



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

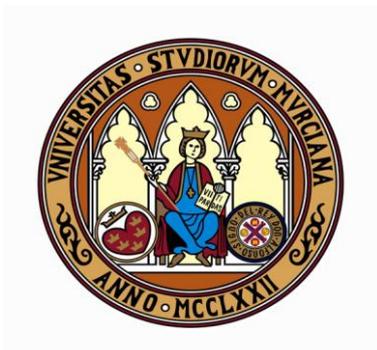
Nuevos Métodos de Pretratamiento de Muestra
para el Análisis de Alimentos mediante
Cromatografía Líquida

D^ª Juana Gema Férez Melgarejo

2014

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA



**NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE
MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS
MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA**

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

JUANA GEMA FÉREZ MELGAREJO

2014



**NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO
DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

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



Fdo.: JUANA GEMA FÉREZ MELGAREJO



D^a. Natalia Campillo Seva, Profesora Titular de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica

AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA", realizada por D^a J. Gema Férrez Melgarejo, 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 8 de Abril de 2014

Fdo.: Natalia Campillo Seva



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 "NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA", realizada por D^a J. Gema Férez Melgarejo, 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 8 de Abril de 2014

Fdo.: Pilar Viñas López-Peigrín



D. Ignacio Francisco López García, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "NUEVOS MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA", ha sido realizada por D^a J. Gema Férrez Melgarejo, bajo la inmediata dirección y supervisión de D^a Natalia Campillo Seva y D^a Pilar Viñas López-Pelegrín, para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, a 8 de Abril de 2014

Fdo.: Ignacio Francisco López García

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).

Agradecimientos

Me resulta difícil escribir estas palabras porque, entre otras cosas, nunca pensé que llegaría este momento. De hecho, no entraba en mis planes poder tener ni siquiera la oportunidad de hacer una Tesis.

Parece mentira que esta etapa de mi vida que comenzó hace ya casi 5 años por casualidad, vaya a llegar a su fin. Estoy contenta por ello pues significa que la confianza depositada por el Departamento no ha sido en vano, aunque siento enormemente que algo perderé al finalizar este proyecto.

Quiero, por tanto, aprovechar esta oportunidad para agradecer sinceramente a las personas que, de algún modo, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Al Departamento de Química Analítica por hacerme sentir unas más de ellos, por su continuo apoyo. A mis directoras de Tesis D^a Pilar Viñas López-Pelegrín y D^a Natalia Campillo Seva, por animarme en los momentos malos, tanto profesionales como personales, por comprenderme y demostrarme su amistad, porque me han enseñado que es perfectamente posible compatibilizar todo en esta vida. Me siento afortunada por haber podido trabajar con ellas. Es admirable la ilusión y la entrega con la que desempeñan su trabajo. Me conformo con un poco de la paciencia y el entusiasmo con las que desarrollan su labor. Por muchas veces que os dé las gracias, nunca será suficiente.

A D. Manuel Hernández Córdoba porque siempre ha tenido buenas palabras conmigo. A D. Ignacio López García por su bondad y su disponibilidad, dispuesto a ayudarme en cualquier momento. Gracias por tu tiempo y paciencia. A D^a Carmen López Erroz, por orientarme.

A mis compañeros, María Bravo, mi hermana de laboratorio; Nacho, el laboratorio no hubiese sido lo mismo sin ti; Marta, toda ternura, Yésica, siempre servicial; María Cuartero, cariñosa. A Elena y Miguel Ángel por vuestro continuo apoyo. A Rosa, Ricardo, Luisa y Nelson, por los momentos compartidos. Me alegro de haberos conocido a todos. Habéis aportado momentos maravillosos a mi vida.

A mis padres de todo corazón. Debo agradecerlos lo mucho o lo poco que soy. Gracias porque sois el pilar donde sé que siempre puedo apoyarme. Os quiero. A mis hermanos Carmen M^a y Andrés, por animarme siempre y ayudarme sin pedirlo, gracias por intentar comprenderme. Sé que a veces, es difícil.

A mis sobrinos, Pablo, Carmen y Alejandro porque hacéis que sonrío incluso en el peor de los días.

A mi familia en general, a mi cuñada Ana y a mi amiga Celi, por ayudarme tanto, porque habéis llorado con mis penas y reído con mis alegrías. Gracias.

A José Alberto, por quererme, confiar en mí, apoyarme, comprenderme, por tu paciencia, por hacerme reír, por ser mi amigo, simplemente por estar ahí, gracias cariño.

A mis hijos, porque ellos son el amor de mi vida, el mejor proyecto que he podido llevar a cabo, el formar una familia. A mi hijo José, porque eres un ángel, porque tú si que sabes quitarme las penas. A mi hijo/a, estoy esperándote con los brazos abiertos. Ahora entiendo a mis padres.

No puedo olvidarme de mi abuela Carmen, con la que compartí mi vida como una madre más, porque siento enormemente que te fueras perdiéndote cosas tan importantes de mi vida. Me acuerdo de ti todos los días, te echo tanto de menos...

Mientras escribo estas palabras me doy cuenta realmente de lo afortunada que soy, de toda la gente que tengo a mi alrededor y que se alegran de mis éxitos. A todos os agradezco vuestro apoyo. Gracias a todos.

Siempre es más valioso tener el respeto que la admiración de las personas.

Jean-Jacques Rousseau

A mis padres por luchar tanto por mí,
a José Alberto por compartir su vida conmigo,
a mi hijo José y el que viene en camino porque sois la luz de mi vida,
a mi querida abuela,...

ÍNDICE

OBJETIVOS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. ANÁLISIS DE ALIMENTOS	11
2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	16
2.1. El papel de la Química Verde en la preparación de la muestra.....	16
2.2. Aspectos básicos de la preparación de la muestra	20
2.3. Miniaturización en la preparación de la muestra	22
2.3.1. Técnicas de microextracción basadas en adsorción y partición.....	25
2.3.2. Técnicas de microextracción en fase líquida basadas en partición	28
2.3.3. Comparación de técnicas miniaturizadas de preparación de muestra	33
2.4. Técnicas de extracción para muestras sólidas.....	35
2.5. Técnicas de extracción en fase sólida	39
3. ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS	42
3.1. Interfases para LC-MS	43
3.2. Analizadores de masas para LC-MS	50
3.3. Detección multidimensional para LC	58
4. CONTROL DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA MEDIANTE LC	59
5. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS	62
6. BIBLIOGRAFÍA	64
CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN ALIMENTOS INFANTILES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE PARES IÓNICOS ACOPLADA CON DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO CON ELECTROSPRAY E IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA	77
I.1. Alimentos infantiles	79
I.2. Alimentos funcionales	81
I.3. Función de los nucleótidos en la alimentación infantil	82
I.4. Métodos de determinación de nucleótidos	87
I.5. Procedimiento experimental	88
I.6. Separación de los nucleótidos por cromatografía líquida.....	90
I.7. Empleo del sistema detector ESI-APCI-TOF-MS	92

I.8. Datos analíticos y validación.....	95
I.9. Estudio del efecto matriz.....	96
I.10. Extracción de la muestra	97
I.11. Análisis de alimentos infantiles	98
I.12. Estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles acidificados	100
I.13. Bibliografía	102

CAPÍTULO II. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y DIODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MELAMINA Y SUS DERIVADOS EN ALIMENTOS ... 105

II.1. La melamina y compuestos derivados.....	107
II.2. Métodos de determinación de melamina y sus derivados	108
II.3. Procedimiento experimental.....	109
II.4. Optimización de la separación cromatográfica	111
II.5. Optimización de las condiciones APCI-MS	112
II.6. Procedimiento de extracción de la muestra	114
II.7. Validación de los métodos analíticos.....	115
II.8. Estudio del efecto matriz	116
II.9. Análisis de alimentos	117
II.10. Bibliografía.....	117

CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y TANINOS HIDROLIZABLES EN GRANADA Y PRODUCTOS DERIVADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO 123

III.1. La granada y sus constituyentes esenciales	125
III.2. Los compuestos fenólicos en la granada.....	127
III.3. La granada como alimento funcional	129
III.4. Productos derivados de la granada.....	130
III.5. Métodos de determinación de taninos hidrolizables y ácidos fenólicos	131
III.6. Procedimiento experimental.....	134
III.7. Optimización de la separación por cromatografía líquida.....	137
III.8. Selección de la técnica de detección MS	138
III.9. Optimización de la preparación de la muestra	138

III.10. Características analíticas del método	139
III.11. Análisis de muestras y estudios de recuperación	145
III.12. Bibliografía	148

**CAPÍTULO IV. EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN CON BARRAS AGITADORAS
ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA EL ANÁLISIS DE FUNGICIDAS
ESTROBILURINAS EN FRUTAS 153**

IV.1. Extracción por adsorción con barras agitadoras	155
IV.1.1. Consideraciones generales.....	155
IV.1.2. Principios básicos de SBSE.....	160
IV.1.3. Factores que afectan al procedimiento SBSE.....	162
IV.1.3.1. Etapa de extracción	162
IV.1.3.2. Etapa de desorción	166
IV.1.4. Análisis cuantitativo en SBSE. Efecto matriz	167
IV.1.5. Aplicaciones de SBSE	168
IV.2. Los plaguicidas.....	169
IV.2.1. Dinámica de los plaguicidas en el medio ambiente	170
IV.2.2. Toxicidad de los plaguicidas.....	172
IV.2.3. Efectos ecológicos de los plaguicidas.....	174
IV.3. Principales características de los fungicidas estrobilurinas	175
IV.4. Métodos de análisis de estrobilurinas en alimentos	178
IV.5. Procedimiento experimental	180
IV.6. Optimización de la separación cromatográfica	183
IV.7. Optimización de la etapa SBSE	184
IV.8. Optimización de la preparación de la muestra sólida	188
IV.9. Características analíticas del método.....	189
IV.10. Análisis de muestras y validación del método	191
IV.11. Bibliografía	193

**CAPÍTULO V. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA
DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS DE MIEL
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM 205**

V.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido	207
---	-----

V.1.1. Principios básicos de DLLME	207
V.1.2. Parámetros que afectan en DLLME	209
V.1.3. Ecuaciones básicas.....	212
V.1.4. Aplicaciones de DLLME	213
V.2. Los insecticidas neonicotinoides.....	216
V.3. Métodos de determinación de insecticidas neonicotinoides	217
V.4. Procedimiento experimental	219
V.5. Optimización de las condiciones cromatográficas	221
V.6. Selección de las condiciones SPE	222
V.7. Selección de las condiciones DLLME.....	223
V.8. Características analíticas del método.....	224
V.9. Análisis de las muestras y estudios de recuperación.....	226
V.10. Bibliografía	230

CAPÍTULO VI. DETERMINACIÓN DE LACTONAS MACROCÍCLICAS EN LECHE USANDO MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM CON IONIZACIÓN QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y TRAMPA DE IONES..... **237**

VI.1. Lactonas macrocíclicas.....	239
VI.2. Métodos de determinación de lactonas macrocíclicas	241
VI.3. Procedimiento experimental	242
VI.4. Optimización de la separación cromatográfica	245
VI.5. Pretratamiento de la muestra	245
VI.6. Optimización de las condiciones DLLME	246
VI.7. Características analíticas del método.....	249
VI.8. Análisis de las muestras y validación del método	251
VI.9. Bibliografía.....	254

CAPÍTULO VII. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA—ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO EN COMBINACIÓN CON MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE CITOQUININAS EN FRUTAS Y VERDURAS..... **259**

VII.1. Sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas	261
VII.2. Las citoquininas	262

VII.3. Métodos de determinación de citoquinas.....	263
VII.4. Procedimiento experimental.....	265
VII.5. Separación por cromatografía líquida.....	268
VII.6. Optimización de la preparación de la muestra.....	268
VII.7. Optimización de las condiciones DLLME.....	268
VII.8. Selección de la técnica de detección MS.....	273
VII.9. Características analíticas del método.....	273
VII.10. Análisis de muestras y validación del método.....	275
VII.11. Bibliografía.....	278

CAPÍTULO VIII. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN MIEL MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO.....	283
VIII.1. Flavonoides.....	285
VIII.2. Métodos de determinación de flavonoides en miel.....	289
VIII.3. Procedimiento experimental.....	290
VIII.4. Optimización de la separación por cromatografía líquida.....	293
VIII.5. Selección de las condiciones DLLME.....	294
VIII.6. Características analíticas del método.....	298
VIII.7. Análisis de las muestras y estudios de recuperación.....	303
VIII.8. Bibliografía.....	307
CONCLUSIONES.....	313

ABREVIATURAS

AAS, espectrometría de absorción atómica
ABA, abamectina
ACE, acetamiprid
AMD, amelida
AMN, amelina
AMP, adenosina 5'-monofosfato
ANOVA, análisis estadístico de la varianza
APCI, ionización química a presión atmosférica
API, ionización a presión atmosférica
APPI, fotoionización a presión atmosférica
ASE, extracción acelerada con disolventes
ATP, trifosfato de adenosina
CA, ácido cianúrico
CAR, carboxen
CE, electroforesis capilar
CG, corilagina
CIAME, microextracción por agregación inducida por frío
CID, disociación por colisión inducida
CK, citoquinina
CLO, clotianidina
CMC, concentración micelar crítica
CMP, citidina 5'-monofosfato
CPE, extracción en punto de nube
CPPU, forclorfenurón
CW, carbowax
DAD, detector de diodos
DART, análisis directo en tiempo real
DC, corriente continua
DHBA, ácido 3,4-dihidroxibenzoico
DI, inmersión directa
DLLME, microextracción dispersiva líquido-líquido
DMHA, dimetilhexilamina
DNA, ácido desoxirribonucleico
DOR, doramectina
DPU, difenilurea
DSDME, microextracción en gota simple directamente suspendida
DSPE, extracción dispersiva en fase sólida
DVB, divinilbenceno
EA, ácido elágico
EF, factor de enriquecimiento

EIC, cromatograma de iones extraídos
EPRI, eprinomectina
ER, recuperación de la extracción
ESI, ionización por electrospray
ETAAS, espectrometría de absorción atómica electrotérmica
EU, unión europea
FAO, organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
FDA, agencia de drogas y alimentos
FID, detector de ionización de llama
FLD, detector de fluorescencia
FMAE, extracción focalizada asistida por microondas
FNME, microextracción en aguja empaquetada
FOS, fructooligosacáridos
FRC, reactivo Folin-Ciocalteu
FOSHU, alimentos para uso específico de salud
FT, transformada de Fourier
GA, ácido gálico
GAC, química analítica verde
GC, cromatografía de gases
GMP, guanosina 5'-monofosfato
HF, fibra hueca
HFM, membrana de fibra hueca
HPLC, cromatografía líquida de alta resolución
HPSE, extracción en disolventes a alta presión
HS, espacio de cabeza
HSSE, extracción por absorción en espacio de cabeza
HTs, taninos hidrolizables
ICR, resonancia de ión-ciclotrón
IL, líquido iónico
IMI, imidacloprid
IMP, inosina 5'-monofosfato
IPC, cromatografía de pares iónicos
IR, infrarrojo
IT, trampa de iones
IUPAC, unión internacional de química pura y aplicada
IVM, ivermectina
LC, cromatografía líquida
LIT, trampa de iones lineal
LLE, extracción líquido-líquido
LLLME, microextracción líquido-líquido-líquido
LLME, microextracción líquido-líquido
LOD, límite de detección

LOQ, límite de cuantificación
LPME, microextracción en fase líquida
LVI, inyección de volúmenes grandes
MAE, extracción asistida por microondas
MALDI, ionización por desorción láser asistida por matriz
ME, microextracción
MEL, melamina
MEPS, microextracción en jeringa empaquetada
MIP, polímero de impresión molecular
MOX, moxidectina
MRL, límite máximo de residuo
MRM, método multiresiduo
MS, espectrometría de masas
MS/MS, espectrometría de masas en tándem
MSPD, dispersión en fase sólida de la matriz
OAD, diseño experimental de matriz ortogonal
ODS, octadecilsililo
ONU, organización de naciones unidas
PA, poliacrilato
PAHs, hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBBs, bifenilos polibromados
PBDEs, polibromodifenil éteres
PC, punicalina
PCBs, bifenilos policlorados
PCDDs, dibenzodioxinas policloradas
PCDFs, dibenzofuranos policlorados
PDMS, polidimetilsiloxano
PEG, polietilenglicol
PES, polietersulfona
PFE, extracción en fluidos presurizados
PG, punicalagina
PGR, regulador del crecimiento de las plantas
PLE, extracción líquida presurizada
PMAE, extracción presurizada asistida por microondas
PSA, amina primaria/secundaria
PTFE, politetrafluoroetileno
PTV, vaporizador de temperatura programable
PVDF, difluoruro de polivinilideno
Q, cuadrupolo
QIT, trampa de iones cuadrupolar
QqQ, cuadrupolo triple

QuEChERS, rápido, fácil, barato, eficaz, robust y seguro
RF, radiofrecuencia
RMN, resonancia magnética nuclear
RNA, ácido ribonucleico
RP, fase reversa
RSD, desviación estándar relativa
SBME, microextracción en barra con disolvente
SBSE, extracción por adsorción con barras agitadoras
SCX, intercambio catiónico fuerte
SD, desviación estándar
SDME, microextracción en gota simple
SFE, extracción en fluidos supercríticos
SFO, solidificación de la gota orgánica flotante
SHWE, extracción en agua supercaliente
SIM, medida de iones seleccionados
SLE, extracción sólido-líquido
SME, microextracción en un disolvente
SPDE, microextracción en fase sólida dinámica
SPE, extracción en fase sólida
SPME, microextracción en fase sólida
SRM, monitorización de reacciones seleccionadas
SRSE, extracción por adsorción en varillas agitadoras
TA, temperatura ambiente
TCA, ácido tricloroacético
TDS, sistema de desorción térmica
TDZ, tidiázurón
TFME, microextracción de película delgada
THIA, tiaclopid
TIC, cromatograma de iones totales
TMX, tiametoxam
TOF, tiempo de vuelo
UAE, extracción asistida por ultrasonidos
UMP, uridina 5'-monofosfato
UPLC, cromatografía líquida de ultrarresolución
USAEME, microextracción con emulsificación asistida por ultrasonidos
UV, detección ultravioleta
VALLME, microextracción líquido-líquido asistida por vórtice
WHO, organización mundial de la salud

OBJETIVOS

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. La Cromatografía Líquida (LC, HPLC) se utiliza preferentemente como método de confirmación o test de barrido para la determinación de contaminantes y compuestos naturales. Dependiendo de las estructuras químicas y características analíticas de los grupos de compuestos analizados, los métodos analíticos utilizados en esta Tesis Doctoral han sido, en principio, hibridaciones de la cromatografía líquida con un detector clásico y sencillo, disponible en cualquier laboratorio analítico, como el detector de diodos (LC-DAD).

La necesidad de caracterización molecular de los alimentos lleva a la industria alimentaria a aplicar técnicas avanzadas. La cromatografía combinada en línea con Espectrometría de Masas (MS) es una de las metodologías analíticas más sensibles y selectivas. Entre los métodos híbridos, 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 para análisis de alimentos.

LC-MS combina el poder separativo de LC y el poder de MS para identificar estructuras moleculares. Las técnicas en línea LC-MS son similares a las que usan las dos técnicas separadamente. 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, relativamente baratos y excelentes para cuantificación. Entre las técnicas avanzadas, la más importante y más ampliamente usada es la Espectrometría de Masas en Tándem (MS/MS), que proporciona información estructural y, al mismo tiempo, aumenta la selectividad, permitiendo la

identificación y cuantificación incluso en presencia de compuestos coeluyentes. También los espectrómetros de masas de Tiempo de Vuelo (TOF-MS) acoplados a LC presentan varias ventajas, ya que el gran rango de masas que pueden ser analizadas 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. 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, 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.

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 hibridación instrumental LC-MS como técnica general para caracterizar varias clases de moléculas.

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. Así, el desarrollo de 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.

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, respetuosos con el medio ambiente, y al mismo tiempo, manteniendo 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.

Las técnicas de Microextracción (ME) representan un avance en la miniaturización del laboratorio analítico, basándose en la extracción selectiva de los compuestos en las diferencias en sus características físico-químicas (peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y volatilidad).

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. La Microextracción en Fase Sólida (SPME) utiliza fibras de diferentes adsorbentes para miniaturizar el proceso SPE.

La Extracción por Adsorción en Barras Agitadoras (SBSE) fue desarrollada con el propósito de superar la limitada capacidad de extracción de las fibras SPME. La idea inicial partió del hecho de que la cantidad de analito extraído en SPME es proporcional al

volumen de fase extractante, por tanto, la sensibilidad del procedimiento de extracción podría ser mejorada al aumentar el volumen de dicha fase.

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.

Así pues, el Objetivo Principal de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar los acoplamientos instrumentales de LC con DAD y MS con fuentes ESI y APCI, así como analizadores IT-MS/MS y TOF con distintos procedimientos verdes de tratamiento de la muestra como Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE), SPE, SBSE y DLLME, para la determinación de diferentes grupos de compuestos orgánicos naturales o residuos de contaminantes en distintos tipos de alimentos.

