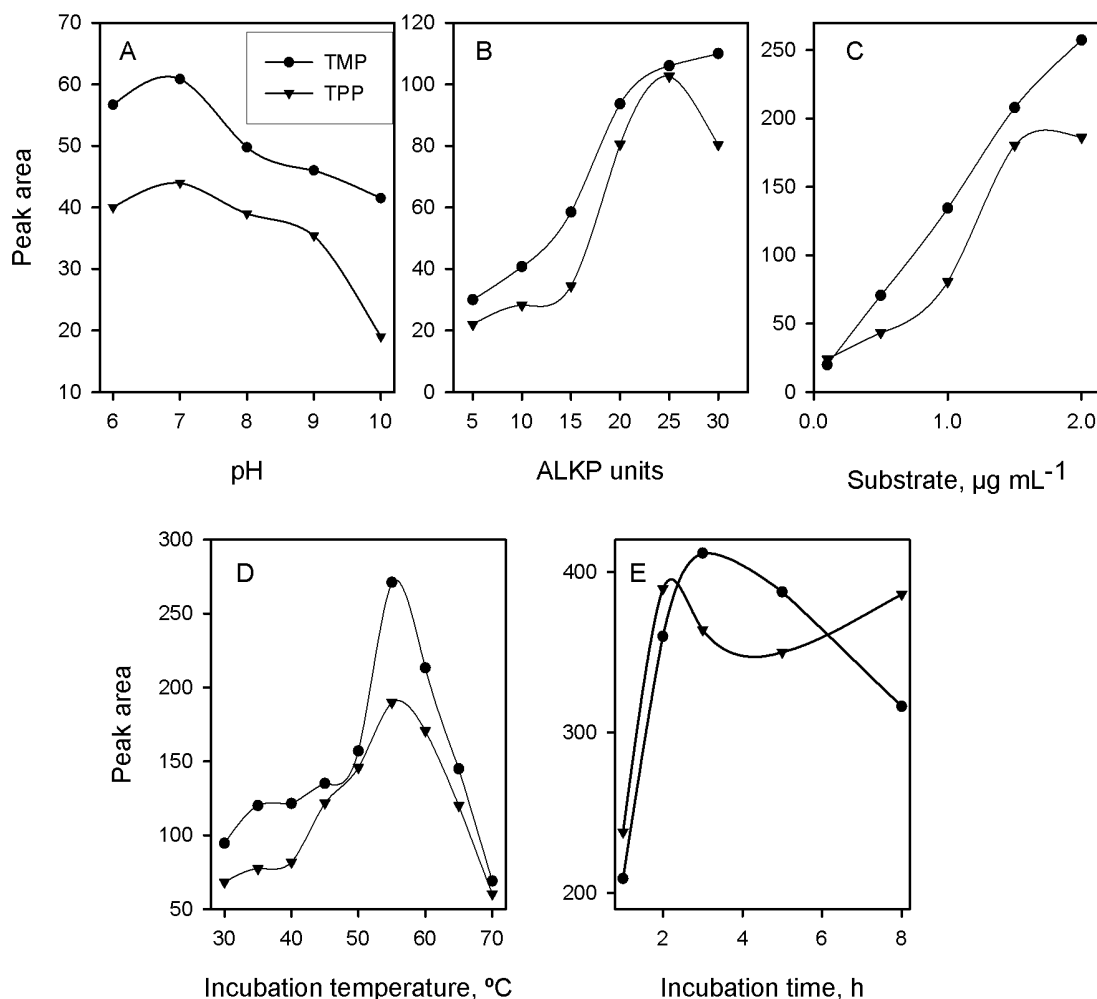


Fig. 2 Influence of the experimental variables affecting the extraction efficiency of thiochrome by DLLME. Concentration of thiamine, 100 ng mL^{-1}

ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, accuracy and precision. The calibration curve using DLLME was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area versus thiamine concentration using six levels in duplicate experiments. Table 1 shows the results obtained. The limit of detection (LOD, calculated as three times the standard error of the estimate) was 0.09 ng mL^{-1} . The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the thiamine elution time for blank

chromatograms of different unspiked samples. No matrix compounds existed that might give a false positive signal in the blank samples. The repeatability was calculated by using the relative standard deviation from a series of ten consecutive DLLME-LC analyses of one aqueous standard solution containing thiamine at 5 ng mL⁻¹ and a beer sample containing 520 ng g⁻¹. Relative standard deviations (RSD) of 3.2 and 5.6%, respectively, were obtained.

The matrix effect was studied by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different samples. Values were 0.257 mL ng⁻¹ for cereals, 0.456 for beer, 0.033 for honey, 0.136 for puree, 0.082 for infant formula and 0.205 for fermented milk, obtained by plotting concentration (at six different levels) against peak area and following linear regression analysis. The presence of a matrix effect was confirmed because “p” values obtained from application of a paired t-test were lower than 0.05. Consequently, calibration and analysis of all the samples must be performed by the standard additions method.

The validation parameters obtained for the thiamine esters using the enzymatic hydrolysis and DLLME procedure are also shown in Table 1.

Table 1 Calibration graphs for thiamine and its esters

Vitamin	Enzymatic hydrolysis	Intercept	Slope (mL ng ⁻¹)	Correlation coefficient	Linearity (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)
T	No	0.125±0.063	2.54±0.02	0.9999	0.5-10	0.09
TMP	Yes	1.89±0.74	0.726±0.104	0.9998	1-30	0.74
TPP	Yes	1.59±0.51	0.524±0.027	0.9997	3-30	2.05

ANALYSIS OF SAMPLES AND VALIDATION OF THE METHOD

Thiamine is very labile in neutral to basic solutions but not in acidic solutions. Loss of thiamine may occur for mildly acidic to neutral or basic foods upon heat treatment, but more acidic foods would not suffer this loss. The greatest losses during domestic cooking as well as in commercial food processing occur when the vitamin is leached into the cooking water. The vitamin is necessary to

break up carbohydrates and its main sources are cereals and wholemeal grain. Beer is a natural beverage manufactured from malted barley, water, yeast, and hops, and contains all of the important vitamins of the B group that come from malt, increase during barley germination, and remain during toasting. Consequently, samples of different type of foods rich in thiamine as beer, brewer's yeast, honey and baby foods including infant formulas, fermented milk, cereals and purees were analyzed.

For the solid samples, an acid hydrolysis using trichloroacetic acid was used because in this way the phosphate esters are not affected. The results showed that the commercial brewer's yeast analyzed contained the higher levels of thiamine. Cereals and infant formula also contained a high amount of the vitamin, since the products are commercialized in the dry form. The samples of fermented milk contained lower levels and the lowest concentrations were found in the samples of beer, honey and infant puree (Table 2).

Table 2 Thiamine content in several foods

Food	Thiamine ^a , $\mu\text{g g}^{-1}$
Beer	0.520 ± 0.03
Brewer's yeast	31.1 ± 0.57
Honey	0.212 ± 0.004
Infant formula	4.97 ± 0.036
Fermented milk	0.858 ± 0.015
Cereals mixture	4.15 ± 0.47
Cereals without gluten	4.06 ± 0.04
Mixed vegetables Puree	0.220 ± 0.022

^a Mean \pm standard deviation, $n=3$

To test the accuracy of the proposed method, five different foods were fortified and analyzed by the optimized method, taking into account the known analyte contents for these samples. The results for thiamine are presented in Table 3. Figure 3 shows typical chromatographic profiles obtained using DLLME-LC for non-spiked samples of brewer's yeast and two baby foods, namely cereals mixture and fermented milk in the selected conditions. Similar chromatograms were obtained for the other samples.

Table 3 Recovery study for thiamine

Food	Thiamine added, $\mu\text{g g}^{-1}$	Thiamine found, $\mu\text{g g}^{-1}$	Recovery	RSD, %
Beer	0.2	0.70	97.2	5.8
Honey	0.2	0.39	94.7	6.3
Infant formula	0.5	5.4	98.7	5.4
Cereals mixture	0.5	4.75	102	6.1
Puree	0.2	0.40	95.2	7.1

The food samples were then submitted to both acid and enzymatic hydrolysis to examine the presence of thiamine esters. A comparison was made on the efficiency of the enzymes ALKP and takadiastase for dephosphorylation of the esters in the cereals mixture sample, and the results obtained ($\mu\text{g g}^{-1}$ thiamine) were 4.15 without enzyme, 4.05 with takadiastase and 4.35 with ALKP, showing that all the thiamine is present in the free form. The values obtained were also in accordance with the contents reported by the manufacturer, which were $4.0 \mu\text{g g}^{-1}$ thiamine for both cereals mixture and cereals without gluten samples. For the infant formula, values of 4.97 without enzyme, 5.03 with takadiastase and 5.12 with ALKP, were obtained, which is again in accordance with the $4.7 \mu\text{g g}^{-1}$ thiamine content reported by the manufacturer. Similar results were obtained for the rest of the samples, confirming the presence of the thiamine in the free form and the non-existence of esters.

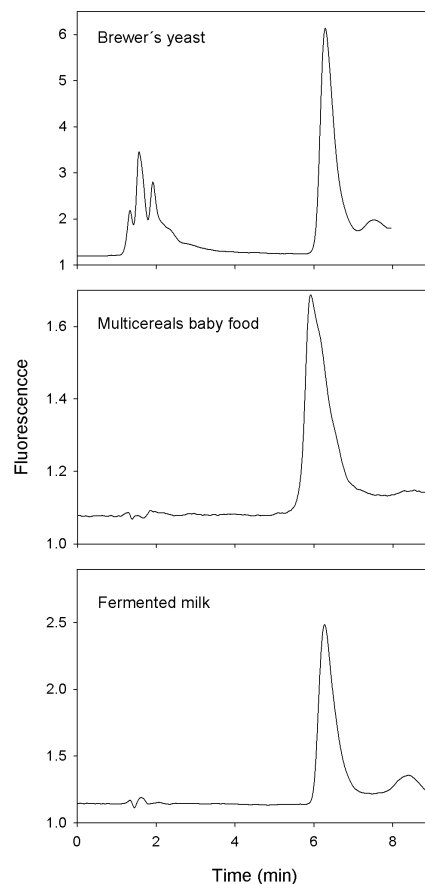


Fig. 3 Elution profiles obtained for different food samples by DLLME-LC-Fluorescence

The reliability of the method was further checked by using a certified reference material, pig's liver (CRM 487). The value obtained was $8.76 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ thiamine, which is in excellent agreement with the certified value, $8.6 \pm 1.1 \mu\text{g g}^{-1}$. The statistical study using the paired *t*-test showed that there was no significant difference (95% confidence interval) between the result obtained and the certified value. Such data also confirm the efficacy of the extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous thiamine in foods.

CONCLUSION

The miniaturized preconcentration procedure based on DLLME was seen to be an excellent alternative for the analysis of thiamine in different foods at low concentrations using LC-Fluorescence. In addition of achieving low detection limits,

very low quantities of solvent were used so that the procedure can be described as environmentally friendly. The possibility of determining thiamine esters after a suitable enzymatic treatment is also noteworthy.

Acknowledgements The authors acknowledge to Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10) and to the Spanish MICINN (Project CTQ2009-08267/BQU) for financial support. M. Bravo-Bravo acknowledges a fellowship from Fundación Séneca, CARM. Samples of baby foods were kindly supplied by Hero España S.A.

REFERENCES

1. Coultate TP, Food. The Chemistry of Its Components, 2nd ed, Royal Society of Chemistry, London 1989
2. Association of Official Analytical Chemists. In Official Methods of Analysis, Williams S, Ed, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA 1984, p 836
3. Van Niekerk PJ, Determination of Vitamins. In HPLC in Food Analysis, Macrae R, Ed, Academic Press, London 1988, p 156
4. Goldschmidt RJ, Wolf WR (2010) *Anal Bioanal Chem* 397:471-481
5. Lebidzińska A, Marszall ML, Kuta J, Szefer P (2007) *J Chromatogr A* 1173:71-80
6. Tang XY, Cronin DA, Brunton NP (2006) *J Food Compos Anal* 19:831-837
7. Marszall ML, Lebidzińska A, Czarnowski W, Szefer P (2005) *J Chromatogr A* 1094:91-98
8. Chienthavorn O, Smith RM, Saha S, Wilson ID, Wright B, Taylor SD, Lenz EM (2004) *J Pharm Biomed Anal* 36:477-482
9. Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004) *J Chromatogr Sci* 42:117-120
10. Viñas P, López-Eroz C, Balsalobre N, Hernández-Córdoba M (2003) *J Agric Food Chem* 51:3222-3227

11. Viñas P, López-Erroz C, Balsalobre N, Hernández-Córdoba M (2003) *J Chromatogr A* 1007:77-84
12. Li K (2002) *Biomed Chromatogr* 16:504-507
13. Woollard DC, Indyk HE (2002) *J Assoc Off Anal Chem Int* 85:945-951
14. Esteve MJ, Farre R, Frigola A, García-Cantabella JM (2001) *J Agric Food Chem* 49:1450-1454
15. Viñas P, López-Erroz C, Balsalobre N, Hernández-Córdoba M (2001) *J Chromatogr B* 757:301-308
16. Yamanaka K, Matsuoka M, Banno K (1996) *J Chromatogr A* 726:237-240
17. Blanco D, Llaneza MB, Gutierrez MDA (1996) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 19:2155-2164
18. Gehring TA, Cooper WM, Holder CL, Thompson HC Jr (1995) *J Assoc Off Anal Chem Int* 78:307-309
19. Barna E, Dworschak E (1994) *J Chromatogr A* 668:359-363
20. Yamanaka K, Horimoto S, Matsuoka M, Banno K (1994) *Chromatographia* 39:91-96
21. Ollilainen V, Vahteristo L, Uusi-Rauva A, Varo P, Koivistoinen P, Huttunen J (1993) *J Food Compos Anal* 6:152-165
22. Alyabis AM, Simpson KL (1993) *J Food Compos Anal* 6:166-171
23. Ohta H, Maeda M, Nogata Y, Yoza KI, Takeda Y, Osajima Y (1993) *J Liq Chromatogr* 16:2617-2629
24. Chase GW Jr, Landen WO Jr, Soliman AGM, Eitenmiller RR (1993) *J Assoc Off Anal Chem Int* 76:1276-1280
25. Bogner A (1992) *Fresenius J Anal Chem* 343:155-156
26. Chase GW Jr, Landen WO Jr, Eitenmiller RR, Soliman AGM (1992) *J Assoc Off Anal Chem Int* 75:561-565
27. Otles S (1991) *Z Lebensm Unters Forsch* 193:347-350
28. Nicolas EC, Pfender K (1990) *J Assoc Off Anal Chem* 73:792-798
29. Vidal-Valverde C, Reche A (1990) *Z Lebensm Unters Forsch* 19:313-318
30. Dawson KR, Unklesbay NF, Hedrick HB (1988) *J Agric Food Chem* 36:1176-1179

31. Lavigne C, Zee JA, Simard RE, Gosselin C (1987) *J Chromatogr A* 410:201-205
32. Vanderslice JT, Huang MHA (1986) *J Micronutr Anal* 2:189-199
33. Ayi BK, Yuhás DA, Moffett KS, Joyce DM, DeAngelis NJ (1985) *J Assoc Off Anal Chem* 68:1087-1092
34. Wills RBH, Wimalasiri P, Greenfield H (1985) *J Micronutr Anal* 1:23-29
35. Wimalasiri P, Wills RBH (1985) *J Chromatogr A* 318:412-416
36. Wehling RL, Wetzel DL (1984) *J Agric Food Chem* 32:1326-1331
37. Mauro DJ, Wetzel DL (1984) *J Chromatogr A* 299:281-287
38. Augustin J (1984) *J Assoc Off Anal Chem* 67:1012-1015
39. Fellman JK, Artz WE, Tassinari PD, Cole CL, Augustin J (1982) *J Food Sci* 47:2048-2050
40. Kamman JF, Labuza TP, Warthesen JJ (1980) *J Food Sci* 45:1497-1499
41. Kimura M, Fujita T, Nishida S, Itokawa Y (1980) *J Chromatogr A* 188:417-419
42. Ang CYW, Moseley FA (1980) *J Agric Food Chem* 28:483-486
43. Hemming BC, Gubler CJ (1980) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 3:1697-1712
44. Analytical Methods Committee (2000) *Analyst* 125:353-360
45. Lynch PLM, Young IS (2000) *J Chromatogr A* 881:267-284
46. Hollman PCH, Slangen JH, Wagstaffe PJ, Faure U, Southgate DAT, Finglas PM (1993) *Analyst* 118:481-488
47. Abdel-Kader ZM (1992) *Food Chem* 43:393-397
48. Anastas PT, Warner JC, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, 2000
49. Ramos L, Ramos JJ, Brinkman UATh (2005) *Anal Bioanal Chem* 381:119-140
50. Cuadros-Rodríguez L, Almansa-Lopez EM, Garcia-Campana AM, Gonzalez-Casado A, Egea-González FJ, Garrido-Frenich A, Martinez-Vidal JL (2005) *Talanta* 66:1063-1072

51. Mitra S (Ed), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2003
52. Nerín C, Salafranca J, Aznar M, Batlle R (2009) *Anal Bioanal Chem* 393:809-833
53. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S (2006) *J Chromatogr A* 1116:1-9
54. Bosch Ojeda C, Sánchez Rojas F (2009) *Chromatographia* 69:1149-1159
55. Zeeb M, Ganjali MR, Norouzi P (2010) *Microchim Acta* 168:317-324



CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE BENFOTIAMINA EN
PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS USANDO
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-
LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA

La benfotiamina (S-benzoiltiamina-O-monofosfato, BT) es un derivado lipofílico de la tiamina identificado inicialmente en ajo en 1950. Posteriormente, fue confirmado en otros vegetales *Allium*. La fórmula molecular de la benfotiamina es $C_{19}H_{23}N_4O_6PS$, su peso molecular es 466,5 g/mol y su fórmula estructural se muestra en la Figura III.1.

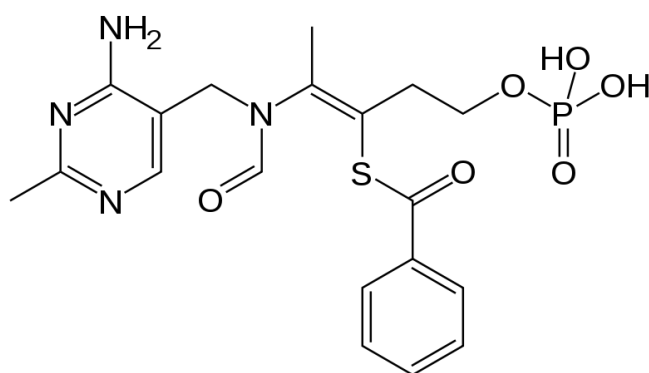


Figura III.1. Estructura química de la benfotiamina

La benfotiamina es un sólido blanco cristalino ligeramente soluble en agua y soluble in etanol. La pérdida en el secado no es superior al 1,5%. Se produce de forma sintética o por síntesis enzimática usando levaduras fosfoquinasas. También se puede obtener de microorganismos modificados genéticamente.

Benfotiamina se usa como fuente de vitamina B₁ en suplementos nutricionales incluyendo tabletas, cápsulas, tabletas masticables, polvos efervescentes y líquidos. El método de incorporación es determinado por el fabricante individual como el más apropiado para el tipo particular de producto final. Las recomendaciones de ingesta para benfotiamina serán consistentes con las descritas para sales de vitamina B₁ y se establecen como un máximo de 100 mg/día de vitamina B₁ suplementada.

La exposición de la población a la benfotiamina proviene de suplementos alimenticios o de productos conteniendo multivitaminas y multiminerales o como combinaciones más específicas. Niveles típicos de benfotiamina incluidos en suplementos nutricionales alcanzan hasta 100 mg/día.

La toxicidad oral de tiamina y sus derivados en humanos es considerada muy baja. Esta opinión se refiere también a la información sobre seguridad específica de benfotiamina, TMP y TPP. Los estudios toxicológicos demuestran la seguridad a los niveles usados de benfotiamina.

La legislación de la Unión Europea incluye a la benfotiamina en la lista de sustancias que se pueden añadir a los suplementos dietéticos como fuente de nutrientes [1]. BT es un derivado sintético de la tiamina que, después de la absorción, se puede defosforilar por las células en un proceso enzimático, liberando BT liposoluble. Su absorción y biodisponibilidad son mayores (5–25 veces) que las de la vitamina B₁ y se usa como paliativo para las deficiencias nutricionales de tiamina [2] y para inhibir la formación de productos finales de glicación (AGE), una propiedad que es especialmente importante para los diabéticos [3]. La dosis oral para adultos es 100 mg por día, que se puede incrementar hasta 300 mg por día [4].

Los últimos avances en la ciencia de la nutrición para conseguir una buena salud y reducir los efectos del envejecimiento consisten en introducir nuevos agentes tales como nutracéuticos y nutricosméticos. Estos productos son ingredientes naturales, usualmente extraídos de plantas o frutas, y contienen minerales y vitaminas. Son suplementos dietéticos en tabletas o cápsulas que mejoran algunos aspectos de la salud por sus ingredientes activos y nutrientes [5].

La necesidad de determinar los compuestos orgánicos naturales o los aditivos es una tendencia frecuente ya que se requiere el control de los constituyentes bioactivos principales usados en el manufacturado de alimentos

funcionales beneficiosos para la salud y los nutraceuticos [6]. Este es el caso de las vitaminas A, E, C y el complejo B.

LC es una técnica analítica poderosa que se puede usar como método de confirmación o test de screening, permitiendo determinar drogas y/o sus metabolitos, excipientes, aditivos y contaminantes tanto en las materias primas como en los productos farmacéuticos o nutraceuticos para asegurar la calidad y seguridad [7].

La preparación de la muestra de los nutraceuticos es una etapa analítica compleja y en el futuro se requerirá la investigación y desarrollo de nuevos métodos analíticos. La microextracción representa un avance en la miniaturización de las técnicas analíticas [8], que está basada en la extracción selectiva de los compuestos por sus características físico-químicas.

LPME incluye varias técnicas miniaturizadas basadas en la extracción de los analitos en una fase líquida [8–11]. DLLME que está basada en el uso de un sistema de disolventes ternario, ahorra tiempo y permite disminuir el uso de disolventes orgánicos [12–14]. La dispersión líquido-líquido juega un papel esencial en los procesos de separación y los sistemas de reacción debido a que la gran área interfacial resultante de la dispersión mejora la transferencia de masa y la velocidad de reacción [15]. La fase orgánica enriquecida se somete directamente a análisis cromatográfico.

La benfotiamina se ha determinado fundamentalmente usando métodos farmacológicos [16–17] y se han propuesto muy pocas técnicas analíticas usando LC [18–20]. Con respecto a las nuevas técnicas verdes de preparación de la muestra, DLLME solo se ha aplicado para la determinación de tiamina y sus ésteres en diferentes tipos de alimentos [21]. Sin embargo, no se ha encontrado ninguna referencia al acoplamiento de LC y DLLME para la determinación de BT.

El Capítulo III de esta Tesis Doctoral describe un procedimiento DLLME acoplado a LC con detección fluorescente para la determinación de BT. En primer lugar, la muestra es sometida a una etapa de hidrólisis enzimática usando fosfatasa alcalina. Entonces, se lleva a cabo la derivatización por oxidación química con ferricianuro a pH 13 para formar tiocromo fluorescente.

Para DLLME, se inyectan rápidamente 0,5 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) conteniendo 90 μL de 1,1,2,2-tetracloroetano (disolvente extractante) en un volumen de 10 mL de una disolución de la muestra conteniendo el tiocromo derivatizado y cloruro sódico al 24% (m/v), formando así una disolución turbia. La separación de fases se llevó a cabo por centrifugación y se sometió a análisis por LC un volumen de 20 μL de la fase sedimentada.

La fase móvil fue una mezcla al 90% (v/v) de una disolución de KH_2PO_4 10 mM (pH 7) y 10% (v/v) de acetonitrilo a 1 mL min^{-1} . Se usó una fase estacionaria amida constituida por un ligando con grupos amida y un encapsulante de trimetilsililo.

La gráfica de calibrado se obtuvo usando estándares acuosos (coeficiente de correlación 0,9998). El límite de detección fue $0,8 \text{ ng mL}^{-1}$. La selectividad del método se comprobó por la ausencia de picos interferentes al tiempo de retención de BT para cromatogramas blanco. Se obtuvo una RSD de 2,8% para una serie de diez análisis consecutivos DLLME-LC de una disolución estándar acuosa conteniendo 10 ng mL^{-1} BT.

El método se aplicó a la determinación de benfotiamina en diferentes productos nutracéuticos. La principal ventaja del método es que, mientras no se puede llevar a cabo la inyección directa de tiocromo debido a la elevada alcalinidad del extracto, el uso de DLLME proporciona un extracto no-corrosivo de BT y permite obtener un límite de detección más bajo ya que el factor de preconcentración fue cercano a 250. Este es el primer procedimiento limpio y respetuoso con el medio ambiente para la determinación de BT.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que han sido publicados en la revista *Analytical Methods*.

Determination of benfothiamine in nutraceuticals using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography

Analytical Methods 4 (2012) 2759–2763

DOI: 10.1039/c2ay25444a

Publicado en el número especial del 4th EMUNI Research Souk. Cartagena, 17-18 Abril 2012.

La dirección url para esta publicación es:

<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/ay/c2ay25444a#!divAbstract>

ABSTRACT

This paper describes a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) procedure coupled to liquid chromatography (LC) with fluorimetric detection for the determination of benfothiamine (BT). First, the sample was submitted to an enzymatic hydrolysis step using alkaline phosphatase. Then, BT was derivatized by chemical oxidation with ferricyanide at pH 13 to form fluorescent thiochrome. For DLLME, 0.5 mL of acetonitrile (disperser solvent) containing 90 μL of 1,1,2,2-tetrachloroethane (extraction solvent) was rapidly injected into 10 mL of a sample solution containing the derivatized thiochrome and 24% (w/v) sodium chloride, thereby forming a cloudy solution. Phase separation was carried out by centrifugation, and a volume of 20 μL of the sedimented phase was submitted to LC. The mobile phase was a mixture of a 90% (v/v) 10 mM KH_2PO_4 (pH 7) solution and 10% (v/v) acetonitrile at 1 mL min^{-1} . An amide-based stationary phase involving a ligand with amide groups and trimethylsilyl endcapping was used. The calibration graph was obtained using aqueous standards. The method was applied to the determination of benfothiamine in different pharmaceutical products or dietetic supplements. The main advantage of the method is that, while direct injection of thiochrome cannot be carried out due to the high alkalinity of the extract, the use of DLLME permits a lower detection limit and provides a non-corrosive extract of BT. This is the first time that BT has been determined using a clean, environmentally friendly procedure.

Keywords:

Dispersive liquid-liquid microextraction

Liquid chromatography

Fluorimetric derivatization

Benfothiamine

Pharmaceutical products

1. INTRODUCTION

EC legislation includes benfothiamine in the list of substances which can be added to dietetic supplements as a source of nutrients [1]. Benfothiamine (BT) or S-benzoylthiamine O-monophosphate is a synthetic derivative of thiamine (vitamin B₁) which, after absorption, may be dephosphorylated by cells in an enzymatic process, giving liposoluble BT. Its absorption and biodisponibility are higher (5-25 fold) than those of vitamin B₁ and it is used as palliative for thiamine nutritional deficiencies [2] and to inhibit the formation of advanced glycation endproducts (AGE), a property that is especially important for diabetics [3]. The oral dose for adults is 100 mg/day, which can increase to 300 mg/day [4].

Pharmaceutical products contain multiple active ingredients and liquid chromatography (LC) is a powerful analytical technique that can be used as a confirmation method or screening test, allowing drugs and/or their metabolites, excipients, additives and contaminants from the raw material, pharmaceuticals or biological fluids to be determined to ensure quality and safety [5]. The LC methods used for drug development must be validated [6], while the quality standards for pharmaceutical laboratories require the design (DQ), installation (IQ), operation (OQ) and performance (PQ) qualification [7].

Microextraction represents an advance in the miniaturization of analytical techniques [8], being based on the selective extraction of compounds by their physico-chemical characteristics. Liquid-phase microextraction (LPME) includes several miniaturized techniques based on the extraction of the analytes into a liquid phase [8-11]. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), which is based on the use of a ternary solvent system, saves time and decreases the use of organic solvents, favouring its inclusion in the list of clean procedures [12-14]. Liquid-liquid dispersion plays an essential role in the separation processes and reaction systems because the great interfacial area resulting from dispersion improves the

mass transfer and the reaction rate [15]. A small amount of a water-immiscible extraction solvent is dissolved in a water-soluble solvent and is rapidly injected with a syringe into the aqueous sample. The fast injection of the mixture of organic solvents into the water disperses the water-immiscible solvent in the aqueous mass as small micro-drops, from which the target analytes can be rapidly extracted. The enriched organic phase is then separated from the aqueous sample by centrifugation and directly subjected to chromatography.

Benfotiamine has mainly been analyzed using pharmacological methods [16, 17], and very few analytical techniques have been proposed using LC [18, 19]. As regards to the new green sample preparation techniques, DLLME has only been applied for the determination of thiamine and its esters in different types of food [20]. However, no reference has been found to the coupling of LC and DLLME for BT determination.

Consequently, this contribution represents the first study of BT using green chemistry principles to develop a miniaturized sample treatment procedure based on DLLME coupled to reversed-phase LC. Detection was performed using an enzymatic hydrolysis step followed by precolumn fluorescence derivatization involving oxidation to the highly fluorescent thiochrome.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. STANDARDS AND REAGENTS

BT (S-Benzoylthiamine O-monophosphate) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The stock solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in pure water and stored in amber bottles in darkness at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Working standard solutions were freshly prepared in pure water and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. For the enzymatic hydrolysis, alkaline phosphatase (ALKP) from bovine intestinal mucous (Sigma-Aldrich) was dissolved in 10 mM Tris Buffer solution (pH 7.4). Potassium ferricyanide, sodium hydroxide, sodium chloride, potassium dihydrogen phosphate and phosphoric acid (85%) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

Chromatographic quality 1,1,2,2-tetrachloroethane and acetonitrile were obtained from Sigma-Aldrich. The water used was previously purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. INSTRUMENTATION

The LC system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature with a flow-rate of 1 mL min⁻¹. The solvents were degassed using an on-line membrane system (Agilent 1100, G1379A). The fluorescence detector was an Agilent FLD (Agilent 1100, G1321A) operating at an excitation wavelength of 375 nm and an emission wavelength of 438 nm. The analytical column used for the reversed-phase technique was a Discovery RP-AmideC₁₆ (15 cm x 0.46 cm x 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Aliquots of 20 µL were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA).

To filter the samples, OlimPeak PVDF (polyvinylidene fluoride) filters (0.45 µm) (Teknokroma, Barcelona, Spain) were used. A D-78532 centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany) was used at the maximum speed supported by the conical glass tubes, 4000 rpm. The samples were stirred using a magnetic stirrer IKA RH-KT/C (IKA, Staufen, Germany). A laboratory-made system built in the Central Laboratory Service of the University of Murcia and consisting of a drilled block equipped with an electronic temperature control system was used to heat the tubes for hydrolysis.

2.3. SAMPLES

The samples were different type of pharmaceutical products or dietetic supplements commercially supplied. Samples were stored at room temperature and all operations were performed in subdued light.

2.4. ANALYTICAL PROCEDURE

Samples were first submitted to an enzymatic hydrolysis step. Amounts of 0.02-0.5 g were weighed, diluted to 100-mL in a volumetric flask and filtered using a PVDF 0.45 μm filter. An aliquot of 100 μL was introduced into an amber 15-mL screw cap glass tube and 1 mL of 10 mM KH_2PO_4 buffer solution (pH 7), 25 units of ALKP and 3 mL of pure water were added. The sample was incubated in a block with magnetic stirring at 55 $^\circ\text{C}$ for 2 h in the absence of light. Then, the sample was cooled and transferred to a 10-mL volumetric flask. For DLLME, the 10 mL aliquot submitted to enzymatic hydrolysis was placed in a 15-mL screw cap glass tube with conical bottom. Volumes of 2 mL of a 2 M sodium hydroxide solution (pH 13) and 50 μL of 0.01 M potassium ferricyanide were added for derivatization and the mixture was vortex shaken. Sodium chloride was added to reach a 24% m/v concentration. Then, 0.5 mL of acetonitrile (disperser solvent) containing 90 μL of 1,1,2,2-tetrachloroethane (extraction solvent) was rapidly injected into the sample solution using a micropipette, and the mixture was again gently shaken manually for several seconds. A cloudy solution consisting of very fine droplets of tetrachloroethane dispersed through the sample solution was formed, and the derivatized thiochrome was extracted in the fine droplets. After centrifugation for 1 min at 4000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (the volume was about 40 μL). Twenty microlitres of the sedimented phase were removed with a microsyringe and injected into the LC using as mobile phase a 90/10 (v/v) mixture of 10 mM KH_2PO_4 (pH 7)/acetonitrile at a flow-rate of 1 mL min^{-1} .

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. OPTIMIZATION OF ENZYMATIC HYDROLYSIS

For the determination of BT, a prior enzymatic hydrolysis step was necessary to achieve dephosphorylation of the phosphate ester using alkaline

phosphatase (ALKP), which is one of the [hydrolase enzymes](#) responsible for removing phosphate groups from many types of molecules. The parameters influencing the hydrolysis, namely pH, enzyme and substrate concentration, and both the temperature and time of the incubation step, were optimized.

When the effect of pH was studied between pH 6 and 10, the hydrolysis was found to be most effective at pH 7 for BT, both lower and higher values leading to a decrease in the fluorescence signal. The optimal enzyme concentration was studied between 5 and 30 units. Fig. 1A shows that the sensitivity continuously increased up to 25 units, above which the signal decreased. This concentration was therefore selected. When the effect of substrate concentration was studied, the signal increased for higher concentrations of BT; however, linearity was also achieved for concentrations lower than $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The incubation temperature was varied from 30 to 70 °C. The signal intensity increased up to 55 °C and then rapidly decreased, so that this value was chosen. Finally, the incubation time was also an important factor affecting the enzymatic hydrolysis. The effect of this variable was studied between 1 and 8 h (Fig. 1B), a time of 2 h being chosen as a compromise between maximum sensitivity and total analysis time.