En los primeros Capítulos (I a III), se han desarrollado métodos analíticos para la determinación de nucleótidos en alimentos infantiles, de melamina y sus derivados en alimentos y de ácidos fenólicos y taninos hidrolizables en granada y productos derivados, mediante LC en Fase Reversa (RP), con o sin pares iónicos, y de intercambio iónico, acoplada con detección DAD y MS empleando IT-MS/MS o TOF-MS. 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 ultravioleta (UV) y MS.

El Capítulo IV recoge el desarrollo de un nuevo método analítico basado en SBSE acoplado a LC para el análisis de fungicidas estrobilurinas en frutas.

Por último, los Capítulos V a VIII abordan la aplicación de la técnica DLLME utilizando diferentes acoplamientos de LC con detección DAD 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 modo 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 IT y TOF acoplados a LC, estableciendo sus ventajas e inconvenientes, tanto a nivel cuantitativo como de confirmación.

Se han resuelto diferentes problemas analíticos como la determinación de insecticidas neonicotinoides en muestras de miel, así como la determinación de lactonas macrocíclicas en leche, mediante LC con detección DAD y APCI-IT-MS/MS, determinación de citoquininas en frutas y verduras por LC-ESI-TOF-MS y de flavonoides en miel mediante LC-DAD-ESI-TOF-MS. Para todos los compuestos, 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.

De nuevo en estos casos, los métodos de análisis se han validado siguiendo los criterios de las normas europeas. La confirmación de la identidad de los compuestos detectados en muestras de alimentos se ha llevado a cabo mediante la comparación de datos de retención, de los espectros UV 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 el acoplamiento LC-DAD para la determinación cuantitativa de diferentes grupos de analitos 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 y picos estrechos.
4. Selección de la fase móvil adecuada a cada problema de separación teniendo en cuenta su compatibilidad con el sistema detector MS.
5. Desarrollo y optimización de procedimientos miniaturizados para el tratamiento de la muestra.
6. Aplicación de SBSE utilizando barras agitadoras para la retención de analitos. Optimización de las condiciones de adsorción y de desorción.
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.
8. Estudio, comparación y optimización del procedimiento para la extracción de los analitos de los alimentos. Se comparan diferentes posibilidades como el uso de ultrasonidos, digestión ácida, extracción con disolventes orgánicos, etc.
9. Validación de los métodos analíticos siguiendo los criterios de las normas europeas.
10. Análisis de diferentes tipos de muestras de alimentos. Es importante confirmar la identidad de los positivos detectados en muestras reales.
11. Validación de los métodos propuestos mediante estudios de recuperación.

INTRODUCCIÓN

1. ANÁLISIS DE ALIMENTOS

El objetivo último del análisis de productos alimenticios puede tener distinta índole, desde la comprobación de que el producto cumple con los requisitos legales y de etiquetado, su control de calidad, la determinación de su valor nutricional, la detección de adulteraciones, con fines de investigación y desarrollo, etc. El análisis de alimentos es un área en continua evolución, lo que principalmente ha sido propiciado por la demanda creciente de seguridad y calidad alimentaria por parte de los consumidores, la preocupación de las autoridades para garantizar la seguridad alimentaria al más alto nivel nutricional, y el esfuerzo de productores e industrias para cumplir estas demandas. Esto resulta particularmente complejo ya que supone aplicar conceptos de química, biología, bioquímica, microbiología, nutrición e incluso ingeniería [1,2].

Las agencias gubernamentales y oficiales velan por el cumplimiento de los requisitos legales, de etiquetado y de autenticidad. Esto incluye la detección de posibles adulteraciones y prácticas fraudulentas que podrían conducir a pérdidas económicas y daños al consumidor. Para la industria alimentaria, el análisis de alimentos también resulta primordial con el fin de asegurar la calidad de las materias primas empleadas y su mantenimiento durante las etapas de procesado, transporte y conservación. Por otro lado, los investigadores científicos se hallan envueltos en una constante puesta al día de metodologías aplicadas para el control de los aspectos mencionados, así como en el desarrollo de procedimientos analíticos más sensibles que permitan rebajar los niveles máximos permitidos (MRLs) de compuestos tóxicos y la inclusión de nuevos compuestos en la legislación. La caracterización de los productos alimenticios y el desarrollo de nuevos alimentos con valor añadido son también aspectos cada vez más demandados por los consumidores.

El campo del análisis de alimentos es muy amplio y se halla en continua evolución, abordando determinaciones de muy diversa naturaleza y con objetivos muy diferentes. La

Tabla 1 muestra los métodos usados para estos objetivos, que van desde procedimientos que podrían catalogarse con el término de subjetivos, como son las determinaciones organolépticas, hasta procedimientos objetivos basados en determinaciones físicas, químicas, microscópicas y microbiológicas. Otros procedimientos se basan en determinaciones biológicas y cuestionarios personales [1].

Tabla 1. Tipos de métodos aplicados al análisis de alimentos

<p>SUBJETIVOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Organolépticos <p>OBJETIVOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Físicos - Químicos - Microscópicos - Microbiológicos <p>OTROS MÉTODOS</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biológicos - Encuestas nutricionales 		<p>Métodos clásicos: (determinaciones básicas)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Humedad y sólidos - Cenizas totales - Fibra - Proteínas - Grasas - Alcohol, acidez... <p>Métodos instrumentales</p>
---	--	---

El progreso en la ciencia y tecnología de los alimentos y sus conceptos han supuesto diferentes cambios en la metodología analítica empleada, siendo sustituidos, en muchos casos, los métodos analíticos clásicos (volumetrías y gravimetrías) por métodos instrumentales y bioquímicos (cromatografía, espectroscopía, biosensores...), ya que se requiere nueva información cualitativa y cuantitativa [1]. No obstante, debe puntualizarse que los métodos clásicos todavía siguen aplicándose para ciertas determinaciones siendo además recomendados oficialmente.

Las especies que habitualmente son objeto de análisis químico en alimentos se muestran en la Tabla 2, incluyendo tanto componentes propios del alimento como contaminantes. En muchos casos estos compuestos son objeto de análisis rutinarios. Muchos componentes tanto mayoritarios como minoritarios (proteínas, carbohidratos, vitaminas...) se analizan por razones de cumplimiento de la legalidad, de calidad o con fines de investigación. Por otro lado, los aditivos alimentarios, residuos y una gran variedad de contaminantes de diferente naturaleza y origen, siempre se monitorizan para comprobar que los productos cumplen con los requerimientos legales.

Tabla 2. Sustancias químicas habituales en análisis de alimentos

-
- Componentes volátiles
 - Aromas y fragancias
 - Olores desagradables (off-flavours)
 - Componentes semivolátiles y no volátiles
 - Lípidos, proteínas, carbohidratos, carotenoides, vitaminas...
 - Antioxidantes, polifenoles...
 - Aditivos alimentarios y contaminantes
 - Pesticidas y drogas veterinarias
 - PCBs, PCDD/Fs, PAHs, PBDEs, ftalatos, aceites minerales...
 - Mico- y fitotoxinas
 - Compuestos migrados desde el material de empaquetamiento
 - Residuos del procesado y/o almacenamiento
 - Metales y compuestos organometálicos
-

Uno de los principales problemas con que se encuentra el análisis de alimentos es el establecimiento del concepto de alimento. La literatura especializada en la materia propone diferentes definiciones, siendo las más habituales las que atienden a la composición del alimento (carbohidratos, grasas, proteínas y agua) o a la forma a través de la cual lo obtiene el hombre (agricultura, ganadería y pesca). En otros casos, las definiciones atienden a la naturaleza del material en sí mismo y/o los beneficios relacionados con su consumo. Considerando los distintos puntos de vista, podría definirse un alimento como una sustancia o producto, líquido o sólido, natural, elaborado o procesado que, por sus características, aplicaciones, composición, preparación y estado de conservación, es comido o bebido por el hombre con fines nutricionales o de disfrute [1].

Sea cual fuere la definición adoptada para el término alimento, es claro que en todos los casos se trata de una mezcla heterogénea y compleja de un conjunto relativamente amplio de sustancias químicas.

Excepto para unos pocos casos en los que la determinación directa es factible, cítese como ejemplo el control de procesos empleando ultrasonidos de baja intensidad, la determinación de los analitos presentados en la Tabla 2 requiere algún tipo de preparación previa de la muestra antes de proceder a la etapa de determinación de la señal analítica [1]. En los casos más sencillos, esta etapa de preparación de la muestra

consiste en la extracción cuantitativa del analito o analitos de interés desde la matriz del alimento, una etapa de fraccionamiento o limpieza para aislarlo de los componentes de la matriz coextraídos y una etapa final de concentración de los extractos purificados para asegurar una detección exacta y precisa. Otra etapa que puede estar incluida es la derivatización cuando la especie de interés no se halla en la forma química más adecuada para su determinación.

Cuando el alimento bajo análisis se encuentra en estado sólido, 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. Tras la aplicación de la mayoría de estos métodos de extracción, los analitos de interés se encuentran en una disolución orgánica o acuosa, que requiere entonces 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 Dispersión en Fase Sólida de la Matriz (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD), desarrollada por primera vez en 1989 [3].

Como ocurre en muchas otras áreas, en análisis de alimentos la etapa de preparación de la muestra suele llevarse a cabo de forma discontinua (off-line) respecto del análisis instrumental propiamente dicho. De forma general, la complejidad de los procedimientos propuestos aumenta al disminuir la concentración de los analitos en la muestra, por lo que la probabilidad de que ocurran contaminaciones, degradaciones y/o

pérdidas de analito también aumenta debido a una mayor manipulación manual de la muestra. En los últimos años, diversas investigaciones se han dirigido a minimizar estos inconvenientes, desarrollándose técnicas de extracción más rápidas, exhaustivas y versátiles.

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 [4].

La determinación de la composición molecular de alimentos requiere el uso de herramientas analíticas para identificar y cuantificar apropiadamente todos los compuestos de interés. Las técnicas GC y LC combinadas en línea con MS son las metodologías analíticas más sensibles y selectivas. Entre los métodos acoplados, GC-MS es el más ampliamente usado para análisis de alimentos. LC-MS se ha usado con menos frecuencia, aunque su aplicación está creciendo rápidamente entre las metodologías analíticas en análisis de alimentos (Figura 1) [5], debido, entre otras razones, a que los procedimientos de extracción de las muestras suelen ser más simples y además se elimina la necesidad de aplicar reacciones de derivatización [1,6].

Merece la pena destacar el papel que la Electroforesis Capilar (CE) ha ido tomando dentro del campo del análisis de alimentos, debido a la variedad de modos de separación que actualmente ofrece, así como a su capacidad de ser automatizada. Además, la combinación CE-MS ofrece importantes posibilidades para análisis de proteínas y péptidos [1].

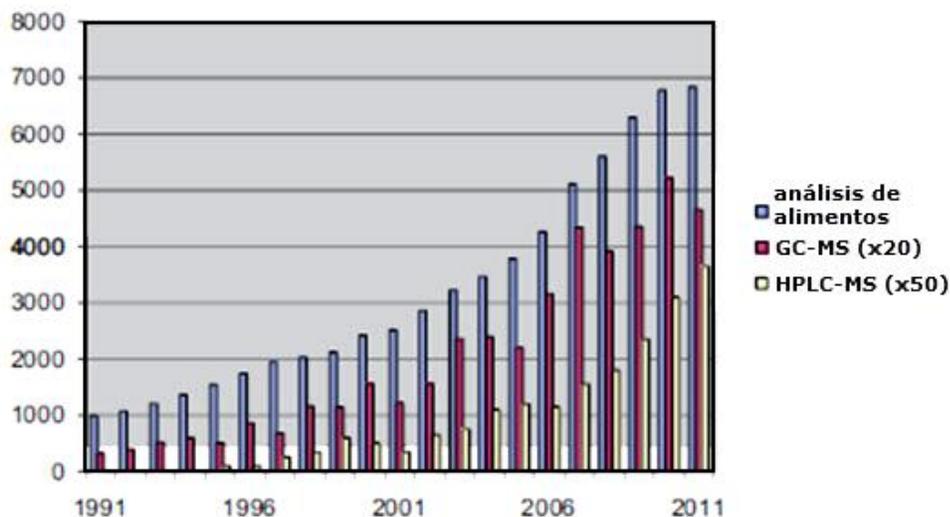


Figura 1. Aumento en el número de trabajos relativos al análisis de alimentos usando metodologías GC-MS o LC-MS (multiplicados por 20 y 50 veces, respectivamente). Datos obtenidos de la base de datos Web of Science

En esta Tesis Doctoral se aborda el análisis de contaminantes (pesticidas, lactonas macrocíclicas, sustancias sintéticas reguladoras del crecimiento de las plantas (PGRs) y melamina y compuestos derivados de esta), componentes minoritarios (polifenoles naturales) y compuestos añadidos para aumentar el valor nutricional (nucleótidos) en distintos tipos de alimentos: leche, alimentos infantiles, harinas, vegetales, frutas, miel, zumos de frutas y bebidas de soja y de coco, mediante LC.

2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

2.1. EL PAPEL DE LA QUÍMICA VERDE EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Gran parte de la sociedad actual admite como propias las responsabilidades en cuanto a la prevención de la contaminación. Términos como "protección del medio ambiente" y "ecología", o más recientes como "desarrollo sostenible", se han convertido en habituales en diferentes áreas. La primera definición clara del término "desarrollo sostenible" apareció publicada en 1987 en el libro "Our common future" que recoge el informe socioeconómico denominado Brundtland, en honor a la directora que encabezaba

la comisión formada por distintas naciones de la Organización de las Naciones Unidas (ONU). Se considera "desarrollo sostenible" a una forma de desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer las necesidades de futuras generaciones [7]. Esta definición deja claro que el desarrollo sostenible demanda ciertas limitaciones en las actividades humanas, formando la intersección de tres áreas diferentes: sociedad, mercado y medio ambiente [8].

La comunidad global ha realizado grandes esfuerzos hacia la consecución de una mejora en la calidad de vida. En 1988, las Naciones Unidas impulsaron la "Declaración Internacional sobre una producción más limpia", en la que aparecieron por primera vez términos como ecoeficiencia, productividad ecológica o prevención de la contaminación. En este sentido, Naciones Unidas celebra regularmente reuniones con objeto de examinar la aplicación de los acuerdos para paliar el cambio climático y establecer nuevas pautas. En 1990, la Agencia de Protección Ambiental publicó el "Acta de prevención de la contaminación" que condujo a la apertura de la oficina para la Prevención de la Contaminación y Sustancias Tóxicas.

Se conoce como "Química Verde" a la aplicación de técnicas y metodologías químicas innovadoras que reduzcan o eliminen el uso o generación de sustancias químicas peligrosas para la salud humana o el medio ambiente [9]. La Química Verde establece su filosofía a través de sus doce conocidos principios [10], pretendiendo dirigir las actuaciones hacia un uso más racional de nuestros recursos y conocimientos:

1. Prevención: es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez generado.
2. Economía atómica: los métodos de síntesis deben diseñarse de modo que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.
3. Uso de metodologías que generen productos de baja toxicidad: los métodos de síntesis deben utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
4. Generación de productos eficaces pero no tóxicos: los productos químicos deberán mantener su eficacia, a la vez que reducir su toxicidad.

5. Empleo de disolventes y materiales auxiliares más seguros: se evitará en la medida de lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles y en el caso de que se utilicen, que sean lo más inocuas posible.
6. Disminución del consumo energético: los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se preferirán los trabajos de síntesis llevados a cabo a temperatura y presión ambientales.
7. Uso de materias primas renovables: la materia prima ha de ser preferiblemente renovable y no agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. Evitar derivados innecesarios: se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
9. Potenciación de la catálisis: se emplearán catalizadores, a ser posible selectivos y reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. Generación de productos biodegradables: los productos químicos se diseñarán de modo que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente, sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
11. Desarrollo de metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real de los procesos: las metodologías analíticas serán desarrolladas para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. Minimización del riesgo potencial de accidentes químicos: se seleccionarán las sustancias a emplear en los procesos químicos de modo que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas emanaciones, explosiones e incendios.

Aunque el químico analítico siempre ha tenido en cuenta los posibles impactos medioambientales de sus análisis, los primeros métodos descritos en la bibliografía en los que se especifica la aplicación de la ideología de la Química Verde a los laboratorios analíticos datan de 1995, hablando entonces de "Química Analítica Verde, Green Analytical Chemistry (GAC)" [11,12]. El impacto medioambiental de los métodos de análisis ha sido reducido atacando desde tres frentes diferentes [13]: 1) reducción de la cantidad de

disolventes requerida en el tratamiento de las muestras, 2) reducción en la cantidad y toxicidad de los disolventes y reactivos empleados para llevar a cabo la medida analítica y 3) desarrollo de metodologías analíticas directas que no requieran el uso de disolventes o reactivos. En lo que se refiere al primer punto, la mayoría de las muestras analizadas por métodos instrumentales de separación no pueden ser introducidas de forma directa en el sistema ya que son demasiado complejas, presentan contenidos analíticos muy bajos o son incompatibles con el sistema cromatográfico usado. Por ello, una preparación previa de la muestra resulta imprescindible antes de su introducción en el sistema instrumental. El desarrollo de nuevas técnicas de extracción rápidas y fiables resulta de gran interés [14]. En efecto, la tendencia hacia el análisis de un amplio espectro de analitos a muy bajas concentraciones en muestras de matrices muy complejas ha venido facilitada por el desarrollo de una nueva generación de instrumentos de análisis de elevada sensibilidad, así como por el desarrollo de nuevos procedimientos de preparación de muestra [8]. Ha de puntualizarse el hecho de que, en numerosas ocasiones, los nuevos sistemas instrumentales de medida no son suficientemente sensibles como para determinar gran cantidad de analitos en diferentes tipos de muestras. Por ello, la optimización de las distintas etapas y operaciones asociadas a la preparación de la muestra, ocupan una parte importante de las investigaciones actuales en el área de Química Analítica. En este sentido, la preparación de la muestra implica las siguientes etapas sucesivas [8]:

- aislamiento de los analitos desde la matriz original hasta otra matriz receptora de composición más simple que la inicial (siendo opcional la preconcentración de los analitos);
- liberación de los analitos, previamente atrapados en una fase adecuada, hasta la fase de aislamiento y/o preconcentración;
- eliminación del exceso de disolvente, secado, purificación y fraccionamiento de los extractos.

Estas etapas suelen ir seguidas de análisis mediante técnicas cromatográficas, que generalmente se usan para separar mezclas en sus especies químicas individuales de forma previa a su determinación final. Las operaciones implicadas en la preparación de la muestra son generalmente tediosas, consumen mucho tiempo y son difíciles de automatizar. Las técnicas modernas de preparación de la muestra ofrecen la posibilidad de

automatización, son limpias, selectivas, rápidas, eficaces e idealmente, baratas, sencillas y libres de disolventes tóxicos.

2.2. ASPECTOS BÁSICOS DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de la muestra juega un papel esencial en los métodos analíticos modernos, lo que ya ha sido mencionado anteriormente, tratándose de una etapa crítica en el proceso analítico global e incluye todas las etapas necesarias para dejar la muestra (o más estrictamente, los analitos contenidos en la muestra original) lista para su introducción en el instrumento de medida. Esta definición resulta en concordancia con la proporcionada por la IUPAC, que establece que "la preparación de la muestra tiene como objetivo transformar los analitos en formas medibles" [15].

El proceso de preparación de la muestra depende de la matriz de la misma y de las propiedades y nivel de concentración de los analitos. Las etapas típicas, previas a la etapa de medida instrumental que constituyen la preparación de la muestra incluyen, muestreo/homogeneización, extracción, limpieza y concentración. En ocasiones, es necesario incluir una etapa de derivatización para hacer compatible los analitos con el sistema de separación y/o detección. Debido a las bajas concentraciones a las que los analitos de interés generalmente requieren ser cuantificados en las muestras, la preparación de la muestra requiere la extracción exhaustiva de los analitos. La naturaleza esencialmente no selectiva de esta etapa de extracción suele hacer necesaria una purificación o limpieza de los extractos obtenidos antes de proceder al análisis instrumental propiamente dicho. Los tratamientos de limpieza son generalmente aplicados en discontinuo, lo cual afecta al análisis en términos de tiempo, consumo de reactivos, probabilidad de contaminaciones y degradación de los analitos y, a menudo, en la generación de grandes cantidades de residuos. Estas características explican por qué se estima que la etapa de preparación de la muestra computa un tercio del tiempo de análisis total y, lo que es más importante, se considera la principal fuente de errores y discrepancias entre laboratorios [16]. Para la determinación de trazas de compuestos orgánicos, el análisis final se lleva a cabo utilizando generalmente cromatografía combinada con un detector adecuado.

La preparación de la muestra debe adaptarse al análisis final, teniendo en cuenta la instrumentación a emplear, el grado de exactitud requerido y si se va a llevar a cabo un análisis cualitativo o cuantitativo. En análisis cuantitativo, también es necesario considerar la forma más adecuada de preparación de los patrones de calibración. En algunos casos, la calibración directa frente a patrones acuosos no es posible y es necesario aplicar el método de adiciones estándar a las muestras o emplear una muestra como matriz modelo o disolvente de calibración. El uso de un estándar interno adecuado ha de ser considerado. En cualquier caso, cualquiera que sea la técnica que se seleccione, ya sea manual o automática, ha de ser robusta y reproducible [4].