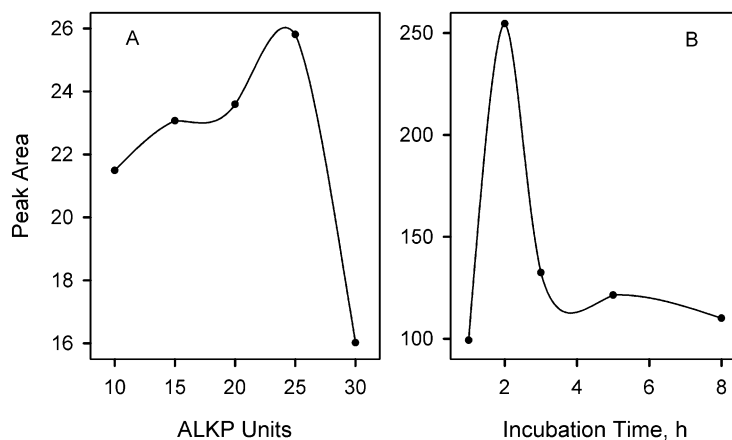


Fig. 1. Influence of the enzyme concentration (A) and the incubation time (B) on the enzymatic hydrolysis step. Concentration of BT, 100 ng mL^{-1}

3.2. DERIVATIZATION REACTION

The oxidation of BT to thiochrome is a very efficient, simple and fast derivatization reaction that produces a highly fluorescent derivative. An alkaline medium is needed for the reaction, and so the pH effect was studied in the 6-13 range using a sodium hydroxide solution. The sensitivity continuously increased up to pH 13 (obtained by adding 2 mL of 2 M NaOH solution), which was selected. The influence of the oxidant concentration was studied in the 10^{-5} - 5×10^{-4} M range. The fluorescence increased to reach a maximum at 2×10^{-4} - 7×10^{-4} M and decreased above this concentration; a 5×10^{-4} M concentration was selected.

3.3. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The ionic character of BT allows its interaction with the silanol groups of the conventional ODS columns, leading to tailing peaks. Separation using the amide-based stationary phase with trimethylsilyl endcapping is advantageous with respect to other reversed-phases because the peaks are much narrower and column life is longer due to the simplicity of the mobile phase, avoiding the need for ion-pairing reagents. The optimal composition of the mobile phase was studied using several phosphate buffers at pH values ranging from 4 to 8 and phosphate concentrations in the 10-50 mM range. The addition of acetonitrile was assayed in an attempt to decrease the retention of BT. The best separation was achieved using a mixture (90% v/v) of 10 mM KH_2PO_4 buffer solution (pH 7) and 10% v/v acetonitrile. The flow-rate was 1 mL min^{-1} .

3.4. OPTIMIZATION OF DLLME PARAMETERS

The parameters affecting the DLLME procedure, namely the type and volume of both the extraction and disperser solvents, the addition of salt and the centrifugation time, were optimized. For this purpose, 10 mL of an aqueous solution or a sample containing 100 ng mL^{-1} BT and the derivatized reagents were submitted to DLLME, and 20 μL of the settled phase was injected into the LC. In

this way, a 10 mL sample volume was concentrated into a 40 μL fraction, which implied a preconcentration factor close to 250.

The extraction solvent must have a higher density than water, low solubility in the same, a high extraction capacity and good chromatographic behaviour. Thus, the halogenated hydrocarbons carbon tetrachloride, chloroform, dichloromethane and 1,1,2,2-tetrachloroethane were selected because of their high density, using 100 μL of the extraction solvent and 0.5 mL acetone as the disperser solvent. The sedimented phase was not appreciable when using dichloromethane due to its high solubility in water. Fig. 2A shows the results obtained for the rest of the solvents, the best extraction efficiency being obtained using 1,1,2,2-tetrachloroethane as extraction solvent.

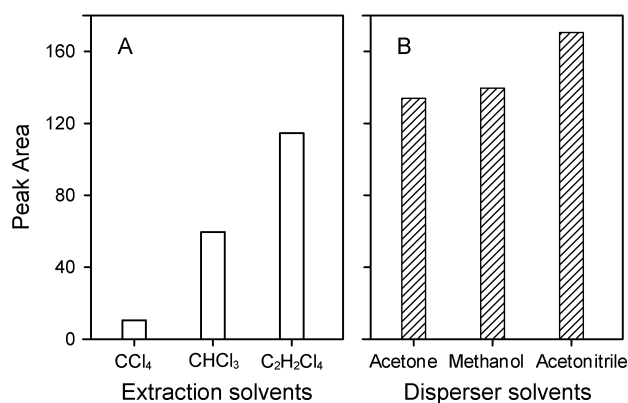


Fig. 2. Influence of different extraction solvents (A) and disperser solvents (B) on the determination of BT by DLLME. Concentration of BT, 100 ng mL^{-1}

The disperser solvent must be miscible with both the extraction solvent and the aqueous phase. Acetone, methanol and acetonitrile were assayed by rapidly injecting 0.5 mL of each disperser containing 90 μL of $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$ into the aqueous solution. The extraction efficiency was higher when using acetonitrile (Fig. 2B), which was therefore selected.

The volume of the extractant solvent strongly affects the preconcentration factor (PF). At higher volumes, the sedimented phase obtained by centrifugation increases its volume, leading to a lower PF. Thus, the optimal volume must ensure high PF values and provide a sufficient volume of the sedimented phase for LC

analysis. The influence of the $C_2H_2Cl_4$ volume was studied in the 40 to 120 μL range. Peak areas increased with increasing extraction solvent volumes in the range 40-90 μL . On further increasing the volume of extraction solvent, peak areas decreased as a consequence of dilution, and so 90 μL was selected (the volume of the sedimented phase was $40 \pm 10 \mu L$ after extraction and centrifugation).

The volume of the disperser solvent directly influences the formation of the cloudy solution, the degree of dispersion of the extraction solvent in the aqueous phase and, consequently, the extraction efficiency. The variation of this volume modifies the volume of the sedimented phase. Thus, the volumes assayed for the disperser solvent were 0.25-2 mL, containing, in all cases, the extraction solvent volume at the previously optimized value. The extraction efficiency increased up to 0.5 mL and then decreased with higher volumes, since the solubility of thiochrome probably increases in water, and so the extraction efficiency decreases. Highest sensitivity was attained with 0.5 mL of acetonitrile.

The effect of adding salt to the sample has been extensively evaluated because salt may increase the coefficient of partition of the analytes to the organic phase. Sodium chloride was added to the aqueous phase to increase its ionic strength, thus reducing the solubility of thiochrome and increasing the solubility in the organic phase. The effect of the amount of sodium chloride on the extraction efficiency was studied between 0 and 24% m/v. Peak area increased with increasing salt concentration throughout the range studied and a 24% m/v concentration was selected.

Extraction time in DLLME is defined as the time elapsing between injecting the mixture of disperser and extraction solvents and the time the centrifugation step is started. As expected, no differences in sensitivity were attained in the interval 30 s – 5 min, demonstrating that DLLME is practically time-independent, which is one of its most important advantages. Therefore, the mixture was shaken for a few seconds and then centrifuged, the centrifugation step being the most time-consuming. Nevertheless, the centrifugation time and speed, necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase were evaluated. When the centrifugation time was varied between 1 and 4 min, the extraction

efficiency continuously decreased, and so a time of 1 min was selected. The centrifugation speed was modified in the 1000-6000 rpm range and sensitivity increased up to 4000 rpm, and decreased thereafter. Thus, the maximum speed recommended for the glass conic tubes used, 4000 rpm, was selected.

3.5. COMPARISON WITH OTHER LPME PROCEDURES

The preconcentration procedure using DLLME was compared with other LPME methods. Thus, the use of directly suspended drop microextraction (DSDME), was assayed using a 10 mL aliquot containing the derivatized thiochrome while stirring to give a vortex. Following this, 100 μ L of an extraction solvent (undecanone, 1-undecanol or decanol) were added and the mixture was stirred for 30 min. The microdroplet of organic solvent suspended on the top centre of aqueous sample was removed with a microsyringe and an aliquot of 20 μ L was injected into the LC. Best results were obtained using 1-undecanol, but the extraction efficiency was lower and the extraction time was longer than when using DLLME. On the other hand, the ultrasound assisted emulsification microextraction (USAEME) was also tried using a 10 mL aliquot containing the derivatized thiochrome, to which 100 μ L of the extraction solvent (1-undecanol or tetrachloroethane) were added, submitting the mixture to an ultrasonic probe for 2 min. A solution consisting of very fine droplets of tetrachloroethane dispersed into the sample solution was formed. After centrifugation for 1 min at 4000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube and 20 μ L were removed with a microsyringe and injected into the LC. The organic drop obtained under these conditions was very small and so the USAEME technique was also discarded. Consequently, optimal results were obtained using the DLLME procedure.

3.6. ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, accuracy and precision. The calibration curve using DLLME was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area *versus* benfothiamine concentration, using six levels in duplicate. The calibration parameters were ordinate 1.24 ± 0.048 , slope $0.287 \pm 0.003 \text{ mL ng}^{-1}$ and correlation coefficient 0.9998. The limit of detection (LOD, calculated as three times the standard error of the estimate) was 0.8 ng mL^{-1} . The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the BT elution time for blank chromatograms. No matrix compounds existed that might give a false positive signal in the blank samples. The repeatability was calculated by using the relative standard deviation from a series of ten consecutive DLLME-LC analyses of an aqueous standard solution containing 10 ng mL^{-1} BT. A RSD value of 2.8 % was obtained.

The matrix effect was studied by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different pharmaceutical products, obtained by plotting concentration (at six different levels) against peak area and following linear regression analysis. A statistical paired t-test was carried out, and the “p” values obtained were in all cases higher than 0.05. Consequently, the matrix effect was discarded and calibration can be carried out using aqueous standards.

3.7. ANALYSIS OF SAMPLES

Benfothiamine is used as a source of vitamin B₁ in pharmaceutical products and dietetic supplements, including tablets, capsules, chewables, effervescent tablets and liquid products. The method of incorporation is determined by the manufacturer as the most appropriate for each particular product. The proposed method was applied to the determination of BT in three pharmaceutical products of different characteristics. Table 1 shows the results obtained by the DLLME-LC

procedure, as well as the contents declared by the manufacturer. To test the accuracy of the method, the pharmaceuticals were fortified and analyzed, taking into account the known BT contents for these samples. An average recovery \pm SD (n=9) of 96 ± 8 was obtained.

Table 1 Benfothiamine content in nutraceuticals

Sample ^a	BT found ^b , mg/capsule	BT declared, mg/capsule
Terraternal BT	189 ± 12	200
Smart BT	80.1 ± 0.2	80
Rehab BT	12.5 ± 0.5	12.5

^b Mean \pm standard deviation, n=3

^a Nutraceuticals contained among others: vitamin C, aminoacids, curcumine, pomegranate extract, ginger root, rice flour, cellulose, magnesium stearate, silicon dioxide

Figure 3 shows typical chromatographic profiles obtained for two pharmaceuticals in the selected conditions. Similar chromatograms were obtained for the other samples. BT was identified by comparing the retention data obtained for the standard, the samples and the spiked samples under identical conditions. Retention times were in very good agreement for the different samples. The peaks were also identified using the detector to record the fluorescence spectra continuously while the analyte passed through the flow cell, thus confirming the identity and purity of the peaks.

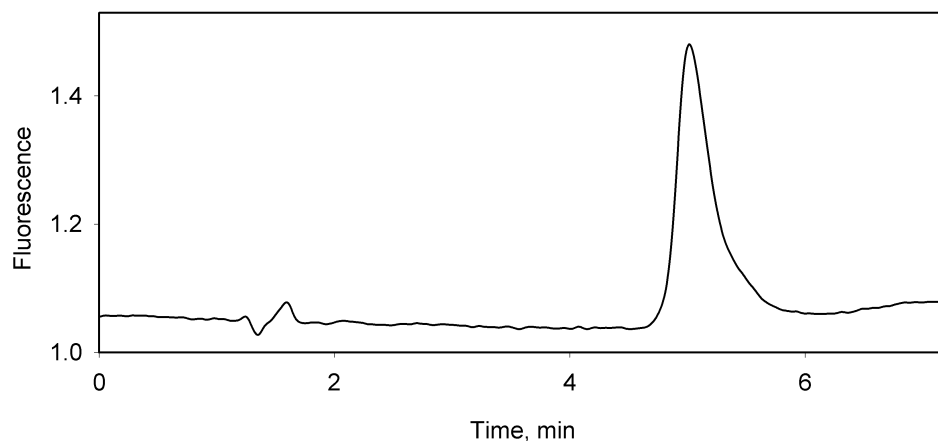


Fig. 3. Elution profiles obtained for two pharmaceutical products by DLLME-LC-Fluorescence

4. CONCLUSION

The determination of benfothiame in pharmaceutical products can be carried out using a miniaturized preconcentration procedure based on DLLME coupled to LC with fluorescence detection. Very low quantities of organic solvent were needed, and so the procedure can be regarded as environmentally friendly. Furthermore, it avoids the inconvenience of the direct injection of thiocrome, which cannot be carried out due to the high alkalinity of the extract. The absence of a matrix effect allows calibration using aqueous standards, and low detection limits were obtained.

Acknowledgements

The authors acknowledge to Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10) and to the Spanish MICINN (Project CTQ2009-08267/BQU) for financial support. M. Bravo-Bravo acknowledges a fellowship from Fundación Séneca, CARM.

REFERENCES

- [1] Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council on the approximation of the laws of the Member States relating to food supplements. Application for submission of a nutritional substance directive 2002/46/EC Article 4(6). June 6, 2005.
- [2] A.G. Gilman, T.W. Rall, A.S. Nies, P. Taylor, Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 8th ed., p. 1532, Pergamon Press, New York, USA, 1990.
- [3] P. Balakumar, A. Rohilla, P. Krishan, P. Solairaj, A. Thangathirupathi, The multifaceted therapeutic potential of benfothiamine, *Pharmacol. Res.* 61 (2010) 482-488.
- [4] **EVM (Expert Group on Vitamins and Minerals), Revised Review of Thiamin, Food Standards Agency, UK, 2002.**
- [5] R. Velagaleti, P. Burns, M. Gill, Analytical support for drug manufacturing in the United States: from active pharmaceutical ingredient synthesis to drug product shelf life, *Drug Inform. J.* 37 (2003) 407-438.
- [6] G.A. Shabir, Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 57-66.
- [7] S. Levin, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the pharmaceutical analysis, Medtechnica, Israel, 2010.
- [8] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, Critical review on recent developments in solventless techniques for extraction of analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809-833.
- [9] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817-1821.
- [10] D.C. Wood, J.M. Miller, I. Christ, Miniaturized approaches to conventional liquid-liquid extraction, *LC-GC Eur.* 17 (2004) 573-579.

- [11] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339-364.
- [12] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
- [13] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 1-15.
- [14] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
- [15] B. Takahiko, K. Fumio, N. Susumu, T. Katsuroku, Study of drop coalescence behaviour for liquid-liquid extraction operation, *Chem. Eng. Sci.* 55 (2000) 5385-5391.
- [16] P. Balakumar, R. Sharma, M. Singh, Benfotiamine attenuates nicotine and uric acid-induced vascular endothelial dysfunction in the rat, *Pharm. Res.* 58 (2008) 356-363.
- [17] G. Sánchez-Ramírez, N. Caram-Salas, H. Rocha-González, G. Vidal-Cantu, R. Medina-Santillan, G. Reyes-García, V. Granados-Soto, Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats, *Eur. J. Pharm.* 530 (2006) 48-53.
- [18] H. Salem, LC simultaneous determination of thioctic acid, benfotiamine and cyanocobalamin in thiotacid compound capsules, *Chromatographia* 72 (2010) 327-330.
- [19] T. Hoshino, M. Senda, T. Hondo, M. Saito, S. Tohei, Application of photodiode array ultraviolet detector to unresolved peak analysis, *J. Chromatogr. A* 316 (1984) 473-486.
- [20] P. Viñas, I. López-García, M. Bravo-Bravo, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods, *Anal. Bioanal. Chem.*, in press.



CAPÍTULO IV

UNA EVALUACIÓN DE LOS CONTENIDOS DE *CIS-*
Y *TRANS*-RETINOL EN ZUMOS USANDO
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-
LÍQUIDO ACOPLADA A CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE

Las vitaminas liposolubles se consumen junto con alimentos que contienen grasa. Se disuelven en grasas y aceites. Se almacenan en el hígado y en los tejidos grasos, y no es necesario tomarlas todos los días por lo que es posible, tras un consumo suficiente, subsistir una época sin su aporte. Si se consumen en exceso (más de 10 veces las cantidades recomendadas) pueden resultar tóxicas.

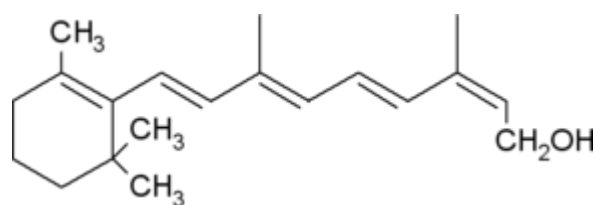
Las vitaminas liposolubles son: Vitamina A (Retinol), Vitamina D (Calciferol), Vitamina E (Tocoferol) y Vitamina K (Antihemorrágica). Estas vitaminas no contienen nitrógeno, son transportadas en la grasa de los alimentos que la contienen y son bastante estables frente al calor. Se absorben en el intestino delgado con la grasa alimentaria y no se excretan en la orina.

Algunas bebidas funcionales en el sector de las bebidas se comercializan como zumos ACE. Son bebidas basadas en zumos de frutas y vegetales a las que se añaden las vitaminas antioxidantes A, C y E [1]. Los productos alimenticios enriquecidos con vitaminas se caracterizan por presentar beneficios para la salud y contra la oxidación y el envejecimiento [2]. Todos los antioxidantes principales se encuentran en alimentos derivados de las plantas, lo que explica la necesidad de incluir frutas, legumbres, vegetales y cereales en la dieta [3]. Cuando un producto alimenticio es enriquecido con vitaminas, debe establecerse un programa de control de calidad para asegurar que el producto contiene los niveles declarados. Sin embargo, un exceso de algunas vitaminas puede tener efectos perjudiciales.

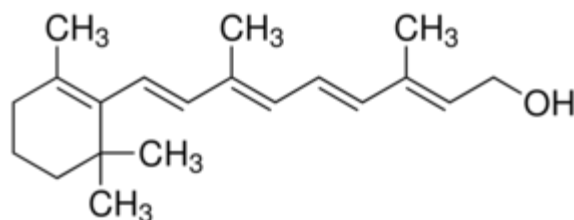
La vitamina A juega un papel esencial en la visión, y también actúa en el cuerpo como un antioxidante, proporcionando protección contra el riesgo de cáncer. Hay dos fuentes de vitamina A en la dieta. Las formas activas se obtienen de los productos animales e incluyen retinal, retinol y ésteres de retinol, cuya hidrólisis origina retinol, que puede existir en la configuración *trans*- o *cis*-. Los precursores, también conocidos como provitaminas, se obtienen de frutas y

vegetales conteniendo pigmentos, conocidos como carotenoides, siendo el más conocido de ellos el β -caroteno [4]. Por esta razón, las cantidades de vitamina A se miden en equivalentes de retinal (RE).

Las dos formas químicas *cis*- y *trans*- del retinol se muestran en la Figura IV.1.



13-*cis*-Retinol



all-*trans*-Retinol

Figura IV.1. Formas químicas del retinol

Ambas formas químicas exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible y además presentan fluorescencia natural. Los máximos de excitación se encuentran a 325 nm y de emisión a 480 nm.

El retinol puro es extremadamente sensible a la oxidación y, cuando se prepara como suplemento de la dieta, se estabiliza como los derivados ésteres. Las preformas de la vitamina A son nutrientes de elevado potencial tóxico cuando se consumen en exceso [5]. La Comisión EU [6] ha establecido el requisito relativo al nutriente vitamina A en zumos vegetales con un contenido final en el producto no inferior a 100 mg RE/100 kcal (anexo II). Los compuestos permitidos para ser

añadidos como vitamina A son retinol, acetato de retinol, palmitato de retinol y β -caroteno (anexo IV). El contenido máximo de vitamina A en productos basados en cereales y alimentos infantiles es 180 mg RE/100 kcal (anexo VI).

La vitamina A se ha analizado fundamentalmente en muestras de alimentos por LC usando diferentes detectores, tales como DAD, fluorescencia, electroquímico o MS [7–29]. A veces se ha analizado junto con otras vitaminas liposolubles.

La matriz compleja de las muestras de alimentos y las bajas concentraciones de vitaminas esperadas hacen necesario incluir etapas de aislamiento y preconcentración en el procedimiento analítico. Los métodos clásicos de análisis de vitamina A incluyen saponificación y/o extracción con disolventes orgánicos de polaridad relativamente baja, como en el caso de los métodos estandarizados de análisis [30]. Sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo y también requieren cantidades grandes de disolventes orgánicos, ya que las muestras primero son saponificadas usando metanol, y después son extraídas con el disolvente orgánico y este procedimiento se repite 3–4 veces. Los extractos combinados se lavan con agua y entonces se evaporan.

Se han usado algunas técnicas de extracción innovadoras, tales como extracción en punto de nube [31] y extracción asistida por microondas [32] para la preconcentración de vitaminas. LPME incluye varias técnicas miniaturizadas basadas en la extracción de analitos en una fase líquida usando cantidades muy pequeñas de disolventes orgánicos [33]. DLLME es una técnica muy simple y rápida que usa un volumen muy pequeño de un disolvente extractante y se ha aplicado con éxito a la extracción y determinación de compuestos orgánicos en muestras acuosas, proporcionando factores de enriquecimiento elevados [34]. Con relación a las nuevas técnicas verdes de preparación de muestra, no se ha encontrado ninguna referencia a la preconcentración de retinol usando DLLME, o al acoplamiento de LC y DLLME para la determinación de la vitamina.

El Capítulo IV de esta Tesis Doctoral describe un método para acoplar DLLME y LC en fase normal (NP-LC) con detección fluorescente para la determinación de vitamina A con vistas a desarrollar una técnica verde de preparación de la muestra.

Se han optimizado los parámetros que afectan a la DLLME, incluyendo la naturaleza y volumen de ambos disolventes extractante y dispersante, la adición de sal y el tiempo y velocidad de la etapa de centrifugación. La muestra se saponificó de acuerdo con la Norma Europea para convertir todas las formas de la vitamina A en retinol. Para la microextracción, se sitúan 8 mL de agua en un tubo de vidrio con fondo cónico y se inyecta rápidamente con una jeringa la muestra saponificada consistente en 2 mL del extracto metanólico conteniendo 100 μ L de tetracloroetano, formando una disolución turbia. La separación de fases se llevó a cabo por centrifugación, y se analizó un volumen de 20 μ L de la fase sedimentada por NP-LC. El factor de enriquecimiento, calculado como la relación entre las pendientes de DLLME-LC y LC directa fue 50 ± 3 .

Se evaluó el efecto matriz para diferentes muestras de zumos y se concluyó que la cuantificación de la muestra puede llevarse a cabo por calibración con estándares acuosos, cuando los estándares sean sometidos también a saponificación.

El método propuesto se aplicó a la determinación de ambos isómeros *cis*- y *trans*-retinol en zumos comerciales de diferentes tipos. Los valores de la precisión intradia e interdia fueron menores del 6% en términos de RSD. El método se validó usando dos materiales de referencia certificados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que han sido publicados en la revista *Talanta*.

An evaluation of *cis*- and *trans*-retinol contents in juices using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorimetric detection

Talanta 103 (2013) 166–171

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.027>

Publicado en el número especial del XXIII RNE-VII CIE (XXIII Reunión Nacional-VII Congreso Ibérico de Espectroscopía). Córdoba, 17-20 Septiembre 2012.

La dirección url para esta publicación es:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914012008478>

ABSTRACT

This study describes a method for coupling dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and normal-phase liquid chromatography (NP-LC) with fluorescence detection for vitamin A determination with the view to developing a new green sample preparation technique. Parameters affecting DLLME, including the nature and volume of both extractant and disperser solvents, salt addition and time and speed of the centrifugation step, were optimized. The sample was saponified according to European Standards to convert all forms of vitamin A to retinol. For microextraction, 8 mL water were placed in a glass tube with conical bottom and the saponified sample consisting of 2 mL of the methanolic extract containing 100 μL tetrachloroethane was rapidly injected by syringe, thereby forming a cloudy solution. Phase separation was performed by centrifugation, and a volume of 20 μL of the sedimented phase was analyzed by NP-LC. The enrichment factor, calculated as the ratio between the slopes of DLLME-LC and direct LC, was 50 ± 3 . The matrix effect was evaluated for different juice samples, and it was concluded that sample quantification can be carried out by aqueous calibration when the standards are also submitted to saponification. The proposed method was applied for determining both *cis*- and *trans*-retinol isomers in commercial juices of different types. The intraday and interday precisions were lower than 6% in terms of relative standard deviation. The method was validated using two certified reference materials.

Keywords:

Dispersive liquid-liquid microextraction

Liquid chromatography

Saponification

cis-Retinol

trans-Retinol

Fruit juices

1. INTRODUCTION

Some functional foods in the drinks sector are marketed as so-called ACE juices. These are soft drinks based on fruit and vegetable juices to which the antioxidant vitamins A, C and E have been added [1]. Food products enriched with vitamins are assumed to present health benefits against oxidation and the ageing [2]. All the main antioxidants are found in plant foods, which explains the need to include fruits, legumes, vegetables and cereals in the diet [3]. When a food product is enriched with vitamins, a quality control programme must be established to ensure that the product contains the declared levels. However, an excess of several vitamins may have harmful effects.

Vitamin A plays an essential role in vision, and also acts in the body as an antioxidant, providing protection against the risk of certain cancers. There are two sources of dietary vitamin A. Active forms are obtained from animal products and include retinal, retinol and retinyl esters, whose hydrolysis results in retinol, which may exist in *trans*- or *cis*-configuration. Precursors, also known as provitamins, are obtained from fruits and vegetables containing pigments, known as carotenoids, the most well-known being beta-carotene [4]. For this reason, amounts of vitamin A are measured in retinal equivalents (RE). Pure retinol is extremely sensitive to oxidization and, when prepared as a dietary supplement, it is stabilized as the ester derivatives. Preform vitamin A is a nutrient of high toxic potential when consumed in excess [5]. The EU Commission [6] established the requisite relative to the nutrient vitamin A in vegetable juices as a final content in the product no lower than 100 µg RE/100 kcal (annex II). The compounds permitted to be added as vitamin A are retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate and β-carotene (annex IV). The maximum content of vitamin A in cereal-based products and baby foods is 180 µg RE/100 kcal (annex VI).

Vitamin A has mainly been analyzed in food samples by liquid chromatography (LC) using different detectors, such as diode array, fluorescence, electrochemical or mass spectrometry [7-29]. It was sometimes analyzed together with other liposoluble vitamins. The complex matrix of food samples and the low vitamin concentrations expected mean it is necessary to include isolation and preconcentration steps in the analytical procedure. Saponification and/or solvent extraction in relatively low polarity organic solvents, as in the case of the Standardized Method of analysis [30], are classical methods of vitamin A analysis. However, these methods are tedious and also require large amounts of organic solvents, as the samples are first saponified using methanol, before being extracted with organic solvents and the procedure is repeated 3-4 times. The combined extracts are washed with water and then evaporated.

Some innovative extraction techniques, such as cloud point extraction [31] and microwave-assisted extraction [32] have been used for the preconcentration of vitamins.

Liquid-phase microextraction (LPME) includes several miniaturized techniques based on the extraction of analytes in a liquid phase using very low amounts of organic solvents [33]. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a very simple and rapid technique which uses very low volumes of extraction solvent and has successfully been applied to the extraction and determination of organic compounds in aqueous samples, providing high enrichment factors [34]. Among its advantages is the absence of cross-memory effects and the fact the analyses take less time. A small amount of a water-immiscible extraction solvent is dissolved in a water-soluble solvent and is then rapidly injected with a syringe into the aqueous sample. The fast injection of the mixture of organic solvents into the water disperses the water-immiscible solvent in the aqueous mass as small micro-drops, from which the target analytes can be rapidly extracted. The enriched organic phase is then separated from the aqueous sample by centrifugation and directly subjected to chromatography.

As regards the new green sample preparation techniques, no reference has been found to the preconcentration of retinol using DLLME, or to the coupling of LC

and DLLME for the vitamin determination. The present study describes a fast and direct method for the sensitive determination of the *cis*- and *trans*-retinol isomers in fruit juices using DLLME-LC-Fluorescence.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTS

All-*trans*-retinol was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A stock solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) was prepared in hexane and stored in amber vials at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Working standard solutions were freshly prepared in hexane and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ascorbic acid, potassium hydroxide and hydrochloric acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and Merck (Darmstadt, Germany). Chromatographic quality ethanol, methanol, *n*-hexane, 2-propanol and 1,1,2,2-tetrachloroethane were obtained from Sigma. Water used was previously purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. INSTRUMENTATION

The LC system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature with a flow-rate of 2 mL min^{-1} . The solvents were degassed using an on-line membrane system (Agilent 1100, G1379A). The fluorescence detector was an Agilent FLD (Agilent 1100, G1321A) operating at an excitation wavelength of 325 nm and an emission wavelength of 480 nm. The analytical column used for the normal-phase technique was an LiChrospher Si 60 ($25 \text{ cm} \times 0.4 \text{ cm} \times 5 \mu\text{m}$) (Agilent). The mobile phase was a 98:2 (v/v) *n*-hexane:2-propanol mixture. Aliquots of $20 \mu\text{L}$ were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA).

To filter the samples, PVDF filters ($0.45 \mu\text{m}$) (Teknokroma, Barcelona, Spain) were used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge was used

at a speed near to the maximum supported by the conical glass tubes, 3000 rpm. The ultrasonic processor UP 200 H (Dr. Hielscher, Germany) was used for the experiments carried out using the ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME) technique.

2.3. CONCENTRATION AND PURITY TEST FOR VITAMIN A

The mass concentration of all-*trans*-retinol was calculated considering a molar absorptivity value of $1830 \text{ mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$. For an additional check, the absorbance of the standard solution at different wavelengths was measured with 2-propanol as reference. As the ratios between molar absorptivity values at each wavelength and 325 nm did not exceed the permitted values of 0.602 (300 nm), 0.452 (350 nm) and 0.093 (370 nm), the standard substance is suitable for use. On the other hand, the purity test was carried out by injecting a standard solution of all-*trans*-retinol in n-hexane into the LC and calculating the correction factor for purity (P) using the ratios of the peak area with the standard solution and the sum of both peak areas. Values for P were 0.9960 and 0.0040 for all-*trans*-retinol and 13-*cis*-retinol, respectively. Retention times were 4.61 min for 13-*cis*-retinol and 5.76 min for all-*trans*-retinol. Quantification of *cis*-retinol in the juices was carried out considering a value of $1686 \text{ mol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ for the molar absorptivity of this compound [30].

2.4. SAMPLES AND SAPONIFICATION PROCEDURE

The samples were different type of juice enriched with vitamin A (ACE juices) containing orange, pineapple, pear, apple-mango, banana-apple and multifruits, soft orange drinks, milk-containing fruit juices and concentrated fruit juices with milk. The method was validated using two reference materials, an infant/adult nutritional formula SRM 1849a supplied by the National Institute of Standards and Technology (NIST) and whole milk powder ERM[®]-BD600 supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM).

Samples were submitted to a saponification procedure, as described by the European Standard Committee [30]. All operations were performed in subdued light. Amounts of 0.2-2 mL were measured (depending of the content of the vitamin) and 0.25 g of ascorbic acid, 50 mL of methanol and 5 mL of potassium hydroxide solution (50 g/100 mL) were added. Saponification was carried out in the absence of light, at room temperature overnight (approximately 16 h). Then, the pH of the mixture was adjusted to 6.5-7 using 37 % hydrochloric acid. Aliquots were filtered using 0.45 μm PVDF filters for subsequent DLLME-LC, using 2 mL of the methanolic extract containing 100 μL tetrachloroethane. The certified reference materials were analyzed in the same way but using 50 mg of the sample. All samples were saponified in duplicate.

2.5. DLLME PROCEDURE

For DLLME, 8 mL water were placed in a 15-mL screw cap glass tube with conical bottom. Then, 2 mL of the methanolic extract from the saponified standard solution or juice sample (dispersive solvent) containing 100 μL of tetrachloroethane (extractant solvent) was rapidly injected into the water solution using a micropipette, and the mixture was again gently shaken manually for several seconds. A cloudy solution consisting of very fine droplets of tetrachloroethane dispersed through the sample solution was formed, and retinol was extracted into the fine droplets. After centrifugation for 2 min at 3000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (volume about 40 ± 10 μL). Twenty microlitres of the sedimented phase were removed with a microsyringe and injected into the NP-LC.

2.6. RECOVERY ASSAYS

Juice samples free of vitamin A were enriched at two concentration levels, 5 and 25 ng mL^{-1} . The spiked samples were set aside for 1 h in the closed vessels

and submitted to the above described saponification and preconcentration procedures. Samples were analyzed in duplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The normal-phase technique was selected for the separation using a LiChrospher Si 60 analytical column. The mobile phase was selected according to the European Standard [30]. Under these conditions, retention times were 4.61 min for 13-*cis*-retinol and 5.76 min for all-*trans*-retinol. The flow-rate was 2 mL min⁻¹.

3.2. DLLME PARAMETERS

The parameters affecting the DLLME procedure, the extraction and disperser solvents, as well as their volumes, the addition of salt, pH and both the speed and time of the centrifugation step, were optimized. For this purpose, an aqueous standard solution or a diluted juice sample (2 mL saponified juice and 8 mL water) containing analyte concentrations of about 20 ng mL⁻¹ were used and 20 µL of the settled phase was injected into the LC.

The extraction solvent must have the following characteristics: high extraction capability, a higher density than water, low solubility in water and good chromatographic behaviour. Several solvents with a lower density than water (decanol, 1-undecanol and 2-octanone) were tested, but extraction was almost negligible for all these solvents. When extraction solvents of higher density than water were assayed, well-defined settled volumes were recovered with 1,1,2,2-tetrachloroethane, chloroform and carbon tetrachloride, using 100 µL of the extraction solvent and 0.5 mL methanol as the disperser solvent. Values for peak areas were, respectively, 18.4, 6.4 and 3.3. The sedimented phase was not discernible when using dichloromethane due to its high solubility in water. The best extraction efficiency was obtained using tetrachloroethane as extraction solvent.

The influence of the $C_2H_2Cl_4$ volume was first studied in the 50 to 110 μL range for a 20 ng mL^{-1} aqueous standard solution. Volumes of 50-60 μL led to very small volumes for the sedimented organic drop. Fig. 1A shows that peak areas increased with increasing extraction solvent volumes from 80 to 90 μL . Any further increase in the volume of the extraction solvent led to the peak areas decreasing as a consequence of dilution, and so 90 μL appeared the most appropriate volume for the aqueous solution (the volume of the sedimented phase was $40 \pm 10\ \mu L$ after extraction and centrifugation). These experiments were repeated using the diluted juice sample (2 mL saponified juice and 8 mL water) spiked with 20 ng mL^{-1} retinol. Fig. 1B shows that in this case the volume of the sedimented phase was too low for extractant volumes below 100 μL , while the sensitivity decreased for higher volumes. Therefore, a 100 μL extractant volume was selected, which also permitted to obtain a volume of the sedimented phase of $40 \pm 10\ \mu L$ for the juice sample.

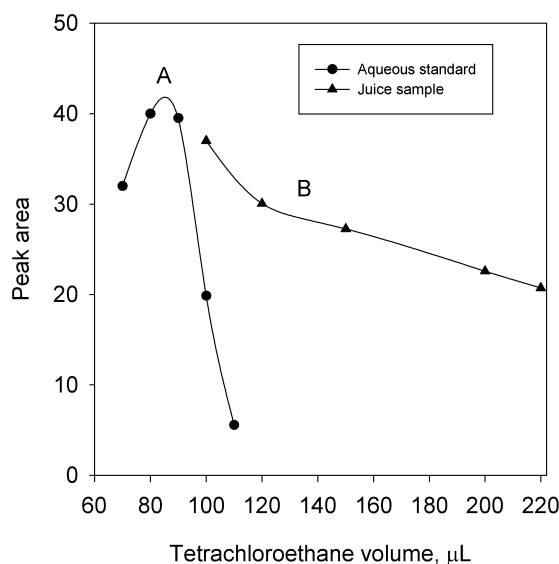


Fig. 1. Influence of the volume of tetrachloroethane on the peak area of all-*trans*-retinol by DLLME-LC for (A) an aqueous standard solution (20 ng mL^{-1}) and (B) a juice sample

The disperser solvent must be miscible in the extraction solvent and the aqueous phase. Acetone, methanol, ethanol, acetonitrile and diethyl ether were tested by rapidly injecting 0.5 mL of each disperser containing 100 μL of $C_2H_2Cl_4$ into the aqueous solution. The extraction efficiency was highest when using methanol (Fig. 2A), which was therefore selected. The volumes assayed for the

disperser solvent were in the range 0.25-2.5 mL, containing in all cases the optimized extraction solvent volume. At low disperser volumes, the cloudy state was difficult to reach, meaning that extraction recovery was low. According to Fig. 2B, the extraction efficiency increased up to 2 mL and then decreased with higher volumes. Highest sensitivity was attained with 2 mL of methanol for both the aqueous standard and the diluted juice sample.

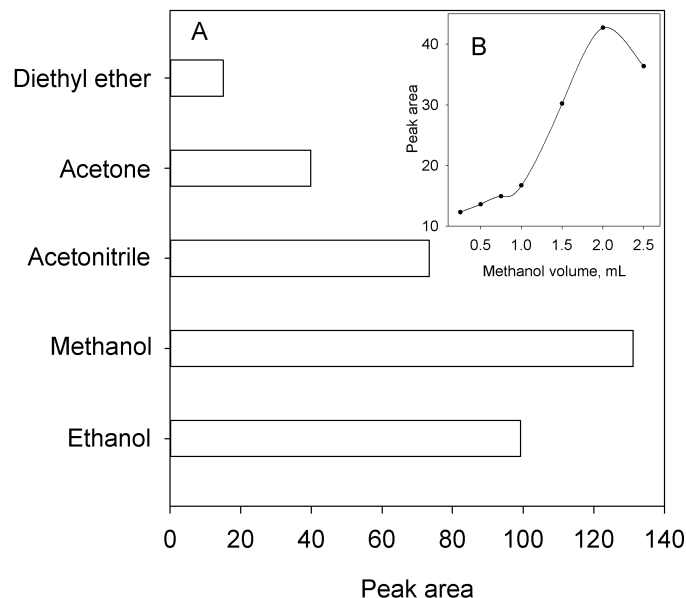


Fig. 2. Effect of the type (A) and volume (B) of the disperser solvent on the peak area of an aqueous standard solution (20 ng mL^{-1}) of all-*trans*-retinol by DLLME-LC

The influence of ionic strength was evaluated at 0-30% (m/v) sodium chloride concentrations in the aqueous phase, in order to reduce the solubility of retinol and increase the solubility in the organic phase. However, peak area decreased with increasing salt concentration throughout the range studied and, so, the addition of salt was discarded. To evaluate the influence of pH in the aqueous phase, different samples were adjusted to pH values ranging between 4 and 10 with a 0.01 M phosphate buffer solution. The volume of the sedimented organic solvent did not vary and no significant differences in the analytical signal were appreciated for all-*trans*-retinol. Consequently, samples were analyzed without pH adjustment in the aqueous phase.

Extraction time in DLLME is defined as the time between injecting the mixture of disperser and extraction solvents and before starting the centrifugation step. As expected, no differences in sensitivity for retinol were attained in the interval 30 s – 5 min, demonstrating that DLLME is practically time-independent, one of its most important advantages. Therefore, the mixture was shaken for a few seconds and then centrifuged. Nevertheless, the centrifugation time and speed necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase were evaluated. When the centrifugation time was varied between 1 and 5 min, extraction efficiency increased up to 2 min and decreased with longer times, and so a time of 2 min is recommended (Fig. 3A). The centrifugation speed was modified in the 1000-3000 rpm range and sensitivity increased up to 3000 rpm, which was selected (Fig. 3B).

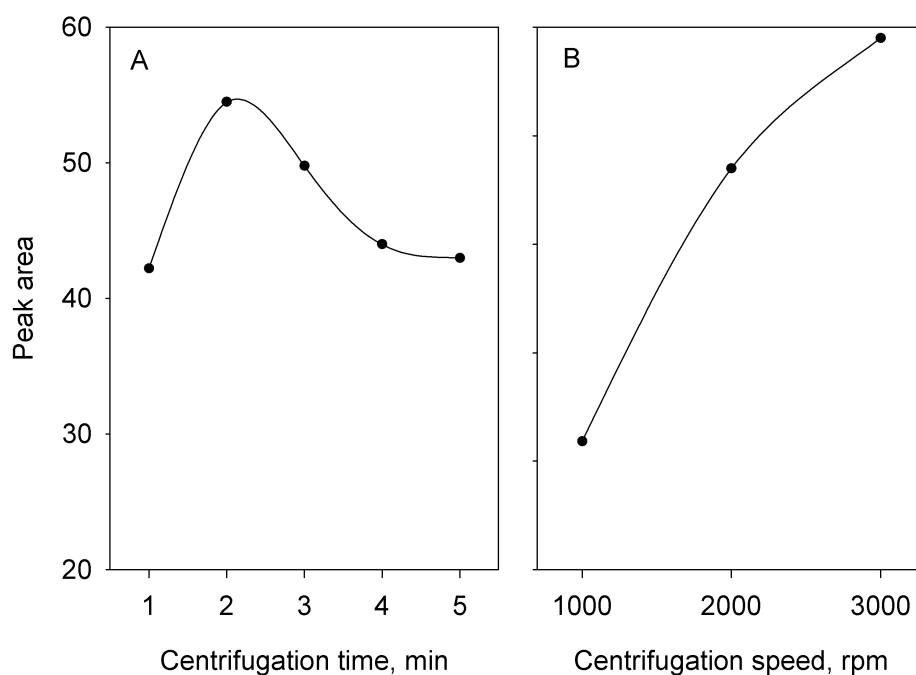


Fig. 3. Influence of the centrifugation time (A) and centrifugation speed (B) on the sensitivity obtained for an aqueous standard solution (20 ng mL^{-1}) of all-*trans*-retinol by DLLME-LC

The DLLME procedure was compared with the ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME) technique, which provided very lower sensitivity

3.3. ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, accuracy and precision. For comparison purposes, the direct LC method without preconcentration was also evaluated. The calibration curve using DLLME-LC was obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area versus retinol concentration, using six levels in duplicate experiments, after saponification of the aqueous standards. When the aqueous standards were not saponified, the calibration graph showed a higher slope. The validation results obtained are summarized in Table 1. The value of r^2 was good ($r^2 > 0.99$), demonstrating excellent linearity for the range studied. The limit of detection (LOD, calculated for a signal-to noise ratio of 3) and the limit of quantification (LOQ, calculated for a signal-to noise ratio of 10) are also shown in Table 1. The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the retinol isomer elution times for blank chromatograms of different non-spiked juices. No matrix compounds were observed that might give a false positive signal in the blank samples. The repeatability was calculated by using the relative standard deviation (RSD) from a series of ten consecutive DLLME-LC analyses of one juice sample containing retinol at 10 ng mL^{-1} . The enrichment factor (EF) was calculated as the ratio between the slope value obtained by DLLME and the slope obtained by LC. In this case, a value of about 50 ± 3 was attained.

Table 1Validation results for all-*trans*-retinol by DLLME-LC

Parameter	Value
Linearity (ng mL ⁻¹)	0.5-50
Slope ± SD (mL ng ⁻¹)	0.767±0.012
Regression coefficient (r ²)	0.9997
LOD (ng mL ⁻¹)	0.23
LOQ (ng mL ⁻¹)	0.76
Intraday RSD, %	1.2
Interday RSD, %	5.7
Enrichment factor	50±3

The matrix effect was studied by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different juice samples, obtained by plotting concentration (at six different levels) against peak area and following linear regression analysis. For the direct LC procedure, the presence of a matrix effect was discarded because “p” value obtained from application of a one-sample t-test was higher than 0.05 (p=0.919). In addition, the matrix effect was studied for the proposed DLLME-LC procedure (Table 2), by obtaining the slopes for the different juice samples and again the matrix effect was discarded because the “p” value obtained from the one-sample t-test was higher than 0.05 (p=0.836). Consequently, calibration and analysis of the samples must be performed using saponified aqueous standards.

Table 2Slopes of calibration graphs for all-*trans*-retinol by DLLME-LC

Sample	Slope \pm SD (mL ng ⁻¹)	r ²
Aqueous standards without saponification	1.51 \pm 0.019	0.9995
Aqueous standards with saponification	0.767 \pm 0.012	0.9997
Pineapple juice with saponification	0.753 \pm 0.013	0.9998
Orange drink with saponification	0.822 \pm 0.013	0.9994
Concentrated juice with saponification	0.798 \pm 0.007	0.9995

3.4. ANALYSIS OF SAMPLES

The juice samples were saponified according to the European Standard using 50 mL methanol and 5 mL KOH for sample volumes of 2-10 mL, depending on the vitamin content. However, after saponification, DLLME was performed to avoid the tedious liquid-liquid extraction procedure with large amounts of organic solvents (100 mL, 3-4 times), washing with water (2 to 4 times, 50 to 150 mL) and then evaporation at low temperature.

Figure 4 shows the elution profiles obtained using DLLME-LC with fluorescence detection for two juice samples and a certified reference material. Similar chromatograms were obtained for the other samples. The elution profiles obtained demonstrated the absence of interfering compounds eluting at the retention times of retinol isomers. Identification was carried out by comparing the retention time and the fluorescence spectra while the analyte passed through the flow cell.

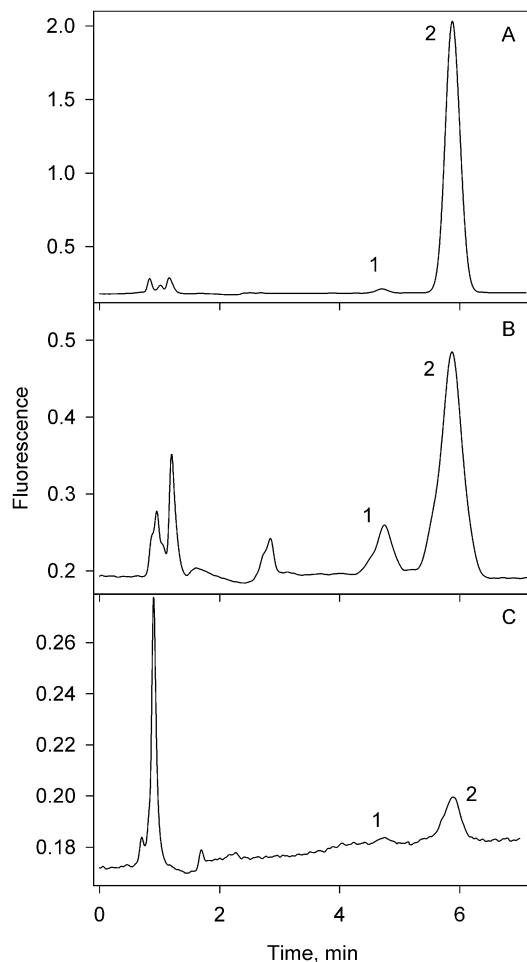


Fig. 4. Elution profiles obtained from a concentrated juice (A), an orange juice (B) and the whole milk powder ERM[®]-BD600 reference material (C) by DLLME-LC. The sample taken was 0.2 mL (A), 2 mL (B) and 50 mg (C). Peaks correspond to: 1, 13-*cis*-retinol and 2, all-*trans*-retinol.

Table 3 shows the results obtained. The contents of all-*trans*-retinol obtained were in accordance with the contents reported by the manufacturers when the juices analyzed were freshly prepared. However, the contents decreased as the storage time increased. Similar values were also obtained for all-*trans*-retinol when using the proposed DLLME-LC procedure and the direct method using LC. The *cis*-retinol isomer was also found when using the DLLME-LC procedure in most of the juice samples analyzed, but always at concentrations considerably lower than those for the *trans*-isomer. However, the direct method using LC cannot be applied to the quantification of this isomer because the concentrations were

below the detection limit when no preconcentration step was applied, thus confirming the usefulness of the DLLME procedure for low levels of retinol.

Table 3
Vitamin A content in juice samples

Sample	DLLME-LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		LC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Declared Vitamin A ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	All- <i>trans</i> -retinol	13- <i>cis</i> -retinol	All- <i>trans</i> -retinol	
Orange drink Sunny Delight	1.11±0.12	ND	1.03±0.17	1.2
Pineapple juice 1	1.29±0.21	0.227±0.043	1.21±0.20	1.2
Pineapple juice 2	1.26±0.11	0.244±0.012	1.13±0.02	1.2
Orange juice	1.49±0.02	0.169±0.005	1.27±0.07	1.2
Multifruits	ND	ND	ND	1.2
Concentrated pineapple juice and milk 1	4.67±0.12	0.108±0.017	4.5±0.54	4.8
Concentrated pineapple juice and milk 2	6.30±0.23	0.249±0.003	6.52±0.2	6.6
Pear juice	0.9±0.022	0.082±0.004	0.87±0.01	1.2
Apple-mango juice	1.07±0.02	0.085±0.001	1.2±0.013	1.2
Banana-apple juice	0.93±0.06	0.081±0.003	0.82±0.01	1.2
Milk-containing multifruit juice	1.64±0.09	0.385±0.021	1.74±0.07	1.2

To test the accuracy of the proposed method, three juice samples free of vitamin A were enriched at two concentration levels (5 and 25 ng mL⁻¹) and analyzed by DLLME-LC after saponification. The results showed a mean recovery \pm standard deviation of 94.7 \pm 5.3% (n=12).

Finally, the reliability of the method was further checked by using two certified reference materials: infant/adult nutritional formula SRM 1849a and whole milk powder ERM[®]-BD600. Table 4 shows the results obtained. The values obtained by the proposed DLLME-LC method were in excellent agreement with the certified contents. The statistical study using the paired *t*-test showed that there was no significant difference (95% confidence interval) between the results obtained and the certified values (*p* values obtained were 0.481 for all-*trans*-retinol and 0.453 for all-*trans*+*cis*-retinol). Such data also confirm the efficacy of the

extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous vitamin A in foods.

Table 4
Vitamin A content in certified reference materials

Reference material	DLLME-LC ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Certified value Vitamin A ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	All- <i>trans</i> -retinol	13- <i>cis</i> -retinol	
Infant/adult nutritional formula SRM 1849a	7.94±0.73	ND	7.68±0.23 mg/kg retinol equivalents, total (<i>trans+cis</i>)-retinol, added as retinol palmitate
Whole milk powder ERM [®] -BD600	3.78±0.21	0.34±0.1	3.8 mg/kg all- <i>trans</i> -retinol and 4.1 mg/kg all- <i>trans</i> -retinol and 13- <i>cis</i> -retinol

4. CONCLUSION

The vitamin A content of several juices was evaluated using a new green sample preparation technique, in this case a miniaturized preconcentration procedure based on DLLME coupled to normal phase LC-Fluorescence. In addition to the low detection limits as a result of the high enrichment power of DLLME, very low quantities of solvent were used, meaning that the procedure can be described as environmentally friendly. The juice samples were saponified according to the European Standard and quantification could be carried out by aqueous calibration. The USAEME technique was also tried, but the sensitivity was lower than that of the DLLME procedure.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10) and the

Spanish MICINN (Project CTQ2009-08267/BQU). M. Bravo-Bravo acknowledges a fellowship from Fundación Séneca, CARM.

REFERENCES

- [1] A. Schieber, F.C. Stintzing, R. Carle, *Trends Food Sci. Technol.* 12 (2001) 401-413.
- [2] T.F. Slater, G. Block, *Am. J. Clin. Nutr.* 53 (1991) 189-196.
- [3] G. Williamson, *Nutr. Food Sci.* 1 (1999) 6-10.
- [4] E. Fernández-García, I. Carvajal-Lérida, M. Jarén-Galán, J. Garrido-Fernández, A. Pérez-Gálvez, D. Hornero-Méndez, *Food Res. Int.* 46 (2012) 438-450.
- [5] P. Sauvant, M. Cansell, A. Abdessattar, H. Sassi, C. Atgié, *Food Res. Int.* 46 (2012) 469-479.
- [6] Commission Directive 1996/5/EC, of 16 February 1996 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children, 1996.
- [7] J.L. Chavez-Servín, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr.* 1122 (2006) 138-143.
- [8] J. López-Cervantes, D.I. Sánchez-Machado, N.J. Rios Vázquez, *J. Chromatogr.* 1105 (2006) 135-139.
- [9] P.J.M. Hulshof, T. van Roekel-Jansen, P. van de Bovenkamp, C.E. West, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 67-75.
- [10] H.X. Li, S.T. Tyndale, D.D. Heath, R.J. Letcher, *J. Chromatogr. B* 816 (2005) 49-56.
- [11] O. Heudi, M.J. Trisconi, C.J. Blake, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 115-123.
- [12] B. Rodas Mendoza, S. Morera Pons, A.I. Castellote Bargalló, M.C. López-Sabater, *J. Chromatogr. A* 1018 (2003) 197-202.
- [13] J.W. DeVries, K.R. Silvera, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 85 (2002) 424-434.
- [14] L. Ye, W.O. Landen, R.R. Eitenmiller, *J. Chromatogr. Sci.* 39 (2001) 1-6.

- [15] D. Blanco, M.P. Fernandez, M.D. Gutierrez, *Analyst* 125 (2000) 427-431.
- [16] D.B. Gomis, M.P. Fernandez, M.D. Gutierrez-Alvarez, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 109-114.
- [17] C.W. Huck, M. Popp, H. Scherz, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 441-449.
- [18] M.J. González-Corbella, M. Tortras-Biosca, A.I. Castellote-Bargallo, M.C. López-Sabater, *Food Chem.* 66 (1999) 221-226.
- [19] G.W. Chase, A.R. Long, R.R. Eitenmiller, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 81 (1998) 577-581.
- [20] G.W. Chase, A.R. Long, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 81 (1998) 582-586.
- [21] R. Andreoli, M. Careri, P. Manini, G. Mori, M. Musci, *Chromatographia* 44 (1997) 605-612.
- [22] M.P. Bueno, *Food Chem.* 59 (1997) 165-170.
- [23] E. Brinkmann, L. Dehne, O.H. Bijosono, R. Tiebach, W. Baltes, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 1459-1471.
- [24] M.M. Delgado-Zamarreno, A. Sánchez-Pérez, M.C. Gómez-Pérez, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 399-406.
- [25] M.M. Delgado-Zamarreno, A. Sánchez-Pérez, M.C. Gómez-Pérez, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 69-74.
- [26] L.G. Rushing, W.M. Cooper, H.C. Thompson, Jr., *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 296-299.
- [27] V.A. Thorpe, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73 (1990) 463-466.
- [28] T.N. Murthi, V.D. Devdhara, G. Jacob, *J. Food Sci. Technol.* 27 (1990) 1-3.
- [29] S.H. Ashoor, M.J. Knox, *J. Chromatogr.* 409 (1987) 419-425.
- [30] European Standard CSN EN 12823-1, *Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 1: Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol*, European Committee for Standardization, Brussels, 2000.
- [31] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251-265.

- [32] U. Höller, D. Wolter, P. Hofmann, V. Spitzer, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1539-1542.
- [33] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809-833.
- [34] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.



CUANTIFICACIÓN DE β -CAROTENO, RETINOL, ACETATO DE RETINOL
Y PALMITATO DE RETINOL EN ZUMOS DE FRUTAS ENRIQUECIDOS
USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO
ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN
FLUORESCENTE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN
QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

La vitamina A incluye un grupo de compuestos que se requieren para la visión, el crecimiento de los huesos, reproducción y diferenciación celular. En general, hay dos categorías, dependiendo de si el alimento procede de una fuente animal o vegetal [1].

Cuando se encuentra en alimentos de origen animal se denomina preformas de vitamina A, que se absorbe en la forma de retinol, una sustancia activa liposoluble. Sus fuentes incluyen hígado, leche entera, huevos, carne y algunos productos alimenticios enriquecidos. El retinol se puede transformar en otras formas activas (retinal y ácido retinoico) en el cuerpo. Ya que el retinol es inestable, la vitamina se encuentra en tejidos como acetato de retinol o palmitato de retinol.

La vitamina A que se encuentra en alimentos derivados de las plantas está en la forma de carotenoides, pigmentos fuertemente coloreados que se pueden transformar en una forma de vitamina A [2]. Uno de tales carotenoides es β -caroteno, un antioxidante que protege las células del daño causado por los radicales libres [3].

La Figura V.1 incluye las fórmulas químicas del retinol, sus ésteres y el carotenoide representativo β -caroteno.

Todas estas especies químicas exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible y, además, presentan fluorescencia natural. Los máximos de excitación se encuentran a 325 nm y de emisión a 480 nm para retinol y sus ésteres. Para β -caroteno, los máximos de excitación y emisión fueron 450 y 530 nm, respectivamente.

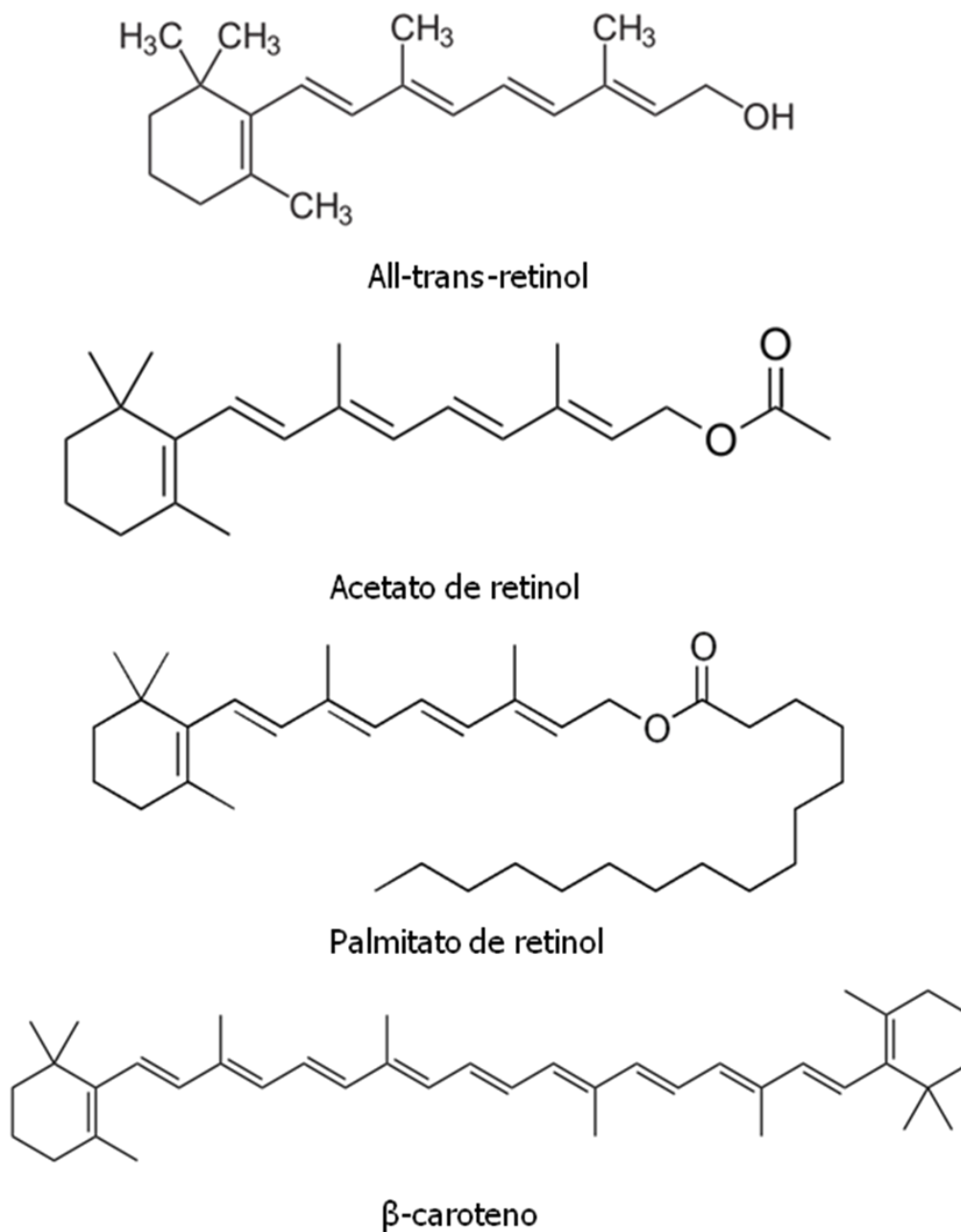


Figura V.1. Fórmulas químicas del retinol, sus ésteres y el β -caroteno

Los métodos clásicos para análisis de vitamina A incluyen saponificación y/o extracción en disolventes orgánicos de baja polaridad, como es el caso con los métodos estandarizados de análisis para retinol [10] y β -caroteno [11]. Sin embargo, estos métodos son tediosos y también requieren cantidades grandes de

disolventes orgánicos, puesto que las muestras deben ser saponificadas usando 50–150 mL de metanol, y entonces extraídas 3–4 veces con volúmenes grandes de disolventes orgánicos. Los extractos combinados se lavan, se evaporan y se analizan por LC en fase normal (NP–LC) para retinol [10] y por LC en fase reversa para β -caroteno [11]. Por otra parte, el proceso de saponificación convierte todos los ésteres en la forma libre del retinol, y así no resulta apropiado para diferenciar las formas diferentes de la vitamina A.

Por otra parte, se han publicado varios estudios relativos a la determinación de la vitamina A en alimentos o muestras biológicas por LC acoplada a MS usando haz de partículas [12], ESI [13–19] y APCI [20–30], consiguiendo de esta forma mejorar la selectividad.

Para determinar las diferentes formas de la vitamina A en muestras de alimentos, es necesario incluir etapas de aislamiento y/o preconcentración para evitar interferencias de la compleja matriz de los alimentos. Las técnicas de microextracción [31–32] son una forma para miniaturizar el laboratorio analítico [33]. DLLME es un método de extracción muy simple y rápido [34]. Con respecto a las nuevas técnicas verdes de preparación de muestra, solo se ha descrito un estudio [35] para la determinación de los isómeros *cis*- y *trans*-retinol usando el acoplamiento DLLME–LC–fluorescencia después de la saponificación de la muestra para convertir todas las formas de la vitamina A en retinol antes de usar NP–LC.

En el Capítulo V de esta Tesis Doctoral, se lleva a cabo una optimización detallada de DLLME para desarrollar técnicas de LC, usando tanto detección fluorimétrica como APCI–MS, para el análisis simultáneo de preformas de la vitamina A: retinol (R), acetato de retinol (RA), palmitato de retinol (RP) y β -caroteno (β -C).

Los análisis LC se llevaron a cabo usando una fase móvil compuesta por metanol y agua, mediante elución por gradiente. Los espectros APCI–MS y de

fluorescencia permitieron conseguir la identificación correcta de los compuestos en las muestras analizadas.

Los parámetros que afectan a DLLME se optimizaron usando 2 mL de metanol (disolvente dispersante) conteniendo 150 μL de tetracloruro de carbono (disolvente extractante). La precisión varió entre 6 y 8% (RSD) y los límites de detección entre 0,03 y 1,4 ng mL^{-1} , dependiendo del compuesto. Los valores del factor de enriquecimiento están en el rango 21–44.

Las muestras de zumo se analizaron sin saponificación y no se encontró efecto matriz cuando se usó detección fluorescente, de forma que fue posible llevar a cabo la calibración con estándares acuosos. Sin embargo, sí se demostró un efecto matriz con APCI–MS, y con este sistema de detección fue necesario aplicar la calibración con una matriz en blanco.

Se ha observado una gran variabilidad en las formas de vitamina A presentes en los zumos, siendo la más abundante el éster acetato de retinol (0,04 a 3,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguida de la cantidad de retinol (0,01 a 0,16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que no se detectó palmitato de retinol, excepto en el zumo enriquecido con leche, en el cual RP fue la forma predominante. Se encontró el carotenoide representativo β -caroteno en cantidades elevadas en los zumos de naranja, melocotón, mango y multifrutas. El método se validó usando dos materiales de referencia certificados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que han sido publicados en la revista *Journal of Chromatography A*.

Quantification of β -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry

Journal of Chromatography A 1275 (2013) 1–8

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.022>

Publicado en el libro de la XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica-VI Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas. Úbeda, 16-19 Junio 2013.

La dirección url para esta publicación es:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312018808>

ABSTRACT

A detailed optimization of dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was carried out for developing liquid chromatographic (HPLC) techniques, using both fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric (APCI-MS) detection, for the simultaneous analysis of preforms of vitamin A: retinol (R), retinyl acetate (RA), retinyl palmitate (RP) and β -carotene (β -C). The HPLC analyses were carried out using a mobile phase composed of methanol and water, with gradient elution. The APCI-MS and fluorescence spectra permitted the correct identification of compounds in the analyzed samples. Parameters affecting DLLME were optimized using 2 mL of methanol (disperser solvent) containing 150 μ L carbon tetrachloride (extraction solvent). The precision ranged from 6 to 8% (RSD) and the limits of detection were between 0.03 and 1.4 ng mL^{-1} , depending on the compound. The enrichment factor values were in the 21-44 range. Juice samples were analyzed without saponification and no matrix effect was found when using fluorescence detection, so calibration was possible with aqueous standards. However, a matrix effect appeared with APCI-MS, in which case it was necessary to apply matrix-matched calibration. There was great variability in the forms of vitamin A present in the juices, the most abundant ester being retinyl acetate (0.04 to 3.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$), followed by the amount of retinol (0.01 to 0.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), while retinyl palmitate was not detected, except in the milk-containing juice, in which RP was the main form. The representative carotenoid β -carotene was present in the orange, peach, mango and multifruit juices in high amounts. The method was validated using two certified reference materials.

Keywords:

HPLC-APCI-MS
Dispersive liquid-liquid microextraction
 β -Carotene
Retinol
Retinol esters
Fruit juices

1. INTRODUCTION

Vitamin A includes a group of compounds which are required for vision, bone growth, reproduction and cell differentiation. In general, there are two categories, depending on whether the food source is an animal or a vegetal [1]. The vitamin A found in animal-derived foods is called preformed vitamin A, which is absorbed in the form of retinol, a fat-soluble active substance. Sources include liver, whole milk, eggs, meat and some fortified food products. Retinol can be transformed into other active forms (retinal and retinoic acid) in the body. Since retinol is unstable, the vitamin is found in tissues as retinyl acetate or retinyl palmitate. The vitamin A found in plant-derived foods comes in the form of carotenoids, dark-colored dyes (pigments) that may be transformed into a form of vitamin A [2]. One such carotenoid is β -carotene, an antioxidant that protects cells from damage caused by free radicals [3]. The more intense the color of a fruit or vegetable, the higher the β -carotene content. Moreover, vegetable sources are fat- and cholesterol-free [4]. β -carotene is less easily absorbed than retinol and must be converted into retinal and retinol by the body. Many supplements provide a combination of retinol and β -carotene.

In recent years, many nutrients have been added to foods and drinks to cover dietetic recommendations and to solve deficiencies in a specific nutrient [5, 6]. Although such functional products, including enriched foods, are designed to improve human health [7], many problems due to possible interactions or imbalances have been described [8]. Enrichment with vitamins involves fewer processing problems than enrichment with minerals or proteins because lower amounts are required. Thus, functional drinks, known as ACE juices, are soft drinks based on fruit and vegetable juices to which the antioxidant vitamins A, C and E have been added. However, vitamin loss during manufacture and storage means that substantial amounts of the nutrient need to be added if the consumer is to receive the required levels. The EU Commission [9] has established that vitamin A in vegetable juices must be present at a final content of no lower than 25 μg RE/100 kJ (100 μg RE/100 kcal), RE being the equivalents of all-*trans*-retinol

(annex II). The compounds permitted to be added as vitamin A are retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate and β -carotene (annex IV). The maximum permitted content of vitamin A in cereal-based products and baby foods is 180 μg RE/100 kcal (annex VI).

Classical methods of vitamin A analysis include saponification and/or solvent extraction in low polarity organic solvents, as is the case with the standardized analysis method for retinol [10] and β -carotene [11]. However, these methods are tedious and also require large amounts of organic solvents, as the samples must be saponified using 50-150 mL methanol, then extracted 3-4 times with high volumes of organic solvents. The combined extracts were then washed, evaporated and analyzed by normal-phase liquid chromatography (NP-HPLC) for retinol [10] and by reversed-phase HPLC for β -carotene [11]. Moreover, the saponification process converts all the esters into the free form of retinol, so that it is unsuitable for differentiating the different forms of vitamin A.

On the other hand, several studies have tackled the determination of vitamin A in foods or biological samples by HPLC coupled to mass spectrometry (MS) using particle beam [12], electrospray ionization (ESI) [13-19] and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [20-30] in this way allowing selectivity to be improved.

To determine the different forms of vitamin A in food samples, it is necessary to include isolation and/or preconcentration steps to avoid interference from the complex food matrix. Microextraction techniques [31, 32] are a way to miniaturize the analytical laboratory [33], the selective extraction of compounds being based on differences in their physical-chemical characteristics. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a very simple and rapid extraction method, based on the use of a ternary component solvent system [34]. Speed and the low consumption of organic solvents are two of the main advantages of this technique, which can be included in the group of clean chemistry procedures. As regards new green sample preparation techniques, only one study [35] has described the determination of *cis*- and *trans*-retinol isomers using the coupling of DLLME-LC-

Fluorescence after saponification of the sample to convert all forms of the vitamin A into retinol before using NP-HPLC.

In the present study, two miniaturized sample treatment procedures based on DLLME coupled to a reversed-phase HPLC technique with two different detection systems, fluorescence and APCI-MS, are proposed for determining retinol (R), retinyl acetate (RA), retinyl palmitate (RP) and β -carotene (β -C). The procedures were applied to the determination of preforms of vitamin A and β -carotene in different types of enriched ACE fruit juices. The novelty of the present approach is based on the use for the first time of DLLME for the determination of these forms of vitamin A using green chemistry principles coupled to liquid chromatography, avoiding the use of high amounts of solvents and the generation of residues. The sensitivity together with the selectivity of the mass spectra using APCI-MS permitted the correct identification of compounds.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTS

Chromatographic quality methanol, ethanol and carbon tetrachloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The water used was previously purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). *All-trans*-retinol, retinyl acetate, retinyl palmitate and β -carotene were obtained from Sigma-Aldrich. Stock solutions ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) of R, RA and RP were prepared in ethanol and stored in amber vials at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, while the stock solution of β -C was prepared in chloroform. Working standard solutions were prepared daily in ethanol.