La adecuada selección y optimización de la etapa de preparación de la muestra resulta clave no solo para reducir el tiempo total de análisis, sino también porque afecta directamente a la exactitud y precisión de los resultados finales, considerando que cada etapa añade una fuente potencial de error. Este hecho se hace más crítico a las bajas concentraciones requeridas para el análisis a nivel de ultratrazas, ya que una proporción significativa de la variabilidad de un método particular, como la reproducibilidad del análisis, se hace menor al disminuir la concentración. Con el fin de minimizar la incertidumbre en la etapa de preparación de la muestra es necesario considerar diversos factores. Ya que estadísticamente la incertidumbre de un método está directamente relacionada con el número de etapas implicadas, una reducción en dicho número debería reducir la incertidumbre. Por ejemplo, con el uso de técnicas de extracción selectivas es posible simplificar u omitir la etapa de limpieza. El uso de técnicas automáticas también conduce a una reducción de la incertidumbre. Los métodos automáticos son generalmente más reproducibles que los manuales, y disminuyen el tiempo de preparación de la muestra que, a menudo, es la etapa limitante del análisis global [4].

Los MRLs legislados para contaminantes en los alimentos están disminuyendo a medida que tanto gobiernos como consumidores demandan mejor calidad y estándares más altos, lo que incrementa la necesidad de metodologías más sensibles y fiables. Ya que los límites de detección disminuyen, la evaluación del riesgo en la seguridad alimentaria es mejor y más robusta, traduciéndose esto en una mejor protección 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 si son potencialmente genotóxicas o cancerígenas. La

evaluación de los riesgos para la salud pública y la seguridad de alimentos, conlleva el empleo de datos fiables y la identificación inequívoca de un analito para que los datos o la evaluación de los riesgos sea incuestionable. 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 niveles requeridos por la legislación, ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas de extracción. Sin embargo, el desarrollo de métodos de extracción y preparación de muestra eficientes es todavía un punto de importancia, particularmente para los métodos LC-MS [17,18].

La extracción selectiva de analitos se basa en las diferencias en sus propiedades químicas y físicas, destacando el peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y diferencias en volatilidad. La teoría del proceso de extracción se estudia con detalle en el libro "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry" [19]. De entre las numerosas técnicas disponibles de extracción de muestra, la selección de la más adecuada se realiza en función del tipo de matriz y compuestos bajo análisis.

2.3. MINIATURIZACIÓN EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El desarrollo de sistemas miniaturizados representa una línea de trabajo muy importante dentro de la Química Analítica. Aunque el término miniaturización es aplicable a la detección, la separación y las técnicas de preparación de muestra, nos centraremos en esta última aplicación.

El empleo de tratamientos de muestra convencionales ha ido progresivamente disminuyendo al ser reemplazados por los métodos miniaturizados, que presentan diferentes ventajas al ser comparados con las clásicas Extracción Líquido-Líquido (LLE) o SPE. Las técnicas SPME y LPME se consideran alternativas encuadradas dentro de la Química Analítica Verde, caracterizándose por el mínimo consumo de disolventes, su elevada capacidad de preconcentración, fácil aplicación y gran eficacia. El volumen de la fase extractante en estas técnicas es del orden de los microlitros, de modo que los elevados factores de enriquecimiento alcanzados se deben a las altas relaciones volumen de disolución de muestra a volumen de fase extractante. De forma general, es posible llevar a cabo la extracción bajo dos modos de trabajo diferentes: por inmersión directa

que consiste en sumergir la fase aceptora en la disolución de muestra (Direct Immersion, DI) o exponiéndola al espacio de cabeza por encima de dicha disolución (Headspace, HS). El campo de aplicación de estas técnicas miniaturizadas es muy amplio gracias al desarrollo de diferentes y complementarias modalidades de SPME y LPME.

Sin embargo, estas técnicas de microextracción no están exentas de limitaciones. En primer lugar, en general no son técnicas de extracción exhaustivas y su aplicación requiere una calibración cuidadosa. Además, algunas técnicas de microextracción no representan la mejor opción cuando se trata con muestras de matrices complejas. La selección de la técnica miniaturizada más adecuada para cada problema analítico no resulta tarea sencilla en numerosas ocasiones [20].

A pesar de las diferencias obvias entre SPME y LPME en términos de la naturaleza de las fases implicadas en la extracción, ambas técnicas responden al mismo principio, el concepto de equilibrio. En algunos casos, solo están implicadas dos fases, como SPME o algunas técnicas LPME aplicadas en el modo DI, mientras que son tres las fases implicadas en el modo HS o Microextracción Líquido-Líquido-Líquido (LLLME). La Tabla 3 muestra las diferentes situaciones [21].

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	LLLME	Líquido-líquido-líquido	Partición

Sin embargo, no solo la naturaleza de las fases marca la diferencia entre SPME y LPME, sino que el principio del equilibrio también ha de ser tenido en consideración. Cuando la fase extractante es sólida, como ocurre en SPME, el fenómeno de adsorción

juega un papel importante y el proceso está mayoritariamente regido 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 isotermas de adsorción.

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, por lo que el analito se extrae según su solubilidad en la fase extractante. Por tanto, la elección de la fase extractante debe realizarse considerando la polaridad de los analitos, su tamaño molecular y las interacciones físico-químicas entre el analito y la muestra líquida y el analito y la fase extractante líquida. En esta situación, compiten dos fases líquidas por el analito. Al disminuir la solubilidad del analito en la muestra líquida y aumentar en la fase líquida extractante, aumentará la eficiencia de extracción.

Si el analito está en fase gas y el extractante es líquido, la disolución del gas en el líquido es el proceso principal. En función de su solubilidad, se producirá la partición del analito entre el gas y las fases líquidas.

Con respecto a los casos anteriores, LLLME es ligeramente diferente, pues el analito está disuelto generalmente en la primera fase líquida, se produce la partición entre la primera y la segunda fase y, finalmente, tiene lugar una interacción química entre el analito y la tercera fase. Aunque la solubilidad del analito en cada fase es el concepto crítico y la partición rige el proceso, dicha solubilidad viene modulada por cambios químicos del analito en cada fase.

La miniaturización del proceso analítico es aquí una realidad ya que todos los conceptos y fenómenos mencionados tienen lugar entre solo microvolúmenes de fases líquidas y mínimas cantidades de fases sólidas, a lo cual hay que añadir ventajas tales como portabilidad, sostenibilidad y bajo precio.

A continuación, presentaremos de forma breve las principales técnicas miniaturizadas disponibles de tratamiento de muestras.

2.3.1. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN BASADAS EN ADSORCIÓN Y PARTICIÓN

Muchas técnicas actuales de preparación de muestra se basan en el atrapamiento de los analitos en o sobre una fase sólida, y su posterior desorción térmica o por elución con una pequeña cantidad de disolvente. La primera opción de desorción no implica dilución de los analitos extraídos aunque su aplicación se limita a compuestos volátiles o semivolátiles y térmicamente estables.

La Figura 2 muestra un esquema de la clasificación de las técnicas de microextracción basadas en adsorción/partición para las que la segunda fase es sólida [22]. Estas técnicas pueden clasificarse de acuerdo a que la extracción se lleve a cabo en un recipiente en modo estático o dentro de un flujo dinámico. De forma general, se emplean fibras y tubos capilares recubiertos con la fase extractante. Otras alternativas basadas en el uso de microjeringas (SPME en aguja) y puntas de pipeta (SPME en punta) como soporte para la fase estacionaria también han sido desarrolladas.

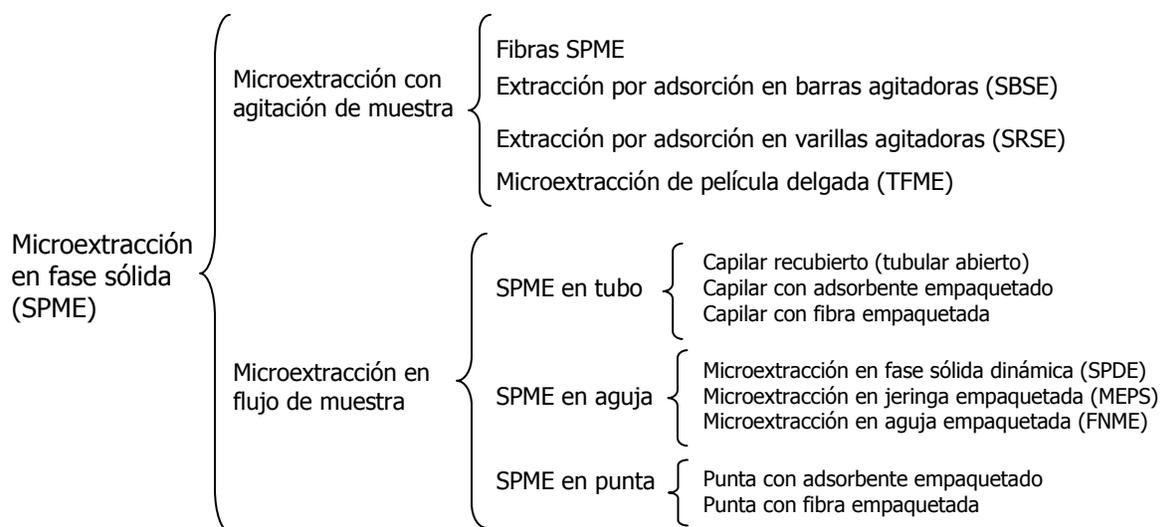


Figura 2. Clasificación de las técnicas de microextracción en fase sólida

SPME es una técnica de preparación libre de disolventes orgánicos que utiliza una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria apropiada ensamblada en una

microjeringa modificada. La técnica fue desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación de Pawliszyn y colaboradores [23], y posteriormente, se han publicado varios libros sobre la técnica [24-26].

La técnica SPME consiste básicamente en un proceso de dos etapas, la primera es la extracción de los analitos desde la matriz de la muestra hasta el recubrimiento de la fibra. Durante la segunda etapa, los analitos extraídos en la fibra son desorbidos. La etapa de desorción puede llevarse a cabo térmicamente, teniendo lugar en el puerto de inyección de un GC, o usando un disolvente que puede ser analizado mediante LC. La desorción líquida acoplada a LC puede llevarse a cabo en modo estático o dinámico, existiendo varias interfases disponibles comercialmente [27]. Existen dos modos diferentes para realizar la etapa de extracción: mediante DI de la fibra en la disolución de la muestra o exponiendo la fibra al HS en contacto con la muestra. Generalmente, el modo DI se aplica para la extracción de analitos de baja volatilidad, mientras que el modo HS se utiliza para compuestos volátiles. Cuando la matriz de la muestra es compleja, el modo DI puede provocar un rápido deterioro de la fase extractante.

La extracción mediante SPME generalmente no es exhaustiva sino que se trata de una técnica de equilibrio. Aunque se obtiene la máxima sensibilidad en el equilibrio, no es necesario llegar a este punto, pudiendo acortar así el tiempo de análisis si se trabaja a un tiempo fijo inferior al del equilibrio. La temperatura y tiempo de extracción así como la velocidad de agitación de la disolución de muestra deben optimizarse para cada caso particular. En cuanto al volumen de fase extractante en SPME es limitado, lo que acota su capacidad de enriquecimiento.

Existe comercialmente disponible una gran variedad de fases extractantes en SPME con espesores y polaridades diferentes [28,29]. La naturaleza del recubrimiento polimérico determina el tipo de retención del analito (absorción o adsorción). Actualmente existen disponibles comercialmente seis recubrimientos poliméricos: polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenceno (DVB), poliacrilato (PA), carboxen (CAR), carbowax (CW) y polietilenglicol (PEG), que de forma individual o combinados posibilitan la extracción de una amplísima variedad de analitos de muy diferentes grados de polaridad. Sin embargo, los principales problemas de las fibras comerciales (variaciones entre análisis y falta de robustez) han conducido al desarrollo de nuevos recubrimientos basados en el uso de la tecnología sol-

gel, polímeros de impresión molecular (Molecularly-Imprinted Polymers, MIPs) [30] y electrodeposición química para obtener recubrimientos de SPME de mayor estabilidad térmica, enlazados químicamente a la fibra de sílice y de menor fragilidad que los comerciales [31,32].

Los efectos de matriz pueden ser importantes y, generalmente, la cuantificación requiere el uso de estándares conteniendo la matriz o el empleo de adiciones estándar a las muestras.

Las principales ventajas de la extracción por SPME comparada con la extracción con disolventes son la minimización del uso de disolventes, la combinación de muestreo y extracción en una única etapa y la habilidad para tratar con muestras de pequeño tamaño. Además, también presenta una elevada sensibilidad, pudiéndose aplicar para la extracción de analitos de diferente polaridad en un amplio rango de matrices.

Una alternativa a SPME es la técnica SPME en tubo (in-tube SPME) que usa un capilar recubierto internamente, a través del que fluye la muestra o es introducida repetidamente. Esta técnica se desarrolló debido a las dificultades del acoplamiento SPME-LC. Los analitos atrapados en el recubrimiento interno del capilar son después desorbidos introduciendo el capilar en un flujo de fase móvil o mediante desorción estática en un disolvente. Un inconveniente de estos dispositivos es que es necesario eliminar las partículas de las muestras antes de la extracción (por centrifugación o filtración) para evitar taponamientos del capilar [33,34].

En SBSE se recubre una barra magnética con una fina capa de material absorbente [35]. Dado que se consigue un volumen de fase extractante mayor, en SBSE se obtiene mayor recuperación y mayor capacidad de extracción que en SPME [36]. En general, se considera que SBSE es superior a SPME en términos de sensibilidad y exactitud para la determinación de compuestos a nivel de trazas en matrices complejas.

Una vez que los analitos han sido transferidos desde la muestra a la fase absorbente de la barra de agitación, la desorción de los mismos puede llevarse a cabo por desorción térmica en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o por desorción líquida con un disolvente adecuado. Un inconveniente de SBSE, cuando las medidas instrumentales se van a llevar a cabo mediante GC, es la etapa de desorción, ya que como el analito está absorbido en el recubrimiento de la barra agitadora no puede desorberse

directamente en el puerto de inyección del equipo de GC. Por tanto, el analito debe ser reextraído en un disolvente adecuado, lo que añade una etapa adicional al método completo, o habrá que emplear una unidad especialmente diseñada para la desorción térmica. Al igual que en SPME, la barra agitadora también puede utilizarse para la extracción de componentes volátiles y semivolátiles de la muestra, manteniéndola en el espacio de cabeza por encima de esta, y para la extracción de componentes no volátiles, sumergiéndola en la disolución de la muestra. Dado que esta técnica de preconcentración ha sido aplicada en el método analítico propuesto en el Capítulo IV, una exposición más detallada acerca de fundamentos, metodología y aplicaciones de la misma, puede encontrarse en la Introducción de dicho Capítulo.

El uso de recubrimientos poliméricos monolíticos en SBSE [37], teniendo en cuenta sus propiedades de alta permeabilidad y biocompatibilidad, ha permitido no sólo la aplicación de la técnica a muestras de carácter biológico sino también, empleando determinados polímeros monolíticos, la extracción de analitos polares. Sin embargo, algunos de estos recubrimientos resultan dañados muy rápidamente como consecuencia del contacto directo de las barras de agitación con las paredes del recipiente contenedor de la muestra. Por esta razón, los recubrimientos polares de PA y PEG se comercializan protegidos por una malla metálica que impide el contacto directo con la base del recipiente. La técnica denominada Extracción por Adsorción sobre Varillas Agitadoras (Stir rod sorptive extraction, SRSE) surge asimismo para evitar ese problema de fricción directa de las barras de agitación con el recipiente [38,39]. La aplicación de la técnica SRSE ha sido también ampliada con otros tipos de recubrimientos para la preconcentración de PAHs [40] y drogas [41].

2.3.2. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA BASADAS EN PARTICIÓN

LPME puede definirse de forma práctica como una técnica de preparación de muestra por extracción y concentración de muestras líquidas, sólidas o gaseosas en microvolúmenes de disolvente (generalmente inferiores a 100 μ L). LPME, también llamada Microextracción en un Disolvente (Solvent Microextraction, SME) [42] se emplea para extracción, purificación y concentración de compuestos volátiles, no volátiles, polares,

apolares, iónicos y metálicos en diversos tipos de muestras. Existe una gran variedad de técnicas LPME. De hecho, en la bibliografía, podemos encontrar un nombre diferente para cada variante, lo que conduce a un número ilimitado de acrónimos que en ocasiones dificulta las búsquedas bibliográficas. La Figura 3 muestra un esquema de la clasificación básica de las técnicas LPME [22].

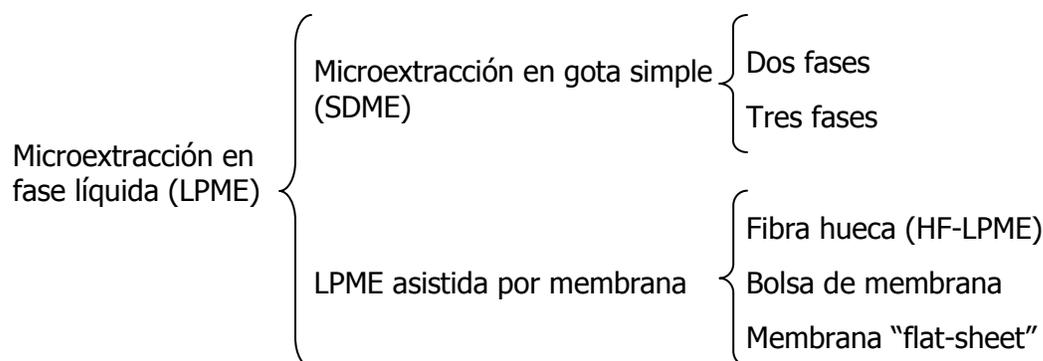


Figura 3. Clasificación de las técnicas de microextracción en fase líquida

Aunque los distintos procedimientos LPME derivan de LLE, es posible distinguir entre sistemas de dos y tres fases. Los procedimientos LPME de dos fases se aplican generalmente para la extracción directa de compuestos sin carga, ya sean volátiles o no volátiles, mientras que los procedimientos LPME de tres fases se usan para la extracción de analitos ionizables (cuando se aplican los sistemas líquido-líquido-líquido) y analitos volátiles y semivolátiles (al aplicar los sistemas líquido-gas-líquido) [20]. La gran variedad de técnicas miniaturizadas de extracción en disolventes a menudo hace difícil conocer cuál resulta más adecuada para cada aplicación particular, existiendo en diversos casos varias alternativas posibles.

En los sistemas de dos fases, el extractante debe ser inmisible con la disolución de la muestra y de muy baja solubilidad en agua. La forma en la que la fase extractante se expone a la muestra determina el tipo de procedimiento LPME. En la técnica denominada Microextracción en Gota Simple (Single-Drop Microextraction, SDME), la gota de extractante se encuentra suspendida de la aguja de una microjeringa y se expone a la disolución de la muestra que es sometida a agitación [43]. La estabilidad de la gota es

limitada, sobre todo en presencia de altas concentraciones de materia orgánica y/o de partículas sólidas, o incluso si se aplican elevadas velocidades de agitación a la muestra o tiempos largos de extracción. Por tanto, la aplicabilidad de esta técnica se limita a extractos de muestra limpios.

Estas limitaciones se han minimizado con el uso de fibras poliméricas huecas para albergar a la fase extractante que además penetra en los poros de las paredes de la fibra hueca, dando lugar a la técnica Microextracción en Fase Líquida con Fibra Hueca (Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HF-LPME). La fibra protege a la fase extractante de las partículas sólidas presentes en la disolución de la muestra, pudiendo a su vez aplicarse velocidades de agitación altas y largos tiempos de extracción. Las fibras más empleadas son las de polipropileno por ser compatibles con gran variedad de disolventes orgánicos [44].

La sustitución del embudo de decantación empleado en LLE clásica por una microjeringa ha dado lugar a la técnica denominada Microextracción Dinámica en Fase Líquida (Dynamic-LPME) [45]. En esta técnica, la fase extractante se mantiene en una microjeringa, y la extracción se produce cuando se expone a la muestra, proceso que se repite mediante movimientos continuos del émbolo de la microjeringa. Al igual que ocurre con SDME, no se recomienda la aplicación de LPME dinámica a disoluciones conteniendo partículas sólidas.

Recientemente, se han propuesto otras técnicas LPME de dos fases, aprovechando diferentes propiedades físico-químicas de la fase extractante, como densidad y/o punto de fusión. De entre ellas destacan Microextracción en Gota Simple Directamente Suspendida (Directly Suspended Droplet Microextraction, DSDME) [46], Microextracción Líquido-Líquido Asistida por Vórtice (Vortex-Assisted Liquid-Liquid Microextraction, VALLME) [47], Microextracción en Gota Orgánica Flotante Solidificada (Solidification of a Floating Organic Drop Microextraction, SFOME) [48], Microextracción con Emulsificación Asistida por Ultrasonidos (Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction, USAEME) [49] o DLLME [50]. En todas estas técnicas, la gota no se mantiene suspendida sino que se expone de forma directa a la disolución de muestra. Además, no sólo se permite la agitación fuerte sino que es ventajosa, ya que acelera la cinética y reduce el tiempo de extracción. La dispersión completa de la fase extractante en la disolución de la muestra puede

conseguirse a través de agitación vórtice, con la aplicación de ultrasonidos o por adición de un agente dispersante. En los casos donde la fase extractante se somete a una dispersión durante el proceso de extracción, es necesario someter la mezcla a centrifugación para conseguir la separación de la fase extractante. DLLME ha sido la técnica de preconcentración aplicada en cuatro de los capítulos de esta Tesis Doctoral, una revisión más extensa de la misma puede consultarse en la Introducción del Capítulo V.