2.2. INSTRUMENTATION FOR HPLC-FLUORESCENCE

The HPLC-fluorescence system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at a flow-rate of 0.9 mL min^{-1} . The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The fluorescence detector (G1321A) was operating at an excitation

wavelength of 325 nm and an emission wavelength of 480 nm for R, RA and RP, and at an excitation wavelength of 450 nm and an emission wavelength of 530 nm for β -C. The analytical column used for the reversed-phase technique was a Zorbax Eclipse XDB-C₈ (15 cm x 46 mm x 5 μ m). The mobile phase was a mixture of methanol and water, operating under gradient elution with the following optimized program: linear gradient from 90:10 methanol:water (v/v) to 100% methanol in 15 min and held for 8 min. Finally, the initial conditions were re-established in 1 min and held for 10 min. Aliquots of 20 μ L were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA). Solutions were stored in 2 or 10 mL amber glass vials. To filter the samples, PVDF filters (0.45 μ m) (Teknokroma, Barcelona, Spain) were used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge was used at a speed near to the maximum supported by the conical glass tubes, 3000 rpm.

2.3. HPLC-APCI-MS SYSTEM

The HPLC system consisted of an Agilent 1200 binary pump (G1312A) operating at a flow-rate of 0.9 mL min⁻¹. The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The column was maintained in a thermostated compartment at room temperature (G1316A). The injection (20 μ L) was performed using an autosampler (G1329A). The column and the gradient program for the mobile phase were the same as those optimized for fluorescence detection. The HPLC system was coupled to an ion-trap mass spectrometer (1036 model) equipped with an APCI interface operating in positive ion mode. Selected ion monitoring (SIM) mode using the ion m/z 269 from 0 to 21.5 min (R, RA and RP), and the ion m/z 539 from 21.5 to 26 min (β -C) was applied, according to previous studies [18, 20, 25-27]. The instrument parameters were: drying temperature, 350 °C; APCI temperature, 400 °C; drying gas flow, 5 L/min and nebulizer gas pressure, 60 psi. Calibration was performed using matrix-matched standards for APCI-MS as the most effective way to compensate for the influence of the matrix

on method performance. Statistical analysis was carried out by applying the ANOVA test and a multiple comparisons test *versus* control group.

2.4. SAMPLES AND CERTIFIED REFERENCE MATERIALS

The samples were different commercial types of juices enriched with vitamin A and E (ACE juices) containing orange, grapefruit, peach, pineapple, banana, pear, apple-mango, apple-banana-orange, multifruit and milk-containing fruit juices. Samples were analyzed in triplicate. The method was validated using two reference materials: infant/adult nutritional formula SRM 1849a supplied by the National Institute of Standards and Technology (NIST) and whole milk powder ERM[®]-BD600 supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM).

2.5. DLLME PROCEDURE

For DLLME, a 0.1-2 mL aliquot of juice was diluted to 10 mL with water in a 15-mL screw cap glass tube with conical bottom. Then, 2 mL of methanol (dispersive solvent) containing 150 μ L of carbon tetrachloride (extractant solvent) was rapidly injected into the water solution using a micropipette, and the mixture was again gently shaken manually for several seconds. A cloudy solution consisting of very fine droplets of carbon tetrachloride dispersed through the sample solution was formed, and the analytes were extracted into the fine droplets. After centrifugation for 2 min at 3000 rpm, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (volume about 50 ± 10 μ L). The sedimented phase was collected and evaporated to dryness with a nitrogen stream. The residue was reconstituted with 50 μ L of methanol, and a volume of 20 μ L was injected into the HPLC.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The use of both normal-phase and reversed phase techniques was compared for improving the resolution of the different forms of vitamin A using fluorescence detection in both cases. The normal-phase technique was tried using a LiChrospher Si 60 analytical column and a mobile phase consisting of a 98:2 (v/v) n-hexane:2-propanol mixture at a flow-rate of 2 mL min⁻¹, according to the European Standard [10]. Under these conditions, the retention time for all-*trans*-retinol was 5.8 min. However, the other compounds (the esters RA and RP, and β -carotene) were not retained, eluting near the void time.

The reversed phase technique was assayed using a C₈ and different C₁₈ columns. Retention of the esters was too high with the C₁₈ packing, and consequently the Zorbax Eclipse XDB-C₈ column was selected. Several mobile phases corresponding to mixtures of methanol or acetonitrile and water in different percentages were assayed. Isocratic elution using a 90:10 (v/v) methanol:water mixture led to retinol being eluted with a retention factor of near 3, while the esters eluted with very high retention factors and β -C was retained. When the methanol proportion was increased, retinol eluted at the void time. Consequently, gradient elution was tried and, after several experiments with different solvent proportions and ramps, the optimized gradient program was: linear gradient from 90:10 methanol:water (v/v) to 100% methanol in 15 min, and held for 8 min. Finally, the initial conditions were re-established in 1 min and held for 10 min. The flow-rate was 0.9 mL min⁻¹. With this program, the order of elution and the retention factors for the analytes were: R (t_R =5.2 min, k =2.7); RA (t_R =7.0 min, k =4.0); RP (t_R =20.3 min, k =13.5) and β -C (t_R =22.4 min, k =15).

3.2. APCI-MS DETECTION

The ionization mode selected in HPLC-MS measurements depends on the polarity of the target compounds. APCI, a soft ionization technique used for small

compounds of low polarity, was selected. Moreover, signal intensity is dependent on the volatility of the compounds, and vitamin A forms are neutral and non-volatile, giving high signals in APCI. A full scan of each analyte was performed using the above-described chromatographic conditions and the experiments in APCI(+) showed that the protonated positive ion fragment m/z 269 was the most abundant for the three compounds (R, RA and RP), while no protonated molecular ions were observed. This ion reflects the loss of water from the protonated molecule of retinol, loss of acetic acid from RA and loss of palmitic acid from RP. However, the protonated molecule $[M-H]^+$ (m/z 539) was more intense and had a higher signal-to-noise (S/N) ratio for β -C. Selected ion monitoring (SIM) mode using the ion m/z 269 from 0 to 21.5 min (R, RA and RP), and the ion m/z 539 from 21.5 to 26 min (β -C) was applied.

3.3. DLLME PARAMETERS

The microextraction step was optimized by studying the experimental variables which affect the extraction efficiency, such as the type and volume of both extraction and disperser solvents, the addition of salt, pH and both the speed and time of the centrifugation step. For this purpose, an aqueous standard solution or a diluted juice sample (1 mL juice and 9 mL water) containing analyte concentrations of about 20 ng mL^{-1} was used.

The extraction solvent must have high affinity for the analytes, a higher density than water and low solubility in water, while also displaying good chromatographic behaviour. In addition, the solvent must have a low boiling temperature because the sedimented organic phase must be evaporated and reconstituted using a solvent compatible with reversed-phase HPLC. Thus, chlorobenzene and tetrachloroethane, both of which have a high boiling temperature, were discarded. Well-defined settled volumes were recovered with dichloroethane, chloroform and carbon tetrachloride, using 200 μL of the extraction solvent and 2 mL of methanol as the disperser solvent. Fig. 1 depicts the peak area values for the different compounds (mean of triplicate experiments). As can

be seen, the best extraction efficiency was obtained using both chloroform and carbon tetrachloride. On the other hand, Fig. 1 also shows the volume obtained for the organic drop sedimented after centrifugation. As this volume was considerably higher when carbon tetrachloride was used, this was selected as the extraction solvent.

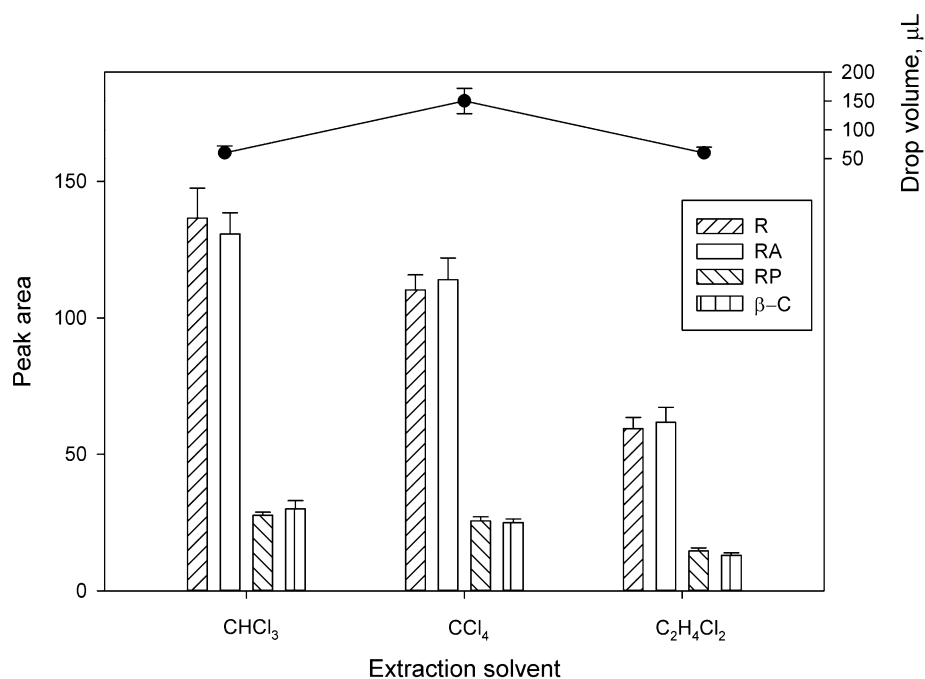


Fig. 1. Effect of the extractant solvent on the peak area of the vitamin A forms in a diluted juice sample by DLLME-HPLC-Fluorescence and on the volume of the organic drop sedimented after centrifugation of the dispersion. Conditions: 200 µL extraction solvent, 2 mL methanol disperser solvent, 20 ng mL⁻¹ concentration of analytes.

Acetone, methanol and acetonitrile are miscible in the extraction solvent and in the aqueous solution and so were assayed as disperser solvents by rapidly injecting 2 mL of each disperser containing 200 µL of CCl₄ into 10 mL of the diluted juice sample. The extraction efficiency was greatest with methanol, which had the additional advantage of low toxicity, and was therefore selected.

The influence of the carbon tetrachloride volume was studied between 50 and 250 µL for a diluted juice sample, carrying out experiments in triplicate. Volumes of between 50 and 60 µL led to very small volumes for the sedimented

drop. Fig. 2A shows that peak areas increased with increasing extraction solvent volumes up to 150-200 μL for the different analytes (values are mean of triplicate experiments). On further increasing the volume of the solvent, the sensitivity decreased as a consequence of dilution, and so a 150 μL extractant volume was selected. Fig. 2 B shows the effect of varying the volume of the disperser solvent on the sensitivity for a diluted juice sample (triplicate experiments). When the volumes assayed were below 1 mL, the dispersion was very inefficient and peak areas were very low. For higher volumes of between 1 and 2 mL, the sensitivity continuously increased and so a volume of 2 mL was selected.

To study the effect of the ionic strength, the experiments were carried out at different sodium chloride concentrations in diluted juice solutions, ranging from 0 to 30% (m/v). The results showed that extraction efficiency decreased for all the compounds when the salt concentration was increased. Therefore, the addition of NaCl to the extraction solution was discarded. To evaluate the influence of pH, different samples were adjusted to pH values of between 4 and 10 with 0.01 M phosphate buffer solutions. The volume of the sedimented organic solvent did not vary and no significant differences in the analytical signals were appreciated. Consequently, samples were analyzed without pH adjustment.

Extraction time in DLLME, defined as the interval between injecting the mixture of disperser and extraction solvents and the centrifugation step, had no influence on extraction efficiency, which is one of the most important advantages of this technique. The mixture of extractant, disperser and the diluted juice was manually shaken for different times of between a few seconds and 5 min, before submitting the mixture to centrifugation. Similar peak areas were obtained in all cases, indicating that the DLLME procedure was practically time-independent. Consequently, only a few seconds were needed to extract the analytes. The centrifugation time and speed necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase were evaluated in the ranges 1-5 min and 500-3000 rpm, respectively. Best results were attained by centrifuging the mixture for 2 min at the maximum speed recommended for the conical glass tubes used, 3000 rpm. The

volume of the sedimented phase was $50 \pm 10 \mu\text{L}$ after extraction and centrifugation.

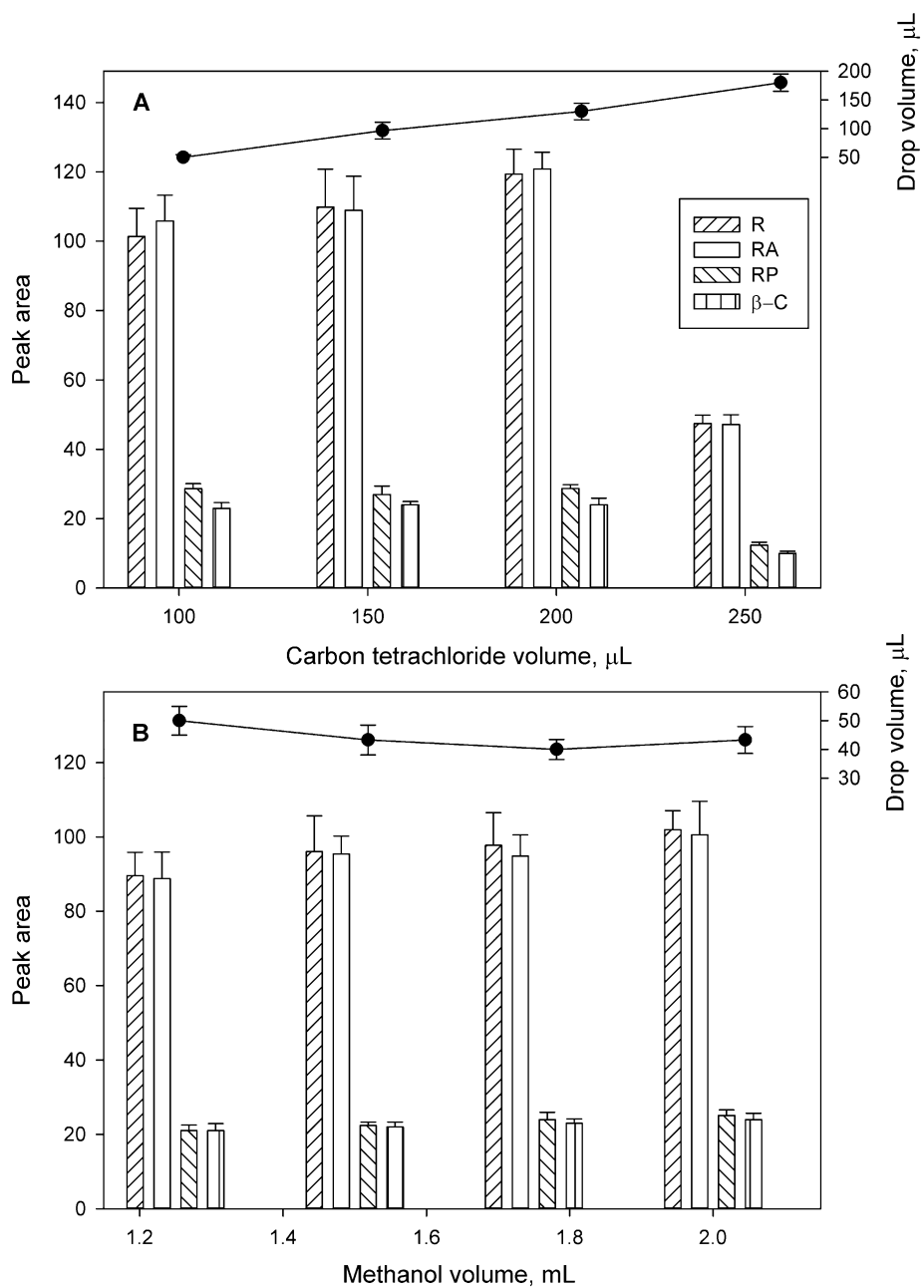


Fig. 2. Influence of the extractant carbon tetrachloride volume (A) and the disperser methanol volume (B) on the peak area of vitamin A forms in a diluted juice sample by DLLME-HPLC-Fluorescence and on the volume of the organic drop sedimented after centrifugation of the dispersion. Concentration of analytes 20 ng mL^{-1} .

Figure 3A shows the elution profile obtained using DLLME-HPLC-Fluorescence and Fig. 3B shows the corresponding chromatogram obtained by DLLME-HPLC-APCI-MS in SIM mode for a standard solution of the different forms of vitamin A in the selected conditions, as well as the mass spectra of the extracted ions for each one of the analytes (Figure 3C).

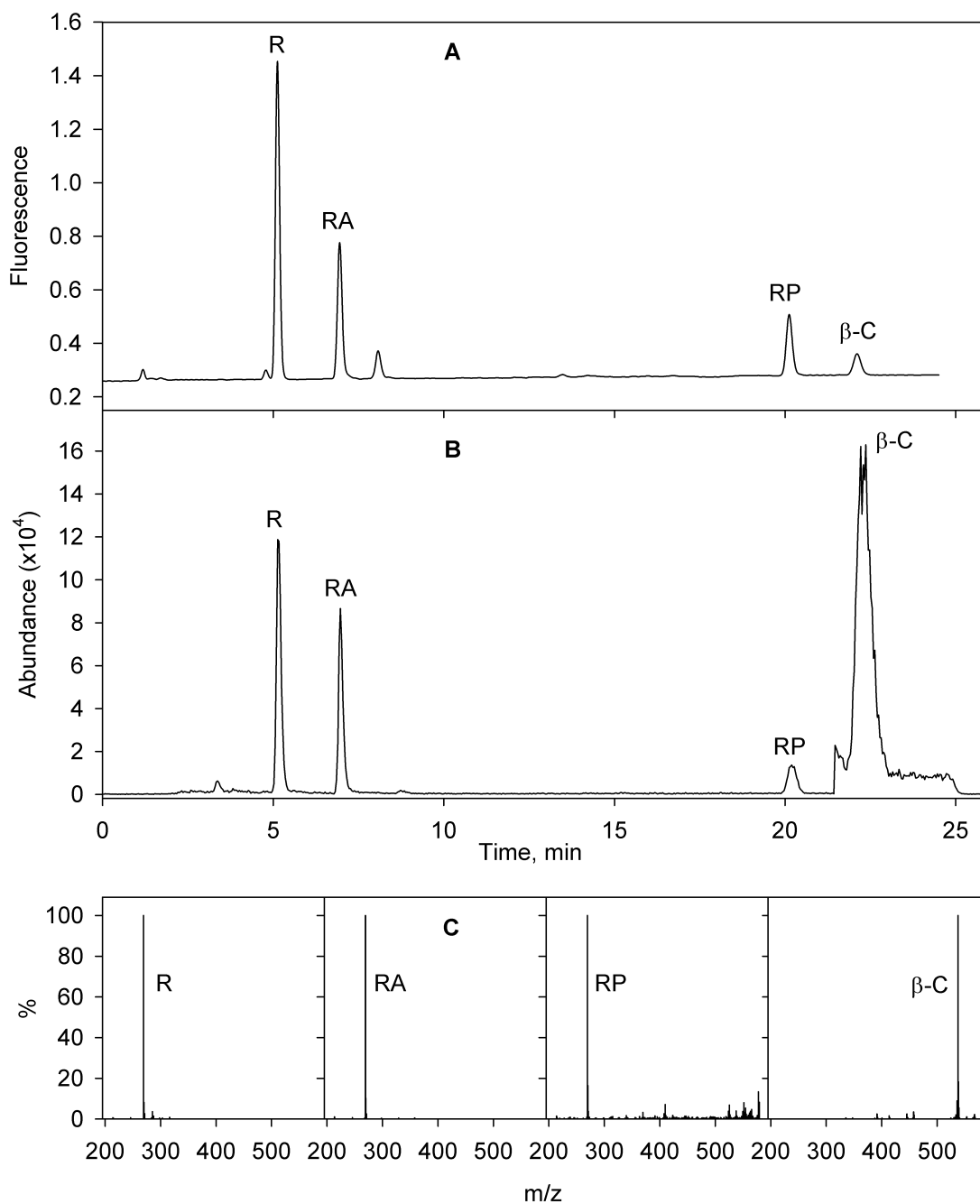


Fig. 3. Elution profile obtained using DLLME-HPLC-Fluorescence (A) and DLLME-HPLC-APCI-MS in SIM mode (B) for a standard solution of the different forms of vitamin A in the selected conditions. Positive-ion APCI mass spectra of the extracted ions for each of the analytes (C).

3.4. ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, accuracy and precision. The calibration graphs for aqueous standards using DLLME-HPLC-fluorescence were obtained by least-squares linear regression analysis of the peak area *versus* analyte concentration using ten levels (1-100 ng mL⁻¹) in duplicate experiments. Quantification was performed by the external standard procedure. The results obtained are summarized in Table 1. The r^2 values were good ($r^2 > 0.994$), demonstrating the excellent linearity for the range studied. The limits of detection (LOD, calculated for a signal-to-noise ratio of 3) and the limits of quantification (LOQ, calculated for a signal-to-noise ratio of 10) are also shown in Table 1. The enrichment factor (EF) was calculated as the ratio between the slope obtained by DLLME and the slope obtained by direct HPLC-fluorescence without preconcentration. The slope values (mL ng⁻¹) for direct HPLC were 0.0118, 0.00464, 0.00385 and 0.000516 for R, RA, RP and β -C, respectively. Consequently, the EF values were 44.2, 31.9, 21.8 and 25.6 for R, RA, RP and β -C, respectively.

Table 1
Calibration graphs by DLLME-HPLC-Fluorescence

Compound	Slope \pm SD (mL ng ⁻¹)	r^2	Linearity (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
All- <i>trans</i> -retinol	0.522 \pm 0.011	0.9956	1-100	0.82	2.7
Retinyl acetate	0.148 \pm 0.003	0.9949	1-100	0.76	2.5
Retinyl palmitate	0.084 \pm 0.003	0.9992	1-100	0.96	3.2
β -Carotene	0.013 \pm 0.001	0.9956	1-100	0.98	3.3

Calibration graphs for aqueous standards were also obtained by using DLLME-HPLC-APCI-MS and the results obtained are summarized in Table 2. SIM of the fragment ion of m/z 269 was used for the quantitative analysis of R, RA and RP, because it was the base peak of the positive ion APCI mass spectra of the three compounds. For β -C, the APCI mass spectra show higher abundance of the intact protonated molecule with m/z 539. Table 2 shows the values of r^2 , which again demonstrated good linearity for the range studied, as well as the LOD and the LOQ values, which were calculated as previously.

Table 2
Calibration graphs by DLLME-HPLC-APCI-MS

Compound	Slope \pm SD (mL ng ⁻¹)	r^2	Linearity (ng mL ⁻¹)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
All- <i>trans</i> -retinol	$8.33 \cdot 10^4 \pm 0.61 \cdot 10^4$	0.9947	0.5-50	0.07	0.25
Retinyl acetate	$7.62 \cdot 10^4 \pm 0.50 \cdot 10^4$	0.9935	0.5-50	0.08	0.26
Retinyl palmitate	$6.95 \cdot 10^3 \pm 0.08 \cdot 10^3$	0.9997	2.5-50	1.4	4.8
β -Carotene	$3.43 \cdot 10^6 \pm 0.21 \cdot 10^6$	0.9943	0.1-50	0.03	0.09

The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the elution times of the vitamin A forms for chromatograms of different non-spiked juices. No matrix compounds existed that might give a false positive signal in the samples. The selectivity was also improved by the high resolution of HPLC-APCI-MS because no peaks at m/z 269 and m/z 539 were observed in the non-spiked juices.

The repeatability was calculated by using the relative standard deviation (RSD) from a series of ten consecutive DLLME-LC analyses of a juice sample spiked with all the analytes at 20 ng mL⁻¹. The RSD values were 7.6, 6.8, 6.1 and 8.6 for R, RA, RP and β -C, respectively, values that indicate that the precision of the method was satisfactory for control analysis.

3.5. STUDY OF THE MATRIX EFFECT

The matrix effect was first evaluated for the DLLME-HPLC-FI procedure by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different juice samples, obtained by plotting concentration (at six

levels) against peak area. A statistical study was carried out using one way analysis of variance (ANOVA). The presence of a matrix effect was discarded because the “P” values obtained were higher than 0.05 for all the analytes. Consequently, calibration and analysis of all the juice samples using fluorescence detection were performed using aqueous standards.

Nevertheless, quantitative analysis using APCI can be affected by the occurrence of signal suppression due to unknown matrix interferences [36]. This phenomenon affects the reproducibility, linearity and accuracy of the method and must be carefully considered. Matrix effects were studied in the different types of juices analyzed to evaluate the ion suppression produced by co-eluting compounds from the juice, which can affect analyte ionization. This was again evaluated by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different juice samples (Table 3). The application of the ANOVA test showed that there was no statistically significant difference between the juice groups. However, when the juice groups were compared by reference to the aqueous standard slopes, the ANOVA tests indicated the presence of statistically significant differences. The application of the multiple comparisons test *versus* control group using aqueous standards (Holm-Sidak method) revealed that $P < 0.001$ for all the comparisons. Consequently, for the DLLME-HPLC-APCI-MS procedure, calibration must be performed using matrix-matched standards, as there were no differences between the different juice matrices, and this technique proved to be the most effective way to compensate for the adverse influence of the matrix on the method's performance.

Table 3

Calibration slopes using DLLME-HPLC-APCI-MS for juice samples, mL ng⁻¹

Juice sample	R	RA	RP	B-C
Aqueous standards	$8.33 \cdot 10^4 \pm 0.61 \cdot 10^4$	$7.62 \cdot 10^4 \pm 0.50 \cdot 10^4$	$6.95 \cdot 10^3 \pm 0.10 \cdot 10^3$	$3.43 \cdot 10^5 \pm 0.21 \cdot 10^5$
Orange	$5.16 \cdot 10^4 \pm 0.50 \cdot 10^4$	$5.30 \cdot 10^4 \pm 0.62 \cdot 10^4$	$2.98 \cdot 10^3 \pm 0.16 \cdot 10^3$	$1.51 \cdot 10^5 \pm 0.10 \cdot 10^5$
Multifruits	$4.51 \cdot 10^4 \pm 0.19 \cdot 10^4$	$5.28 \cdot 10^4 \pm 0.52 \cdot 10^4$	$2.96 \cdot 10^3 \pm 0.37 \cdot 10^3$	$1.43 \cdot 10^5 \pm 0.10 \cdot 10^5$
Pear	$4.82 \cdot 10^4 \pm 0.29 \cdot 10^4$	$4.33 \cdot 10^4 \pm 0.36 \cdot 10^4$	$2.78 \cdot 10^3 \pm 0.15 \cdot 10^3$	$1.51 \cdot 10^5 \pm 0.20 \cdot 10^5$
Orange-banana- apple	$4.86 \cdot 10^4 \pm 0.10 \cdot 10^4$	$4.68 \cdot 10^4 \pm 0.65 \cdot 10^4$	$2.55 \cdot 10^3 \pm 0.15 \cdot 10^3$	$1.31 \cdot 10^5 \pm 0.16 \cdot 10^5$
Fruit+milk	$4.72 \cdot 10^4 \pm 0.28 \cdot 10^4$	$4.35 \cdot 10^4 \pm 0.57 \cdot 10^4$	$2.83 \cdot 10^3 \pm 0.10 \cdot 10^3$	$1.25 \cdot 10^5 \pm 0.10 \cdot 10^5$

3.6. ANALYSIS OF JUICE SAMPLES AND VALIDATION USING CERTIFIED REFERENCE MATERIALS

Juice samples containing different fruits were analyzed. Figure 4 shows the elution profiles obtained using DLLME-HPLC with APCI-MS detection for three juice samples corresponding to peach, mango-apple and milk-multifruits juices. Similar chromatograms were obtained for the other samples.

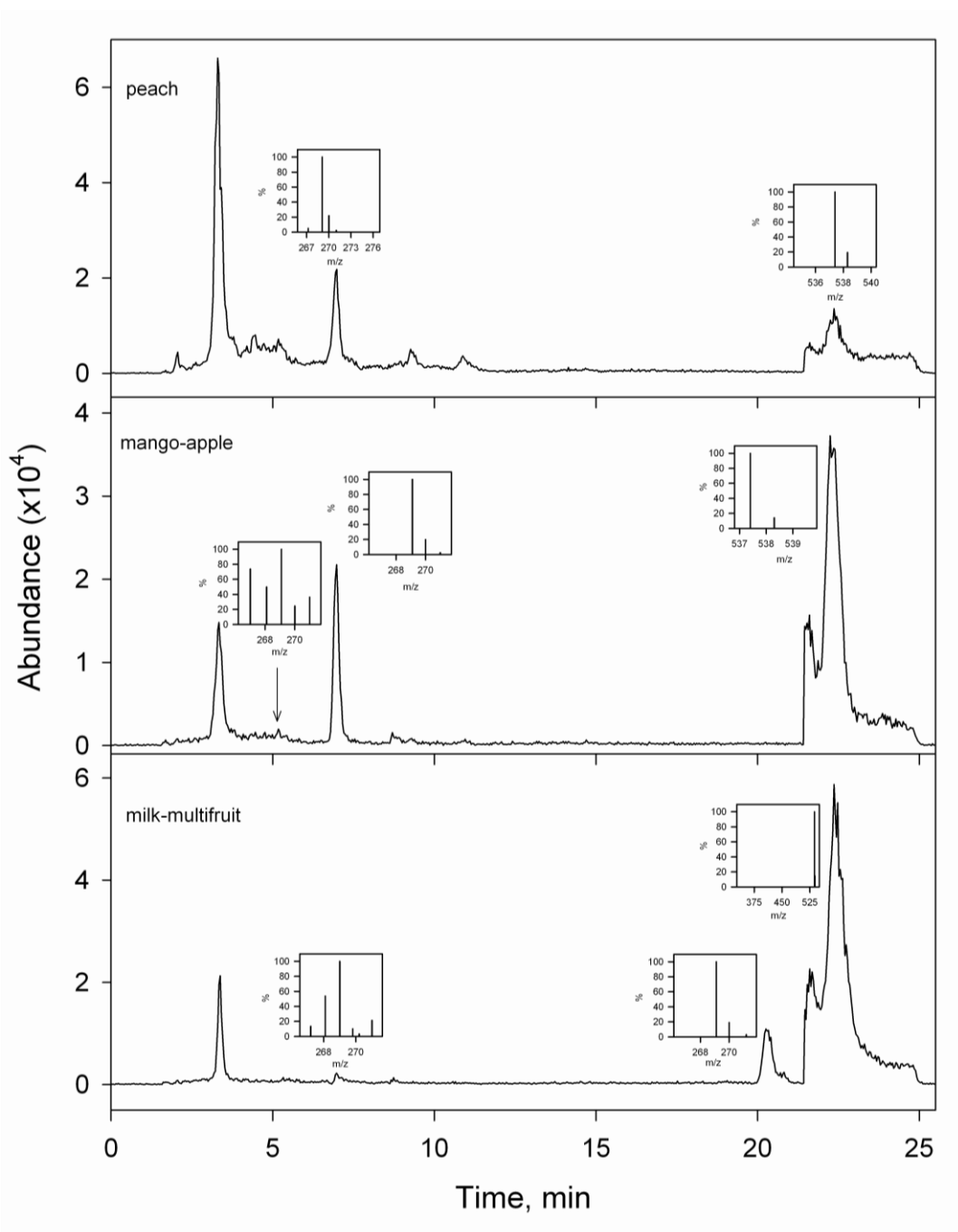


Fig. 4. Elution profiles obtained using DLLME-HPLC with APCI-MS detection for peach, mango-apple and milk-multifruit juices.

The absence of interfering compounds eluting at the retention times of the different vitamin A forms was checked by peak purity analysis and a comparison of MS spectra. The criteria for confirmation were a concordance between the retention times, fluorescence spectra and MS spectra for the standards, non-spiked samples and the samples spiked with the standards. Table 4 shows the

results obtained when using APCI-MS detection. The contents were similar when the fluorescence detector was used.

Table 4
Vitamin A content in juice samples by DLLME-HPLC-APCI-MS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Juice sample	All- <i>trans</i> -retinol	Retinyl acetate	β -Carotene
Orange	0.048 \pm 0.005	0.73 \pm 0.08	1.70 \pm 0.20
Pineapple	0.050 \pm 0.007	0.79 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
Pear	0.056 \pm 0.006	1.50 \pm 0.15	0.17 \pm 0.014
Banana	0.070 \pm 0.004	0.52 \pm 0.05	ND
Peach	0.086 \pm 0.010	2.30 \pm 0.27	0.89 \pm 0.16
Grapefruit	ND	0.69 \pm 0.01	ND
Apple-orange-banana	0.021 \pm 0.003	0.77 \pm 0.13	0.087 \pm 0.005
Apple-mango	0.080 \pm 0.007	2.90 \pm 0.12	2.30 \pm 0.27
Multivitamins	ND	0.074 \pm 0.006	11 \pm 1
Multifruits	ND	0.078 \pm 0.008	3.90 \pm 0.29
Milk-multifruit	0.049 \pm 0.009	0.047 \pm 0.005	3.30 \pm 0.54

Values are mean \pm SD (n=6)

The values reported by the manufacturers for the vitamin A content in juices were 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The contents found in the juices analyzed decreased with time, compared with the contents found in freshly prepared juices. Similar values were obtained for the vitamin A forms when using the proposed DLLME-HPLC procedure in both detection modes. The forms of vitamin A present in the juices varied greatly. The most abundant ester was found to be retinyl acetate, whose content ranged from 0.04 to 2.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, while the amount of all-*trans*-retinol ranged from 0.02 to 0.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and retinyl palmitate was not detected, except in the juice containing milk, in which RP was the main form (7.90 \pm 1.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Carotenoid β -carotene was present in the orange, peach, mango and multifruit juices at high concentrations.

Finally, the reliability of the method was further checked by using two certified reference materials, infant/adult nutritional formula SRM 1849a and whole

milk powder ERM[®]-BD600. Table 5 shows the results obtained. The values obtained by the proposed DLLME-LC-APCI-MS method were in excellent agreement with the certified contents. The statistical study using the paired *t*-test showed that there was no significant difference (95% confidence interval) between the results obtained and the certified values (the *P* value obtained was 0.666). Such data also confirm the efficacy of the extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous vitamin A in juices.

Table 5
Vitamin A content in certified reference materials

Reference material	DLLME-LC-APCI-MS (mg kg ⁻¹)		Certified value (mg kg ⁻¹)
	All- <i>trans</i> -retinol	Retinyl palmitate	Vitamin A
Infant/adult nutritional formula SRM 1849a	—	7.98±0.58	7.68±0.23 mg kg ⁻¹ retinol equivalents, total (<i>trans</i> + <i>cis</i>)-retinol, added as retinyl palmitate ^a
Whole milk powder ERM [®] -BD600	3.72±0.27	—	3.8 mg kg ⁻¹ all- <i>trans</i> -retinol and 4.1 mg kg ⁻¹ all- <i>trans</i> -retinol and 13- <i>cis</i> -retinol ^a

4. CONCLUSION

The use of a miniaturized preconcentration procedure based on DLLME coupled to HPLC permits low detection limits because of the high enrichment power of DLLME, with the additional advantage of using very low quantities of solvents. The combination of MS data with retention times, the fragmentation patterns of R, RA, RP and β-C obtained by APCI, and the fluorescence spectra made peak identification very reliable. The practical applicability of the method was demonstrated by the quantitative analysis of commercially available fruit juices to provide reliable chromatographic fingerprints of their vitamin A forms, avoiding the

tedious saponification step. The validation procedure indicated that this method affords reliable analysis and is appropriate for vitamin A quality control of complex matrices using the new green sample preparation techniques.

Acknowledgements

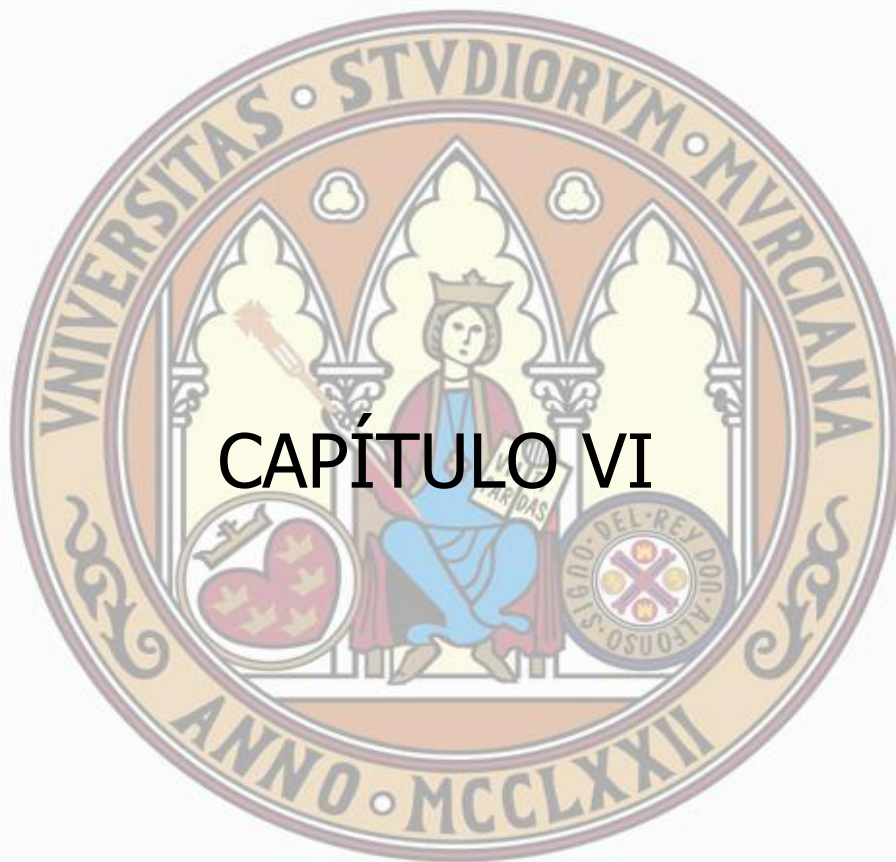
The authors acknowledge the financial support of the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10), the Spanish MICINN (Project CTQ2009-08267/BQU) and Hero España, S.A.. M. Bravo-Bravo acknowledges a fellowship from Fundación Séneca, CARM.

REFERENCES

- [1] P. Sauvant, M. Cansell, A. Abdessattar, H. Sassi, C. Atgié, *Food Res. Int.* 46 (2012) 469.
- [2] E. Fernández-García, I. Carvajal-Lérida, M. Jarén-Galán, J. Garrido-Fernández, A. Pérez-Gálvez, D. Hornero-Méndez, *Food Res. Int.* 46 (2012) 438.
- [3] P.T. Gardner, T.A.C. White, D.B. McPhail, G.G. Duthie, *Food Chem.* 68 (2000)471.
- [4] F. Granado, B. Olmedilla, I. Blanco, E. Rojas-Hidalgo, *J. Agric. Food Chem.* 40(1992) 2135.
- [5] K. Brandt, L.P. Christensen, J. Hansen-Moller, S.L. Hansen, J. Haraldsdottir, L. Jespersen, S. Purup, A. Kharazmi, V. Barkholt, H. Frokiaer, M. Kobaek-Larse, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 384.
- [6] C. Sánchez-Moreno, L. Plaza, B. de Ancos, P. Cano, *J. Sci. Food Agric.* 83 (2003) 430.
- [7] F.A. Tomás-Barberán, *Aliment. Nutr. Salud* 10 (2003) 41.
- [8] M.M. Donma, O. Donma, *Food Res. Int.* 38 (2005) 681.
- [9] Commision Directive 1996/5/EC, of 16 February 1996 on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children (1996).

- [10] European Standard CSN EN 12823-1, Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 1: Measurement of all-trans-retinol and 13-cis-retinol, European Committee for Standardization, Brussels (2000).
- [11] European Standard CSN EN 12823-2, Foodstuffs - Determination of vitamin A by high performance liquid chromatography - Part 2: Measurement of β -carotene, European Committee for Standardization, Brussels (2000).
- [12] R. Andreoli, M. Careri, P. Manini, G. Mori, M. Musci, *Chromatographia* 44(1997) 605.
- [13] R.B. van Breemen, C.R. Huang, *FASEB J.* 10 (1996) 1098.
- [14] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4394.
- [15] A. Lienau, T. Glaser, M. Krucker, D. Zeeb, F. Ley, F. Curro, K. Albert, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5192.
- [16] F. Priego Capote, J. Ruiz Jiménez, J.M. Mata Granados, M.D. Luque de Castro, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1745.
- [17] T. Huang, W. Zhang, J. Liu, Y. Tian, G. Yang, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 712.
- [18] Y.O. Lim, B. Kim, S. Ahn, J. Kim, *Food Chem.* 126 (2011) 1393.
- [19] O. Midttun, P.M. Ueland, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 1942.
- [20] R.B. van Breemen, D. Nikolic, X. Xu, Y. Xiong, M. van Lieshout, C.E. West, A.B. Schilling, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 245.
- [21] Y. Wang, X. Xu, M. Van Lieshout, C.E. West, J. Lugtenburg, A.F. Verhoeven-Creemers, D.P. Muhilal, R.B. Van Breemen, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4999.
- [22] Y. Wang, W. Y Chang, G.S. Prins, R.B.J. van Breemen, *J. Mass. Spectrom.* 36 (2001) 882.
- [23] P. McCaffery, J. Evans, O. Koul, A. Volpert, K. Reid, M.D.J. Ullman, *Lipid Res.* 43 (2002) 1143.
- [24] C.W. Huck, M. Popp, H. Scherz, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 441.
- [25] O. Heudi, M.J. Trisconi, C.J. Blake, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 115.

- [26] R. Andreoli, P. Manini, D. Poli, E. Bergamaschi, A. Mutti, W.M.A. Niessen, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 987.
- [27] D. Zhu, Y. Wang, Y. Pang, A. Liu, J. Guo, C.A. Bouwman, C.E. West, R.B. van Breemen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2427.
- [28] M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, A. Wada, T. Mori, K. Murata, R. Nishino, T. Ukita, K. Uenishi, K. Tanaka, T. Okano, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 192.
- [29] T.E. Gundersen, N.E. Bastani, R. Blomhoff, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1176.
- [30] A. Gentili, F. Caretti, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 684.
- [31] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119.
- [32] C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar, R. Batlle, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 809.
- [33] S. Mitra (Ed), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley-Interscience, New Jersey, 2003.
- [34] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [35] P. Viñas, M. Bravo-Bravo, I. López-García y M. Hernández-Córdoba, *Talanta* in press.
- [36] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491.



CAPÍTULO VI

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR
DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON
IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA
PARA EL ANÁLISIS DE LAS VITAMINAS D Y K EN
ALIMENTOS USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA
LÍQUIDO-LÍQUIDO

La vitamina D es un grupo de secosteroides liposolubles que es necesaria para la salud, para mantener los huesos fuertes y ayudar al cuerpo a absorber el calcio de los alimentos. Las dos formas principales son ergocalciferol (D₂) y colecalciferol (D₃).

Las fuentes dietéticas incluyen especies de pescados grasos, huevos, hígado de ternera y aceites de hígado de pescado [1–2]. En la mayoría de los alimentos, la vitamina D está presente naturalmente como colecalciferol, en algunos alimentos enriquecidos está presente el ergocalciferol, y algunos alimentos contienen ambas formas [3].

La Figura VI.1 incluye las fórmulas químicas de las formas de la vitamina D.

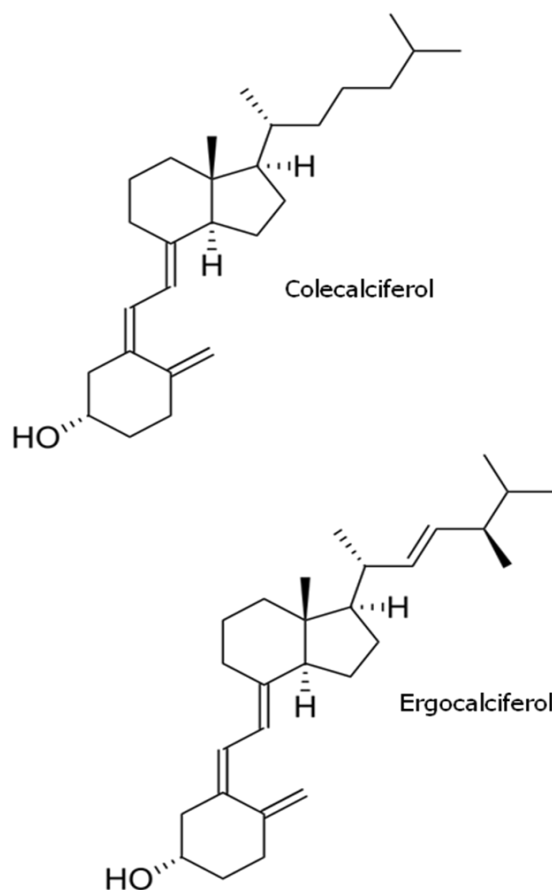


Figura VI.1. Fórmulas químicas de colecalciferol y ergocalciferol

Ambas especies químicas exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible. Los máximos de absorción se encuentran a 265 nm.

La vitamina K es un grupo de naftoquinonas similares estructuralmente, que son necesarias para la coagulación de la sangre y en varios procesos metabólicos en los huesos y otros tejidos. Incluye dos homólogos naturales, la vitamina K₁ (filoquinona), que se encuentra en vegetales de hojas verdes y en el aceite de soja [4] y la vitamina K₂ (menaquinona), que se encuentra en la carne, huevos y productos lácteos [5]. Aunque las formas naturales K₁ y K₂ no son tóxicas, la forma sintética K₃ (menadiona) sí muestra toxicidad.

La Figura VI.3 incluye las fórmulas químicas de los homólogos de la vitamina K.

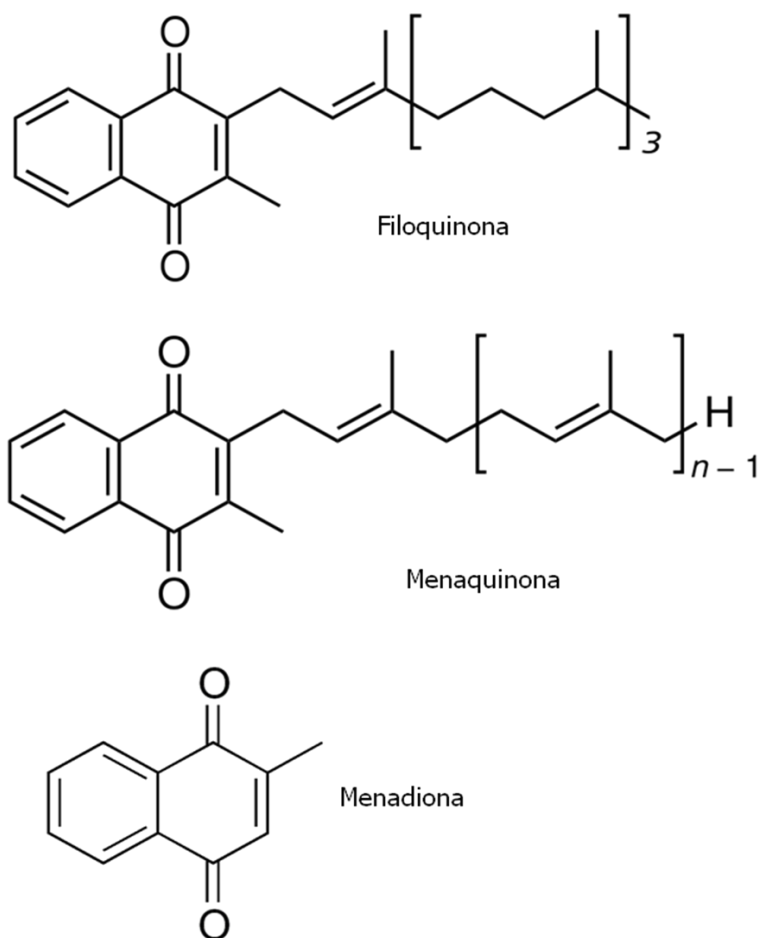


Figura VI.3. Fórmulas químicas de las distintas formas de la vitamina K

Todas estas especies químicas exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible. Los máximos de absorción se encuentran a 245 nm.

Una dieta balanceada en vitaminas permite mantener una buena salud. Sin embargo, hay algunas situaciones en las que está claramente indicada la suplementación con vitaminas. Muy pocos alimentos contienen naturalmente vitaminas D y K, por esta razón, muchos alimentos son enriquecidos. El enriquecimiento con vitaminas presenta menos problemas en el procesado que con minerales o proteínas, debido a que se requieren menores cantidades. Para algunas vitaminas, las ingestas excesivas están asociadas con toxicidad o un riesgo para la salud [6].

Las vitaminas están presentes usualmente a niveles bajos y están acompañadas por otros compuestos con comportamiento químico similar, siendo además muy inestables. La extracción de los alimentos requiere condiciones específicas dependiendo de la estabilidad de cada vitamina frente al pH, temperatura, luz, oxígeno y sus enlaces con la matriz del alimento.

Los métodos clásicos de análisis de la vitamina D incluyen saponificación para eliminar los triglicéridos y/o extracción líquido-líquido en disolventes orgánicos de baja polaridad, como es el caso de los Métodos Estándar de Análisis [7], en los cuales las vitaminas D₃ y D₂ se saponifican en los alimentos usando disolución de hidróxido potásico en metanol y se extraen con un disolvente. La disolución del extracto de la muestra se analiza por LC semi-preparativa en fase-normal (NP-LC) seguida por LC en fase-reversa. El método no es aplicable a alimentos que contienen tanto vitamina D₃ como D₂.

Ya que la vitamina K es destruida por los álcalis fuertes, la eliminación de los triglicéridos antes de la extracción requiere hidrólisis enzimática y extracción en disolventes no-polares [8].

LC es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de vitaminas en alimentos. Se han publicado varias revisiones describiendo el uso de

procedimientos LC [9–10]. Algunos estudios para las vitaminas D y K usan sistemas de detección UV–vis [11–15], fluorescencia [16–20] o electroquímica [21–25] para el análisis de alimentos. El acoplamiento de LC y MS combina la resolución de LC con la especificidad de la detección de MS. Así, se han propuesto varios procedimientos para la determinación de las vitaminas D y/o K en alimentos por LC–MS usando haz de partículas [26–27], ESI [28–31] y APCI [32–43], que permiten obtener mejor selectividad que cuando se usan sistemas de detección UV o fluorescente.

Normalmente se requiere una etapa de extracción como técnica de preparación de la muestra previa a la determinación, que incluye SPE o LLE, técnicas que a menudo consumen tiempo y son complicadas [44]. Se ha usado una técnica innovadora, la extracción en punto de nube [45] para la preconcentración de las vitaminas. La miniaturización del laboratorio analítico usando SPME o LPME, permite obtener elevados factores de preconcentración para los analitos con coeficientes de partición elevados. Estas técnicas cumplen las prioridades de la química verde con respecto al medio ambiente mediante el uso de procesos químicos que utilizan cantidades pequeñas de disolventes para disolver o extraer analitos [46]. Así, se ha utilizado SPME para la extracción de las vitaminas A, D₃ y E [47]. También se ha propuesto un procedimiento LPME usando solidificación de una gota flotante para la determinación de vitaminas liposolubles [48].

DLLME permite obtener factores de enriquecimiento elevados [49]. Considerando las nuevas técnicas limpias de preparación de la muestra para vitaminas basadas en DLLME, sólo se han descrito dos estudios para la determinación de la vitamina A [50–51].

Se pueden aplicar los diseños experimentales ortogonales basados en el método Taguchi [52] para diseñar un modelo de optimización. Así, se pueden considerar múltiples factores simultáneamente mediante un diseño ortogonal balanceado (OAD) de acuerdo con el número de parámetros, llevando a cabo

experimentos basados en OAD, analizando datos, identificando las condiciones óptimas y realizando experiencias de confirmación con los niveles óptimos de todos los parámetros.

El Capítulo VI de la Tesis Doctoral describe un método para la determinación con elevada sensibilidad de las vitaminas D₂, D₃, K₁, K₂ y K₃ en diferentes alimentos mediante el acoplamiento de DLLME con LC usando detección por diodos y APCI-MS.

Se ha aplicado el método experimental Taguchi para estudiar la posible influencia en el rendimiento del método de seis factores (cada factor a tres niveles, 27 experimentos), que son volumen de tetracloruro de carbono, volumen de metanol, volumen de la fase acuosa, pH de la muestra, concentración de cloruro sódico y tiempo de la etapa de centrifugación.

El procedimiento DLLME optimizado consistió en inyectar rápidamente 2 mL de metanol (disolvente dispersante) conteniendo 150 µL de tetracloruro de carbono (disolvente extractante) en la muestra acuosa, formando así una disolución turbia. La separación de fases se llevó a cabo por centrifugación, y la fase sedimentada se evaporó con nitrógeno, reconstituyendo con 50 µL de acetonitrilo e inyectando en el LC.

Los análisis LC se llevaron a cabo usando una fase móvil compuesta por acetonitrilo, 2-propanol y agua, mediante elución por gradiente. La cuantificación se realizó por el método de adiciones estándar. Los espectros APCI-MS, en combinación con los espectros UV, permitieron la identificación correcta de los compuestos en las muestras de alimentos. El método se validó de acuerdo con normas internacionales y usando un material de referencia certificado.

El método se aplicó al análisis de las vitaminas D y K en varios productos vegetales y alimentos infantiles. Se obtuvo poca variación en las formas de vitamina K presentes en productos vegetales, siendo el vitámero más abundante en todas las muestras la filoquinona, mientras que no se detectaron menadiona y

vitamina D. Por el contrario, la forma mayoritaria en los alimentos infantiles fue el colecalciferol, mientras que no se detectó ergocalciferol.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que se encuentran publicados en la revista *Talanta*.

Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode–array and atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry detection

Talanta 115 (2013) 806-813

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.050>

Published in the special issue of ISC´2012 (29th International Symposium on Chromatography) with guest editor B. Buszewski & J. Kowalska. Torun (Polonia), 11-15 Septiembre 2012.

La dirección url para esta publicación es:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003991401300550X>

ABSTRACT

A simple and rapid method was developed using reversed-phase liquid chromatography (LC) with both diode array (DAD) and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric (APCI-MS) detection, for the simultaneous analysis of the vitamins ergocalciferol (D₂), cholecalciferol (D₃), phylloquinone (K₁), menaquinone-4 (K₂) and a synthetic form of vitamin K, menadione (K₃). The Taguchi experimental method, an orthogonal array design (OAD), was used to optimize an efficient and clean preconcentration step based on dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). A factorial design was applied with six factors and three levels for each factor, namely, carbon tetrachloride volume, methanol volume, aqueous sample volume, pH of sample, sodium chloride concentration and time of the centrifugation step. The DLLME optimized procedure consisted of rapidly injecting 3 mL of acetonitrile (disperser solvent) containing 150 µL carbon tetrachloride (extraction solvent) into the aqueous sample, thereby forming a cloudy solution. Phase separation was performed by centrifugation, and the sedimented phase was evaporated with nitrogen, reconstituted with 50 µL of acetonitrile, and injected. The LC analyses were carried out using a mobile phase composed of acetonitrile, 2-propanol and water, under gradient elution. Quantification was carried out by the standard additions method. The APCI-MS spectra, in combination with UV spectra, permitted the correct identification of compounds in the food samples. The method was validated according to international guidelines and using a certified reference material. The validated method was applied for the analysis of vitamins D and K in infant foods and several green vegetables. There was little variability in the forms of vitamin K present in vegetables, with the most abundant vitamer in all the samples being phylloquinone, while menadione could not be detected. Conversely, cholecalciferol, which is present in food of animal origin, was the main form in infant foods, while ergocalciferol was not detected.

Keywords:

Dispersive liquid-liquid microextraction; LC-APCI-MS; Vitamin D (ergocalciferol (D₂), cholecalciferol (D₃)); Vitamin K (phyloquinone (K₁), menaquinone 4 (K₂), menadione (K₃)); Foods

1. INTRODUCTION

Vitamin D is a group of fat-soluble secosteroids which is needed to maintain strong bones and to help the body absorb calcium from foods, and has two major forms, ergocalciferol (D₂) and cholecalciferol (D₃). Dietary sources include fatty fish species, egg, beef liver and fish liver oils [1-2]. In most foodstuffs, vitamin D is naturally present as cholecalciferol, while ergocalciferol is sometimes present in fortified foodstuffs, and some foods contain both forms [3]. Vitamin K is a group of structurally similar naphthoquinones, which are needed for blood coagulation and in metabolic pathways in bone and other tissues. It includes two natural homologues, vitamin K₁ (phyloquinone), found in green leafy vegetables and in soybean oil [4] and vitamin K₂ (menaquinone), found in meat, eggs and dairy products [5]. Although the natural K₁ and K₂ forms are non-toxic, the synthetic form K₃ (menadione) has shown toxicity. For certain vitamins, excessive intakes are associated with toxicity or a health risk [6].

Vitamins are usually present at low levels and are accompanied by other compounds. Extraction from foods requires specific conditions, depending on the stability of each vitamin with pH, temperature, light, and oxygen, and its bond to the food matrix. Classical methods of vitamin D analysis include saponification to remove triglycerides and/or liquid-liquid extraction (LLE) in low polarity organic solvents, as is the case of the Standardized Method of Analysis [7]. The sample extract solution is analyzed by normal-phase LC followed by reversed-phase LC. However, the method is not applicable to foods containing both vitamin D₃ and D₂, because one vitamer is used as internal standard when the other is to be determined [7]. Because vitamin K is destroyed by strong alkali, the removal of

triglycerides before extraction requires enzymatic hydrolysis and extraction into non-polar solvents [8].

LC is the technique most widely used for vitamin determination in foods [9-10]. Some studies for vitamins D and K used ultraviolet-visible (UV-vis) [11-15], fluorescence [16-20] or electrochemical [21-25] detection. The coupling of LC and mass spectrometry (MS) combines high resolution and specificity, and several papers have proposed the determination of vitamins D and/or K in foods by LC-MS using particle beam [26-27], electrospray ionization (ESI) [28-31] and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [32-43], leading to better selectivity than when using UV-vis or fluorescence detection systems.

An extraction step such as solid phase extraction (SPE) or liquid-liquid extraction (LLE) [44], is normally required for sample preparation. An innovative technique, cloud point extraction [45] has been used for the preconcentration of vitamins. Miniaturized techniques (solid-phase microextraction, SPME or liquid-phase microextraction, LPME), which permit high preconcentration factors for analytes with high partition coefficients, have also been used for the purpose. These techniques share the priorities of green chemistry with respect to the environment through the use of chemical processes involving low amounts of solvents for dissolving or extracting analytes [46]. Thus, SPME has been used for the extraction of vitamins A, D₃ and E [47]. An LPME procedure based in solidification of a floating drop has been proposed for the determination of fat-soluble vitamins [48]. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a simple and rapid technique, that uses a very low volume of extraction solvent and has been successfully applied for the extraction and determination of mainly organic compounds in aqueous samples, providing high enrichment factors [49]. DLLME has only been used three times as a clean-up sample preparation technique for the determination of vitamin A [50-51] and α -tocopherol [52].

The present study describes a sensitive determination of vitamins D₂, D₃, K₁, K₂ and K₃ in different foods by coupling DLLME with LC using diode-array and APCI-MS detection. The Taguchi experimental method [53] was applied to study the possible influence on performance of six factors (each factor at three levels, 27

experiments) using a balanced orthogonal array design (OAD). The novelty of this study is based on the use for the first time of the technique DLLME for the determination of vitamins D and K using green chemistry principles coupled to LC-MS, avoiding the use of high amounts of solvents and the generation of residues.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTS

Chromatographic quality acetonitrile, ethanol, isopropanol and carbon tetrachloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The water used was purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). Ergocalciferol (vitamin D₂), cholecalciferol (vitamin D₃), phylloquinone (vitamin K₁), menaquinone-4 (vitamin K₂) and menadione (vitamin K₃) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solutions (1000 µg mL⁻¹) were prepared in ethanol and stored in amber vials at -20 °C. They were stable for at least one month. Working standard solutions were prepared daily in ethanol and stored at 4 °C. 0.2 M sodium formate/formic acid and ammonium chloride/ammonia buffer solutions were used.

2.2. INSTRUMENTATION FOR LC-DAD

The LC-DAD system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature. The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The diode-array detector (Agilent 1200, G1315D) was operated at 245 nm and 265 nm for vitamins K and D, respectively. The UV-vis spectra, recorded in the 200-600 nm range, were used for the tentative identification of vitamins at the corresponding retention times.

The analytical column was a Zorbax Eclipse ODS non-encapped (25 cm x 0.46 cm x 5 µm) (Agilent). The mobile phase consisted of acetonitrile, isopropanol and water, operating under gradient elution conditions with the optimized program being: an isocratic step with a 70:30 acetonitrile:water (v/v) mixture for 2 min, then

a linear gradient from 70:30 acetonitrile:water (v/v) to 60:40 acetonitrile:isopropanol (v/v) in 0.1 min, which was then held for 12 min. Finally, the initial conditions were re-established in 1 min and held for 10 min. The flow-rate was 1 mL min⁻¹.

Aliquots of 20 µL were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA). Vegetable samples were homogenized using a IKA A 11 homogenizer (Staufen, Germany).

2.3. LC-APCI-MS SYSTEM

The LC system consisted of an Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump (G1312A) operating at a flow-rate of 1 mL min⁻¹. The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The column was maintained in a thermostated compartment at 25°C (G1316A), and injection (20 µL) was performed using an autosampler (G1329A). The column and the gradient program for the mobile phase were the same as those optimized for DAD detection. The LC system was coupled to an ion-trap mass spectrometer (1036 model) equipped with an APCI interface operating in negative ion mode for 8 min (vitamin K₃) and in positive ion mode until the end of analysis. The selected ion monitoring (SIM) mode was applied using the ions *m/z* 172 from 0 to 8 min (K₃), *m/z* 445 from 8 to 10.6 min (K₂), *m/z* 397 from 10.6 to 12.3 min (D₂), *m/z* 385 from 12.3 to 13.1 min (D₃) and *m/z* 451 from 13.1 to 16 min (K₁). The instrument parameters were: drying temperature 350 °C, APCI temperature 400 °C, drying gas flow 5 L min⁻¹ and nebulizer gas pressure 60 psi.

2.4. SAMPLE PREPARATION AND DLLME PROCEDURE

The foods of plant origin consisted of different types as spinach, cos lettuce, iceberg lettuce, and lamb's lettuce, all commercially obtained from markets. The vegetables were cut into small pieces and homogenized. An amount of 0.2-2 g (depending of the content of the vitamin) of crushed vegetable was weighed in a polypropylene tube with conical bottom and 3 mL of acetonitrile were added. The

suspension was centrifuged at 6000 rpm for 10 min. The supernatant was recovered and used as dispersive solvent, to which 150 μL of carbon tetrachloride (extractant solvent) was added. The infant foods and certified reference material, infant/adult nutritional formula SRM 1849a supplied by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA), were analyzed in the same way but using 50-250 mg of the sample. Solutions were stored in 2 or 10 mL amber glass vials. To filter the samples, PVDF filters (0.45 μm) (Teknokroma, Barcelona, Spain) were used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge was used at 3000 rpm, which is near the maximum speed supported by the conical glass tubes.

For DLLME procedure, the 3 mL-volume organic fraction resulting from the sample extraction was recovered and used as dispersive solvent, to which 150 μL of carbon tetrachloride (extractant solvent) was added. Then, the mixture was rapidly injected into 6 mL of water using a micropipette, and gently shaken manually for several seconds. After centrifugation at 3000 rpm for 2 min, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (volume recovered 50 ± 10 μL). The sedimented phase was collected and evaporated to dryness under a nitrogen flow. The residue was reconstituted with 50 μL of acetonitrile, and a volume of 20 μL was injected into the LC.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

For selecting the stationary phase, different C_8 and C_{18} columns, including a Zorbax Eclipse XDB- C_8 (15 cm x 0.46 cm x 5 μm), Supelco Discovery HS C_{18} (15 cm x 0.21 cm x 5 μm), Zorbax ODS endcapped (15 cm x 0.46 cm x 5 μm) and Zorbax Eclipse ODS non-endcapped (25 cm x 0.46 cm x 5 μm) were compared. From these stationary phases, the best retention and resolution (when using different mobile phases of acetonitrile, isopropanol and water mixtures) were obtained with C_{18} rather than with C_8 stationary phases. One drawback was the

band pair of vitamins D₂ and D₃, for which none of the mobile phases assayed provided good separation, poor peak shapes, peak overlap and deficient resolution being observed. Columns of different lengths, diameters and chemical properties were compared in an attempt to overcome the problem. When the Discovery HS C₁₈ and the endcapped Zorbax ODS columns were assayed using different organic solvent-water mixtures, an increase in the percentage of organic solvent led to reduced retention for all compounds, giving wide peaks that proved inappropriate for the chromatographic purpose. The non-endcapped Zorbax Eclipse ODS was finally selected since narrow peaks and improved tailing factors were achieved.

Several mobile phases corresponding to mixtures of methanol, isopropanol or acetonitrile and water in different percentages were assayed. A 70:30 (v/v) acetonitrile:water mixture in isocratic mode led to the elution of vitamin K₃ (the least well-retained) with a retention factor of 2.5, while vitamins D₂, D₃ and K₁ eluted with very high retention factors. Vitamin K₃ eluted at the void time for higher acetonitrile percentages. Consequently, several mixtures using isopropanol were assayed. After several experiments involving isocratic elution with different solvent proportions, gradient elution was investigated, with the optimized gradient program being included in the Experimental section. The mobile phase flow-rate was investigated over the range from 0.8–1.5 mL min⁻¹ to determine the effect on the separation and resolution of fat-soluble vitamins. The optimum value of 1.0 mL min⁻¹ was selected because lower flow rates resulted in longer retention times. Table 1 summarizes the order of elution, retention times and retention factors for the analytes with the selected program. Values for the selectivity factor (α) and resolution (R_s) were in the 1.1-2.5 and 1.1-13 ranges, respectively.

Table 1

LC-APCI-MS parameters for the vitamins

Analyte	Retention time (min)	Retention factor	Ionization mode	<i>m/z</i>
Menadione (K ₃)	5.3	2.8	Negative	172
Menaquinone-4 (K ₂)	9.8	6.0	Positive	445
Ergocalciferol (D ₂)	12.1	7.6	Positive	397
Cholecalciferol (D ₃)	12.6	8.0	Positive	385
Phylloquinone (K ₁)	14.1	9.1	Positive	451

3.2. APCI-MS DETECTION

Protonation of liposoluble vitamins is difficult, and the sensitivity obtained using electrospray ionization was very low. APCI was selected for ionization as vitamins D and K are neutral and non-volatile compounds of low polarity, thus giving high signals in APCI. The optimal ionization mode was studied using a full-scan of each analyte, and maximum sensitivity was obtained operating in negative ion mode for vitamin K₃ and in positive ion mode for all the other vitamins, which showed the protonated molecule $[M+H]^+$ as the base peak. Then, optimization of the *m/z* values was carried out in the selected ion monitoring (SIM) mode. The mass spectrum of vitamin D₂ yielded a protonated molecule $[M+H]^+$ at *m/z* 397, a fragment obtained through the loss of one molecule of water generating the less intense ion $[MH-H_2O]^+$ at *m/z* 379, and the fragment at *m/z* 271 corresponding to the loss of its side chain. The vitamin D₃ spectrum contained protonated molecule $[M+H]^+$ at *m/z* 385, and the dehydrated protonated ion $[MH-H_2O]^+$ at *m/z* 367. Vitamins K₁ and K₂ produce protonated molecular ions $[M+H]^+$ at *m/z* 451 and 445, respectively, and both homologues lose their side chain producing the ion at *m/z* 187. Finally, the experiments in APCI(-) showed that the negative ion *m/z* 172, which corresponds to the loss of the side chain, was the most abundant for vitamin K₃, while no molecular ion was observed.

Thus, the ion *m/z* 172 in negative mode was used from 0 to 8 min. However, the protonated ions using APCI(+) were more intense and had higher signal-to-

noise (S/N) ratios for the rest of the vitamins. Consequently, the positive mode was used for the ion m/z 445 from 8 to 10.6 min (K_2), the ion m/z 397 from 10.6 to 12.3 min (D_2), the ion m/z 385 from 12.3 to 13.1 min (D_3) and the ion m/z 451 from 13.1 to 16 min (K_1). Table 1 summarizes the MS parameters selected for the vitamins using this fragmentation study. Other MS parameters were: plate potential, 500 V; skimmer between -17 and 29 V; target trap 30000; maximum accumulation time, 300 ms; scan from 100 to 500 m/z .

Figure 1A shows the elution profile obtained using DLLME-LC-DAD, and Fig. 1B shows the corresponding chromatogram obtained by DLLME-LC-APCI-MS in SIM mode for a standard solution of the vitamins D and K in the selected conditions, as well as the mass spectra of the extracted ions for each one of the analytes (Fig. 1C).