La técnica DLLME es muy similar a la Extracción en Punto de Nube (Cloud Point Extraction, CPE), introducida en 1976 por Watanabe y col. [51], donde los analitos son extraídos en un pequeño volumen de una fase rica en un agente tensioactivo. Los tensioactivos son moléculas que presentan una parte polar hidrofílica (cabeza) y una parte apolar hidrofóbica (cola) que, comúnmente, es una cadena hidrocarbonada lineal hidrofóbica, en algunos casos conteniendo anillos aromáticos. En disolución acuosa y a muy bajas concentraciones, los tensioactivos generalmente se hallan en forma de monómeros. Cuando la concentración de tensioactivo supera un determinado valor, conocido como concentración micelar crítica (CMC), los monómeros se asocian formando micelas que contienen de 60 a 100 monómeros. Según la naturaleza y concentración del tensioactivo y del disolvente, pueden formarse microemulsiones, monocapas, bicapas, etc. Estos agregados moleculares tienen capacidad para extraer solutos de diferente naturaleza, lo que es aprovechado desde el punto de vista analítico para el desarrollo de procedimientos de extracción.

Cuando una disolución de tensioactivo no iónico se calienta hasta una temperatura determinada, conocida como temperatura de punto de nube, se forman dos capas o dos fases, con concentraciones distintas de tensioactivo. Al enfriarse la disolución, aparece de nuevo una sola fase. La temperatura de nube depende del tipo de tensioactivo, de su concentración, así como de la presencia de sales, ácidos y bases, entre otros compuestos.

Normalmente, la fase extractante empleada en CPE se diluye antes de la cromatografía por presentar una viscosidad demasiado alta. Cuando se compara con otras técnicas de extracción, el uso de pequeños volúmenes de surfactantes no volátiles, la fácil aplicación y la combinación de extracción y enriquecimiento en una única etapa, son

ventajas que han de ser destacadas. Sin embargo, algunos surfactantes entorpecen la determinación de algunos compuestos mediante LC-UV [52].

Aunque la mayoría de las aplicaciones de CPE se centran en la determinación de iones metálicos, la determinación de algunos compuestos orgánicos también aparece reflejada en la bibliografía [53,54].

En 2004, se propuso la técnica Microextracción en Barra con Disolvente (Solvent-Bar Microextraction, SBME) [55] que puede ser considerada como una técnica híbrida entre HF-LPME y SBSE. En SBME, la fase extractante se encuentra rellenando el lumen de una pequeña pieza de una fibra hueca porosa sellada en ambos extremos. La barra con disolvente se introduce en la disolución de la muestra junto con un núcleo de agitación magnética convencional y, tras la extracción durante un periodo de tiempo determinado, se saca la barra con disolvente. Seguidamente, empleando una jeringa, se extrae el disolvente enriquecido del interior de la pieza de fibra hueca. Del mismo modo que para el resto de técnicas de microextracción basadas en fibras huecas, pueden emplearse sistemas de dos y de tres fases. Comparada con SDME y HF-LPME, SBME proporciona mayores eficiencias de extracción debido al movimiento producido durante la extracción; sin embargo, son necesarias varias operaciones sucesivas para la aplicación de SBME.

Los procedimientos de LPME de tres fases del tipo líquido-líquido-líquido permiten la extracción y preconcentración de compuestos ionizables al ajustar el pH de las fases dadora y aceptora al valor adecuado. Los analitos se extraen en primer lugar en un microvolumen de fase orgánica, para después ser reextraídos en una fase extractante acuosa. El pH ha de ajustarse a un valor en el que los analitos estén en forma neutra en la muestra y en forma ionizada en la disolución aceptora. Hasta la fecha, se han descrito tres procedimientos LPME líquido-líquido-líquido:

- Microextracción Líquido-Líquido-Líquido (Liquid-Liquid-Liquid Microextraction, LLLME) [56],
- Microextracción Líquido-Líquido-Líquido con Fibra Hueca (Hollow-Fiber Liquid-Liquid-Liquid Microextraction, HF-LLLME) [57] y
- LPME Asistida con Membranas (Membrane Assisted-LPME) [58].

Debido a que los procesos LPME líquido-líquido-líquido implican dos procesos de separación y, además, las fibras poliméricas porosas, en HF-LLME y LPME asistida por membranas actúan como filtros, los extractos obtenidos son muy limpios. Por otro lado, como los extractos finales son de naturaleza acuosa, son compatibles con LC y no necesitan ningún tratamiento adicional previo al análisis instrumental.

En cuanto a los sistemas LPME líquido-gas-líquido, el procedimiento más ampliamente usado es Microextracción en Gota Simple Suspendida en el Espacio de Cabeza de la disolución de la muestra (Headspace Single-Drop Microextraction, HS-SDME) [59]. En primer lugar, los analitos son transferidos al espacio de cabeza, manteniendo la disolución de muestra en agitación, y seguidamente extraídos a la gota de fase extractante. La fase extractante seleccionada debe presentar una polaridad similar a la de los analitos, y además, un punto de ebullición elevado y una baja presión de vapor. En este caso, los extractos finales también son muy limpios, ya que los componentes no volátiles de la disolución de muestra no son extraídos, y además, la extracción de compuestos de elevado peso molecular está desfavorecida cinéticamente.

2.3.3. COMPARACIÓN DE 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 4 resume las principales ventajas e inconvenientes de algunas técnicas discutidas [21]. Otra comparación de las diferentes técnicas de microextracción ha sido publicada por Kataoka [22].

Tabla 4. 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 para amplio rango de analitos</p> <p>Tamaño pequeño, útil para muestreo portátil</p> <p>Consistente, datos cuantificables a concentraciones muy bajas</p> <p>Numerosas fases diferentes (selectividad)</p> <p>Modos 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>Dañado de los recubrimientos</p> <p>Doblado de la aguja</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>
HF-LPME	<p>Estabilidad mayor del disolvente orgánico (soportado sobre los poros de la membrana)</p> <p>Económico</p> <p>Alto potencial de 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>Preacondicionamiento de membranas</p> <p>Precisión media en modo manual</p> <p>Mayoría de estudios en modo estático (resolución limitada)</p>

2.4. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN PARA MUESTRAS SÓLIDAS

Como ya se ha indicado anteriormente, los alimentos cubren una gran variedad de matrices de propiedades físicas muy diferentes, desde sólidos de pequeño tamaño de partícula hasta matrices biológicas como carne, grasas, líquidos o disoluciones. A pesar de las técnicas avanzadas de separación e identificación, pocas veces es posible analizar alimentos sin manipulación, requiriendo en general las muestras sólidas tratamientos más complejos y largos que las muestras líquidas. Las técnicas tradicionales de preparación de la muestra, basadas en la digestión húmeda con adición de reactivos, consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de reactivos que son caros, generan numerosos residuos, pueden contaminar la muestra e incluso enriquecer los analitos [60].

Para el análisis de muestras sólidas, los analitos han de ser desorbidos de la matriz y disueltos en un disolvente o fluido. El tamaño de partícula es un parámetro importante a considerar para la obtención de resultados reproducibles ya que la extensión en la que la matriz se halle disgregada puede influir en la velocidad de extracción de los analitos. Es por ello que las muestras sólidas pueden requerir un tratamiento previo de tamizado, molienda y secado. La solubilidad de los analitos en la fase de extracción, la capacidad de dicha fase para penetrar en la muestra y los efectos de la matriz influyen directamente en la eficiencia de extracción de los analitos. De forma general, las muestras sólidas se homogeneizan directamente o tras haber sido sometidas a un proceso de secado, para posteriormente proceder a la extracción exhaustiva de los analitos. La aplicación de la mayoría de los métodos de extracción proporciona una disolución orgánica o acuosa conteniendo los analitos de interés, que a menudo requiere concentración o alguna limpieza adicional. Los extractos finalmente obtenidos pueden ser tratados como muestras líquidas mediante métodos miniaturizados, que ya han sido revisados anteriormente.

La extracción inicial de los analitos desde la matriz sólida implica el uso de diferentes técnicas analíticas. Extracción Sólido-Líquido (SLE) y Soxhlet son técnicas ampliamente conocidas para el tratamiento de muestras sólidas y semisólidas. A pesar de sus limitaciones, como son el uso de cantidades grandes de muestra y disolventes orgánicos o manipulación de la muestra difícil de automatizar, han persistido sin modificar durante más de un siglo, datando de 2004 las primeras modificaciones de la extracción Soxhlet [61,62].

La Extracción Líquida Presurizada (Pressurized Liquid Extraction, PLE) implica la extracción con disolventes líquidos, siempre a temperaturas y presiones elevadas [63]. A esta técnica se le conoce también como Extracción Acelerada en Disolventes (Accelerated Solvent Extraction, ASE), Extracción en Fluidos Presurizados (Pressurized Fluid Extraction, PFE) y Extracción en Disolventes a Alta Presión (High-Pressure Solvent Extraction, HPSE), entre otras denominaciones. En PLE, la solubilidad de los analitos en la fase extractante aumenta como consecuencia de la disminución de la viscosidad de los disolventes al trabajar a altas temperaturas. Estas temperaturas elevadas también pueden facilitar la liberación de los analitos de la matriz de la muestra. PLE puede llevarse a cabo en modo estático o dinámico o una combinación de ambos. En modo estático, la muestra se introduce en un recipiente cerrado relleno con el extractante y, tras la extracción, este es purgado con nitrógeno hasta un vial colector. En los sistemas dinámicos, el disolvente fluye continuamente a través de la muestra, por consiguiente, el volumen de disolvente empleado será mayor que al trabajar en modo estático y además el extracto final será más diluido. Diversas aplicaciones de PLE para análisis de alimentos quedan recogidas en las revisiones de Carabias-Martínez y col. [64] y Mendiola y col. [65].

La técnica de Extracción en Agua Supercaliente (Super-Heated Water Extraction, SHWE) es un tipo de PLE donde la fase extractante es agua, pero suele tratarse aparte ya que el uso de agua como disolvente ofrece unas ventajas específicas no alcanzadas cuando se utilizan otros extractantes. El gran número de enlaces por puente de hidrógeno en el agua le confiere un elevado punto de ebullición y una constante dieléctrica alta. Esta técnica usa agua en fase condensada entre 100 °C y el punto crítico y se caracteriza por ser más limpia, rápida, económica y respetuosa con el medio ambiente que los procedimientos convencionales. Cuando se calienta el agua bajo presión, su polaridad disminuye, hasta tal punto que entre 100 y 200 °C actúa como un disolvente de polaridad media baja. Un inconveniente importante de SHWE es que el extracto obtenido es una disolución acuosa diluida, por tanto, para análisis de trazas, será necesaria una etapa de preconcentración previa a la medida instrumental y, además, para muestras de alimentos, también será necesaria la inclusión de otra etapa de limpieza del extracto acuoso obtenido, etapa también requerida para los extractos obtenidos por PLE [66-67].

La Extracción en Fluidos Supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE), a pesar de que su uso ha disminuido en los últimos años, sigue considerándose como una técnica

de extracción interesante por sus características únicas [65,68], de entre las que destacan la capacidad de extracción de compuestos térmicamente lábiles o fácilmente oxidables, empleando dióxido de carbono como extractante, con cinéticas más rápidas que la mayoría de los líquidos. Uno de los motivos por los que ha disminuido la frecuencia del uso de SFE es la polaridad baja de los fluidos comúnmente empleados como extractantes, que limita la aplicabilidad de la técnica. De hecho, los compuestos lipídicos suelen ser extraídos junto con los analitos de interés, siendo la extracción de lípidos para la determinación del contenido en grasa, una de las principales aplicaciones de SFE en análisis de alimentos. Además, otro problema importante de SFE es la robustez del método comparada con otras técnicas, ya que las condiciones han de ser consistentes para conseguir extracciones reproducibles. Por otra parte, SFE proporciona elevadas eficiencias de extracción con sólidos finamente divididos, como materiales vegetales desecados, mientras que las extracciones desde muestras líquidas o húmedas resulta difícil. Zougagh y col. publicaron una revisión bibliográfica de aplicaciones de SFE al análisis de alimentos [69].

La eficiencia de extracción puede mejorarse mediante la aplicación de energía auxiliar como en Extracción Asistida por Microondas (Microwave Assisted Extraction, MAE) y en Extracción Asistida por Ultrasonidos (Ultrasound Assisted Extraction, UAE).

En MAE, la muestra es agitada y calentada durante la extracción, siendo sólo aplicable para analitos térmicamente estables debido a que la muestra es sometida a altas temperaturas. Las aplicaciones de MAE para la extracción de compuestos orgánicos son mucho más limitadas que, por ejemplo, para otros analitos como los metales, ya que los disolventes apolares no absorben la energía de las microondas. MAE puede llevarse a cabo en recipientes abiertos o cerrados, refiriéndonos a Extracción Focalizada Asistida por Microondas (Focused Microwave-Assisted Extraction, FMAE) y Extracción Presurizada Asistida por Microondas (Pressurized Microwave-Assisted Extraction, PMAE), respectivamente. PMAE es muy parecida a PLE, ya que se trabaja con el disolvente a alta temperatura y presión en ambos casos. La principal ventaja de MAE son sus tiempos cortos de extracción, las altas eficiencias de extracción usando cantidades pequeñas de disolvente y su aplicabilidad incluso para algunos compuestos lábiles térmicamente [70]. Del mismo modo que en PLE y SHWE, los extractos suelen requerir etapas posteriores de preconcentración y/o limpieza.

La sonicación consiste en la aplicación de ondas sonoras con frecuencias superiores a 20 Hz que viajan a través de la materia provocando variaciones de presión negativas y cavidades. Estas cavidades implosionan cuando no absorben la energía de los ultrasonidos, provocando aumentos bruscos de presión y temperatura en determinados puntos de la muestra, que conducen a la liberación de los analitos desde la matriz donde se hallan retenidos. UAE puede llevarse a cabo por medio de baños o sondas, siendo en cualquier caso las sondas la vía más eficaz. UAE es una alternativa muy interesante a las técnicas clásicas de preparación de muestras para la extracción de compuestos orgánicos desde matrices de alimentos [71]. En UAE la eficiencia de extracción depende directamente del tiempo de sonicación y de la temperatura, y aunque el incremento de la temperatura mejora dicha eficiencia, si los analitos son térmicamente inestables será necesario el control de este parámetro. De nuevo, al igual que PLE, SHWE y MAE, los extractos obtenidos por UAE requieren usualmente etapas de limpieza y/o preconcentración. Recientemente, se han recopilado las aplicaciones de UAE para la determinación de contaminantes en alimentos [72]. La energía de ultrasonidos se ha usado también para acelerar otros procesos de extracción o purificación, como SPE [73] o MSPD [74].

Determinadas muestras de alimentos con altos grados de humedad, como los tejidos animales, pueden causar problemas en la aplicación de las técnicas de extracción anteriormente expuestas, debido a la dificultad para preparar la muestra en una forma adecuada para que el fluido extractante pueda difundir a través de la misma y extraer los analitos. El secado o liofilización de la muestra para poder conseguir un sólido finamente dividido, en ocasiones no es una buena opción, ya que las células pueden colapsar formando agregados que retienen los analitos. La técnica MSPD representa una solución para estas muestras, aunque su uso se puede extender a otros tipos de muestras [3]. La fase dispersante tiene una estructura porosa que permite al disolvente penetrar en la matriz y extraer los analitos, y además puede retener los lípidos [75]. La muestra se mezcla con el dispersante sólido, pudiendo la mezcla ser empaquetada en un cartucho vacío de SPE y, seguidamente, se procede al lavado y elución con un pequeño volumen de disolvente. Esta técnica utiliza menos disolvente que LLE y puede eliminar la necesidad de extracciones múltiples. La selección adecuada del agente dispersante y del disolvente de extracción permite en muchos casos obtener extractos que pueden ser analizados

directamente mediante cromatografía. Los materiales dispersantes empleados en MSPD son similares a los de SPE, siendo los más usados los de RP, sobre todo C_8 y C_{18} , ya que retienen eficientemente componentes de la matriz de polaridad media y baja. Cuando los extractos obtenidos no son suficientemente limpios, o bien la técnica de separación-detección a aplicar no es suficientemente selectiva, es necesario incluir alguna etapa extra de purificación, que generalmente se lleva a cabo en discontinuo. Sin embargo, se han descrito procedimientos de limpieza de la matriz adsorbida en el dispersante de forma previa a la elución de los compuestos de interés o de empaquetamiento de adsorbentes extra para retención de los interferentes.

Las tendencias actuales en MSPD se centran en el uso de nuevos materiales dispersantes [76,77], la miniaturización del proceso [78] y su combinación con otras técnicas novedosas de preparación de muestra con objeto de mejorar la sensibilidad y selectividad del proceso de extracción [79-81]. Sin embargo, no podemos obviar el hecho de que MSPD, aunque útil para el análisis de trazas, en particular como una ayuda o alternativa a LLE o SPE, es difícilmente automatizable y puede consumir mucho tiempo cuando el número de muestras para análisis es alto [4].

2.5. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La eliminación de interferencias de la matriz y/o la preconcentración de los analitos de interés de muestras líquidas y/o extractos de muestras sólidas ha sido llevada a cabo ampliamente mediante la técnica SPE, que es considerada como la más empleada para el análisis de alimentos [4]. SPE fue introducida a mediados de los 70 y comenzó a comercializarse en 1978 como una alternativa a LLE [82], que consume menor volumen de disolventes orgánicos que esta última, aunque nada comparable con las técnicas miniaturizadas de extracción. En la actualidad, se comercializan cartuchos y discos de una gran variedad de matrices para la aplicación de SPE.

SPE implica una partición líquido-sólido, donde la fase extractante es un adsorbente sólido, que ha sido ampliamente utilizada para eliminar y/o concentrar trazas de compuestos orgánicos de muestras líquidas o disoluciones. El adsorbente es seguidamente lavado con un pequeño volumen de disolvente para romper sus enlaces adsorbente-analito, teniendo lugar generalmente la elución de los analitos. Existen

comercialmente disponibles diferentes adsorbentes en los que la extracción/retención de los analitos tiene lugar a través de distintos mecanismos. Los analitos se enlazan a los sitios activos del material adsorbente, siendo, por tanto, importante el área superficial de la fase adsorbente y no su volumen. Hennion publicó un review donde se detallan las etapas de desarrollo del método, su acoplamiento a LC y todos los tipos de adsorbentes SPE [83]. Algunas aplicaciones interesantes de SPE al análisis de alimentos han sido recopiladas por Buldini y col. [60] y Zhang y col. [52].

Existe una gran variedad de adsorbentes, pudiendo encontrar desde fases enlazadas C_8 y C_{18} sobre sílice, resinas poliméricas (poliestireno/DVB), Florisil (silicato de magnesio activado), adsorbentes polares como alúmina, carbón activo, sílice y fases ciano- y amino-enlazadas. 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.

Gracias a los últimos avances en la síntesis de materiales adsorbentes se dispone de materiales con un tamaño de partícula muy pequeño, que proporcionan mayores capacidades de retención que los rellenos convencionales. Este hecho ha promovido también el uso de cartuchos SPE de menor tamaño sin pérdidas significativas de eficiencia de retención, que disminuyen el volumen de muestra desde 0,5-1 L a menos de 50-100 mL, pudiendo a su vez ser eluidos los analitos con volúmenes del disolvente adecuado de 50 a 100 μ L. Estas nuevas características de SPE han promovido el desarrollo de sistemas en línea SPE-LC [84]. Sin embargo, aún considerándose viable el acoplamiento en línea de SPE con LC, los avances en este sentido han sido mínimos, dirigiéndose las investigaciones principalmente hacia la reducción del consumo de muestra y la simplificación de su tratamiento.

SPE es más simple, consume menos disolvente y es más fácil de automatizar que LLE, además la formación de emulsiones a menudo encontrada en LLE puede ser evitada de forma efectiva. Cuando se compara SPE con SFE, PLE, MAE y UAE, SPE generalmente completa la etapa de preparación de la muestra, no requiriéndose ninguna etapa adicional de limpieza y/o concentración. Sin embargo, SPE presenta una serie de

desventajas que no pueden obviarse, como son el alto consumo de disolventes orgánicos respecto de las técnicas de microextracción, la difícil selección de los adsorbentes y eluyentes más adecuados, el empaquetamiento debe ser uniforme para conseguir una alta eficiencia, los sistemas automáticos pueden tener problemas de reproducibilidad y el hecho de que los cartuchos comerciales no pueden reutilizarse. Además, la matriz de la muestra también puede dificultar la capacidad del adsorbente para extraer los analitos debido a competencias en la retención [52].

La Microextracción en Jeringa Empaquetada (Microextraction in Packed Syringe, MEPS) puede considerarse como la versión miniaturizada de la técnica SPE, en la que una masa del orden de 1 mg se coloca en la cabeza de la aguja de una microjeringa. Para llevar a cabo la extracción, se aspiran sucesivamente volúmenes del orden de 10 a 250 μL de la disolución acuosa de muestra, permitiendo la preconcentración de los analitos en la fase adsorbente. La elución de los analitos se lleva a cabo empleando volúmenes de 20 a 50 μL del disolvente adecuado, que será transferido a LC o GC. El campo de aplicación más importante de la técnica MEPS es el del bioanálisis [85], encontrándose en la bibliografía solamente una aplicación al análisis de alimentos [86].