3.3. OPTIMIZATION OF THE TAGUCHI DESIGN METHOD FOR THE DLLME PROCEDURE

The DLLME step was optimized by studying the experimental variables which affect the extraction efficiency, using the Taguchi method. For this purpose, an aqueous standard solution containing analyte concentrations of about 100 ng mL⁻¹ was used. First, the solvents used as extractant and dispersant were selected. The solvents should have a low boiling temperature because the organic phase recovered has to be evaporated and reconstituted using a solvent compatible with reversed-phase LC. Experiments were carried out using carbon tetrachloride, chloroform, 1,2-dichloroethane and dichloromethane and a solvent volume of 150 μ L (in the presence of 2 mL acetonitrile as disperser solvent). Higher peak areas were obtained using both chloroform and carbon tetrachloride. The volume obtained for the organic drop collected after centrifugation of the dispersion was similar for all extractants. For most analytes, the best extraction was achieved with carbon tetrachloride, which was selected. The disperser solvent was selected by rapidly injecting 2 mL of each disperser containing 150 μ L of CCl₄ into 10 mL of the aqueous standard solution. Acetone, methanol and acetonitrile

were assayed because they are miscible in the extraction solvent and in the aqueous solution. The volume recovered for the organic drop was again similar for all disperser solvents, while the extraction efficiency was higher for all vitamins when acetonitrile was used, and so it was selected for the optimized method.

The Taguchi experimental method, an orthogonal array design, was applied to study the possible influence on the performance of the DLLME method of six

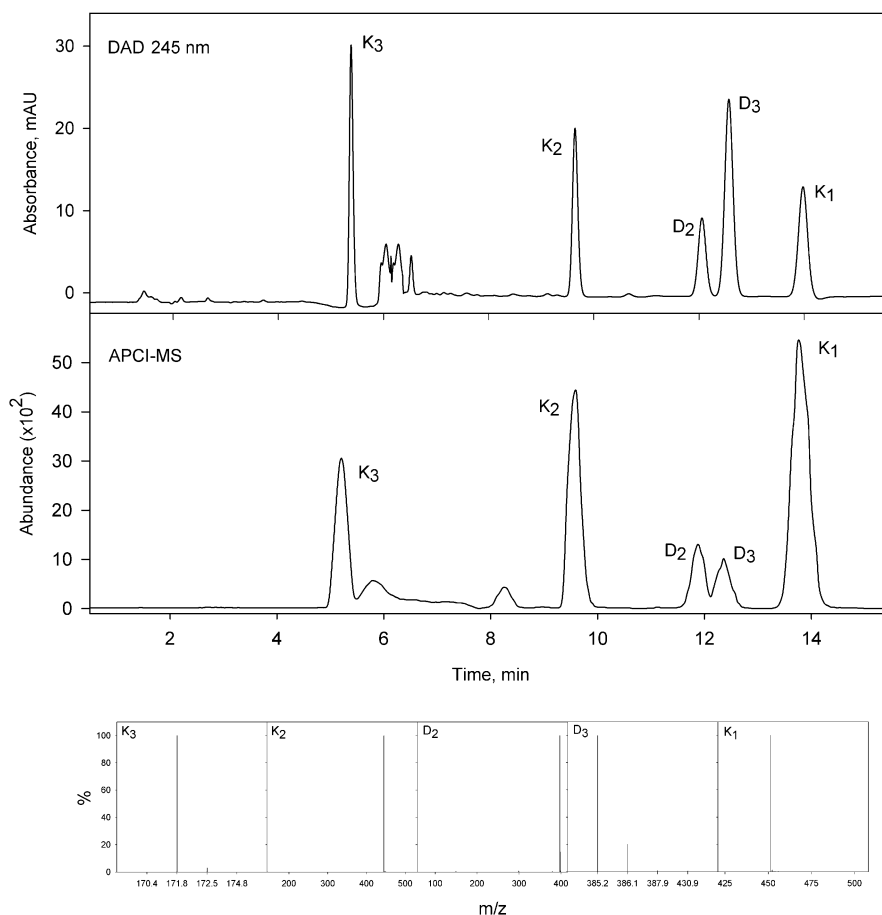


Fig. 1. Elution profile using DLLME-LC-DAD (A) and DLLME-LC-APCI-MS in SIM mode (B) for a standard solution of the vitamins D and K in the selected conditions. (C) APCI mass spectra of the extracted ions for each one of the analytes.

factors (each factor at three levels), namely extractant organic volume, disperser volume, aqueous phase volume, pH of aqueous phase, sodium chloride concentration and duration of the centrifugation step. The temperature, extraction time and stirring were not considered as variables, as equilibrium was reached

rapidly. The centrifugation speed was fixed at 3000 rpm. Table 2 shows the three levels selected for each of the six factors in the Taguchi design proposed. An OAD that considers the factors without their interactions with 27 different trials was selected.

Table 2
Variables selected for the Taguchi design

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
Extractant organic volume, μL	100	150	200
Aqueous phase volume, mL	3	6	10
Disperser volume, mL	0.5	1	3
pH	3	6	9
Sodium chloride, % (m/v)	0	10	25
Centrifugation time, min	1	2	3

Fig. 2 shows the effects of the six factors on the mean response (A) and the signal-to-noise ratio (B). The signal-to-noise ratio was calculated as a higher-is-better response ($S/N = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right)$), where n was the number of repetitions in each of the 27 trials ($n=3$), and y_i were the experimental response values obtained for each trial.

The extraction efficiency was nearly constant up to 150 μL of extractant volume but decreased for high carbon tetrachloride volume due to the dilution effect; therefore a 150 μL volume was selected. When varying the volume of the disperser solvent, it was found that for volumes assayed below 1 mL, dispersions were deficient and peak areas were very low. For higher volumes between 1 and 3 mL, the sensitivity gradually increased, and a volume of 3 mL was selected. Similarly, higher volumes of the aqueous solution led to greater sensitivity, and thus 6 mL was selected for the aqueous phase.

To evaluate the influence of the pH, different samples were adjusted to pH values between 3 and 9 with 0.01 M buffer solutions. The volume of the sedimented organic solvent did not vary, and no significant differences in the analytical signals were observed. To study the effect of the ionic strength, the experiments were carried out at different sodium chloride concentrations ranging

from 0 to 25% (m/v). The results showed that extraction efficiency slightly decreased for all compounds when the salt concentration was increased. Therefore, the addition of NaCl to the extraction solution was discarded. The centrifugation time necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase was not relevant, and thus a medium value of 2 min at the maximum speed recommended for the glass conic tubes, 3000 rpm, was selected.

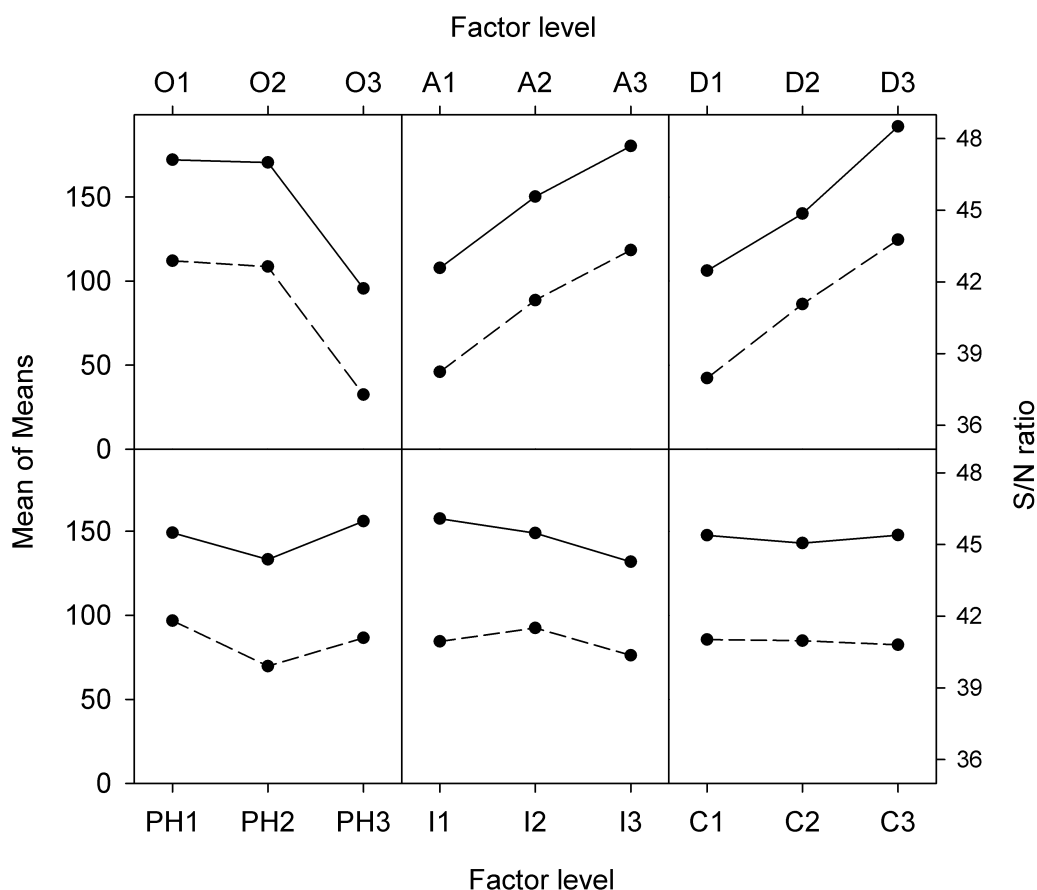


Fig. 2. Effects of factor levels of the extractant organic volume (O), aqueous phase volume (A), disperser volume (D), pH of the aqueous phase (pH), sodium chloride concentration (I) and centrifugation time (C) on the mean response (solid lines) and the signal-to-noise ratio (dotted lines) for the vitamins.

A statistical analysis of variance (ANOVA) was performed to judge which design parameters significantly affect the optimal procedure by calculating the sum of squared deviations, the mean square and the F value (Table 3). From the calculated variance ratios, F, it can be deduced that only three factors considered in the experimental design were statistically significant at a 95% confidence level (in all cases the calculated F was greater than the critical value). The three

variables with a significant effect on the extraction efficiency were the volume of the organic extractant, the disperser volume and the volume of the aqueous solution. The most influential factors were the volumes of both the extractant and the disperser solvents. The contribution of the residual error to the signal variability indicates the validity of the experimental design used. Consequently, it can be asserted that the experimental design used in this work takes into account all the variables affecting the response to be optimized, and that the levels tested are fit for the purpose.

Table 3
Results of the analysis of variance for mean response

Variation source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F	P	Contribution, %
Extractant volume, μL	2	34508	17254	5.59	0.016	33.2
Disperser volume, mL	2	33617	16808	5.44	0.018	32.4
Aqueous volume, mL	2	23926	11963	3.87	0.046	23.0
pH	2	2445	1222	0.4	0.680	2.4
NaCl, % (w/v)	2	3063	1531	0.5	0.619	2.9
Centrifugation time, min	2	135	67	0.02	0.978	0.1
Error	14	43231	3088			
Total	26	140924				

3.4. VALIDATION OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, recovery, accuracy, precision and robustness, according to international guidelines [54].

The linearity of the method was assessed from the calibration graphs obtained using DLLME-LC-DAD by least-squares linear regression analysis of the peak area *versus* analyte concentration using ten levels ($1\text{-}100\text{ ng mL}^{-1}$) in duplicate experiments. Quantification was performed by the external standard procedure. The results obtained are summarized in Table 4. The r^2 values were good ($r^2 > 0.99$), demonstrating the excellent linearity for the range studied. The

sensitivity of the method was evaluated by quantifying the limits of detection (LOD, calculated for a signal-to-noise ratio of 3) and the limits of quantification (LOQ, calculated for a signal-to-noise ratio of 10), which are also shown in Table 4. The enrichment factor (EF) was calculated as the ratio between the slope obtained by DLLME and the slope obtained by direct LC-DAD without preconcentration. Consequently, the EF values were 21.8, 23.9, 26.1, 24.4 and 21.9 for the vitamins K₃, K₂, D₂, D₃ and K₁, respectively. The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the elution times of the vitamins for chromatograms of different samples. The performance criteria from EU Commission Decision (2002/657/EC) [54] established the use of co-chromatography to improve the identification of analytes, especially when no suitable internal standard can be used. Thus, the extract prior to LC was divided into two parts, one of them being directly chromatographed, while the other was fortified with the standards and analyzed. To comply with the EU Decision [54], the variability in the spectra caused by the sample matrix and the detector performance should be verified. The absorption maxima in the spectrum of the analyte shall be at the same wavelengths as those of the calibration standard within a margin determined by the resolution of the detection system. For DAD, this is typically within ± 2 nm. The spectra of the vitamins in the samples were not visibly different from the spectra of the calibration standards. Consequently, no matrix compounds existed that might give a false positive signal in the samples.

Table 4
Method validation data for LC-DLLME

DAD Detection	K ₁	K ₂	K ₃	D ₂	D ₃
Linear range, ng mL ⁻¹	1-100	1-100	1-100	1-100	1-100
Regression coefficient, r ²	0.9915	0.9916	0.9997	0.9923	0.9906
Slope, mL ng ⁻¹	0.963±0.037	0.860±0.003	0.817±0.004	0.435±0.017	1.19±0.05
Detection limit, ng mL ⁻¹	0.3	0.3	0.2	0.6	0.4
Quantification limit, ng mL ⁻¹	0.9	0.9	0.8	2.0	1.3
APCI-MS Detection	K ₁	K ₂	K ₃	D ₂	D ₃
Linear range, ng mL ⁻¹	1-500	1-500	1-500	10-500	10-500
Regression coefficient, r ²	0.9978	0.9942	0.9990	0.9997	0.9967
Slope, mL ng ⁻¹	2602±49	685±30	503±7	84.9±1.1	70.8±2.5
Detection limit, ng mL ⁻¹	0.3	0.2	0.5	3.1	4.0
Quantification limit, ng mL ⁻¹	0.9	0.8	1.6	10	13

Calibration graphs were also obtained by using DLLME-LC-APCI-MS and the results obtained are also summarized in Table 4. SIM of the m/z 172 ion was used for the quantitative analysis of vitamin K₃, because it was the base peak of the negative ion APCI mass spectra of the compound. For the vitamins K₂, D₂, D₃ and K₁ the APCI mass spectra show higher abundance of the positive ions with m/z 445, 397, 385 and 451, respectively. Table 4 shows the values of r^2 , which again demonstrated good linearity for the range studied, as well as the LOD and LOQ values. The selectivity was also confirmed with the LC-APCI-MS data by comparing the variability in the MS spectra caused by the sample matrix and the detector performance.

A precision study was conducted on the basis of repeatability for the vegetable samples, calculated by using the relative standard deviation (RSD) from a series of ten consecutive DLLME-LC analyses of a sample spiked with all the analytes at 50 ng mL⁻¹. The RSD values were 4.1, 8.2, 7.6, 7.7 and 8.4 for K₃, K₂, D₂, D₃ and K₁, respectively. These values indicate that the precision of the method was satisfactory for control analysis purposes.

Quantitative analysis with APCI can be affected by signal suppression due to unknown matrix interferences produced by compounds co-eluting compounds from the sample, which affect analyte ionization [36]. This can be attributed to deprotonation, the presence of non-volatile components and, in complex samples,

large amounts of competing species of the available ions. This phenomenon may affect the reproducibility, linearity and accuracy of the method. However, since blank samples were not available, quantification was carried out using the standard additions method [34]. Standard additions were performed according to EU [54] by analyzing one portion of the native sample, while known amounts of the standard analytes of between two and five times the mean estimated of the analytes in the samples were added to the other test portions before analysis. A study of the relative recovery values for different samples is shown in Table 5.

3.5. SAMPLE PREPARATION

Extraction of the food samples was complex because the fat-soluble vitamins have different structures and chemical properties. Vitamins D₂ and D₃ are quickly destroyed by light, oxygen and acids, and that they are normally extracted from foods using alkaline saponification and subsequent extraction with an organic solvent. On the other hand, vitamin K₁ is degraded by light, oxygen and alkaline reagents, and is extracted from foods using organic solvents.

A direct liquid-phase extraction was used for the extraction of vitamins using different organic solvents, such as acetonitrile, ethanol, methanol, ethyl acetate and their mixtures. The best extractant leading to maximum recoveries of all analytes was acetonitrile. A second extraction step proved unnecessary. Sample preparation was conducted in dim light and at room temperature.

Table 5Recoveries^a from different samples (%)

Sample	Spike level (ng g ⁻¹)	K ₁	K ₂	K ₃	D ₂	D ₃
Cos lettuce	10	94 ± 5	89 ± 7	92 ± 6	93 ± 4	95 ± 5
		(5.3)	(7.9)	(6.5)	(4.3)	(5.3)
	20	96 ± 3	105 ± 4	97 ± 4	96 ± 4	88 ± 6
		(3.1)	(3.8)	(4.1)	(4.2)	(6.8)
	30	97 ± 4	91 ± 6	101 ± 5	91 ± 6	98 ± 4
		(4.1)	(6.6)	(5.0)	(6.6)	(4.1)
Infant cereals	10	92 ± 5	90 ± 5	89 ± 5	90 ± 5	103 ± 5
		(5.4)	(5.6)	(5.6)	(5.6)	(4.9)
	20	101 ± 4	97 ± 6	95 ± 5	92 ± 4	93 ± 5
		(4.0)	(6.2)	(5.3)	(4.3)	(5.4)
	30	96 ± 7	92 ± 5	103 ± 7	98 ± 3	95 ± 6
		(7.3)	(5.4)	(6.8)	(3.1)	(6.3)

^a Mean value ± standard deviation (n=3)

Values into brackets correspond to the RSD (%)

3.6. ANALYSIS OF FOOD PRODUCTS AND VALIDATION USING A CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Food samples were treated as described in the Experimental section and were analyzed. Figure 3 shows the elution profiles obtained using DLLME-LC with APCI-MS detection in SIM mode for (A) a lettuce sample (as well as the mass spectra of the extracted ions for each one of the peaks) and DAD detection for (B) the certified reference material. Similar chromatograms were obtained for the other samples. The elution profiles demonstrate the absence of interfering compounds eluting at the retention times of the different vitamins. Comparison of the retention times for the compounds in the standard mixture and the fortified samples and, especially, the MS spectra, allowed the identification of the vitamins. The

chromatograms obtained using DAD detection also demonstrated the agreement between UV-vis spectra (200-650 nm) for the standards and the analytes in the samples. Table 5 shows the vitamin contents determined in the food samples when using APCI-MS detection. The results were similar when the DAD detector was used. Quantification was performed using the standard additions method.

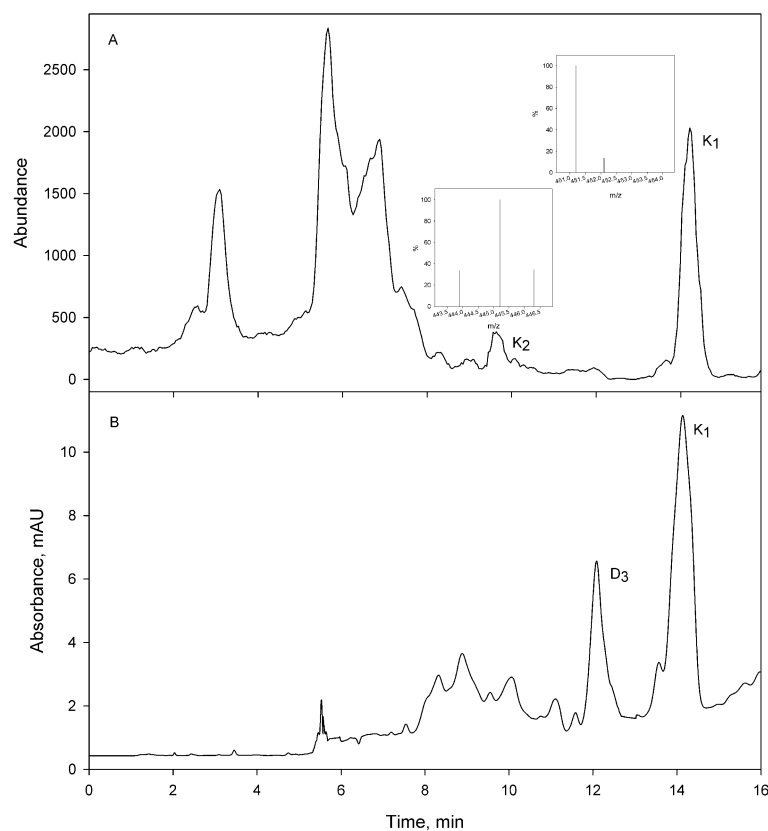


Fig. 3.

Elution profiles obtained using DLLME-LC with APCI-MS detection in SIM mode for (A) a lettuce sample (as well as the mass spectra of the extracted ions) and DAD detection for (B) the certified reference material.

There was little variability in the forms of vitamin K present in vegetables, and in all the samples the most abundant vitamer was phylloquinone ($0.07\text{--}1.2\ \mu\text{g g}^{-1}$). Menaquinone-4 was only found in some samples and in lower amounts ($0.01\text{--}0.05\ \mu\text{g g}^{-1}$), and menadione and vitamin D were not detected. In contrast, cholecalciferol was the main form in infant formula and infant cereals, ergocalciferol was not detected, and vitamin K was present as phylloquinone.

Some losses of vitamins were detected after storage, although the behavior of each vitamin varied strongly among samples [35].

Finally, the accuracy and reliability of the method was further investigated by analyzing a certified reference material, infant/adult nutritional formula SRM 1849a. Table 5 shows the results obtained. The contents for the vitamins obtained by the proposed DLLME-LC-APCI-MS method were in excellent agreement with the certified contents. The statistical study using the one-sample t-test showed that there was no significant difference (95% confidence interval) between the results obtained and the certified values (P values obtained were 0.746 for D₃ and 0.0642 for K₁). Such data also confirm the efficacy of the extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous vitamins D and K in the samples. Vitamin D fortified milk contains vitamin D added in the form of D₃ [3], which agrees with the form found in the certified reference material.

4. CONCLUSION

DLLME is proposed as an environmentally friendly sample-preparation technique for the determination of vitamins D and K since preconcentration is achieved involving a low amount of organic solvent. As a new solvent fraction of only a few microlitres is used for each extraction, no memory effect exists and high enrichment factors are achieved. The combination with LC permits the separation of two forms of vitamin D and three K homologues. The agreement between UV-vis spectra, the expected retention time and APCI-MS spectra allows a reliable identification of these vitamins in foods. The successful validation according to standard guidelines indicates that this method shows considerable potential for routine analysis of vitamin D and K in foods.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10) and Hero España, S.A. M. Bravo-Bravo acknowledges a contract from University of Murcia.

REFERENCES

- [1] USDA, National Nutrient Database for Standard Reference, Nutrient Data Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center. Last modified: 07/12/2011. <http://ndb.nal.usda.gov/>.
- [2] H.V. Kuhnlein, V. Barthelet, A. Farren, E. Falahi, D. Legge, O. Receveur, P. Berti, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 495.
- [3] S. Perales, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, Food Sci. Technol. Internat. 11 (2005) 451.
- [4] M. Damon, N.Z. Zhang, D.B. Haytowitz, S.L. Booth, J. Food Compos. Anal. 18 (2005) 751.
- [5] S.J. Elder, D.B. Haytowitz, J. Howe, J.W. Peterson, S.L. Booth, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 463.
- [6] M.M. Donma, O. Donma, Food Res. Internat. 38 (2005) 681.
- [7] European Standard CSN EN 12821, Foodstuffs - Determination of vitamin D by high performance liquid chromatography - Measurement of cholecalciferol (D₃) and ergocalciferol (D₂), European Committee for Standardization, Brussels (2000).
- [8] European Standard CSN EN 14148, Foodstuffs - Determination of vitamin K₁ by high performance liquid chromatography, European Committee for Standardization, Brussels (2003).
- [9] A.P. De Leenheer, W.E. Lambert, J.F. Van Bocxlaer. Modern chromatographic analysis of vitamins. 3rd Ed. Marcel Dekker. New York (2000).
- [10] C.J. Bates. vitamins: fat and water soluble: analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry. R.A. Meyers, Ed.. John Wiley & Sons Ltd, Chichester (2001).
- [11] N.N. Atia, S. Ahmed, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 35 (2012) 486.
- [12] F.J. Barba, M.J. Esteve, A. Frígola, Eur. Food Res. Technol. 232 (2011) 829.

- [13] V. Kienen, W.F. Costa, J.V. Visentainer, N.E. Souza, C.C. Oliveira, *Talanta* 75 (2008) 141.
- [14] S. Otles, O. Cagindi, *Food Chem.* 100 (2007) 1220.
- [15] D.B. Gomis, M.P. Fernández, M.D. Gutiérrez Alvarez, *J. Chromatogr. A* 891 (2000) 109.
- [16] D.C. Woollard, H.E. Indyk, B.Y. Fong, K.K. Cook, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 682.
- [17] G.M. Ware, G.W. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. AOAC Int.* 83 (2000) 957.
- [18] H. Iwase, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 261.
- [19] G.W. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (2000) 423.
- [20] E. Jakob, I. Elmadfa, *Food Chem.* 56 (1996) 87.
- [21] S. Perales, M.M. Delgado, A. Alegría, R. Barberá, R. Farré, *Anal. Chim. Acta* 543 (2005) 58.
- [22] T.J. Koivu, V.I. Piironen, S.K. Henttonen, P.H. Mattila, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 4644.
- [23] M.M. Delgado Zamarreño, A. Sánchez Pérez, M.C. Gómez Pérez, J. Hernández Méndez, *J. Chromatogr. A* 694 (1995) 399.
- [24] M.M. Delgado Zamarreño, A. Sánchez Pérez, M.C. Gómez Pérez, J. Hernández Méndez, *Anal. Chim. Acta* 315 (1995) 201.
- [25] M.M. Delgado Zamarreño, A. Sánchez Pérez, M.C. Gómez Pérez, J. Hernández Méndez, *J. Chromatogr. A* 623 (1992) 69.
- [26] R. Andreoli, M. Careri, P. Manini, G. Mori, M. Musci, *Chromatographia* 44 (1997) 605.
- [27] M. Careri, A. Mangia, P. Manini, N. Taboni, *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1996) 48.
- [28] J. Santos, J.A. Mendiola, M.B.P.P. Oliveira, E. Ibáñez, M. Herrero, *J. Chromatogr. A* 1261 (2012) 179.
- [29] B.F. Huang, F.F. Zheng, S.S. Fu, J.H. Yao, B.H. Tao, Y.P. Ren, *Eur. Food Res. Technol.* 235 (2012) 873.

- [30] G.A. Abernethy, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1433.
- [31] F. Priego Capote, J. Ruiz Jiménez, J.M. Mata Granados, M.D. Luque de Castro, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1745.
- [32] M. Huang, D. Winters, D. Sullivan, D. Dowell, *J. AOAC Int.* 95 (2012) 319.
- [33] M. Huang, D. Winters, *J. AOAC Int.* 94 (2011) 211.
- [34] A. Gentili, F. Caretti, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 684.
- [35] W.C. Byrdwell, J. Exler, S.E. Gebhardt, J.M. Harnly, J.M. Holden, R.L. Horst, K.Y. Patterson, K.M. Phillips, W.R. Wolf, *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 299.
- [36] L. Bilodeau, G. Dufresne, J. Deeks, G. Clément, J. Bertrand, S. Turcotte, A. Robichaud, F. Beraldin, A. Fouquet, *J. Food Compos. Anal.* 24 (2011) 441.
- [37] V.C. Trenerry, T. Plozza, D. Caridi, S. Murphy, *Food Chem.* 125 (2011) 1314.
- [38] G. Dimartino, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 511.
- [39] M. Huang, P. LaLuzerne, D. Winters, D. Sullivan, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 1327.
- [40] M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, A. Wada, T. Mori, K. Murata, R. Nishino, T. Ukita, K. Uenishi, K. Tanaka, T. Okano, *J. Chromatogr. B* 859 (2007) 192.
- [41] W.C. Byrdwell, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 2235.
- [42] G. Dimartino, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 1340.
- [43] O. Heudi, M.J. Trisconi, C.J. Blake, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 115.
- [44] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *J. Chromatogr. A* 935 (2001) 3.
- [45] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, B. Moreno-Cordero, J.L. Pérez-Pavón, C. García-Pinto, E. Fernández-Laespada, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 251.
- [46] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119.
- [47] G. Gora-Maslak, R. Mindrup, *Supelco Rep.* 16 (No. 4) (1997) 10.
- [48] H.R. Sobhi, Y. Yamini, A. Esrafil, R.H.H.B. Abadi, *J. Chromatogr. A* 1196 (2008) 28.
- [49] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342.

- [50] P. Viñas, M. Bravo-Bravo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A 1275 (2013) 1.
- [51] P. Viñas, M. Bravo-Bravo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Talanta 103 (2012) 166.
- [52] Q. Xie, S. Liu, Y. Fan, X. Zhang, Food Anal. Meth. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12161-013-9592-x>
- [53] G.S. Peace, Taguchi methods: a hand-on approach, Addison-Wesley, Reading, MA (1993).
- [54] Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Comm. L 221, Brussels, Belgium.



CAPÍTULO VII

EXTRACCIÓN LÍQUIDA PRESURIZADA Y MICROEXTRACCIÓN
DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN
DE TOCOFEROLES Y TOCOTRIENOLES EN ALIMENTOS POR
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN
FLUORESCENTE Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON
IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA

Los principios de la tecnología verde se basan en el desarrollo de procedimientos analíticos que reducen o eliminan el uso de disolventes orgánicos tóxicos [1]. PLE es una tecnología verde emergente comparada con las técnicas de extracción convencionales basada en el uso de disolventes a temperatura y presión elevadas [2]. Aumenta la eficiencia de extracción incrementando la solubilidad y propiedades de transferencia de masa [3-4].

En esta técnica, la regla en la elección del disolvente es "semejante disuelve a semejante", que indica el uso de disolventes polares para analitos polares, mientras que los analitos no-polares se disuelven en disolventes no-polares. Un aspecto elemental en la elección del disolvente es la solubilidad del analito, su difusividad en el disolvente y las características de la muestra. Idealmente, debe conseguirse un extracto de elevada pureza y alta selectividad, lo que implica que el analito de interés debería tener una solubilidad elevada en el disolvente mientras que otros compuestos deberían tener una solubilidad nula o mínima.

Cuando se extraen analitos a concentraciones bajas, la velocidad de extracción no está afectada por la concentración de analito sino más bien por la velocidad de transferencia de masa, por tanto, debe escogerse el disolvente adecuado cuyas propiedades químicas aseguren la solvatación y la liberación del analito. Hay distintos modelos que describen la solubilidad de los solutos en un disolvente, por ejemplo, el parámetro de solubilidad de Hansen.

La economía, seguridad y sostenibilidad son aspectos que deben tenerse en consideración cuando se hace la elección del disolvente. Deben preferirse los disolventes menos tóxicos y no-peligrosos que sean fáciles de eliminar o recuperar. El concepto nuevo de disolventes "verdes" refleja el objetivo de disminuir el impacto ambiental resultante del uso de disolventes en procesos químicos. Los alcoholes simples (etanol, metanol) o los alcanos (heptano, hexano) son disolventes preferibles medioambientalmente comparados con dioxano,

acetonitrilo, ácidos, formaldehído y tetrahidrofurano. Además, cuando se comparan las mezclas de disolventes se concluye que las mezclas metanol-agua o etanol-agua son favorables medioambientalmente comparadas al alcohol puro o mezclas propanol-agua.

Otra posibilidad es usar el agua como disolvente en PLE. Un nombre más común para esta técnica es PHWE. En este caso, aplicando una temperatura elevada durante la extracción, disminuye sustancialmente la constante dieléctrica (polaridad) del agua. Aumentando la temperatura del agua también se produce un estado en que disminuye su viscosidad y su tensión superficial, así como las características de difusividad que son más rápidas.

Este hecho convierte al agua en un disolvente para extraer compuestos orgánicos polares, moderadamente polares y no-polares aumentando la temperatura durante la extracción. La eficiencia de extracción depende fundamentalmente de la temperatura mientras que la presión tiene un efecto de menor importancia. El agua caliente presurizada se refiere usualmente a agua líquida a una temperatura entre 100 y 374 °C (punto crítico del agua). Este rango de temperatura es suficiente para producir propiedades físico-químicas del agua que permiten la extracción de muchos compuestos sin riesgos de degradación. Sin embargo, para compuestos termolábiles tales como los antioxidantes, hay siempre un riesgo de degradación durante PHWE.

Sin embargo, a una temperatura más alta, se necesita alguna presión para mantener la fase condensada del agua, por ejemplo, se necesitan 15 bar a una temperatura de 200 °C y 85 bar a 300 °C. Si la presión disminuye por debajo del punto de ebullición del agua, se formará un vapor supercaliente. Algunos factores incluyendo la temperatura y la presión de la extracción, modo de extracción (estático o dinámico) y la mezcla con otros disolventes (modificadores) y aditivos pueden tener influencia en la eficiencia durante la extracción.

Además, el uso de mezclas de disolventes también puede aumentar los rendimientos de extracción mejorando la solubilidad y aumentando la interacción de los analitos con el disolvente de extracción. Usar una mezcla de disolventes durante la extracción podría ser importante para mejorar la eficiencia de extracción. Por ejemplo, en una mezcla doble, un disolvente podría mejorar la solubilidad del analito, mientras que el otro podría mejorar la desorción del analito. En este contexto, el agua es importante usualmente para ayudar a romper la matriz y los enlaces (de hidrógeno) matriz–analito.

La temperatura durante la extracción es uno de los factores críticos que afectan a la eficiencia y selectividad en PLE. El uso de temperaturas elevadas mejora la eficiencia de la extracción ya que ayuda a la disrupción de las interacciones analito–matriz de la muestra causadas por fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno y atracción dipolo. El uso de energía térmica ayuda a superar interacciones cohesivas (molécula–molécula) e interacciones adhesivas entre moléculas disimilares, en este caso, el analito y la matriz de la muestra, disminuyendo la energía de activación requerida para el proceso de desorción. Además, la temperatura elevada disminuye la tensión superficial del disolvente, solutos y matriz. Una disminución en la tensión superficial del disolvente permitirá la formación de cavidades más fácilmente, permitiendo así que los analitos se disuelvan más rápidamente en el disolvente. Una temperatura mayor disminuye la viscosidad de un disolvente líquido, aumentando así su penetración en el interior de las partículas de la matriz, que se traduce en un proceso de extracción mejorado.

Una ventaja final importante del uso de una temperatura mayor del disolvente es que la velocidad de difusión es mayor, y así también la transferencia de masa de la molécula en el disolvente, que permite obtener extracciones más rápidas especialmente en muestras controladas por difusión. Por otra parte, la cantidad de analitos co–extraídos puede ser mayor a temperaturas más altas, disminuyendo la selectividad de la extracción. Además, las temperaturas más altas

pueden afectar a los compuestos termo-lábiles que son sometidos a desintegración y degradación hidrolítica. La principal ventaja de PLE es que emplea fluidos de alta difusión que mejoran la velocidad del proceso de extracción, mientras que disminuye considerablemente la cantidad de disolvente necesaria. El principio de elevada velocidad de difusión mejora la extracción.

La principal ventaja de aplicar presión durante la extracción es que se puede usar una temperatura por encima del punto de ebullición mientras que el disolvente mantiene su estado líquido. El uso de presión elevada a temperatura alta y tensión superficial del disolvente reducida ayuda a forzar que el disolvente entre en los poros de la matriz para contactar con el analito y extraerlo. Usando presión durante la extracción, se podría ejercer presión sobre la matriz, lo que resultaría en la disrupción, que puede aumentar la transferencia de masa del analito de la muestra al disolvente. La alta presión durante la extracción controla los problemas relacionados con la formación de burbujas que aparecen dentro de la matriz y que dificultan que el disolvente alcance al analito. Estas condiciones aceleran la solubilidad del analito y las cinéticas de desorción de la matriz de la muestra. Sin embargo, el efecto de la presión en la recuperación de la mayoría de las sustancias usualmente es inapreciable.

El uso de aditivos tales como un medio micelar se puede usar como una alternativa a los disolventes orgánicos en PLE para extraer contaminantes orgánicos de muestras líquidas y medioambientales. Se ha demostrado que las disoluciones de surfactantes no-iónicos se pueden usar como una alternativa al sistema disolvente.

Otros aditivos de interés en PLE son los antioxidantes protectores, tales como ácido ascórbico o BHT, especialmente para analitos fácilmente oxidables.

El CO₂ se añade a veces para disminuir el pH del agua. Otros aditivos comunes son agentes desecantes.

La perspectiva de hifenación de diferentes técnicas de preparación de muestra y analíticas en un solo proceso es una de las estrategias más recientes en química analítica. En consecuencia, en este último Capítulo de la Tesis se aborda la hifenación de PLE y DLLME [5] con LC para la determinación de la vitamina E.

El grupo de la vitamina E incluye ocho compuestos liposolubles o tocoles. Su estructura comprende dos partes primarias: un anillo cromanol y una cadena lateral hidrofóbica [6]. Se divide en dos grupos fundamentales, cuatro tocoferoles (T), con cadenas laterales isoprenoides saturadas, y cuatro tocotrienoles (T3) con cadenas laterales isoprenoides con tres enlaces dobles. Además, cada grupo incluye cuatro vitámeros (α -, β -, γ - y δ), que difieren en el número y posición de los grupos metilo sustituyentes en el anillo cromanol [7].

El compuesto distribuido más ampliamente y más activo biológicamente como vitamina es α -T, mientras que la actividad de β -T es 30% de la de α -T; γ -T tiene un 15%; y δ -T sólo 3%. La actividad de α -T3 es 25% de la de α -T.

El contenido de vitamina E en alimentos de origen animal es muy variable, dependiendo de la dieta del animal. En contraste, se encuentra mayoritariamente en las plantas, especialmente en semillas oleaginosas, partes verdes de las plantas, y aceites y germen de trigo, girasol, maíz y oliva. Debido a su papel antioxidante, el contenido de vitamina E en los alimentos tiene también un significado tecnológico, ya que estos compuestos reaccionan con los radicales libres, y su contenido se reduce durante la fabricación y almacenamiento de los alimentos [8].

La Figura VII.1 muestra las estructuras químicas de los diferentes vitámeros que se han determinado en esta Tesis. Se trata de los cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles.

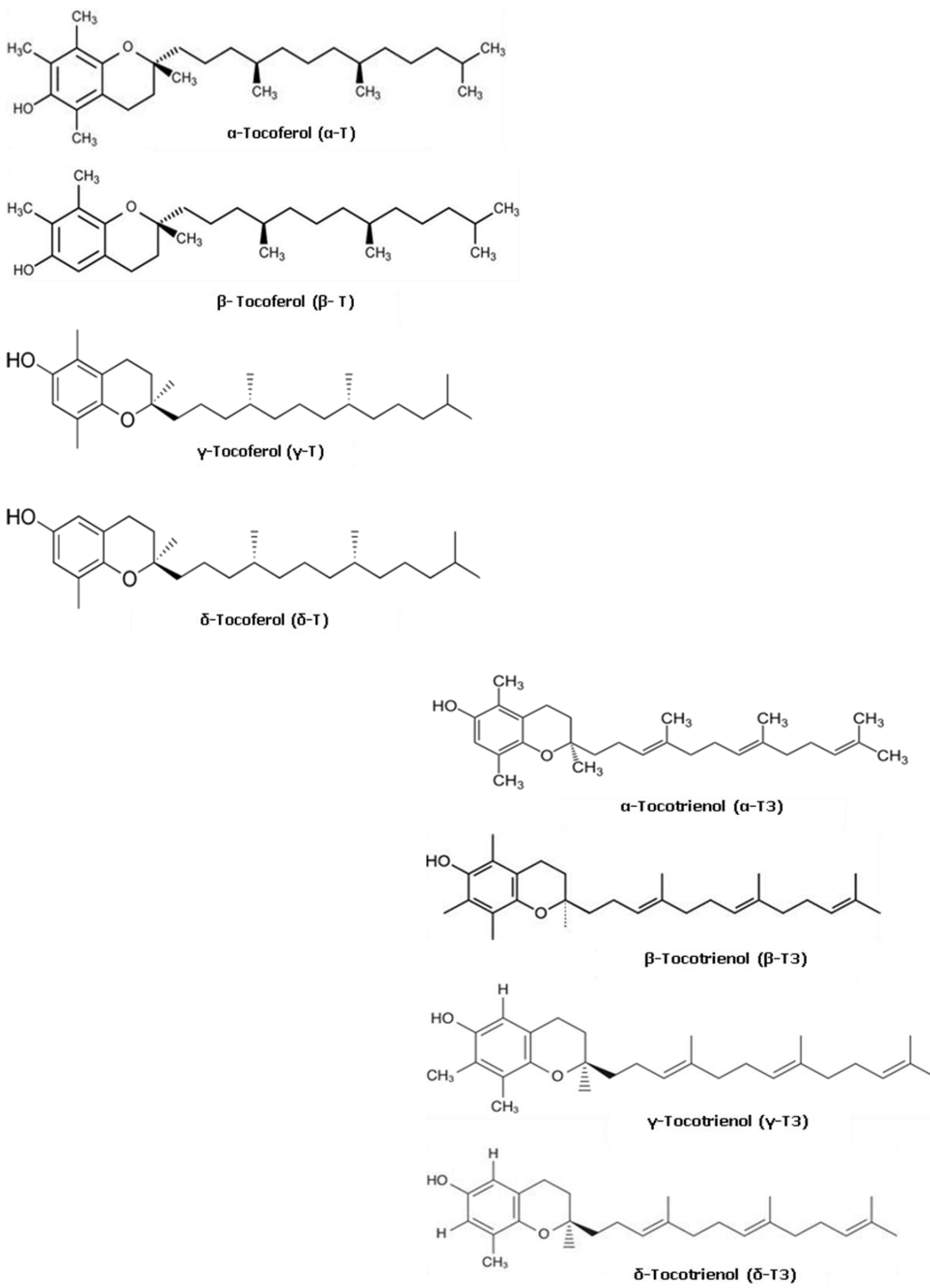


Figura VII.1. Distintos vitámeros constituyentes de la vitamina E

Todos estos compuestos exhiben absorción de radiación en la zona UV-visible y además presentan fluorescencia natural. Los máximos de excitación se encuentran a 298 nm y de emisión a 345 nm.

LC es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de vitamina E en alimentos [8, 9]. Se usan diferentes sistemas de detección, tales como UV-vis [10-16], fluorescencia [17-32], electroquímica [33-35] o MS, que combina la resolución de LC con la especificidad de la detección de MS, usando mayoritariamente APCI o ESI [11-12, 36-43].

La etapa de preparación de la muestra es la mayor fuente de error y los métodos usados más comúnmente para extraer la vitamina E son la extracción en disolventes orgánicos o la hidrólisis alcalina [7-9]. Los alimentos naturales no necesitan ser hidrolizados porque los vitámeros se encuentran fundamentalmente como compuestos libres, pero los alimentos enriquecidos deben ser saponificados ya que generalmente la vitamina se añade como ésteres [10].

Como alternativa, se pueden extraer los tocoles utilizando técnicas PLE [33-35, 40], disminuyendo así el tiempo de extracción y el volumen de disolvente.

El método estandarizado de análisis para la vitamina E incluye la determinación de α -, β -, γ - y δ -tocoferol mediante LC y detección UV o preferiblemente fluorimétrica. En la mayoría de los casos, es necesaria una saponificación del material seguida de extracción [44].

Con respecto a las nuevas técnicas de preparación de la muestra, se ha utilizado SPME para la extracción de las vitaminas A, D₃ y E [45], microextracción de vitamina E con hexano y detección fluorescente [46] y un procedimiento LPME usando solificación de la gota flotante para la determinación de vitaminas liposolubles [47]. DLLME se ha aplicado recientemente en la determinación de α -tocoferol [48] y tocoferoles y tocotrienoles usando detección fluorescente [49].

En este último Capítulo de la Tesis se acopla PLE con DLLME para extraer y preconcentrar los tocoferoles y tocotrienoles de alimentos vegetales. Se usó un

diseño experimental Taguchi para optimizar los seis factores (tres niveles para cada factor), que afectan a DLLME, el volumen de tetracloruro de carbono, volumen de metanol, volumen de la fase acuosa, pH de la muestra, concentración de cloruro sódico y el tiempo de la etapa de centrifugación [50].

Los parámetros seleccionados como influyentes fueron 2 mL de una mezcla metanol:isopropanol (1:1) (disolvente dispersante), 150 μL de tetracloruro de carbono (disolvente extractante) y 10 mL de la disolución acuosa. La fase orgánica se inyectó en LC en fase reversa con una fase móvil isocrática compuesta por una mezcla 85:15 (v/v) metanol:agua y una fase estacionaria de pentafluorofenilo.

La detección se llevó a cabo mediante fluorescencia y APCI-MS en modo negativo. La cuantificación se realizó por el método de adiciones estándar. Los límites de detección están en el rango 0,2-0,3 ng mL^{-1} para los vitámeros consiguiendo buena resolución hasta la línea base. Las recuperaciones obtenidas se encuentran entre 90-108%, con valores de RSD menores de 6,7%. Los espectros APCI- MS, en combinación con los espectros de fluorescencia, permiten la identificación con certeza de los compuestos en las muestras de verduras y frutas. El método se ha validado de acuerdo con guías internacionales y usando dos materiales de referencia certificados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos que se encuentran en prensa en la revista *Talanta*.

Pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods by liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection

***Talanta*, en prensa**

Publicado en el número especial del 1st MED-SOUK (1st International Conference for Young Researchers in the Mediterranean). Campus Mare Nostrum (University of Murcia, October 23-25, 2013).

ABSTRACT

Pressurized liquid extraction (PLE) and dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) were used to isolate and preconcentrate tocopherols and tocotrienols from plant foods. The Taguchi experimental method was used to optimize the six factors (three levels for each factor), affecting DLLME, namely, carbon tetrachloride volume, methanol volume, aqueous sample volume, pH of sample, sodium chloride concentration and time of the centrifugation step. The influencing parameters selected were 2 mL of methanol:isopropanol (1:1) (disperser solvent), 150 μ L carbon tetrachloride (extraction solvent) and 10 mL aqueous solution. The organic phase was injected into reversed-phase liquid chromatography (LC) with an isocratic mobile phase composed of an 85:15 (v/v) methanol:water mixture and a pentafluorophenyl stationary phase. Detection was carried out using both fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) in negative ion mode. Quantification was carried out by the standard addition method. Detection limits were in the range 0.2-0.3 ng mL⁻¹ for the vitamers with base-line resolution. The recoveries obtained using the optimized DLLME were in the 90-108% range, with RSDs lower than 6.7%. The APCI-MS spectra, in combination with fluorescence spectra, permitted the correct identification of compounds in the vegetable and fruit samples. The method was validated according to international guidelines and using two certified reference materials.

Keywords:

LC-APCI-MS

Pressurized liquid extraction

Dispersive liquid-liquid microextraction

Tocopherols

Tocotrienols

Foods

1. INTRODUCTION

Pressurized liquid technology (PLE) is an emerging greener technique based on the use of liquid solvents at elevated temperature and pressure, thus improving the extraction performance of classical techniques [1]. The extraction of bioactive compounds, which are sensitive, thermolabile and found in low concentrations in foods, leads to low yields with traditional techniques. However, PLE enhances the extraction efficiency by increasing solubility and mass transfer properties [2-3].

The perspective of hyphenation and combination of different sample preparation techniques is one recent strategy in analytical chemistry. Thus, by combining PLE with miniaturized analytical techniques, it would be possible to extract compounds from samples and high preconcentration through chemical processes which use low quantities of solvents for dissolving or extracting analytes, in line with the priorities of green chemistry [4]. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a very simple and rapid technique [5] using a ternary component solvent system formed by an aqueous solution containing the analytes, a water-immiscible extraction solvent and a water miscible disperser solvent.

The vitamin E group includes eight liposoluble vitamers or tocols. Its structure is comprises two primary parts: a chromanol ring and a hydrophobic side chain [6], which are divided into two fundamental groups, four tocopherols (T), with saturated isoprenoid side chains, and four tocotrienols (T3) with isoprenyl side chains with three double bonds. Furthermore, each group includes four vitamers (α -, β -, γ - and δ), which differ in the number and position of the methyl substitutes in the chromanol ring [7]. The most widely distributed and biologically active as a vitamin is α -T, while the activity of β -T is 30% of that of α -T; γ -T has 15%; and δ -T only 3%. The activity of α -T3 is 25% of that of α -T.

The vitamin E content in animal foods is very variable, depending on the animal diet. In contrast, it is mainly found in plant foods, especially in oilseeds, green parts of plants, and oils of wheat germ, sunflower, corn and olive. Because of its antioxidant role, the vitamin E content in foods also has a technological significance, since these compounds react with free radicals, and are reduced during the manufacture and storing of foods [8].

Liquid chromatography (LC) is the most widely used technique for vitamin E determination in foods [8, 9]. It uses different detection systems, such as UV-vis [10-16], fluorescence [17-32], electrochemical [33-35] or mass spectrometry (MS), which combines the resolution of LC with the detection specificity of MS, mainly using atmospheric pressure chemical ionization (APCI) or electrospray ionization (ESI) [11-12, 36-43].

The food sample preparation is the main source of error and the most commonly used methods to extract vitamin E are solvent extraction or alkaline hydrolysis [7-9]. Natural foods would not need to be hydrolyzed because the vitamers occur mainly as free compounds, but fortified foods should be saponified because they are generally added as esters [10]. As an alternative, tocopherols may be extracted by PLE techniques [33-35, 40], thus achieving shorter extraction times and decreasing solvent volumes. The Standardized Method of analysis for vitamin E includes the determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherol by LC separation and subsequent photometric (UV) or preferably fluorimetric detection. In most cases, a saponification of the material followed by an extraction is necessary [44].

As regards new clean sample preparation techniques, solid-phase microextraction (SPME) has been used to the extraction of vitamins A, D₃ and E [45], microextraction of vitamin E with hexane and fluorescence detection [46]. A liquid-phase microextraction (LPME) procedure using solidification of a floating drop has been proposed for determination of fat-soluble vitamins [47], and DLLME has recently been applied in the determination of α -tocopherol [48] and tocopherols and tocotrienols using fluorescence detection [49].

When designing an optimization model, the multiple factors affecting DLLME can be considered together by a balanced orthogonal array design (OAD) based

on the Taguchi method [50]. Depending on the number of parameters, the OAD approach made it possible to run experiments, analyze data, identify the optimum conditions and perform confirmation runs with the optimum levels of all the parameters.

This study proposes a procedure using LPE and DLLME such as green sample preparation techniques for the efficient determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods with LC using fluorescence and APCI-MS detection. The Taguchi experimental method is applied to study the possible influence on the performance of the method of six factors. The method is validated according to international guidelines. The main contribution of this study is that is the first time that vitamin E forms are preconcentrated by PLE and DLLME and unequivocally identified by MS.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTS AND SAMPLES

Chromatographic quality acetonitrile, methanol and carbon tetrachloride were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The water used was previously purified in a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA). DL- α -tocopherol, rac- β -tocopherol, γ -tocopherol and δ -tocopherol, were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Stock solutions ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) were prepared in ethanol and stored in amber vials at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The stock solutions were checked for concentration and purity by UV spectroscopy using the known absorption coefficient of each isomer [35]. Working standard solutions were prepared daily in ethanol and stored at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Because tocotrienols were not available, refined palm oil was obtained from Fluka (Spain). The oil (2 g) was extracted by a PLE treatment [35] using methanol/isopropanol (50 mL, 1:1, v/v) as solvent at a temperature of 50°C and a pressure of 1600 psi, with one cycle of extraction during a static time of 5 min. The extract contained α -, γ - and δ -tocotrienol and was used to provide reference retention times for tocotrienols. The calibration graphs of tocopherols were used to

quantify both tocopherols and their corresponding tocotrienols, according to the literature [35]. Other reagents were hydromatrix celite (Agilent), sodium chloride, ascorbic acid and potassium hydroxide (Merck).

Samples of fruits and vegetables were commercially obtained and just analyzed. Samples were spiked with a mixture containing the standards and extracted after 30 min.

2.2. INSTRUMENTATION FOR LC-FLUORESCENCE

The LC-fluorescence system consisted of an Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) quaternary pump (G1311A) operating at room temperature. The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The fluorescence detector was an Agilent FLD (G1321A) operating at an excitation wavelength of 298 nm and an emission wavelength of 345 nm.

The analytical column used for the reversed-phase technique was Ascentis® Express F5 filled with dimethylpentafluorophenylpropyl (15 cm x 0.46 cm x 5 µm) (Sigma). The mobile phase was a 85:15 methanol:water (v/v) mixture under isocratic conditions. The flow-rate was 1 mL min⁻¹. Aliquots of 20 µL were injected manually using a Model 7125-075 Rheodyne injection valve (Rheodyne, Berkeley, CA, USA). Solutions were stored in 2 or 10 mL amber glass vials. To filter the samples, PVDF filters (0.45 µm) (Teknokroma, Barcelona, Spain) were used. An EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) centrifuge was used at a speed near to the maximum supported by the conical glass tubes, 3000 rpm. Vegetable samples were homogenized using an IKA A 11 homogenizer (Staufen, Germany).

Extractions were performed with a Dionex (Germany) 200 Accelerated solvent extractor system, equipped with 22 mL stainless steel extraction cells and 60 mL Dionex glass vials for extract collection.

2.3. LC-APCI-MS SYSTEM

The LC system consisted of an Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) binary pump (G1312A) operating at a flow-rate of 1 mL min⁻¹. The solvents were degassed using an on-line membrane system (G1379A). The column was maintained in a thermostated compartment at room temperature (G1316A), and injection (20 µL) was performed using an autosampler (G1329A). The column and the mobile phase were the same as those optimized for fluorescence detection. The LC system was coupled to an ion-trap (IT) mass spectrometer (1036 model) equipped with an APCI interface operating in negative ion mode. The selected ion monitoring (SIM) mode was applied. The instrument parameters were: drying temperature 350 °C, APCI temperature 400 °C, drying gas flow 5 L min⁻¹ and nebulizer gas pressure 60 psi.

2.4. PLE PROCEDURE FOR FOOD SAMPLES

The fruit and vegetable foods consisted of different types, such as spinach, corn, cranberry, pomegranate and mango juice, all commercially obtained from street markets. The samples were cut into small pieces and homogenized. 3 g of crushed food was weighed and mixed with 1.5 g of the drying agent (hydromatrix celite) in order to prevent the aggregation of sample particles and was placed in a 22 mL extraction cell with double glass fiber (Dionex Corp.) inside. The sample was extracted by a PLE treatment using methanol:isopropanol (1:1 v/v, 50 mL) as solvent at an oven temperature of 50°C and a pressure of 1600 psi, with one cycle of extraction during a static time of 5 min. After the extraction, a volume of clean solvent was pumped into the sample cell, and the solvent was then purged from the cell with nitrogen with a purge time of 60 s. The extracts were diluted to 50 mL and filtered through 0.45 µm PVDF filters.

2.5. DLLME PROCEDURE

For DLLME, a 0.2-2 mL-volume organic fraction resulting from the PLE extraction (depending on the analyte concentration) was recovered and used as dispersant solvent, to which methanol:isopropanol (1:1, v/v) up to 2 mL and 150 μ L of carbon tetrachloride (extractant solvent) was added. The mixture was then rapidly injected into 10 mL of water using a micropipette, and gently shaken manually for several seconds. After centrifugation at 3000 rpm for 3 min, the extraction solvent was sedimented at the bottom of the conical tube (volume recovered 50 ± 10 μ L). The sedimented phase was collected and evaporated to dryness under argon flow. The residue was reconstituted with 50 μ L of methanol, and 20 μ L was injected into the LC.

2.6. ANALYSIS OF CERTIFIED REFERENCE MATERIALS

The method was validated using two reference materials: infant/adult nutritional formula SRM 1849a, supplied by the National Institute of Standards and Technology (NIST) and whole milk powder ERM[®]-BD600, supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). The samples were saponified (according to the procedure indicated by suppliers) in duplicate. All operations were performed in subdued light. 50 mg was weighed and 25 mg of ascorbic acid, 50 mL of methanol and 5 mL of potassium hydroxide solution (50 g/100 mL) were added. Saponification was carried out in the absence of light, at room temperature overnight (approximately 16 h). Aliquots were filtered using 0.45 μ m PVDF filters for subsequent DLLME, using 0.2 mL of the extract plus 1.8 mL 1:1 methanol:isopropanol, as dispersant solvent.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION

The optimization of the chromatographic separation was carried out using a palm oil sample extracted by PLE and fortified with the four tocopherols. Several reversed-phase (RP) stationary phases including C₈ and C₁₈ (both endcapped and non-endcapped), such as Zorbax Eclipse XDB-C₈ (15 cm x 0.46 cm x 5 μm), Zorbax ODS endcapped (15 cm x 0.46 cm x 5 μm) and Zorbax Eclipse ODS non-endcapped (25 cm x 0.46 cm x 5 μm) were compared. T and T3 were separated into two groups because of their different polarity and saturation degree of the side chain. In RP-LC, the tocopherols eluted later than tocotrienols because of their lower polarity. With all these stationary phases, good separation was achieved for all tocols with the exception of the band pair corresponding to β- and γ-T, for which none of the assayed mobile and stationary phases provided good resolution. An Ascentis® Express F5 filled with dimethylpentafluorophenylpropyl (15 cm x 0.46 cm x 5 μm) was then tested. This stationary phase is packed with electron-deficient phenyl rings due to the presence of electronegative fluorines. In addition, F5 phases also retain compounds by polar interactions. As a result of their having both polar and non-polar character, F5 phases retain hydrophobic compounds less than C18, and are ideal for the separation of closely related compounds, such as the isomers β- and γ-.

Several mobile phases corresponding to mixtures of methanol and water in different percentages were assayed. A 85:15 (v/v) methanol:water mixture in isocratic mode led to the elution of the tocols with appropriate retention times, between 5.2 and 15.5 min, leading to complete resolution of the isomers band pair of β- and γ-T, which cannot be resolved in most published procedures. The mobile phase flow-rate was maintained at 1.0 mL min⁻¹. Table 1 summarizes the order of elution, retention times and retention factors for the analytes in the selected conditions.

Table 1

LC parameters for the vitamin E forms

Analyte	Retention time (min)	Retention factor
δ -T3	5.2	3.9
γ -T3	6.9	5.5
α -T3	8.1	6.6
δ -T	9.4	7.9
β -T	11.8	10.1
γ -T	12.9	11.1
α -T	15.5	13.7

3.2. APCI-MS DETECTION

APCI was selected for ionization as vitamin E forms are neutral and non-volatile compounds of low polarity, thus giving higher signals in APCI than in ESI. The optimal ionization mode was studied using a full-scan of each analyte, and maximum sensitivity was obtained operating in negative ion mode for all isomers, obtaining the deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ as base peak. Then, optimization of the mass-to-charge ratio values was carried out in the selected ion monitoring (SIM) mode and the m/z corresponding to the ions were m/z 429.5 for α -T, m/z 415.5 for β -T and γ -T, m/z 401.4 for δ -T, m/z 423.5 for α -T3, m/z 409.5 for γ -T3 and m/z 395.4 for δ -T3.

3.3. OPTIMIZATION OF THE PLE TECHNIQUE

Vitamin E is generally extracted from a food matrix using organic solvents or by alkaline hydrolysis, which improves extractability although significant losses may occur unless protected from oxidation [7, 9]. As an alternative, tocopherols may be extracted by a PLE technique, which decrease solvent volume, extraction time and facilitates automation. Several extraction organic solvents, such as acetonitrile, methanol and a methanol:isopropanol mixture were tried and slightly higher recoveries were obtained using the 1:1 (v/v) methanol:isopropanol mixture, which

was selected. Extractions were performed at 50, 70, 80 and 90°C at a pressure of 1600 psi. However, high temperatures might affect thermo-labile compounds and, due to the thermal instability of vitamin E, a value of 50°C was selected to avoid losses. The effect of elevated pressure was tried. Thus, extractions were carried out at 1400, 1600 and 1800 psi. However, the effect of pressure on recovery was not significant, as previously reported [2], and a pressure of 1600 psi was selected. The optimization of sample amount was performed between 1 and 5 g sample. Recovery was highest for a sample of 3 g, which was mixed with the drying agent hydromatrix celite to prevent the aggregation of sample particles. The static time was optimized with extractions at 5, 8 and 10 min and recoveries did not show significant differences, so a static time of 5 min was selected. The static process can be repeated and a number of 1, 2 and 3 extraction cycles were assayed. No significant differences were obtained for several cycles and one single extraction cycle was applied to decrease the total treatment time.

3.4. OPTIMIZATION OF THE DLLME PROCEDURE USING A TAGUCHI DESIGN METHOD

The experimental variables affecting DLLME procedure were optimized using the Taguchi method. These experiments were carried out using diluted mango-apple juice fortified with 100 ng mL⁻¹ of tocopherols. First, the solvents used as extractant and dispersant were selected, given that they should have a low boiling temperature because the sedimented organic phase must be evaporated and reconstituted using a solvent compatible with RP-LC. The extractant solvents assayed were carbon tetrachloride, chloroform and 1,2-dichloroethane (150 µL volume), using 2 mL of dispersant solvent. Fig. 1 gives the results obtained for tocopherols, showing higher extraction efficiency for all the isomers when using carbon tetrachloride. The volume obtained for the organic drop collected after centrifugation of the dispersion was smaller for this solvent. Similar experiments were repeated to select the optimal dispersant solvent by rapidly injecting 2 mL of each dispersant (acetone, methanol:isopropanol, ethanol and acetonitrile)

containing 150 μL of CCl_4 into 10 mL of both a fortified diluted juice sample and a spinach extract. The volume of the collected organic drop was similar for all dispersant solvents, while the extraction efficiency was higher for all analytes using acetone and 1:1 methanol:isopropanol, so the latter was selected.

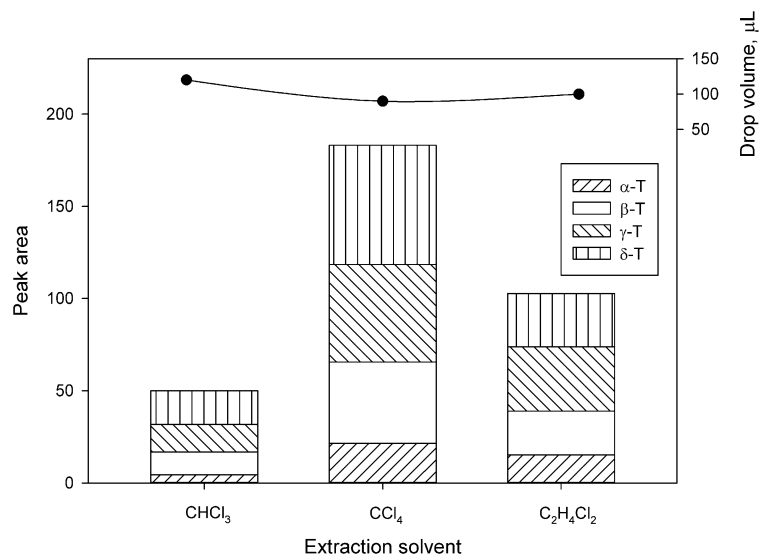


Fig. 1. Influence of the extractant solvent on the extraction efficiency for tocopherol isomers and on the organic drop volume.

The rest of the experimental variables affecting DLLME were optimized using an orthogonal array design (OAD), the Taguchi method, which was applied for six factors (each factor at three levels), as shown in Table 2. The proposed OAD considers the factors without their interactions with 27 different trials. On the other hand, the temperature, extraction time and stirring were not considered as variables, as equilibrium was rapidly reached. The centrifugation speed was fixed at 3000 rpm.

Table 2

Variables selected for the Taguchi design for DLLME

Factors	Level 1	Level 2	Level 3
Extractant organic volume, μL	50	100	150
Aqueous phase volume, mL	3	6	10
Dispersant volume, mL	0.5	1	2
pH	3	6	9
Sodium chloride, % (m/v)	0	10	25
Centrifugation time, min	1	2	3

Fig. 2 shows the effects of the six factor levels on the mean response for the extraction efficiency of tocopherols (solid lines) and the mean response for the drop volume (dotted lines). The extraction efficiency increased up to 100-150 μL of carbon tetrachloride volume (depending on the sample), while it decreased for higher volumes due to the dilution effect; therefore, a 150 μL volume was selected. The variation of the aqueous phase volume led to an almost constant peak area for all the range studied, and a volume of 10 mL was chosen. The increase in the volume of the dispersant solvent produced a continuous increase in the sensitivity and a 2 mL volume was selected. The variation of the pH between 3 and 9 with 0.01 M buffer solutions shows that optimal results were obtained at pH 3. The volume of the sedimented organic solvent did not vary and no significant differences in the analytical signals were observed. Extraction efficiency slightly decreased when the salt concentration was increased and, thus, the addition of NaCl to the extraction solution was discarded. The centrifugation time necessary to disrupt the cloudy solution and collect the sedimented phase caused higher peak areas for higher values and a time of 3 min at 3000 rpm was selected.

The mean response for the drop volume shows that no significant variations were produced when all the parameters were varied, with the exception of the extraction solvent volume, where the drop volume continuously increased in the range studied.

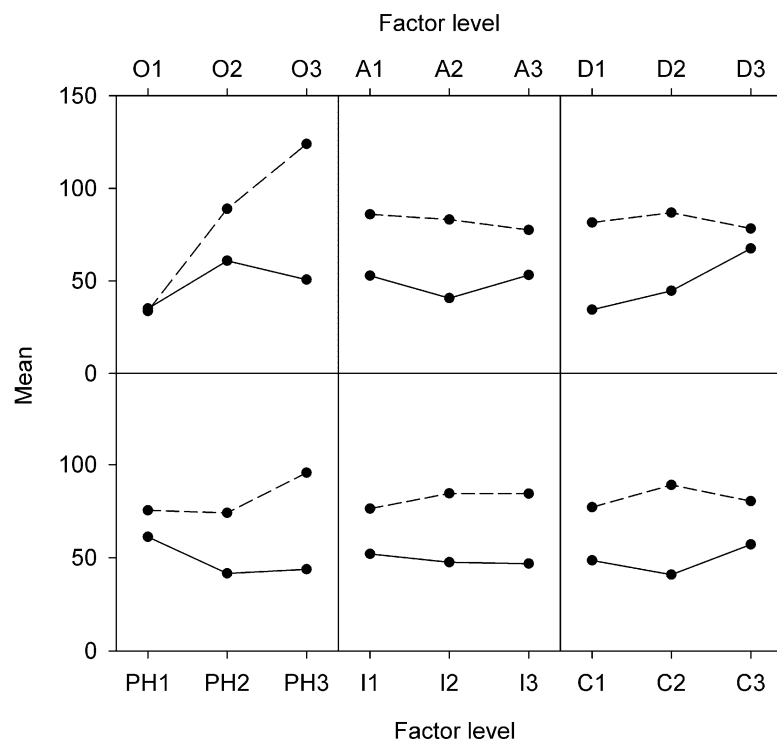


Fig. 2. Effects of factor levels of the extractant organic volume (O), aqueous phase volume (A), disperser volume (D), pH of the aqueous phase (pH), sodium chloride concentration (I) and centrifugation time (C) on the mean response for the extraction efficiency of tocopherols (solid lines) and the mean response for the drop volume (dotted lines).

A statistical analysis of variance (ANOVA) was performed to discriminate which parameters significantly affect extraction efficiency (Table 3). From the calculated variance ratios, F , it can be deduced that only three factors considered in the experimental design were statistically significant at a 95% confidence level (in all cases the calculated F was greater than the critical value). These variables were the dispersant volume, the extractant volume and the pH of the aqueous solution. The most influential factors were the volumes of both the dispersant and the extractant solvents. The contribution of the residual error to the signal variability indicates the goodness of the experimental design used. On the other hand, the only parameter having a significant effect on the drop volume was the organic extractant volume, as can be deduced from the variable values in brackets.

Table 3

Results of the analysis of variance for mean response and volume drop (into brackets)

Variation source	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean squares	F	P	Contribution, %
Extractant volume, μL	2	3038.9 (37243.6)	1519.4 (18621.8)	4.95 (35.6)	0.024 (0)	24.3 (89.6)
Aqueous volume, mL	2	910.8 (333.4)	455.4 (166.7)	1.48 (0.32)	0.26 (0.73)	7.3 (0.8)
Dispersant volume, mL	2	5156.5 (336.1)	2578.3 (168)	8.41 (0.32)	0.004 (0.73)	41.2 (0.8)
pH	2	2076.6 (2598.3)	1038.3 (1299.1)	3.39 (2.49)	0.063 (0.119)	16.6 (6.2)
NaCl, % (w/v)	2	141.9 (389.4)	71 (194.7)	0.23 (0.37)	0.796 (0.696)	1.1 (0.9)
Centrifugation time, min	2	1184.9 (680.5)	592.5 (340.3)	1.93 (0.65)	0.182 (0.536)	9.5 (1.6)
Error	14	4293.9 (7314.1)	306.7 (522.4)			
Total	26	16803.4 (48895.4)				

3.5. VALIDATION OF THE METHOD

The method was validated for linearity, detection and quantification limits, selectivity, recovery, accuracy, precision and robustness, according to international guidelines [51]. Calibration graphs were obtained by the external standard procedure using DLLME and LC-Fluorescence by least-squares linear regression analysis of the peak area *versus* analyte concentration using ten levels (1-100 ng mL⁻¹) in duplicate experiments. The linearity of the method was assessed from 1-50 ng mL⁻¹ for the isomers β -, γ - and δ -T and in the range 5-100 ng mL⁻¹ for α -T, due to the lower fluorescence intensity for this isomer. The results obtained are summarized in Table 4. The sensitivity of the method was evaluated by calculating the limits of detection (LOD, for a signal-to-noise ratio of 3), which are also shown in Table 4.