La Extracción Dispersiva en Fase Sólida (Dispersive Solid Phase Extraction, DSPE) bajo la metodología de preparación de muestra denominada QuEChERS, fue introducida en 2003 [87] y se basa en una extracción a microescala empleando acetonitrilo, absorción de agua y partición líquido-líquido usando sulfato magnésico y cloruro sódico, y limpieza mediante SPE dispersiva empleando un adsorbente tipo amina primaria/secundaria (PSA) para eliminar componentes polares de la muestra. En análisis de alimentos, otros adsorbentes como C_{18} pueden acompañar a la PSA en la etapa de dispersión de la fase sólida, para eliminar componentes lipofílicos extraídos en el acetonitrilo [88]. Extracción, separación y limpieza se combinan en una única etapa, evitando así homogeneización, filtración, uso de grandes volúmenes de disolvente, evaporación, condensación y/o posibles intercambios de disolventes para la determinación cromatográfica. La abreviatura con la que se conoce esta técnica proviene de rápida, fácil, barata, efectiva, robusta y segura (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), adjetivos que describen sus ventajas sobre LLE. Hasta el momento, acetonitrilo es el extractante más empleado en QuEChERS pues, aunque es miscible con el agua, se puede separar de esta fácilmente mediante adición de sales y centrifugación, y además presenta numerosas ventajas sobre

otros disolventes como acetona y metanol. Si se compara la técnica QuEChERS con LLE las ventajas son claras, ya que se simplifican enormemente las etapas de extracción y limpieza con resultados cuantitativos [52], prueba de ello son las numerosas aplicaciones para la cuantificación de pesticidas en alimentos recopiladas recientemente [89].

3. ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La combinación de la cromatografía con MS ha atraído gran interés en los últimos años. La primera combinación comercial data de 1967, siendo para GC con MS. La hibridación GC-MS se ha aceptado como una técnica de análisis de rutina, debido a la disponibilidad de interfases tanto para columnas empaquetadas como capilares, que permiten la transferencia eficiente de una gran variedad de compuestos, susceptibles de ser separados mediante GC, hasta el espectrómetro. La realidad es que para que los compuestos puedan ser separados mediante GC, han de ser volátiles a las temperaturas usadas para la separación, y térmicamente estables; siendo precisamente estas características los requisitos necesarios para producir un espectro de masas empleando impacto electrónico o ionización química.

Sin embargo, esto no es así cuando se considera la combinación LC-MS. Las incompatibilidades entre ambas técnicas impiden que puedan combinarse de forma directa, ya que LC trabaja en fase condensada y MS opera bajo vacío. Es, por tanto, necesario emplear una interfase cuyo propósito principal es la eliminación de la fase móvil.

LC es muy efectiva en la separación de compuestos no volátiles e inestables térmicamente. El detector más ampliamente usado para LC es, sin duda, el de absorción UV, que dependiendo del modo en el que se emplee, puede considerarse como específico o general. Si se dispone de un detector DAD se puede monitorizar más de una longitud de onda y medirse la relación entre las absorbancias. La concordancia entre la relación medida para una muestra y la obtenida para una disolución estándar del analito proporciona más fiabilidad de identificación que cuando se trabaja a una sola longitud de onda, como ocurre en los detectores de absorción UV. Sin embargo, aún en el caso del uso de DAD no se tendrá certeza absoluta en la identificación del compuesto [90].

De hecho, la falta de detectores LC sensibles y selectivos, ha limitado el uso de esta técnica en el análisis de muestras con matrices de alta complejidad, como es el caso de los alimentos. Hasta hace dos décadas, no se disponía de una interfase apropiada de LC con MS porque este acoplamiento no se consideraba natural, ya que no solo los analitos han de ser ionizados sino que también se requiere la vaporización de la fase móvil. 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 debido a su gran especificidad, sensibilidad y eficiencia [1,91]. 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 [92-94].

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 interfaces desarrolladas, las más comúnmente usadas en LC-MS son ESI, APCI y APPI, siendo todas ellas técnicas API [1]. Con ESI y APCI, se han desarrollado estrategias analíticas de LC-MS 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 [95,96].

3.1. INTERFASES PARA LC-MS

Los sistemas LC-MS se basan casi exclusivamente en interfaces API de "ionización débil". La Figura 4 compara la aplicabilidad de las tres técnicas de ionización ESI, APCI y APPI de acuerdo con el peso molecular de los compuestos y su polaridad [1].

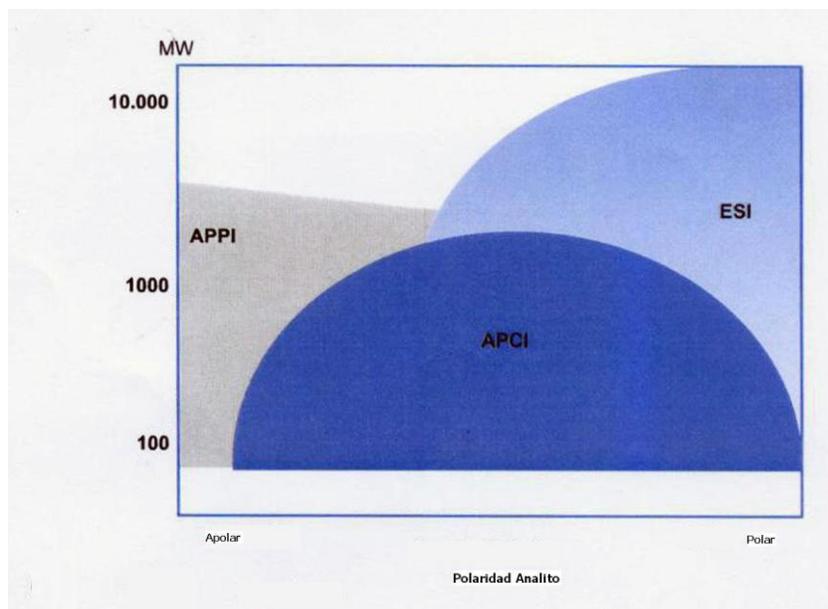


Figura 4. Comparación del campo de aplicación de los tres modos de ionización a presión atmosférica [1]

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 de elevado peso molecular (>1000 Da) [1,97]. APCI es más útil para compuestos no iónicos, de polaridad baja a alta y de peso molecular moderado. APPI se considera complementaria a ESI y APCI ya que amplía el intervalo de compuestos analizables a moléculas de muy baja polaridad que no son fácilmente ionizables. Puede concluirse que no existe ninguna técnica de ionización útil para todo tipo de compuestos; es decir, ciertas moléculas son más eficientemente ionizadas en un modo y otras requieren otro tipo de ionización, por ejemplo ESI o APCI. Además, una vez seleccionada la técnica de ionización, algunas sustancias son determinadas de forma más efectiva a partir de sus iones cargados positivamente, mientras que para otras es preferible la ionización negativa. Por ejemplo, los ácidos son más fácilmente ionizados con ESI en modo negativo mientras que las aminas se ionizan mejor con ESI en modo positivo.

Existen comercialmente 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, APPI u otros medios,

- (3) la apertura de muestreo de iones,
- (4) la interfase de 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 5 muestra un diagrama esquemático de una fuente API [95]. Mediante el intercambio del lateral derecho, es posible cambiar fácilmente entre ESI y APCI.

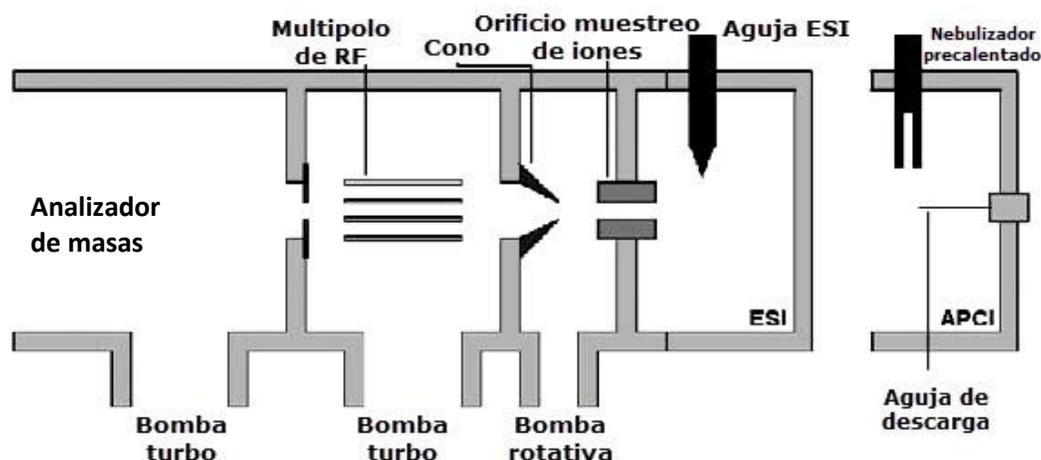


Figura 5. Diagrama esquemático de una fuente API para LC-MS. El intercambio del lateral derecho permite cambiar entre ESI y APCI

El principio operacional de la mayoría de interfases API y diseños generales de fuente de iones es el siguiente [96]: 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, (3) por una combinación de ambos, es decir, en ESI por spray de iones (ion-spray) o asistido neumáticamente (pneumatically-assisted) o (4) por impacto de fotones APPI. Los iones son producidos a partir de las gotas evaporadas, o por reacciones ión-molécula en fase gaseosa, por la desorción, evaporación o desolvatación suave de iones a partir de estas gotas o por impacto de fotones. 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 ESI, fuente más ampliamente usada en LC-MS, la ionización tiene lugar directamente desde la disolución, que pasa a presión atmosférica a través de una aguja coaxial, construida de acero inoxidable o un capilar interno de sílice fundida donde se aplica un voltaje alto (generalmente de 3 a 4 kV). El gas nebulizador se introduce a través de un capilar externo de acero inoxidable. La nebulización del líquido se debe a la acción combinada de la aplicación de un campo eléctrico grande resultante de la diferencia de potencial entre la aguja ESI y un contraelectrodo circundante, y la nebulización neumática. La evaporación del disolvente desde las gotas es asistida por una corriente de gas nitrógeno. Con la evaporación del disolvente, las gotas van disminuyendo progresivamente de volumen hasta alcanzar un punto crítico en el que la repulsión electrostática es mayor que la tensión superficial, por lo que la gota sufre una desintegración electrohidrodinámica inducida por el campo o explosión de 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) [98,99]. Esta secuencia de eventos que lleva a la formación de iones en fase gaseosa en ionización por ESI se muestra en la Figura 6.

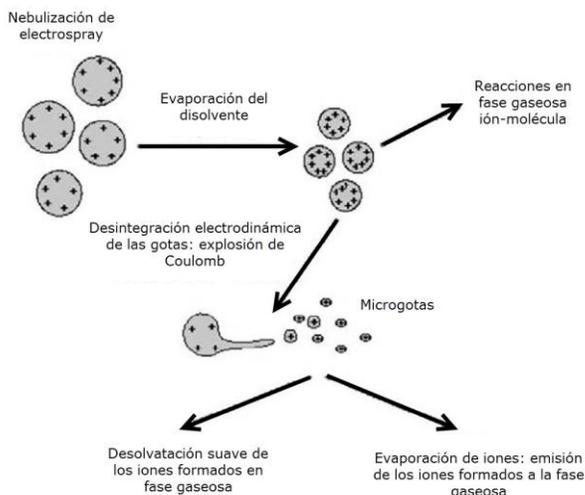


Figura 6. Secuencia de eventos que conduce a la formación de iones en ESI

En APCI, el efluente de la columna es introducido en un nebulizador donde se convierte en una niebla de finas gotas al confluir con una corriente de nitrógeno gaseoso a alta velocidad. Las gotas formadas se calientan en un tubo a alta temperatura (300-500 °C) donde la fase móvil es vaporizada y los analitos transferidos a la fase gas. El voltaje aplicado (1-5 kV) sobre la aguja de descarga en corona provoca la formación de iones reactivos a través de una serie de reacciones químicas con las moléculas de disolvente y la corriente de nitrógeno, produciéndose N_2^+ , que colisiona con las moléculas de disolvente vaporizado formándose H_3O^+ y OH^- . La colisión de H_3O^+ y OH^- con las moléculas de analito provoca la formación de los iones moleculares que serán positivos $[M+H]^+$ si tiene lugar una transferencia de protones hacia ellos o negativos $[M-H]^-$ si los iones OH^- actúan sustrayendo un protón de la molécula de analito. La Figura 7 muestra un esquema del proceso de ionización en una fuente APCI.

En APPI, las gotas de disolvente se calientan a elevadas temperaturas y las moléculas de analito interaccionan con fotones (de energías superiores a 10 eV) emitidos desde una fuente de luz, produciendo así iones moleculares $[M]^+$. La excitación de una molécula por un fotón puede expulsar un electrón si la energía del fotón excede el potencial de ionización de dicha molécula. Este proceso es independiente de las moléculas circundantes, lo que minimiza los efectos de supresión. Dado que ni el gas nitrógeno empleado en la nebulización ni las moléculas de los disolventes comúnmente empleados

como fase móvil se ionizan, la selectividad es una de las propiedades más características de APPI. La fuente de ionización APPI se ha empleado para análisis de PAHs, esteroides y pesticidas [100-102], entre otros compuestos.

Hay algunas reglas básicas para seleccionar el modo de ionización y la interfase [90,91].

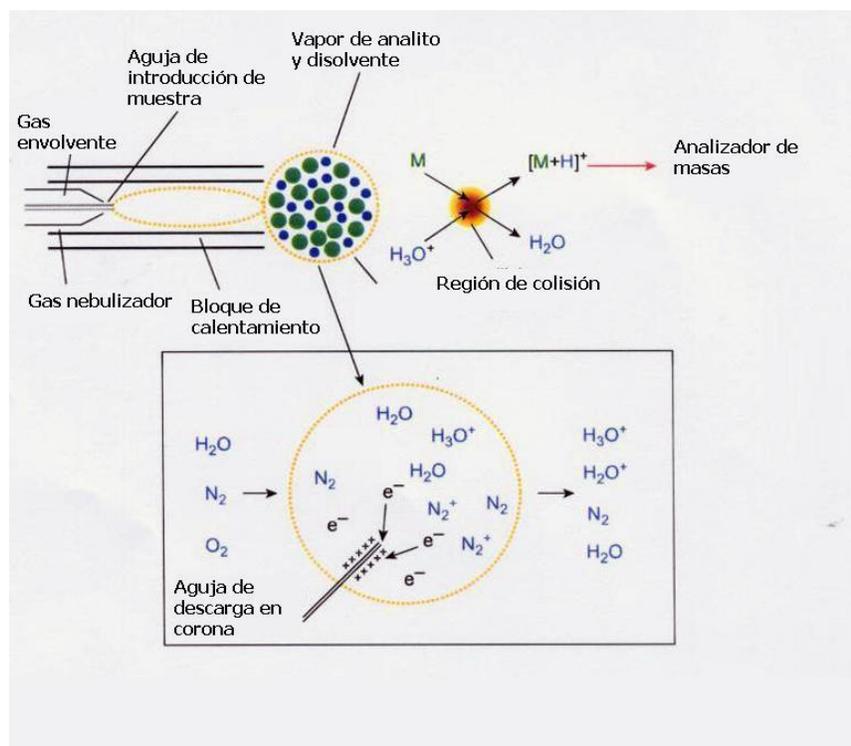


Figura 7. Secuencia de eventos que conduce a la formación de iones por APCI [1]

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 coeluyen con los analitos generan un problema muy importante en LC-MS, las interferencias de la matriz. Estas interferencias son causadas por sustancias coextraídas desde la muestra, que pueden provocar aumento o supresión de la señal de los analitos [90,103]. 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 pretratada 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 pretratamiento 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 multi-residuos, 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 [97]:

- 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 y se obtiene un espectro de barrido total o *full scan*.
- Adquisición de un ión seleccionado (*Single Ion Monitoring, SIM*). La adquisición SIM está dirigida a la medida de un solo ión que es seleccionado en el cuadrupolo.

3.2. 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 en función de la relación masa/carga (m/z). Es el que establece la diferencia entre los distintos espectrómetros. 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. Sin lugar a dudas, MS ha adquirido una rápida y creciente importancia (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 [104-110].

En el diseño de los analizadores MS se distinguen como los más populares: Q, Trampa de Iones Cuadrupolar (Quadrupole Ion Trap, QIT), Trampa de Iones Lineal (Linear Ion Trap, LIT) y TOF [1].

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. Además, 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 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. Solo 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 ión 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, solo 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 Figura 8 muestra un esquema de la separación de iones mediante un analizador de tipo cuadrupolo.

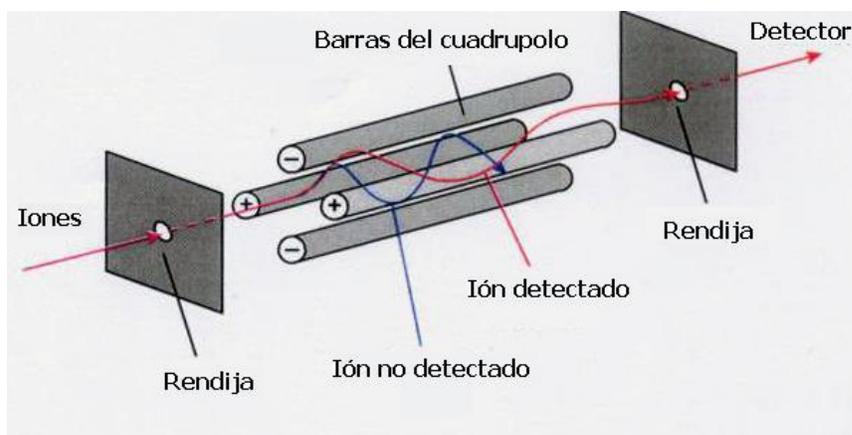


Figura 8. Esquema de separación de iones mediante un analizador de tipo cuadrupolo [1]

La sensibilidad es mucho mayor en el modo SIM del cuadrupolo. En este caso, los potenciales DC y RF se mantienen constantes, así solo 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 solo 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 solo 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 (QqQ) o una IT debería utilizarse también con propósitos de confirmación [91].

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 [91]: el primer grupo comprende técnicas de alta resolución, tales como TOF-MS, y el segundo grupo incluye técnicas capaces de llevar a cabo MS/MS, tales como 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. Los instrumentos híbridos combinan dos analizadores en sofisticadas configuraciones como IT-TOF o la combinación de IT con analizadores tipo Orbitrap o de Transformadas de Fourier de Resonancia Ión-Ciclotrón (FT-ICR) [1].

TOF-MS lineal es muy simple. Consta solo 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 , dado que los iones pasan directamente desde la fuente hasta el detector. Para obtener un espectro de masas más completo es necesario incrementar la distancia que los iones tienen que recorrer desde la fuente hasta el detector, lo que supondría una instrumentación del todo no manejable. Como resultado, los instrumentos TOF modernos emplean normalmente uno o más espejos, a los que se les llama reflectores, que aumentan la resolución al reflejar el haz de iones, en el caso de un instrumento con un solo reflector, hacia el segundo detector, duplicándose la distancia recorrida. En la Figura 9 se representa un esquema de la separación de iones en un analizador TOF.

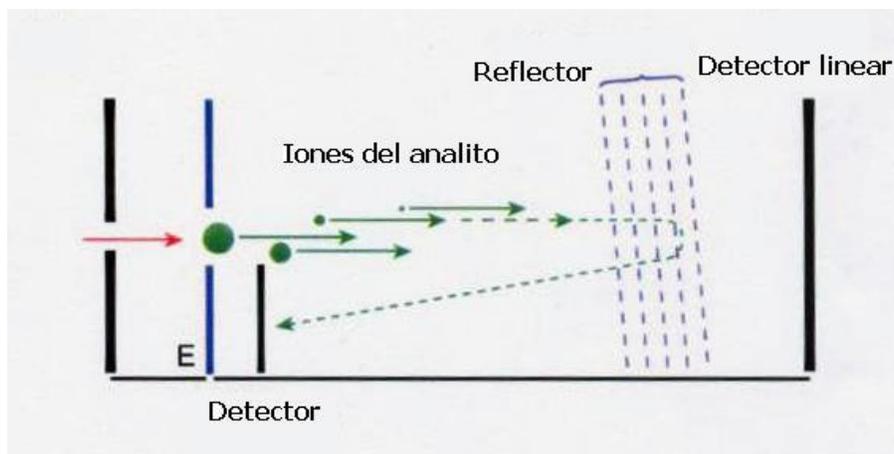


Figura 9. Esquema de separación de iones mediante un analizador TOF [1]

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, la Cromatografía Líquida de Ultrarresolución (UPLC) combinada con TOF-MS es una técnica muy efectiva y conveniente para el desarrollo de estrategias de barrido y para análisis rutinarios de masa exacta [111].

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. 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 [91]. La exactitud en masa de TOF solamente es superada por los analizadores de Orbitrap y FT-ICR-MS.

Otro desarrollo importante es QIT [1,91], que consiste en un anillo electrodo cilíndrico al cual se aplica el campo cuadrupolo, y dos electrodos terminales (end-cap) (Figura 10). 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 la relación señal-ruido (S/N), porque no se consigue ganancia en la medida del ión 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.