Table 4

Calibration parameters for tocopherols

Fluorescence Detection	δ -T	β -T	γ -T	α -T
Linear range, ng mL ⁻¹	1-50	1-50	1-50	5-100
Intercept	-0.95±0.31	-0.52±0.32	0.42±0.28	-0.41±0.22
Slope, mL ng ⁻¹	2.02±0.01	1.22±0.06	1.68 ± 0.03	0.31 ± 0.01
Sy/x	0.26	0.32	0.46	1.6
Detection limit, ng mL ⁻¹	0.15	0.21	0.32	1.1
APCI-MS Detection	δ -T	β -T	γ -T	α -T
Linear range, ng mL ⁻¹	1-50	1-50	1-50	1-50
Intercept (x10 ³)	5.2±0.9	4.2±0.6	1.7±0.7	-2.3±1.0
Slope, mL ng ⁻¹ (x10 ³)	11.9±0.48	15.1±0.28	16.0±0.37	15.1±0.46
Sy/x	0.41	0.35	0.23	0.48
Detection limit, ng mL ⁻¹	0.21	0.20	0.25	0.32

Calibration graphs were also obtained by using DLLME and LC-APCI-MS in the SIM mode of the negative fragment ions and the results obtained are also summarized in Table 4, as well as the LOD values. The linearity of the method was in the range 1-50 ng mL⁻¹ for all the tocopherols. Tocotrienols were quantified using the calibration equations of the corresponding tocopherols.

The selectivity of the method was judged from the absence of interfering peaks at the elution times of the tocols for chromatograms of different samples. The performance criteria from EU Commission Decision (2002/657/EC) [51] established the use of co-chromatography to improve the identification of analytes. Thus, the extract prior to LC was divided into two parts, one being directly chromatographed while the other was fortified with the standards and analyzed. To comply with the EU Decision [51], the variability in the fluorescence spectra of the tocols in the samples were not visibly different from the spectra of the calibration standards. Consequently, no matrix compounds existed that might cause interference in the samples. The selectivity was also confirmed by the LC-APCI-MS spectra.

A precision study was carried out on the basis of repeatability, calculated by using the relative standard deviation (RSD) from a series of ten consecutive DLLME followed by LC analyses of a sample spiked with all the analytes at 25 ng

mL⁻¹. The RSD values ranged between 5.4 and 7.5%. These values indicate that the precision of the method was satisfactory for control analysis purposes.

3.6. MATRIX EFFECT AND RECOVERY STUDY

The matrix effect was first evaluated for the DLLME and LC-Fluorescence procedure by comparing the slopes of aqueous standards and standard additions calibration graphs for the different food samples, obtained by plotting concentration (at six levels) against peak area and following linear regression analysis. A statistical study was carried out using one-way variance analysis (ANOVA) and the presence of a matrix effect was discarded because the “P” values obtained were higher than 0.05 for all the analytes. Consequently, calibration and analysis of the samples using fluorescence detection must be performed using aqueous standards.

Moreover, matrix interferences are very important in quantitative analysis with APCI and can produce the signal suppression of the analytes due to co-eluting compounds. This phenomenon may affect the reproducibility, linearity and accuracy of the method. However, since blank samples were not available, quantification was carried out using the standard additions method [43]. Standard additions were performed according to EU [51] by analyzing one portion of the sample as such, while known amounts of the standard analytes were added to the other test portions before analysis by DLLME followed by LC.

The accuracy of the method was tested by fortifying three samples (spinach, corn and mango-apple juice) with tocopherol amounts of 50 and 100 ng g⁻¹. The recoveries obtained were in the range 90-108%, with RSD lower than 6.7% in all cases (Table 5).

Table 5Recoveries^a from different samples (%)

Sample	Spike level (ng g ⁻¹)	α-T	β-T	γ-T	δ-T
Spinach	50	108 ± 7	94 ± 4	102 ± 3	101 ± 6
	100	100 ± 5	97 ± 5	107 ± 5	105 ± 4
Corn	50	101 ± 6	93 ± 5	96 ± 5	108 ± 7
	100	96 ± 5	101 ± 6	92 ± 4	98 ± 7
Mango- apple juice	50	98 ± 6	98 ± 5	99 ± 4	103 ± 6
	100	104 ± 7	90 ± 5	102 ± 5	93 ± 5

^a Mean value ± standard deviation (n=3)

3.7. ANALYSIS OF FOOD PRODUCTS AND VALIDATION USING CERTIFIED REFERENCE MATERIALS

The proposed method was used for the determination of tocopherols and tocotrienols in different fruits and vegetables. Food samples were extracted by PLE and submitted to analysis. Figure 3 shows the chromatograms obtained using DLLME and LC with APCI-MS detection in SIM mode for (A) a mixture containing the tocopherol standards and tocotrienols (from the palm oil extract), (B) a spinach extract, (C) a corn sample and (D) the 1849a CRM, as well as the mass spectra of the extracted ions for each one of the peak isomers. Similar chromatograms were obtained for the other samples. The elution profiles obtained demonstrated the absence of interfering compounds eluting at the retention times of the different tocopherols. Comparison of the retention times for the compounds in the standard mixture and the fortified samples and, especially, the MS spectra, allowed the identification of the vitamin E forms. On the other hand, the chromatograms obtained using fluorescence detection also demonstrated the agreement between spectra for the standards, the samples and the fortified samples.

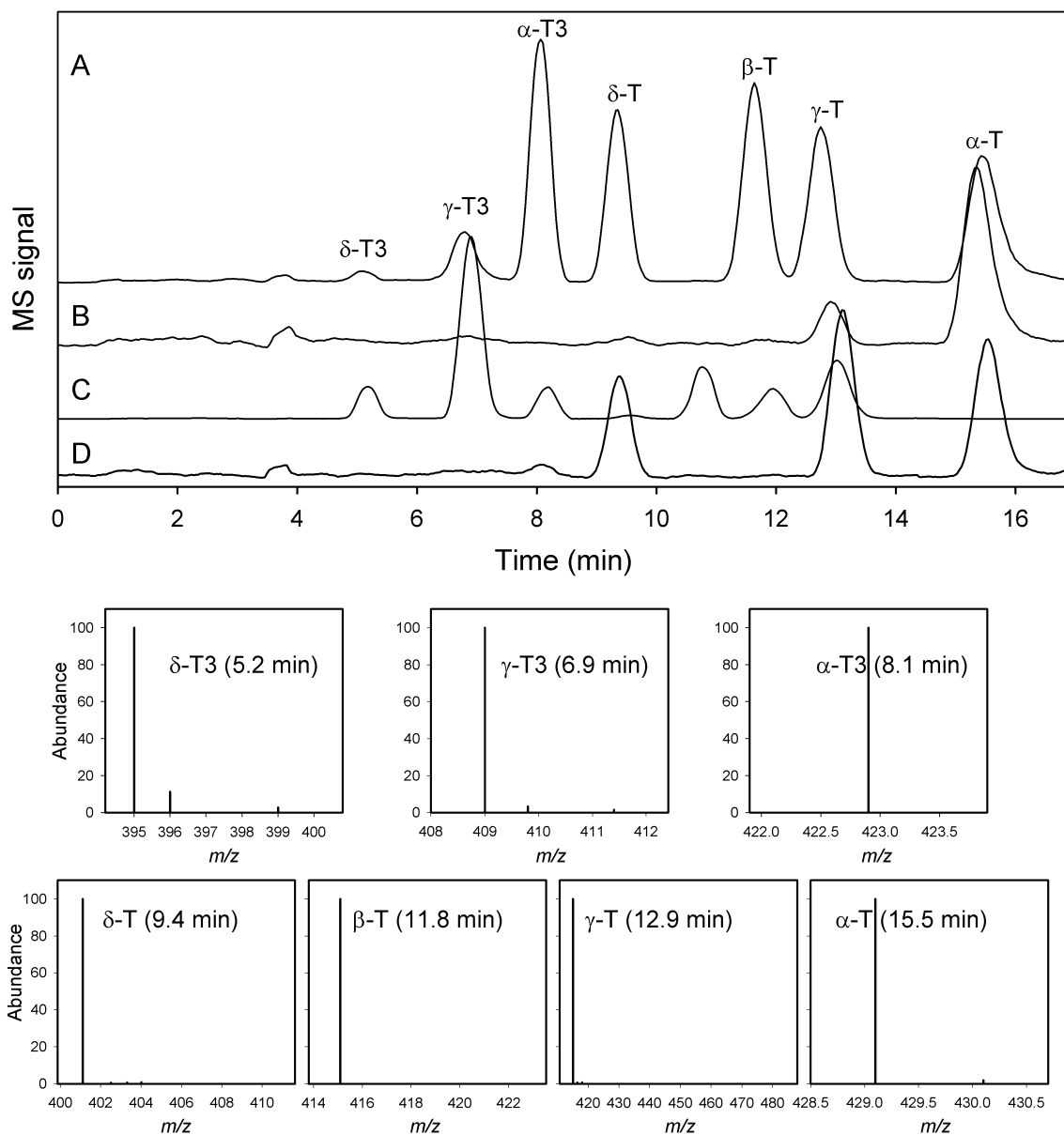


Fig. 3. Chromatograms obtained using DLLME followed by LC-APCI-MS in SIM mode for (A) a mixture containing the tocopherol standards and tocotrienols (from the palm oil extract), (B) a spinach extract, (C) a corn sample and (D) the 1849a CRM, and the mass spectra of the extracted ions for the peak isomers.

Table 6 shows the tocopherol and tocotrienol contents obtained using the standard additions method to the food samples when using APCI-MS detection. The results were similar when the fluorescence detector was used. Among vegetables and fruits, α -T levels were relatively high in spinach, cranberry and

mango. γ -T was higher than α -T in some products, including corn and pomegranate. T3s were found in some plant foods but usually at levels lower than those of Ts. However, γ -T3 was the predominant vitamin E form in corn, cranberry and pomegranate, as indicated by other authors [52].

Table 6

Content of tocopherols and tocotrienols in plant foods and certified reference materials determined by DLLME and LC-MS

Food Sample	Content ($\mu\text{g kg}^{-1}$)						
	α -T	β -T	γ -T	δ -T	α -T3	γ -T3	δ -T3
Spinach	284 \pm 13	8 \pm 0.1	83 \pm 3	ND	ND	ND	ND
Corn	ND	143 \pm 10	408 \pm 20	81 \pm 4	753 \pm 21	2630 \pm 79	744 \pm 31
Cranberry	117 \pm 5	ND	74 \pm 3	ND	ND	334 \pm 12	93 \pm 3
Pomegranate	ND	ND	7 \pm 1	21 \pm 2	9 \pm 0.7	56 \pm 4	ND
Mango-apple juice	319 \pm 19	20 \pm 2	10 \pm 1	39 \pm 3	16 \pm 1	ND	ND
	α -T (mg kg^{-1})						
CRM	DLLME and LC-MS		Certified value				
SRM 1849a	204 \pm 6		177 \pm 47 (added as α -T acetate)				
ERM-BD600	72 \pm 4		86 \pm 15 (added as α -T)				

Finally, the accuracy and reliability of the method was further checked by analyzing two certified reference materials, infant/adult nutritional formula SRM 1849a (NIST) and whole milk powder ERM[®]-BD600 (IRMM). Table 6 shows the results obtained. The contents for the vitamins obtained by the proposed DLLME and LC-APCI-MS method were in agreement with the certified contents. The statistical study using the paired t-test showed that there was no significant difference (95% confidence interval) between the results obtained and the certified values (P value obtained was 0.805). These data also confirm the efficacy of the extraction procedure for recovering both free supplemented and endogenous tocopherols in the samples.

4. CONCLUSION

The hyphenation of different sample preparation techniques is a recent strategy in analytical chemistry. The combination of PLE, which is an emerging greener technique based on extraction using liquid solvents at elevated temperature and pressure, with a miniaturized analytical technique as DLLME, which uses low amounts of solvents for extracting analytes, makes it possible to extract and determine tocopherols and tocotrienols, according to the priorities of green chemistry. The combination with LC using a dimethylpentafluorophenylpropyl stationary phase permits the separation of all the isomers with good resolution. The agreement between fluorescence spectra, the expected retention time and APCI-MS spectra allow a reliable identification of the different forms of vitamin E in food samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM, Fundación Séneca, Project 15217/PI/10) and Hero España, S.A. M. Bravo-Bravo acknowledges a contract from University of Murcia.

REFERENCES

- [1] A. Mustafa, C. Turner, *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 8.
- [23] V. Camel, *Analyst* 126 (2001) 1182.
- [3] L. Ramos, E.M. Kristenson, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 3.
- [4] M. de la Guardia, S. Armenta, *Origins of green analytical chemistry*, in: M.D.L. Guardia, S. Armenta (Eds.), *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, 2011.
- [5] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342.

- [6] R.R. Eitenmiller, J. Lee, Vitamin E, Food Chemistry, Composition, and Analysis, Marcel Dekker Inc., New York (2004).
- [7] A.M. Lampi, Analysis of tocopherols and tocotrienols by HPLC, Selected Topics in the Analysis of Lipids, The AOCS lipid library, <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/tocopherols/index.htm>
- [8] S.L. Abidi, J. Chromatogr. A 881 (2000) 197.
- [9] F.J. Ruperez, D. Martin, E. Herrera, C. Barbas, J. Chromatogr. A 935 (2001) 45.
- [10] M. Diack, M. Saska, J. Am. Oil Chem. Soc. 71 (1994) 1211.
- [11] C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, Anal. Chem. 70 (1998) 4394.
- [12] S. Strohschein, C. Rentel, T. Lacker, E. Bayer, K. Albert, Anal. Chem. 71 (1999) 1780.
- [13] D.B. Gomis, M.P. Fernández, M.D. Gutiérrez Álvarez, J. Chromatogr. A 891 (2000) 109.
- [14] B. Rodas Mendoza, S. Morera Pons, A.I. Castellote Bargalló, M.C. López-Sabater, J. Chromatogr. A 1018 (2003) 197.
- [15] J.L. Chávez-Servín, A.I. Castellote Bargalló, M.C. López-Sabater, J. Chromatogr. A 1122 (2006) 138.
- [16] F.J. Barba, M.J. Esteve, A. Frígola, Eur. Food Res. Technol. 232 (2011) 829.
- [17] A. Kamal-Eldin, S. Gorgen, J. Pettersson, A.M. Lampi, J. Chromatogr. A 881 (2000) 217.
- [18] A. Fratianni, M.F. Caboni, M. Irano, G. Panfili, Eur. Food Res. Technol. 215 (2002) 353.
- [19] G. Panfili, A. Fratianni, M. Irano, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3940.
- [20] U. Höller, D. Wolter, P. Hofmann, V. Spitzer, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1539.
- [21] S.L. Abidi, J. Am. Oil Chem. Soc. 80 (2003) 327.
- [22] M. Rynänen, A. Lampi, P. Salo-Väänänen, V. Ollilainen, V. Piironen, J. Food Comp. Anal. 17 (2004) 749.
- [23] A. Gliszczynska-Swiglo, E. Sikorska, J. Chromatogr. A 1048 (2004) 195.

- [24] G. Horvath, L. Wessjohann, J. Bigirimana, M. Jansen, Y. Guisez, R. Caubergs, N. Horemans, *Phytochemistry* 67 (2006) 1185.
- [25] P. Sookwong, K. Nakagawa, K. Murata, Y. Kojima, T. Miyazawa, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 461.
- [26] H. Schwartz, V. Ollilainen, V. Piironen, A. Lampi, *J. Food Comp. Anal.* 21 (2008) 152.
- [27] M.M. Nielsen, A. Hansen, *Cereal Chem.* 85 (2008) 248.
- [28] R.C. Alves, S. Casal, M.B.P.P. Oliveira, *Food Sci. Technol. Int.* 15 (2009) 57.
- [29] B. Butinar, M. Bucar-Miklavcic, C. Mariani, P. Raspor, *Food Chem.* 128 (2011) 505.
- [30] M.N. Irakli, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1430.
- [31] H.M. Pinheiro-Sant'Ana, M. Guinazi, D. da Silva Oliveira, C. Mattos Della Lucia, B. de Lazzari Reis, S.C. Cardoso Brandao, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 8496.
- [32] N. Grebenstein, J. Frank, *J. Chromatogr. A* 1243 (2012) 39.
- [33] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 249.
- [34] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, M. García-Jiménez, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martínez, *Talanta* 70 (2006) 1094.
- [35] M.M. Delgado-Zamarreño, M. Bustamante-Rangel, S. Sierra-Manzano, M. Verdugo-Jara, R. Carabias-Martínez, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1430.
- [36] W.M. Stöggli, C.W. Huck, H. Scherz, M. Popp, G.K. Bonn, *Chromatographia* 54 (2001) 179.
- [37] A. Kalman, C. Mujahid, P. Mottier, O. Heudi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 723.
- [38] O. Heudi, M.J. Trisconi, C.J. Blake, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 115.
- [39] Z. Hao, B. Parker, M. Knapp, L. Yu, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 83.
- [40] M. Bustamante-Rangel, M.M. Delgado-Zamarreño, A. Sanchez-Perez, R. Carabias-Martinez, *Anal. Chim. Acta* 587 (2007) 216.

- [41] S.A. Lanina, P. Toledo, S. Sampels, A. Kamal-Eldin, J.A. Jastrebova, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 159.
- [42] A. Lampi, T. Nurmi, V. Ollilainen, V. Piironen, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 9716.
- [43] A. Gentili, F. Caretti, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 684.
- [44] European Standard CSN EN 12822, Foodstuffs - Determination of vitamin E by high performance liquid chromatography - Measurement of α -, β -, γ - and δ -tocopherols, European Committee for Standardization, Brussels (2000).
- [45] G. Gora-Maslak, R. Mindrup, Supelco Rep. 16 (No. 4) (1997) 10.
- [46] R.C. Alves, S. Casal, M.B.P.P. Oliveira, Food Sci. Technol. Int. 15 (2009) 57.
- [47] H.R. Sobhi, Y. Yamini, A. Esrafil, R.H.H.B. Abadi, J. Chromatogr. A 1196 (2008) 28.
- [48] Q. Xie, S. Liu, Y. Fan, X. Zhang, Food Anal. Meth. <http://link.springer.com/article/10.1007/s12161-013-9592-x>
- [49] B. Shammugasamy, Y. Ramakrishnan, H.M. Ghazali, K. Muhammad, J. Chromatogr. A 1300 (2013) 31.
- [50] G.S. Peace, Taguchi methods: a hand-on approach, Addison-Wesley, Reading, MA (1993).
- [51] Commission Decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Comm. L 221, Brussels, Belgium.
- [52] J. Chun, J. Lee, L. Ye, J. Exler, R.R. Eitenmiller, J. Food Compos. Anal. 19 (2006) 196.



CONCLUSIONES

La Conclusión General que se puede extraer de esta Tesis Doctoral es que se han obtenido excelentes resultados al estudiar diferentes hifenaciones instrumentales entre la cromatografía líquida con los detectores de diodos, fluorescencia y espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica y trampa de iones. Se han acoplado además con distintos procedimientos de tratamiento de la muestra basados en los principios de "química limpia", como extracción con ultrasonidos, extracción líquida presurizada, extracción en fase sólida con nanotubos de carbón multipared y microextracción dispersiva líquido-líquido. Se ha llevado a cabo la determinación de diferentes grupos de vitaminas hidrosolubles y liposolubles en distintos tipos de alimentos. Todos estos métodos hifenados se han abordado desde la perspectiva de la Química Analítica Verde con el objetivo de desarrollar procedimientos que generen menos residuos peligrosos, sean seguros y más respetuosos con el medio ambiente.

Las Conclusiones Concretas que se han obtenido en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Se han aplicado con éxito los principios de la Química Analítica Verde al diseño de nuevas técnicas de preparación de muestra que sean limpias y selectivas, con mayor rapidez y eficacia, baratas, sencillas y con cantidades mínimas de disolventes tóxicos.
2. La investigación en el área de la combinación e hifenación de técnicas de preparación de muestra y analíticas ha dado como resultado el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos con una disminución sustancial en la cantidad de muestra usada así como en los volúmenes y disolventes de extracción, con mayor eficiencia y selectividad.
3. Se han comparado las ventajas e inconvenientes de diferentes métodos de extracción de las muestras sólidas de alimentos como extracción por

ultrasonidos, extracción con disolventes orgánicos y extracción líquida presurizada, y se ha seleccionado en cada caso la técnica que aportaba mayores ventajas. PLE implica la extracción con disolventes líquidos, pero a temperaturas y presiones elevadas y es una tecnología verde emergente comparada con las técnicas de extracción convencionales, ya que no sólo mejora el rendimiento de extracción, sino que también disminuye el tiempo y consumo de disolventes.

4. El procedimiento más utilizado para la determinación del contenido total de las vitaminas ha sido la saponificación alcalina de las muestras. Cualquier éster que pueda haberse agregado como un suplemento a los alimentos se convierte en la forma libre por este procedimiento. Por otra parte, para liberar los ésteres fosfatados se ha incluido una hidrólisis ácida seguida por una defosforilación enzimática de los ésteres y determinación de la vitamina liberada. Por el contrario, cuando se busca la determinación de todas las formas posibles de las vitaminas, así como de sus ésteres, se ha llevado a cabo la extracción con un disolvente orgánico apropiado.
5. Se ha abordado uno de los desafíos del trabajo analítico actual, las técnicas de microextracción, que representan un paso adelante en la miniaturización del laboratorio analítico. LPME es rápida y económica, con mínima exposición a disolventes orgánicos tóxicos. Se han conseguido factores de enriquecimiento altos debido a la elevada relación volumen de muestra/volumen de fase aceptora. Se han comparado diferentes técnicas de microextracción, SDME, DSDME, DLLME y USAEME, para la determinación de los distintos grupos de vitaminas. La técnica que ha proporcionado los mejores resultados en cuanto a rapidez, sensibilidad y selectividad ha sido DLLME.
6. También se ha utilizado con éxito la extracción en fase sólida. En este sistema, las vitaminas son atrapadas en una minicolumna conteniendo nanotubos de carbón. Esta estrategia SPE se ha empleado tanto para el

pretratamiento de la muestra como para la preconcentración de las vitaminas, evitando el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos. Se ha ensayado el empleo de las nanopartículas como sorbentes reversibles gracias a sus propiedades químicas superficiales. Se han usado nanotubos de carbono multipared, que han supuesto una auténtica revolución en este ámbito, pues disminuyen los inconvenientes de las formas tradicionales de carbono como sorbentes y presentan ventajas como alta capacidad de adsorción, buena estabilidad térmica y amplio rango de pH de aplicación, presentando una superficie activa para la adsorción/desorción de moléculas orgánicas.

7. Las técnicas de pretratamiento de la muestra se han combinado con métodos de separación cromatográficos, seleccionando la Cromatografía Líquida, ya que las vitaminas son compuestos de baja volatilidad.
8. En casi todos los procedimientos, el modo cromatográfico más utilizado para separar las vitaminas mediante LC, ha sido la fase reversa. Se utilizaron diferentes fases estacionarias y distintos disolventes como fases móviles, incluyendo agua, metanol, acetonitrilo, isopropanol y mezclas de los anteriores, así como disoluciones reguladoras. Se ha trabajado en elución isocrática o mediante elución por gradiente.
9. Se han propuesto diversos procedimientos de separación cromatográfica en línea acoplada a detectores UV y de fluorescencia: LC–UV y LC–FI.
10. Para la determinación de tiamina y sus ésteres y benfotiamina, se ha utilizado con éxito la derivatización fluorescente. Se llevó a cabo la derivatización por oxidación química con ferricianuro a pH 13 para formar el tiocromo fluorescente. Así, se consigue mejorar la sensibilidad y selectividad de los procedimientos propuestos.
11. Se han utilizado diferentes estrategias de hifenación, técnica de separación cromatográfica en línea acoplada a MS, LC–MS. El

acoplamiento directo de LC con MS reduce los problemas en la separación cromatográfica debido a la selectividad de las masas y los patrones de fragmentación diferenciados.

12. Para los sistemas LC–MS, se han comparado las interfases API de ionización débil, APCI y ESI. Para las vitaminas liposolubles, APCI ha resultado la técnica más útil.
13. Para eliminar el efecto matriz en análisis cuantitativo por MS se ha realizado un amplio estudio, cambiando la composición de la fase móvil y/o aplicando una técnica de calibración apropiada que compense el efecto matriz. También se ha considerado el impacto de los efectos de matriz sobre los sistemas de detección, tales como eficiencia de ionización, ruido del detector y límites de detección y cuantificación, como resultado directo de la preparación de la muestra.
14. A pesar de que la técnica MS es extremadamente poderosa para la identificación y la elucidación estructural, para aumentar el nivel de seguridad, se ha utilizado una segunda técnica además de MS, abordando así estrategias de separación en línea acopladas a detectores múltiples. Las estrategias de detector dual aplicadas han sido aquellas que combinan MS con otra técnica espectrométrica, con objeto de obtener información estructural complementaria. Así, se han usado detectores de flujo no destructivos para LC, como detectores de diodos y fluorescencia, para la aplicación de sistemas de detección dual en LC–MS. La combinación del tiempo de retención en un sistema LC bien definido, la coincidencia del espectro UV, y la masa molecular (y posible información estructural) de MS han sido especialmente útiles para confirmar la identidad.
15. Se han llevado a cabo nuevos progresos en la integración de múltiples acoplamientos en–línea e hifenación de técnicas de preparación de

muestra y analíticas en un solo proceso, como PLE–DLLME–LC–UV–APCI–MS.

16. La optimización de los procedimientos se ha llevado a cabo utilizando procedimientos univariantes y multivariantes mediante diseños experimentales de matriz ortogonal. Algunos procedimientos analíticos se han optimizado utilizando OAD basados en el método Taguchi. Así, todos los factores múltiples pueden ser considerados de forma conjunta, identificando las condiciones óptimas y realizando experimentos de confirmación con los niveles optimizados para todos los parámetros.
17. Se ha propuesto una mini–columna empaquetada con nanotubos de carbón multipared acoplada con LC como una excelente alternativa para el análisis y especiación de las cobalaminas. El procedimiento de preconcentración miniaturizado basado en un dispositivo con flujo continuo permite obtener buena sensibilidad. Además, se necesita una cantidad muy pequeña de disolvente orgánico, por lo que el procedimiento resulta respetuoso con el medio ambiente. La extracción de las cobalaminas es muy simple porque se basa en un tratamiento de ultrasonidos y la validación del método permitió su aplicación a la especiación de cobalaminas, permitiendo el control de calidad real de alimentos marinos frescos y enlatados.
18. Una alternativa excelente para la determinación de tiamina y sus ésteres en diferentes alimentos se ha llevado a cabo mediante un procedimiento de preconcentración miniaturizado basado en DLLME y usando la hifenación LC–fluorescencia. Además de conseguir límites de detección bajos, se utilizan cantidades muy pequeñas de disolventes por lo que se puede considerar como un procedimiento de química verde. Es de destacar también la posibilidad de determinar los ésteres de la tiamina después de un tratamiento enzimático adecuado.

19. La determinación de benfotiamina en productos nutracéuticos se puede llevar a cabo mediante DLLME acoplado a LC con detección fluorescente. Se elimina el inconveniente de la inyección directa del tiocromo, que no se puede llevar a cabo debido a la elevada alcalinidad del extracto. La ausencia de efecto matriz permite la calibración directa usando estándares acuosos, y se obtienen límites de detección bajos.
20. El contenido de vitamina A (*cis*- y *trans*-retinol) de varios zumos se ha evaluado usando un procedimiento basado en DLLME acoplado a LC en fase normal y fluorescencia. Además de los bajos límites de detección, se usan cantidades muy pequeñas de disolvente. Las muestras de zumo se saponificaron de acuerdo con la Norma Europea y la cuantificación se llevó a cabo mediante calibración acuosa. También se ensayó la técnica USAEME, pero la sensibilidad fue más baja que con el procedimiento DLLME.
21. Se han propuesto nuevos métodos utilizando las hifenaciones DLLME-LC con fluorescencia y APCI-MS. La combinación de los datos MS con los tiempos de retención, los patrones de fragmentación de retinol, acetato de retinol, palmitato de retinol y β -caroteno obtenidos por APCI, y los espectros de fluorescencia hacen muy fiable la identificación de los picos. La aplicabilidad práctica del método se ha demostrado por el análisis cuantitativo de zumos de frutas disponibles comercialmente. Así, se puede llevar a cabo el control de calidad mediante análisis cromatográfico de las distintas formas de la vitamina A en matrices complejas, evitando la tediosa etapa de saponificación y usando técnicas verdes de preparación de muestra.
22. El uso de DLLME para la determinación de las vitaminas D y K permite su preconcentración. Como se usa una fracción de disolvente nueva de sólo unos pocos microlitros para cada extracción, no existen efectos de memoria y se consiguen factores de enriquecimiento elevados. Se empleó

- un método de optimización multivariante basado en OAD. La combinación con LC permite la separación de dos formas de la vitamina D y de los tres homólogos de la vitamina K. La concordancia entre los espectros UV-vis, los tiempos de retención esperados y los espectros APCI-MS permiten la identificación con certeza de estas vitaminas en alimentos.
23. PLE es una tecnología verde emergente comparada con las técnicas de extracción convencionales que implica la extracción con disolventes líquidos, pero a temperaturas y presiones elevadas y se ha utilizado para extraer los tocoferoles y tocotrienoles de alimentos derivados de las plantas. Las variables experimentales se optimizaron con el método Taguchi. Los acoplamientos PLE-DLLME-LC con fluorescencia y APCI-MS se utilizaron para el análisis de los ocho tocoles. La identificación de los compuestos en muestras de alimentos se consiguió utilizando los espectros APCI-MS en combinación con los espectros de fluorescencia.
 24. Los métodos desarrollados han sido validados siguiendo las normas de la Unión Europea. Todos los métodos han presentado excelentes características analíticas tanto en términos de sensibilidad y selectividad como de exactitud y precisión.
 25. La validez de todos los métodos propuestos se verificó usando materiales de referencia certificados.
 26. La siguiente tabla muestra un resumen de las variables cromatográficas y de detección optimizadas en esta Tesis Doctoral para la determinación de vitaminas en alimentos.

Tabla resumen

Analitos	LC	Columna	Fase móvil	Detector	MS Interfase	MS Analizador	Preparación muestra	Alimento	Extracción	SRM
Cobalaminas: OH-Cbl, CN-Cbl, Me-Cbl, Ado-Cbl,	RP	Discovery RP-AmideC ₁₆	ACN—KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7 Gradiente	DAD (265, 351 y 361 nm)	—	—	SPE con MWCNTs	Alimentos marinos	Ultrasonidos	CRM 487
Tiamina y ésteres: T, TMP y TPP	RP	Discovery RP-AmideC ₁₆	10% ACN—90% KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7 Isocrático	Fluorescencia con derivatización (375/438 nm)	—	—	DLLME (90 µL C ₂ H ₂ Cl ₄ + 0,5 mL ACN)	Cerveza, levadura, miel, alimentos infantiles	Hidrólisis ácida con TCA y enzimática con ALKP	CRM 487
Benfotiamina	RP	Discovery RP-AmideC ₁₆	10% ACN—90% KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 7 Isocrático	Fluorescencia con derivatización (375/438 nm)	—	—	DLLME (90 µL C ₂ H ₂ Cl ₄ + 0,5 mL ACN)	Nutracéuticos y suplementos dietéticos	Hidrólisis enzimática con ALKP	—
<i>Cis- y trans-retinol</i>	NP	LiChrospher Si 60	98% n-Hexano—2% propanol Isocrático	Fluorescencia (325/480 nm)	—	—	DLLME (100 µL C ₂ H ₂ Cl ₄ + 2 mL extracto metanólico)	Zumos de frutas	Saponificación con metanol y KOH	SRM 1849a y ERM-BD 600
Retinol, acetato de retinol, palmitato de retinol y β-caroteno	RP	Zorbax Eclipse XDB-C ₈	Metanol—Agua Gradiente	Fluorescencia (325/480 y 450/530 nm)	APCI en modo positivo	Trampa de iones	DLLME (150 µL CCl ₄ + 2 mL metanol)	Zumos de frutas	Dilución con agua	SRM 1849a y ERM-BD 600
Ergocalciferol (D ₂), colecalciferol (D ₃), filoquinona (K ₁), menaquinona 4 (K ₂) y menadiona (K ₃)	RP	Zorbax Eclipse ODS no-encapsulada	ACN, 2-propanol y agua Gradiente	DAD (245 y 265 nm)	APCI en modo negativo (K ₃) y positivo (el resto)	Trampa de iones	DLLME (150 µL CCl ₄ + 2 mL metanol)	Alimentos vegetales y alimentos infantiles	Extracción con acetonitrilo (vegetales) Saponificación alcalina (alimentos infantiles)	SRM 1849a
Tocoferoles (α, β, γ, δ) y tocotrienoles (α, β, γ, δ)	RP	Ascentis® Express F5 filled with dimethylpentafluorophenylpropyl	85% Metanol-15% Agua Isocrático	Fluorescencia (298/345 nm)	APCI en modo positivo y negativo	Trampa de iones	DLLME (150 µL CCl ₄ + 2 mL metanol/isopropanol)	Frutas y alimentos vegetales	Extracción líquida presurizada con metanol/isopropanol	SRM 1849a

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se han presentado en Congresos Nacionales e Internacionales.

- Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for the speciation of cobalamins in seafoods by liquid chromatography
Analytical and Bioanalytical Chemistry 401 (2011) 1393–1399
DOI 10.1007/s00216-011-5158-1

Published in the special issue Euroanalysis XVI (The European Conference on Analytical Chemistry) with guest editor Slavica Ražić. Belgrade (Serbia), 11-15 Septiembre 2011.
- Dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography for thiamine determination in foods.
Analytical and Bioanalytical Chemistry 403 (2012) 1059–1066
DOI 10.1007/s00216-012-5804-2

Published in the special issue Euroanalysis XVI (The European Conference on Analytical Chemistry) with guest editor Slavica Ražić. Belgrade (Serbia), 11-15 Septiembre 2011.
- Determination of benfothiamine in nutraceuticals using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography
Analytical Methods 4 (2012) 2759–2763
DOI: 10.1039/c2ay25444a

Publicado en el número especial del 4th EMUNI Research Souk. Cartagena, 17-18 Abril 2012.

- An evaluation of *cis*- and *trans*-retinol contents in juices using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorimetric detection

Talanta 103 (2013) 166–171

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.027>

Publicado en el número especial del XXIII RNE-VII CIE (XXIII Reunión Nacional-VII Congreso Ibérico de Espectroscopía). Córdoba, 17-20 Septiembre 2012.

- Quantification of β -carotene, retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate in enriched fruit juices using dispersive liquid–liquid microextraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry

Journal of Chromatography A 1275 (2013) 1–8

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.022>

Publicado en el libro de la XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica-VI Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas. Úbeda, 16-19 Junio 2013.

- Dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode–array and atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry detection

Talanta 115 (2013) 806-813

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.050>

Published in the special issue of ISC´2012 (29th International Symposium on Chromatography) with guest editor B. Buszewski & J. Kowalska. Torun (Polonia), 11-15 Septiembre 2012.

- Pressurized liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for determination of tocopherols and tocotrienols in plant foods by liquid chromatography with fluorescence and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection

Talanta, en prensa

Publicado en el número especial del 1st MED-SOUK (1st International Conference for Young Researchers in the Mediterranean). Campus Mare Nostrum (University of Murcia, October 23-25, 2013).