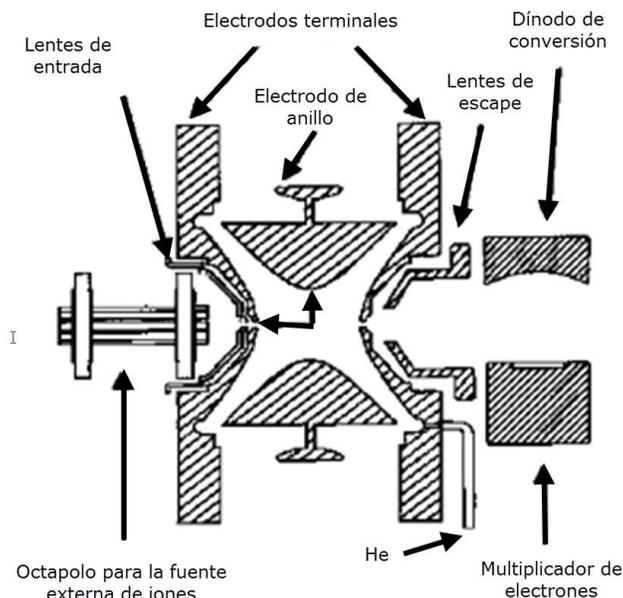


Figura 10. Espectrómetro de masas de trampa de iones con fuente de ionización externa

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.

MS/MS cubre un número de técnicas en las que una etapa del proceso, no necesariamente la primera, es usada para aislar un ión de interés y, en una segunda etapa, se estudia la relación de dicho ión con otros que puedan haber sido generados. Las dos etapas están relacionadas en modos específicos para proporcionar la información analítica requerida. No todos los espectrómetros de masas presentan la capacidad de trabajar bajo la metodología de tándem, ya que hay que considerar implicadas dos etapas de MS. A continuación, se describen brevemente los instrumentos más comúnmente usados que permiten llevar a cabo análisis MS/MS [90]:

- QqQ: Es posiblemente el más usado y consiste en tres grupos de barras metálicas dispuestas en serie. El segundo grupo de barras no se usa como separador de masas sino

como una celda de colisión, donde tiene lugar la fragmentación de los iones transmitidos por el primer cuadrupolo, y como sistema para focalizar los iones producidos hacia el tercer cuadrupolo. Tanto el primer como el segundo cuadrupolo pueden ser controlados para permitir la transmisión solo de iones de determinado intervalo m/z . La Figura 11 muestra un esquema de un espectrómetro de masas QqQ.

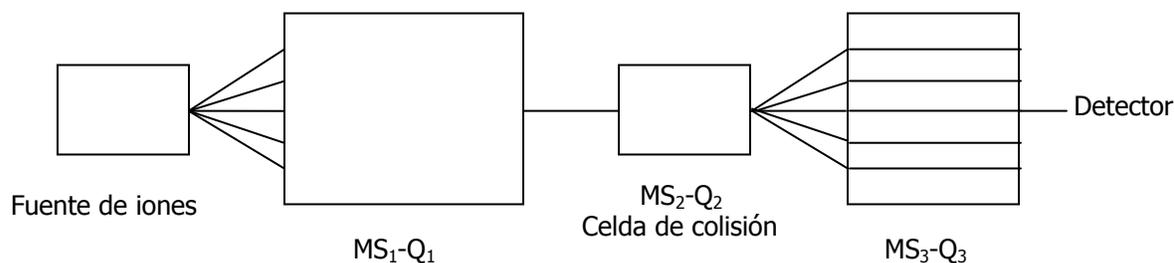


Figura 11. Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo [90]

- TOF-MS/MS: Como anteriormente se ha indicado, en TOF los iones producidos en la fuente son acelerados en un tubo de vuelo para el análisis de sus masas. Si un ión fragmenta durante su recorrido en el tubo de vuelo, los fragmentos tendrán la misma velocidad que su precursor pero menor energía cinética. La energía cinética de los iones producto está directamente relacionada con la relación entre sus masas y la del ión precursor. En los instrumentos sin reflector, tanto el ión precursor como sus fragmentos alcanzan el detector al mismo tiempo y no pueden ser separados. Sin embargo, el reflector es un analizador de energía y los iones producto con distintas energías, tras pasar por el reflector, necesitarán distintos tiempos para alcanzar el detector, pudiendo ser así separados y su valor m/z determinado [90].

- Combinación Q-TOF: En este instrumento, la etapa final del triple cuadrupolo se sustituye por un TOF ortogonal, generalmente de dos reflectores. La diferencia entre este y otros tipos de instrumentos para tándem MS es la forma de operación, ya que en contraste con otros analizadores de masas que monitorizan secuencialmente dentro del intervalo m/z de interés y proporcionan espectros MS/MS de las masas especificadas por el usuario, TOF detecta simultáneamente todos los iones que entran durante un tiempo especificado. Es, por tanto, posible obtener de forma continua el espectro de cada ión

producido en la fuente. La desventaja de este modo de operación es que no es posible obtener barridos para los iones precursores.

- IT-MS/MS: Este tipo de sistema difiere en el modo en el que opera la trampa y no requiere la adición de una célula de colisión u otro analizador. Esto es así ya que las etapas de selección de iones, su descomposición y posterior análisis de los iones producto tienen lugar en la misma parte del instrumento, de modo que los procesos simplemente están separados en el tiempo y no en el espacio. Como en Q-TOF, solamente es posible trabajar en dos modos: barrido de los iones producto y monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), siendo este último modo el equivalente a SIM en MS convencional. En SRM se monitorea la fragmentación de un ión precursor seleccionado hasta un determinado ión producto, lo que se consigue estableciendo las etapas en tándem de modo que solo un único ión sea transmitido.

3.3. DETECCIÓN MULTIDIMENSIONAL PARA LC

La disponibilidad de detectores de flujo no destructivos para LC, como el detector de absorción UV y el de fluorescencia (FLD), 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 diodos UV en serie permite la adquisición en línea de los espectros UV, así como los espectros de masas (Figura 12).

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 de los compuestos. 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 a lo largo del pico cromatográfico. Este hecho puede ser de gran ayuda para establecer los perfiles de impurezas mediante LC-UV-DAD-MS.

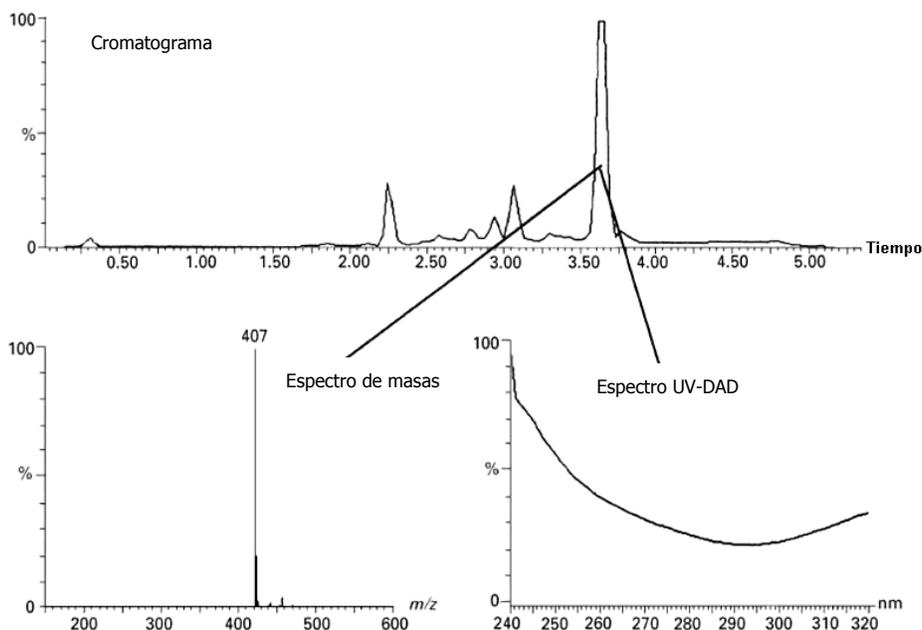


Figura 12. Ejemplo de resultados típicos de un dispositivo LC-UV-DAD-MS para detección dual de compuestos separados

Aunque el uso de infrarrojo (IR) con FT o FT-ICR en combinación con LC adquiere una importancia creciente, la combinación en línea de FT-IR con MS 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.

4. CONTROL DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA MEDIANTE LC

Se ha seleccionado LC para multitud de aplicaciones dentro del campo del análisis de alimentos, ya que resulta compatible con una gran variedad de muestras y permite la separación de compuestos de muy distinta naturaleza desde iones a biopolímeros, empleando condiciones suaves de separación y bajas temperaturas que evitan la descomposición térmica de compuestos inestables como, por ejemplo, vitaminas o polifenoles. Además, LC también proporciona buena resolución, sensibilidad y

selectividad, por supuesto para estos dos últimos parámetros teniendo en consideración el sistema de detección acoplado. LC se ha empleado en análisis de alimentos tanto para la determinación de componentes mayoritarios como minoritarios [6].

Los métodos LC son ampliamente usados en control de calidad y seguridad alimentaria. De entre las distintas aplicaciones, se pueden resaltar los siguientes objetivos como los más importantes [1]:

- Determinación del valor nutricional del alimento
- Determinación de la alta calidad y frescura de los productos
- Detección de la identidad de productos
- Control de contaminantes
- Determinación de aditivos artificiales en el alimento
- Análisis de medicamentos de origen veterinario
- Control de la contaminación procedente del empaquetamiento
- Control de procesos tecnológicos aplicados al alimento como, por ejemplo, tratamientos a altas temperaturas o mediante irradiación radioactiva con fines de esterilización.

El uso de detectores poderosos MS en combinación con LC 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 EU, 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 MRM de gran escala y la identificación de compuestos desconocidos [111,112].

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 [113]. Para superar estas sospechas, los gobiernos de distintos países han aumentado la legislación relativa a la seguridad alimentaria [114,115]. LC-MS, que tradicionalmente ha sido de gran utilidad en el laboratorio médico, encuentra en la actualidad un mercado en crecimiento en el ámbito de seguridad alimentaria [116]. En concreto, LC-MS 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 barrido, confirmación y cuantificación de cientos de componentes con un análisis [117].

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, Q-IT, Qq-TOF y FT-ICR-MS, han permitido el desarrollo de varios métodos nuevos para la detección de contaminantes [111].

La Decisión de la Comisión 2002/657/EC [118] es probablemente el documento clave de la legislación a consultar por los laboratorios analíticos de control de seguridad alimentaria. Este documento 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 existen criterios establecidos (por ejemplo, para un número de nuevos contaminantes emergentes). Los MRLs establecidos determinan la sensibilidad requerida y, generalmente, obligan a mejorar los límites de detección (LODs) de los métodos de análisis.

La bibliografía demuestra la importancia de LC en el análisis de alimentos por el elevado número de libros y revisiones bibliográficas publicadas al respecto. Teniendo en cuenta el progresivo desarrollo en el que se halla inmersa la LC, es de esperar una continua mejora en la calidad de las nuevas metodologías LC para el análisis de nuevos productos alimenticios, fruto de la continua innovación en el área de la tecnología de producción nutricional.

5. 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 [119-122].

OAD es una estrategia de optimización efectiva que se puede usar para asignar factores experimentales en una serie de experimentos [123].

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) 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 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 solo 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 [124].

Los procedimientos analíticos se pueden optimizar utilizando OAD basados en el método Taguchi [124-127]. 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 serie.

El reconocimiento de las variables que producen mayor efecto en la respuesta analítica también puede llevarse a cabo a través de otros diseños ortogonales como los de Plackett-Burman [128].

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.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. Picó, Chemical analysis of food: Techniques and applications, Elsevier, Netherlands, 2012.
- [2] M. de la Guardia, A. González, Food protected designation of origin: Methodologies and application. En: Comprehensive Analytical Chemistry, Barceló. Vol. 60, Elsevier, Netherlands, 2013.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] S. Fanali, P. Haddad, C. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd, Liquid chromatography: Applications. Elsevier, Netherlands, 2013.
- [7] The Report of the World Commission on Environment and Development, Our Common Future, Oxford University Press, USA, 1987.
- [8] M. Tobiszewski, A. Mechlinska, J. Namiesnik, Green analytical chemistry-theory and practice, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 2869-2878.
- [9] H. Malissa, En: E. Roth (Ed.), Euroanalysis VI. Reviews on analytical chemistry, Les editions de physique, France, 1987, 49-67.
- [10] P. Anastas, J. Warner, Green Chemistry: Theory and practice, Oxford University Press, USA, 1998.
- [11] M. de la Guardia, J. Ruzicka, Towards environmentally conscientious analytical-chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement, *Analyst* 120 (1995) 17N-17N.
- [12] M. de la Guardia, K.D. Khalaf, V. Carbonell, A. Morales-Rubio, Clean analytical method for the determination of propoxur, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 462-468.

- [13] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 28 (2008) 497-511.
- [14] M.D. Luque de Castro, J.L. Luque García, Acceleration and automation of solid sample treatment, Elsevier, Netherlands, 2002.
- [15] M.A. Fernández Muíño, J. Simal Lozano, Simplified method for the determination of organochlorine pesticides in honey, *Analyst* 116 (1991) 269-271.
- [16] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84-98.
- [17] P. Zoller, 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, *LCGC Eur.* 16 (2003) 163-171.
- [18] T. Sangster, Seminar presentation, The "Nuts and Bolts" of sample preparation. A joint Chromatographic society and RSC meeting, 2005.
- [19] S. Mitra (Ed.), Sample preparation techniques in analytical chemistry, Wiley-Interscience, USA, 2003.
- [20] F. Pena-Pereira, R.M.B.O. Duarte, A.C. Duarte, Considerations on the application of miniaturized sample preparation approaches for the analysis of organic compounds in environmental matrices, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 433-449.
- [21] 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.
- [22] H. Kataoka, Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339-364.
- [23] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.
- [24] J. Pawliszyn, Solid phase microextraction: Theory and practice, Wiley, USA, 1997.
- [25] S.A.S. Wercinski, Solid phase microextraction: a practical guide, Marcel Dekker, USA, 1999.

- [26] J. Pawliszyn, Applications of solid phase microextraction (RSC Chromatography Monographs), Royal Society of Chemistry, UK, 1999.
- [27] H. Lord, J. Pawliszyn, Microextraction of drugs, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 17-63.
- [28] 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.
- [29] W. Wardencki, M. Michulec, J. Curylo, A review of theoretical and practical aspects on solid-phase microextraction in food analysis, *Int. J. Food. Sci. Technol.* 39 (2004) 703-717.
- [30] H. Xiaogang, C. Quanlin, F. Yanan, T. Ye, Y. Cao, C. Guo, Molecularly imprinted polymer coated solid-phase microextraction fibers for determination of Sudan I-IV dyes in hot chili powder and poultry feed samples, *J. Chromatogr. A* 1219 (2012) 39-46.
- [31] A. Spietelun, M. Pilarczyk, A. Kloskowski, J. Namieśnik, Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 4524-4537.
- [32] H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, M. Naderi, Towards greater mechanical, thermal and chemical stability in solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 126-139.
- [33] H. Kataoka, Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application - a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 31-45.
- [34] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5555-5563.
- [35] 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.

- [36] C. Dietz, J. Sanz, C. Cámara, Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 183-192.
- [37] X.J. Huang, D.X. Yuan, Preparation of stir bars for sorptive extraction based on monolithic material, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 152-157.
- [38] Y.B. Luo, Q. Ma, Y.Q. Feng, Stir rod sorptive extraction with monolithic polymer as coating and its application to the analysis of fluoroquinolones in honey sample, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3583-3589.
- [39] F. Wei, Y.Q. Feng, Methods of sample preparation for determination of veterinary residues in food matrices by porous monolith microextraction-based techniques, *Anal. Methods* 3 (2011) 1246-1256.
- [40] Y.B. Luo, J.-S. Cheng, Q. Ma, Y.Q. Feng, J.H. Li, Graphene-polymer composite: extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples by stir rod sorptive extraction, *Anal. Methods* 3 (2011) 92-98.
- [41] Y.B. Luo, H.B. Zheng, J.X. Wang, Q. Gao, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, An anionic exchange stir rod sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental aqueous samples, *Talanta* 86 (2011) 103-108.
- [42] J. Kokosa, A. Przyjazny, M.A. Jeannot, Solvent microextraction, Theory and practice, Wiley, USA, 2009.
- [43] 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.
- [44] M.A. Bello-López, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, Analytical applications of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME): a review, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804-830.
- [45] 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.
- [46] L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, Directly suspended droplet microextraction, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 259-264.

- [47] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Ytrovola, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquid-liquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, *Talanta* 80 (2010) 2057-2062.
- [48] M.R. Khalili Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.Å. Jönsson, A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286-293.
- [49] R. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, J.C. García-Montegudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.
- [50] 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.
- [51] J. Miura, H. Ishii, H. Watanabe, Extraction and separation of nickel chelate of 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol in nonionic surfactant solution, *Bunseki Kagaku* 25 (1976) 808-809.
- [52] L. Zhang, S. Liu, X. Cui, C. Pan, A. Zhang, F. Chen, A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 900-925.
- [53] L. Calvo-Seronero, M.E. Fernández-Laespada, J.L. Pérez-Pavón, B. Moreno-Cordero, Cloud point preconcentration of rather polar compounds: application to the high-performance liquid chromatographic determination of priority pollutant chlorophenols, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 171-176.
- [54] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Álvarez, C. García-Pinto, J. Hernández-Méndez, Prediction of the behaviour of organic pollutants using cloudpoint extraction, *J. Chromatogr. A* 1005 (2003) 23-34.
- [55] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5591-5596.
- [56] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Preconcentration into a single microdrop, *Anal. Chem.* 71 (1999) 388-393.

- [57] 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.
- [58] I. Pedrón, A. Chisvert, J.G. March, A. Salvador, J.L. Benedé, Development of a new three-phase membrane-assisted liquid-phase microextraction method: determination of nitrite in tap water samples as model analytical application, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 595-601.
- [59] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, Headspace solvent microextraction, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651-5654.
- [60] P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, Recent applications of sample preparation techniques in food analysis, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 47-70.
- [61] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment: Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 237-242.
- [62] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications, *Talanta* 64 (2004) 571-577.
- [63] 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.
- [64] 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.
- [65] J.A. Mendiola, M. Herrero, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Use of compressed fluids for sample preparations: Food applications, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 234-246.
- [66] R.M. Smith, Superheated water: the ultimate green solvent for separation science, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 419-421.
- [67] A.G. Carr, R. Mammucari, N.R. Foster, A review of subcritical water as a solvent and its utilisation for the processing of hydrophobic organic compounds, *Chem. Engineering J.* 172 (2011) 1-17.

- [68] M. Herrero, J.A. Mendiola, A. Cifuentes, E. Ibáñez, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2495-2511.
- [69] M. Zougagh, M. Valcárcel, A. Ríos, Supercritical fluid extraction: a critical review of its analytical usefulness, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 399-405.
- [70] Y. Chem, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, Sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 191-219.
- [71] S. Shahram, Y. Yamini, Analytical sonochemistry; developments, applications, and hyphenations of ultrasound in sample preparation and analytical techniques, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 938-976.
- [72] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, A.I. García-Valcárcel, Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2415-2440.
- [73] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, Determination of organophosphorus pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6915-6921.
- [74] J.J. Ramos, R. Rial-Otero, L. Ramos, J.L. Capelo, Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion as an improved methodology for the determination of pesticides in fruits, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 145-149.
- [75] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review, *Talanta* 79 (2009) 109-128.
- [76] S. Guan, Z. Yu, H. Yu, C. Song, , Z. Qin, Multi-walled carbon nanotubes as matrix solid-phase dispersion extraction adsorbent for simultaneous residues of nine organophosphorus pesticides in fruit and vegetables by rapid resolution LC-MS-MS, *Chromatographia* 73 (2011) 33-41.
- [77] H. Yan, H. Wang, J. Qiao, G. Yang, Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2182-2188.

- [78] J.J. Ramos, M.J. González, L. Ramos, Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturised sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7307-7313.
- [79] E.M. Kristenson, L. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Recent advances in matrix solid-phase dispersion, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96-111.
- [80] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 963-974.
- [81] A.L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Lagana, Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2521-2532.
- [82] L.M. Davi, M. Baldi, L. Penazzi, M. Liboni, Evaluation of the membrane approach to solid-phase extractions of pesticide-residues in drinking-water, *Pestic. Sci.* 35 (1992) 63-67.
- [83] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3-54.
- [84] Y. Niu, J. Zhang, Y. Wu, B. Shao, Analysis of bisphenol A and alkylphenols in cereals by automated on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 6116-6122.
- [85] M. Abdel-Rehim, Current advances in microextraction by packed sorbent (MEPS) for bioanalysis applications, *LCGC Europe* 22 (2009) 8-18.
- [86] S. Jonsson, J. Hagberg, B. Bavel, Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole in wine using microextraction in packed syringe and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4962-4967.
- [87] 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. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.
- [88] P. Georgakopoulos, R. Zachari, M. Mataragas, P. Athanasopoulos, E.H. Drosinos, P.N. Skandamis, Optimisation of octadecyl (C₁₈) sorbent amount in QuEChERS

- analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology, *Food Chem.* 128 (2011) 536-542.
- [89] A. Wiilkowska, M. Biziuk, Determination of pesticide residues in food matrices using QuEChERS methodology, *Food Chem.* 125 (2011) 803-812.
- [90] R.B. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: An introduction*, Wiley, UK, 2003.
- [91] C. Blasco, Y. Picó, *Liquid chromatography-mass spectrometry*. En Y. Picó (Ed.), *Food toxicants analysis. Techniques, strategies and developments*, Elsevier, Netherlands, 2007.
- [92] 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.
- [93] E.T. Furlong, I. Ferrer, P.M. Gates, J.D. Cahill, E.M. Thurman. En: I. Ferrer, E.M. Thurman (Eds.), *Liquid chromatography/mass spectrometry, MS/MS and time of flight MS: Analysis of emerging contaminants*, American Chemical Society, USA, 2003.
- [94] 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.
- [95] 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.
- [96] W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. En: *Chromatographic Science Series*, 2nd ed, Vol. 79, Marcel Dekker, USA, 1999.
- [97] 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.

- [98] R.B. Cole (Ed.), *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*, Wiley Interscience, USA, 1997.
- [99] B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross, *Applied electrospray mass spectrometry*, Marcel Dekker, USA, 2002.
- [100] D.D. Snow, T. Damon-Powell, S. Onanong, D.A. Cassada, Sensitive and simplified analysis of natural and synthetic steroids in water and solids using on-line solid-phase extraction and microwave-assisted solvent extraction coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry atmospheric pressure photoionization, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 1759-1771.
- [101] S.S. Cai, J. Stevens, J.A. Syage, Ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters, *J. Chromatogr. A* 1227 (2012) 138-144.
- [102] A. Krueve, M. Haapala, V. Saarela, S. Franssila, R. Kostianen, T. Kotiaho, R.A. Ketola, Feasibility of capillary liquid chromatography-microchip-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for pesticide analysis in tomato, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 77-83.
- [103] 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.
- [104] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part I, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 1.
- [105] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part II, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 1.
- [106] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part III, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 1.
- [107] W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part IV, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.

- [108] G.W. Somesen, W.M.A. Niessen, Mass spectrometry: innovation and application. Part V, Capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1159 (2007) 1.
- [109] M. Holčápek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VI, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3907.
- [110] M. Holčápek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VII, *J. Chromatogr. A* 1259 (2012) 1-2.
- [111] A.K. Malik, C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography–mass spectrometry in food safety, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4018-4040.
- [112] 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, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 1070-1090.
- [113] 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, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 695-707.
- [114] 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, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 927-936
- [115] J.E. Hobbs, A. Fearne, J. Spriggs, Incentive structures for food safety and quality assurance: an international comparison, *Food Control* 13 (2002) 77-81.
- [116] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galcerán, LC–MS/MS analysis of organic toxics in food, *Trends Anal. Chem.* 24 (2007) 683-703.
- [117] 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.
- [118] 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.* L221 (2002) 8-36.

- [119] 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.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] R.K. Roy, A primer on the Taguchi method, Van Nostrand Reinhold, USA, 1990.
- [125] D.C. Montgomery, Design and analysis of experiments, Wiley, USA, 1997.
- [126] G. Taguchi, System of experimental designs, vols. 1-2, Kraus, USA, 1987.
- [127] P.J. Ross, Taguchi techniques for quality engineering, McGraw-Hill, USA, 1988.
- [128] G.E. Box, J.S. Hunter, W.G. Hunter, Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento, Reverté, España, 2008.

CAPÍTULO I

**DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS EN
ALIMENTOS INFANTILES MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE PARES IÓNICOS
ACOPLADA CON DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE
MASAS DE TIEMPO DE VUELO CON
ELECTROSPRAY E IONIZACIÓN QUÍMICA A
PRESIÓN ATMOSFÉRICA**

I.1. 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 la salud y calidad de vida de los niños y no solo para la obtención de unos beneficios inmediatos. El niño, en sus primeros años de vida, necesita recibir en su alimentación los nutrientes necesarios para asegurar el crecimiento y desarrollo de su sistema nervioso, así como un desempeño óptimo de sus funciones psicomotora, afectiva e intelectual, durante el resto de su vida. Los lactantes que, por alguna razón, no pueden recibir leche materna deben disponer de los beneficios de esta 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 pudieran 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. Asimismo, un niño con buena

salud gastrointestinal tendrá una mejor absorción de nutrientes básicos, que garantizan su desarrollo integral y refuerzan sus defensas.

Los alimentos infantiles engloban un amplio rango de diferentes matrices [1]: 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 la actualidad, la tecnología ha alcanzado un grado de desarrollo lo suficientemente importante como para poder ofrecer productos de elevada calidad nutritiva. Aunque en la mayor parte de los casos esto es así, no es menos cierto que no todos los preparados son iguales. Por esta razón, tanto el consumidor como el profesional deberían estar en condiciones de decidir cuál de ellos elegir, no sólo en base a la garantía que ofrece el laboratorio o empresa fabricantes, sino a partir de datos objetivos de análisis, cuya inclusión no es, por el momento, obligatoria. 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 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, aunque es un hecho de todos conocido que tal tipo de análisis dista mucho de evaluar la posible existencia de componentes tóxicos.

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.

I.2. 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 normalmente se consumirían en el contexto de una dieta global [2].

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 EU 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.

Dentro del mercado de los alimentos funcionales, en continua expansión, el mercado de los alimentos lácteos funcionales y de los ingredientes funcionales de origen lácteo supone un segmento muy importante y en crecimiento [3]. 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.

Por tanto, un niño con buena salud gastrointestinal tendrá una mejor absorción de nutrientes básicos, que garantizan su desarrollo integral y refuerzan sus defensas. Esto se da gracias a los probióticos, bacterias beneficiosas que promueven la salud intestinal y los fructooligosacáridos (FOS) prebióticos, fibra no digerible que alimenta la flora intestinal normal. Por esta razón, estas bacterias beneficiosas deben ser incluidas en la dieta de los niños.

1.3. FUNCIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS EN LA ALIMENTACIÓN INFANTIL

Los ácidos nucleicos, DNA (ácido desoxirribonucleico) y RNA (ácido ribonucleico) son polímeros de monómeros llamados nucleótidos. Por tanto, el DNA y el RNA son polinucleótidos. El DNA lleva la información genética de la célula y el RNA actúa como una molécula intermediaria para convertir la información en secuencias definidas de aminoácidos en las proteínas. A pesar de estas importantes funciones celulares, los ácidos nucleicos están compuestos tan solo por un reducido número de componentes estructurales. Cada nucleótido se compone de tres unidades separadas: un azúcar de cinco carbonos, ribosa (en el RNA) o desoxirribosa (en el DNA), una base nitrogenada y una molécula de fosfato PO_4^{3-} .

Las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos pertenecen a dos clases químicas. Las bases púricas, adenina y guanina, contienen dos anillos con carbono y nitrógeno unidos, mientras que las bases pirimidínicas, timina, citosina y uracilo, contienen un único anillo hexagonal con carbono y nitrógeno. La guanina, adenina y citosina se encuentran tanto en el DNA como en el RNA; la timina (salvo raras excepciones) se presenta solo en el DNA, mientras que el uracilo aparece solo en el RNA. En cada nucleótido, la base nitrogenada se une a un azúcar, la pentosa, por un enlace glucosídico entre el carbono 1 del azúcar y el nitrógeno de la base, ya sea el nitrógeno 1 (bases pirimidínicas) o el nitrógeno 9 (bases púricas). En ausencia de fosfato, una base unida a un azúcar se denomina nucleósido. Los nucleótidos son, por tanto, nucleósidos que contienen uno o más fosfatos. Son parte esencial de los ácidos nucleicos, quizás los constituyentes fundamentales y más importantes de las células vivas [4].

Son numerosas las funciones atribuidas a los nucleótidos, que pueden agruparse en tres campos: inmunitarias, lipídicas y digestivas. Las primeras conducen a una disminución en los procesos infecciosos, gastroenteritis y sepsis, y una mejor respuesta a la inmunización activa, la acción sobre los lípidos condiciona un menor índice aterogénico y mejora el perfil de ácidos grasos de cadena larga y, por último, las digestivas hacen referencia a un incremento en la maduración del intestino delgado y desarrollo de flora intestinal más parecida a la que presentan los lactantes alimentados al pecho. En niños, se han desarrollado varios estudios en este sentido basados en la comparación de tres grupos de pacientes: alimentados con leche materna, alimentados con fórmula sin nucleótidos y un tercer grupo alimentado con fórmula adicionada con nucleótidos [5,6].

La introducción de nucleótidos en las fórmulas infantiles se realiza en Japón desde 1965, y en Europa fue España el país que comenzó a utilizarlos en 1983. Posteriormente, se ha comercializado en otros países como Estados Unidos en 1989, países del sudeste asiático en 1990 y, por último, en Australia desde el 2000 [7]. Algunos autores han alertado sobre la posibilidad de que el uso de nucleótidos no esté libre, en teoría, de posibles efectos secundarios. Así, su metabolización hasta ácido úrico genera radicales hidroxilo que podrían ser tóxicos para el lactante y, a concentraciones elevadas, la adenina o la degradación por calor de los nucleótidos que contienen pirimidina, pueden originar ácido orótico. Sin embargo, ninguno de los numerosos estudios publicados realizados en recién nacidos y lactantes ha puesto de manifiesto la presencia de efectos secundarios

atribuibles a la adición de nucleótidos. Las recomendaciones del Scientific Committee of Food de la European Commission fueron publicadas en 1991 y en ellas no se hacía mención a la utilización de nucleótidos en las fórmulas infantiles. Posteriormente, en 1996, se revisaron y se reconoció la ausencia de efectos secundarios tras varios años de utilización de nucleótidos en fórmulas infantiles en algunos países. Limita su utilización con este fin a cinco nucleótidos: citidina 5'-monofosfato (CMP), 2,5 mg/100 kcal; uridina 5'-monofosfato (UMP), 1,75 mg/100 kcal; adenosina 5'-monofosfato (AMP), 1,5 mg/100 kcal; guanosina 5'-monofosfato (GMP), 0,5 mg/100 kcal e inosina 5'-monofosfato (IMP), 1 mg/100 kcal. En total, la concentración máxima de nucleótidos autorizada es de 5 mg/100 kcal, que equivale a la cantidad de nucleótidos libres existente en la leche materna. Sin embargo, las últimas recomendaciones publicadas en Estados Unidos elevan la cantidad total a un máximo de 16 mg/100 kcal en fórmulas adaptadas para recién nacidos a término y de 22 mg/100 kcal para las fórmulas de prematuros [8]. Estas recomendaciones se basan en la cantidad total de nucleósidos potencialmente disponibles en la leche humana.

Como conclusión, los nucleótidos influyen de forma positiva en la maduración del sistema inmunológico del recién nacido, aceleran la maduración del sistema digestivo, mejoran el metabolismo lipídico y favorecen la colonización intestinal por bacterias con un perfil más parecido al que presentan los recién nacidos alimentados con leche materna. En el recién nacido a término de peso adecuado, estas acciones no influyen de forma significativa en su crecimiento extrauterino. Sin embargo, en el recién nacido a término de bajo peso para la edad gestacional, se ha comprobado mayor tasa de crecimiento en los primeros 6 meses de vida si reciben fórmula adaptada suplementada con nucleótidos. No hay consenso en la actualidad sobre la concentración a la que los nutrientes pueden adicionarse a las fórmulas infantiles. Aunque es necesario seguir investigando en este campo, la adición de nucleótidos a las fórmulas infantiles parece segura y beneficiosa, sobre todo, las destinadas a recién nacidos prematuros y con bajo peso al nacimiento, en los que las necesidades pueden desbordar la capacidad de síntesis endógena.

Se han reconocido como elementos importantes en la nutrición de los mamíferos, especialmente durante períodos de crecimiento rápido o estrés fisiológico, además de jugar un papel crucial en la función eficiente del sistema inmunológico. Muchos tejidos no son capaces de sintetizar los nucleótidos y los hombres deben incorporarlos a partir de

fuentes exógenas con la dieta [9]. En muchos procesos bioquímicos, los nucleótidos primarios monofosfato se usan para producir metabolitos intermedios a través de una serie de reacciones enzimáticas. La suplementación con nucleótidos primarios en la dieta proporciona una fuente real en la síntesis de intermediarios.

Los nucleótidos se encuentran abundantemente en la leche materna humana y, cuando la lactancia materna no es posible, se recomienda una fórmula enriquecida. Para gente joven sana, la ingesta de nucleótidos a través de la dieta debería ser suficiente, sin embargo, en la mayoría de los alimentos, las cantidades de nucleótidos útiles son muy bajas comparadas con sus necesidades.

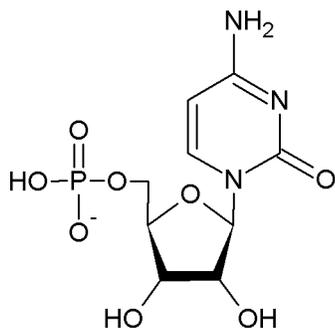
Todos los ingredientes de origen animal y vegetal conteniendo material celular son fuentes potenciales, usualmente en la forma de nucleoproteínas. El contenido es particularmente elevado en ingredientes tales como proteínas solubles de origen animal, legumbres y extractos de levadura. El contenido, proporción y disponibilidad difiere entre ellos. La proteína del músculo es una fuente pobre de nucleótidos, al igual que las semillas, soja, granos, frutas, verduras y productos procesados de la leche [10]. Entre las fuentes de origen marino, las anchoas y sardinas, por ejemplo, tienen niveles muy altos de guanina, mucho más altos que los calamares, almejas o caballa. La disponibilidad y facilidad de digestión también son factores muy importantes. Las proteínas solubles de pescado y de origen animal son digeridas fácilmente, pero también sufren lixiviación con gran facilidad, afectando a la disponibilidad global [11].

Hay un interés persistente sobre la importancia de los nucleótidos de la dieta en la nutrición infantil. Cuando se añaden alimentos nuevos a una dieta infantil, aquellos conteniendo elementos celulares suministrarán nucleótidos dietéticos. Ya que los alimentos derivados de los vegetales y de la leche tienen escasos contenidos de nucleótidos, la suplementación con la dieta puede ser de particular interés para los niños que no sólo se alimentan de leche.

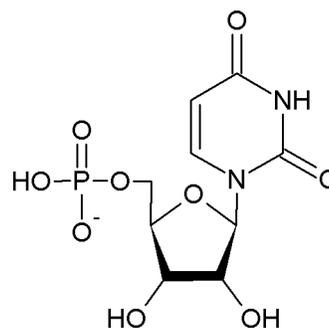
Los nucleótidos permitidos en las formulas infantiles están limitados a cinco compuestos, CMP, UMP, AMP, GMP e IMP [8], cuyas estructuras químicas se muestran en la Figura I.1. Sin embargo, no existe información sobre los niveles de nucleótidos en algunos alimentos infantiles tales como cereales y tarritos y tampoco hay niveles

establecidos para el suplemento de los alimentos infantiles. Además, algunos estudios clínicos han establecido la eficacia de la suplementación con nucleótidos [10,12].

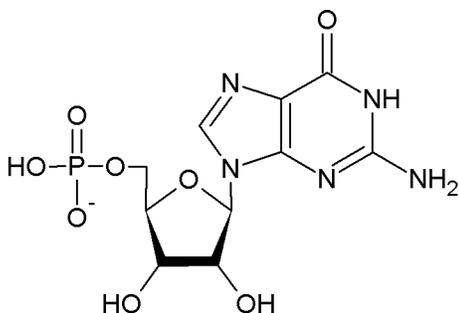
CITIDINA 5'-MONOFOSFATO (CMP)



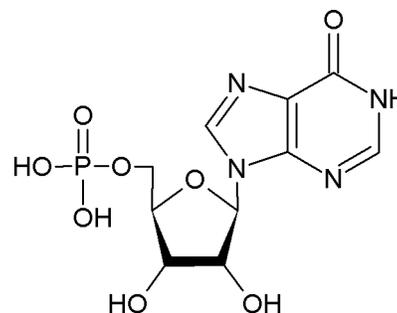
URIDINA 5'-MONOFOSFATO (UMP)



GUANOSINA 5'-MONOFOSFATO (GMP)



INOSINA 5'-MONOFOSFATO (IMP)



ADENOSINA 5'-MONOFOSFATO (AMP)

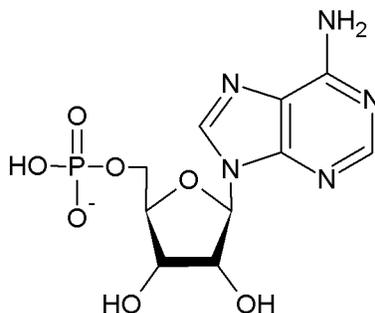


Figura I.1. Estructuras de los nucleótidos 5'-monofosfato

I.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE NUCLEÓTIDOS

Los nucleótidos son compuestos inestables y relativamente no volátiles y el método preferido para su análisis en matrices de alimentos ha sido LC, tanto como método de confirmación o como test de barrido. Sin embargo, la separación de nucleótidos se lleva a cabo usualmente por LC de intercambio aniónico o LC en Fase Reversa con Pares Iónicos (RP-IPC), ya que son analitos con alta polaridad y naturaleza aniónica. Así, se han propuesto varios métodos LC para la separación y determinación de nucleótidos en fórmulas infantiles o matrices biológicas [13-21] usando diferentes sistemas de detección, fundamentalmente DAD y MS. Se ha propuesto un método LC por intercambio iónico para la determinación de nucleótidos en alimentos infantiles usando detección DAD [22].

El método que se propone en este Capítulo, usa el acoplamiento de LC de pares iónicos con dos sistemas de detección: DAD y TOF-MS con interfase dual ESI-APCI operando en modo negativo. El uso del reactivo volátil N,N-dimetilhexilamina (DMHA) permitió mejorar la compatibilidad de LC de pares iónicos con ESI-APCI-MS. Es la primera vez que los cinco nucleótidos, CMP, UMP, AMP, GMP e IMP, han sido determinados en una amplia variedad de alimentos infantiles y/o funcionales tales como cereales y tarritos, sin y con suplementación. La sensibilidad junto con elevada selectividad de ESI-APCI-TOF-MS permitió la identificación correcta de los compuestos. El método se basa en la desproteización de los alimentos y el análisis directo de los nucleótidos por LC de pares iónicos usando elución isocrática con una fase móvil 5 % v/v de metanol y 95 % v/v de disolución reguladora de formiato 0,1 M (pH 5,5) conteniendo DMHA 0,01 M a una velocidad de flujo de 0,7 mL min⁻¹.

Se validó la linealidad, LODs y límites de cuantificación (LOQs), selectividad, exactitud y precisión del método. Las recuperaciones obtenidas para muestras fortificadas fueron satisfactorias para todos los analitos. El procedimiento propuesto permitió determinar los únicos nucleótidos autorizados y se aplicó con éxito al análisis de diferentes alimentos infantiles y/o funcionales, como cereales, tarritos y productos lácteos. Se llevó a cabo un estudio sobre la estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles lácteos acidificados (mezclas de yogur pasteurizado con fórmulas infantiles de continuación) almacenados a temperatura ambiente y a 30 °C.

I.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

I.5.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312A) con una velocidad de flujo de 0,7 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado a temperatura ambiente (Agilent G1316A). El detector de diodos fue un Agilent G1315D operando a tres longitudes de onda de 252, 260 y 271 nm.

La separación se realizó en una columna C₁₈ Gemini®-NX de 5 µm (150 mm x 4,6 mm), que proporcionó eficiencias altas, resistencia mecánica y estabilidad en un intervalo de pH muy amplio entre 1 y 12. La inyección (40 µL) se llevó a cabo usando un automuestreador (Agilent G1329A). El sistema LC se acopló a un espectrómetro de masas TOF-MS (Agilent 6220) equipado con una interfase dual ESI-APCI.

Las disoluciones se almacenaron en viales de vidrio ámbar de 10 mL. Se usó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) en el tratamiento de las muestras.

I.5.2. REACTIVOS

Se utilizaron acetonitrilo y metanol de calidad grado reactivo de Lab-Scan (Dublin, Ireland). El agua desionizada se obtuvo con un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Los cinco nucleótidos 5'-monofosfato comerciales, CMP, AMP, GMP, IMP y UMP, se obtuvieron como sales sódicas de Sigma (St. Louis, MO, USA). Las disoluciones patrón (1000 µg mL⁻¹) se prepararon disolviendo los productos comerciales en agua. Se mantuvieron a -18 °C en botellas oscuras selladas con tapones de PTFE/silicona. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente por dilución con agua.

Otros reactivos usados fueron formiato sódico, DMHA y ácido tricloroacético (TCA) (Sigma).

I.5.3. MUESTRAS

Las muestras de diferentes tipos de alimentos infantiles y/o funcionales se obtuvieron de fabricantes locales (Hero España, S.A.). Fueron alimentos infantiles o tarritos (a partir de 4 meses de edad) conteniendo verduras, carne, pescado y frutas, alimentos infantiles (a partir de 12 meses de edad) conteniendo carne con verduras, potaje de garbanzos, lentejas y espaguetis y cereales infantiles (multicereales con miel y con cacao).

Por otra parte, se llevó a cabo un estudio sobre la estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles lácteos consistentes en mezclas de yogur pasteurizado con fórmulas de continuación. Las muestras se mantuvieron durante un tiempo de seis meses en dos condiciones experimentales diferentes, a temperatura ambiente y a 30 °C.

Los experimentos de recuperación se llevaron a cabo usando muestras fortificadas con una mezcla estándar de nucleótidos. Las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante al menos media hora antes de iniciar el procedimiento de extracción.

I.5.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Las muestras se prepararon pesando 1 g del alimento infantil o 0,25 g del alimento lácteo en un tubo de centrífuga de 10 mL y agregando 2 mL de agua. Seguidamente, se añadió 1 mL de TCA al 3 % y se dejó reposar durante 15 min para permitir la precipitación de las proteínas. La muestra se centrifugó entonces a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. La disolución sobrenadante se recuperó y se diluyó a 5 mL con agua en un matraz aforado. Se filtraron alícuotas a través de filtros de jeringa de 0,45 µm de difluoruro de polivinilideno (PVDF) con carcasa de polipropileno y se inyectaron 40 µL en LC con el automuestreador usando viales ámbar.

La fase móvil usada en condiciones isocráticas fue una mezcla al 95 % v/v de disolución reguladora de formiato 0,1 M conteniendo DMHA 0,01 M (pH 5,5) y 5 % v/v de metanol. La velocidad de flujo fue 0,7 mL min⁻¹. La detección UV-vis se realizó en el intervalo 190-450 nm y el detector DAD se utilizó a longitudes de onda de 252 nm para GMP e IMP, 260 nm para AMP y UMP y 271 nm para CMP. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado y las inyecciones por duplicado.

I.5.5. DETECCIÓN ESI-APCI-TOF-MS

El sistema LC ($0,7 \text{ mL min}^{-1}$) se acopló a un TOF-MS equipado con una interfase dual ESI-APCI operando en modo negativo usando un voltaje capilar de +1 kV. Los valores óptimos de otros parámetros ESI-TOF fueron: temperatura del gas de secado, $350 \text{ }^{\circ}\text{C}$; flujo del gas de secado, 11 L min^{-1} y presión del gas nebulizador, 58 psi. La detección se llevó a cabo considerando un rango de masas de 50–600 m/z . Los datos de masa exacta de los iones moleculares fueron procesados con el programa Mass Hunter considerando el criterio de exactitud ampliamente aceptado para confirmación de la composición elemental establecido a 5 ppm. Durante el desarrollo del método LC, se realizó calibración externa del instrumento. La disolución de calibración se inyectó al principio de cada tanda y todos los espectros se calibraron antes de la identificación del compuesto.

I.6. SEPARACIÓN DE LOS NUCLEÓTIDOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Los nucleótidos muestran un fuerte carácter ácido como consecuencia de la disociación de los grupos fosfato en disolución acuosa. Generalmente, están presentes cargados negativamente ya que sus valores de pK son inferiores a 7. Los nucleótidos ionizados tienen mayor polaridad que las especies neutras y son retenidos en menor extensión, lo que puede ser atribuido a su débil interacción con la fase estacionaria hidrofóbica y a su mayor afinidad con la porción acuosa de la fase móvil. Las especies ionizadas también tienen interacciones iónicas con los silanoles expuestos y activados, lo que repercute en la forma del pico y la reproducibilidad.

Se ensayó en primer lugar el uso de RP-LC empleando columnas C_{18} como Zorbax Eclipse XDB y Discovery HS. Las fases móviles fueron mezclas de diferentes disoluciones reguladoras como formiato (10 mM, pH 3-5), fosfato (50 mM, pH 7) o Bis-Tris (10 mM, pH 7) en ausencia o en presencia de metanol hasta el 60 % v/v. Sin embargo, debido a su naturaleza polar, los nucleótidos no fueron retenidos por las columnas en ninguna de las condiciones estudiadas.

La acidificación de la fase móvil para neutralizar los grupos silanol es una opción usual para reducir interacciones secundarias y disminuir la ionización de los analitos,

presentando una interacción mayor con la fase estacionaria. Así, se ensayó una fase móvil de pH 2 conteniendo ácido acético (2 % v/v) y metanol (0-40 % v/v), pero los resultados no fueron satisfactorios y, en consecuencia, la técnica RP fue desechada.

Para aumentar la retención de los nucleótidos, se seleccionó IPC. La naturaleza iónica de los ésteres fosfato facilitó las interacciones fuertes con reactivos de pares iónicos catiónicos a valores de pH apropiados, aumentando así la retención de los nucleótidos y la resolución. Con el uso de la técnica LC-MS, la resolución de la columna en disoluciones reguladoras volátiles es crítica. Se ha seleccionado una columna C₁₈ Gemini®-NX de 5 µm, que resulta muy tolerante a los cambios en el pH de la fase móvil entre 1 y 12, suministrando alta eficiencia y fuerza mecánica sin degradación de la fase estacionaria.

Como los nucleótidos están cargados negativamente, la superficie del empaquetamiento de la columna C₁₈ se recubrió con moléculas adsorbidas de un reactivo de pares iónicos positivo y la carga del reactivo se enlazó a la fase estacionaria. Se ensayaron diferentes reactivos. El par de picos cuya separación es más problemática es GMP e IMP. El empleo de hidróxido de tetrapropilamonio así como de hidróxido de tetrabutilamonio condujo a una mala resolución para este par de picos. Por otra parte, estos reactivos no volátiles no son compatibles con la detección MS.

En consecuencia, se ensayó el reactivo volátil DMHA para originar interferencias mínimas con MS y separación adecuada [23]. Es muy frecuente que la influencia de la concentración del reactivo formador de pares de iones tenga efectos opuestos en la resolución de LC y de MS; así, se intentó modificar la retención de los nucleótidos variando la concentración del reactivo en la fase móvil entre 5 y 25 mM. La retención alcanzó un valor máximo al aumentar la concentración de reactivo hasta aproximadamente 20 mM.

Por otra parte, la hibridación LC-MS solo puede tener éxito si la fase móvil permite la generación suficiente de analitos ionizados en la fase gaseosa. Sin embargo, con esta concentración de reactivo tan elevada, la detección por MS es difícil, ya que la señal de fondo es muy alta y no es reproducible. Así, se seleccionó una concentración 10 mM como solución de compromiso entre una buena separación y la sensibilidad de MS.

Se estudió el efecto del pH de la fase móvil en el rango 2-8 sobre los tiempos de retención así como sobre las formas de los picos, bajo estas condiciones de formación de pares iónicos. Para valores de pH de 2 a 4, los nucleótidos, que se encuentran

predominantemente como especies ionizadas, disminuyen su retención. A valores de pH 5-6, están como especies neutras y exhiben mayor retención, mientras que permanecen sin carga a valores de pH superior a 8. Así, se seleccionó un valor de pH de 5,5 que proporcionó la mejor resolución y forma de pico.

La influencia de la concentración de disolución reguladora de formiato se estudió entre 20 y 100 mM y el aumento de la concentración se tradujo en una disminución en la retención de los nucleótidos. Se seleccionó una concentración 100 mM.

La presencia de modificadores orgánicos tales como metanol o acetonitrilo añadidos a la disolución reguladora puede facilitar y mejorar la resolución. Así, se varió el porcentaje de metanol entre 0 y 15 % v/v, con el objetivo de modificar el rango de retención y el espaciado de las bandas.

Un aumento en la proporción de metanol provocó una disminución en la retención para todos los compuestos y, por tanto, una menor resolución de las dos bandas de GMP e IMP, debido a la reducción de la adsorción del reactivo formador de pares iónicos sobre la fase estacionaria, que se tradujo en una menor retención de los nucleótidos iónicos. La mejor separación se consiguió con una fase móvil conteniendo 5 % v/v de metanol.

1.7. EMPLEO DEL SISTEMA DETECTOR ESI-APCI-TOF-MS

ESI es un método de ionización más suave que APCI, que se usa generalmente para diferentes compuestos polares. Así, se ha seleccionado el uso de un modo de ionización dual ESI-APCI que permite la conjunción directa para un amplio rango de compuestos.

La supresión de la ionización es un fenómeno complejo asociado con la detección MS, que puede ser atribuido a la desprotonación, presencia de componentes no volátiles y, en muestras complejas, grandes cantidades de especies competitivas con los iones disponibles.

Así, se evaluó la supresión de la ionización por aplicación de los dos modos de operación positivo y negativo. En modo positivo, los espectros producidos fueron más complejos, con interferencias del fondo elevadas debido al ión DMHA protonado, mientras

que en modo negativo, las intensidades de los iones moleculares negativos generalmente fueron más fuertes y se obtuvo un fondo más bajo.

En consecuencia, se descartó la operación en modo positivo porque el DMHA en sí mismo produjo una señal muy fuerte que suprimió otros iones positivos. Se seleccionó el modo de ionización negativo que proporcionó la mayor sensibilidad.

La Figura I.2 (A) muestra el cromatograma UV obtenido a 260 nm para una mezcla de los cinco estándares de los nucleótidos y los cromatogramas de iones extraídos (EICs) (B-F) por LC-ESI-APCI-TOF-MS bajo las condiciones seleccionadas.

Todos los nucleótidos fueron identificados por interpretación de sus espectros de masas obtenidos por ESI-APCI-TOF-MS considerando la fórmula molecular proporcionada y su masa exacta, así como los espectros de absorción en la región UV. Los espectros TOF-MS representativos de los compuestos se muestran también en la Figura I.2.

La Tabla I.1 resume los tiempos de retención, las bandas UV y los datos TOF-MS incluyendo los valores m/z experimentales y calculados para las fórmulas moleculares proporcionadas, error, la fórmula molecular y los compuestos identificados.

Tabla I.1. Datos TOF-MS y bandas UV para los nucleótidos

Pico	t_R (min)	λ_{max} (nm)	m/z Experimental	m/z Calculado	Error (ppm)	Fórmula molecular	Compuesto
1	3,75	271	322,0437	322,0446	2,56	C ₉ H ₁₄ N ₃ O ₈ P	CMP
2	4,77	260	323,0293	323,0286	-2,04	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	UMP
3	6,81	252	362,0510	362,0507	-0,80	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	GMP
4	7,04	252	347,0390	347,0398	2,30	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₇ P	IMP
5	14,36	260	346,0543	346,0558	4,46	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	AMP

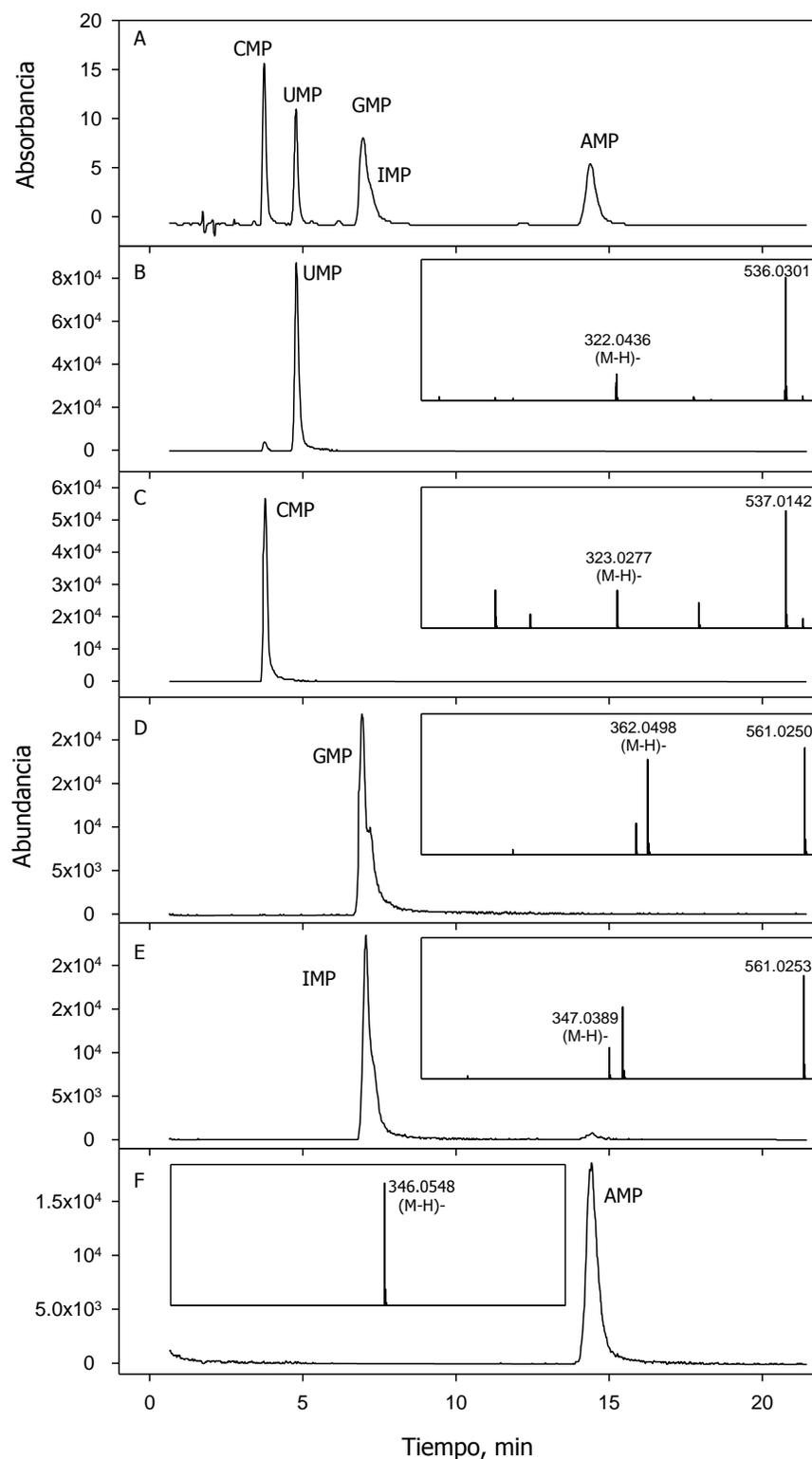


Figura I.2. Cromatogramas obtenidos para una mezcla estándar de nucleótidos de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ usando LC de pares iónicos. A: Cromatograma obtenido con DAD a 260 nm; B-F: EICs obtenidos mediante ESI-APCI-TOF-MS mostrando los espectros de los compuestos

I.8. DATOS ANALÍTICOS Y VALIDACIÓN

Se validó la linealidad, LODs, LOQs, selectividad, exactitud y precisión del método.

Las curvas de calibrado se obtuvieron mediante análisis por regresión lineal de las áreas de pico *versus* la concentración de analito usando seis niveles de concentración. La cuantificación se llevó a cabo por el método del estándar externo. Los parámetros de validación, coeficientes de correlación y rango de linealidad para los nucleótidos se muestran en la Tabla I.2.

Los valores de r^2 fueron apropiados ($r^2 > 0,99$) y se obtuvo una linealidad excelente para todo el intervalo estudiado.

Los LODs se calcularon sobre la base de tres veces el valor de la desviación estándar (SD) de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado y los LOQs usando diez veces la desviación estándar de la ordenada en el origen. Estos valores se incluyen también en la Tabla I.2.

Tabla I.2. Datos analíticos para los nucleótidos usando LC de pares iónicos

Analito	Pendiente (mL μg^{-1})	Coefficiente correlación	Linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOD (ng mL $^{-1}$)	LOQ (ng mL $^{-1}$)
LC-DAD					
CMP	31	0,9972	0,02-5	6,3	21
UMP	30	0,9964	0,02-5	5,5	18
GMP	33	0,9992	0,02-5	4,5	15
IMP	29	0,9991	0,02-5	7,6	25
AMP	40	0,9995	0,02-5	4,5	15
LC-MS					
CMP	14752	0,9987	0,1-5	11	35
UMP	11019	0,9991	0,1-5	13	42
GMP	3917	0,9985	0,1-5	19	62
IMP	4107	0,9982	0,1-5	17	58
AMP	3526	0,9992	0,1-5	16	55

Para chequear la repetitividad del método, se llevaron a cabo diez análisis idénticos de una muestra de leche fermentada y se obtuvieron valores de desviación estándar relativa (RSD) entre 2,1 y 6,8 %. Estos valores indicaron que la precisión del método fue satisfactoria para análisis de control.

Se consiguió una gran selectividad del método debido a la elevada resolución y las medidas de masa exacta de LC-TOF-MS. La identificación se llevó a cabo usando el nivel de exactitud, ampliamente aceptado para confirmación de la composición elemental, correspondiente a una tolerancia en el error de 5 ppm.

No se observaron picos de impurezas a los tiempos de retención correspondientes a los nucleótidos.

I.9. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

El efecto matriz ha sido estudiado en los diferentes tipos de muestras analizadas para evaluar la supresión de la señal producida por la coelución de compuestos de la matriz de la muestra que pueden afectar a la ionización del analito.

El efecto matriz de las muestras de alimentos infantiles para los nucleótidos estudiados se evaluó comparando las pendientes de las gráficas de calibrado para los estándares acuosos y las gráficas de adiciones estándar para las diferentes matrices, obtenidas representando la concentración (a cinco niveles) frente a las áreas de pico y llevando a cabo un análisis de regresión lineal.

La Tabla I.3 muestra los datos obtenidos. Como puede comprobarse, las pendientes de las gráficas de calibrado de adiciones estándar para las muestras fueron diferentes de las obtenidas para los estándares acuosos para los cinco nucleótidos, confirmando que la calibración se debe llevar a cabo por el método de adiciones estándar para compensar el efecto matriz.

Para comprobar la exactitud del método propuesto, se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando tres muestras (yogur pasteurizado con fórmula de continuación, cereales infantiles y tarrito de verduras) a dos niveles de concentración correspondientes a aproximadamente dos y cuatro veces los LOQs. Las recuperaciones de los nucleótidos de

las muestras fortificadas variaron del 85 al 96 %, con una recuperación media±desviación estándar (n=30) de 92±3.

Tabla I.3. Pendientes de calibración para diferentes alimentos infantiles (mL μg^{-1})

Muestra	CMP	UMP	GMP	IMP	AMP
Estándares acuosos	14752	11019	3917	4107	3526
Alimentos infantiles de 4-6 meses de edad					
Pollo con arroz	5211	2290	3410	4375	1692
Cordero con verduras	3729	3495	3345	3743	954
Pavo con verduras	2733	4821	1345	2588	1368
Jamón con guisantes	2031	4501	3563	4182	1455
Ternera con verduras	1051	3654	1801	1251	757
Jamón/Ternera con verduras	1228	4168	2220	1872	1314
Alimentos infantiles de 12 meses de edad					
Potaje de garbanzos	1133	3302	3388	581	1011
Pollo con arroz y verduras	695	4411	2067	1077	1466
Lentejas	6638	3570	2300	782	750
Espaguetis con carne	5021	5266	2929	2706	762
Cereales infantiles					
Multicereales con miel	3654	1614	452	562	559
Cereales con cacao	2029	1447	480	590	490
Alimentos infantiles lácteos					
Yogur pasteurizado con fórmula de continuación	7697	9412	2472	2267	2031

I.10. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Los alimentos infantiles y los alimentos lácteos son muestras biológicas altamente complejas y, por tanto, fue necesario utilizar alguna forma de preparación de la muestra para simplificar la matriz y facilitar la interpretación de la señal con certeza. Hay que tomar precauciones adicionales para asegurar la integridad de la muestra a través del proceso analítico. Esto es particularmente crítico en el análisis de alimentos lácteos, ya

que los nucleótidos son susceptibles de conversiones enzimáticas con una variedad de enzimas endógenas como nucleotidasas y fosfatasas, que pueden degradar rápidamente los analitos.

Por tanto, la muestra se trató con ácidos para inhibir la conversión de los nucleótidos por inactivación de estas enzimas. Para eliminar las proteínas, se ensayó la extracción por adición tanto de ácido acético como TCA y, después de la centrifugación, el precipitado se lavó con agua y se combinaron los extractos. Los mejores resultados relativos a la eliminación eficiente de las proteínas de la leche se consiguieron usando TCA. La precipitación de las proteínas con ácido, sin neutralización, ofrece la ventaja de una preparación de la muestra rápida y simplificada. Sin embargo, se pueden producir pérdidas potenciales de los nucleótidos con tiempos largos de almacenamiento de los nucleótidos en medio ácido. Así, se ensayaron diferentes concentraciones de TCA en el rango 0,1-1 % y, a continuación, los extractos se centrifugaron y se filtraron para su inmediato análisis cromatográfico. Se consiguieron buenas recuperaciones con precipitación de las proteínas usando TCA al 0,6 %.

Se probó también la extracción usando disolventes orgánicos; sin embargo, metanol y acetonitrilo proporcionaron eficiencias de extracción muy bajas y se descartó su uso.

Antes de la inyección en LC, se filtraron las muestras. Los alimentos infantiles conteniendo aceite de oliva presentaron algunos problemas en la filtración con filtros de nailon. Sin embargo, se consiguió una buena filtración con el uso de filtros de jeringa de PVDF con carcasa de polipropileno. El PVDF tiene carácter hidrofílico y es una membrana que se puede usar para proteínas y péptidos.

I.11. ANÁLISIS DE ALIMENTOS INFANTILES

Se analizaron diferentes alimentos infantiles correspondientes a diez muestras en forma de tarritos (de 4-6 meses de edad) conteniendo verduras, carne, pescado y frutas, muestras de alimentos (desde 12 meses de edad) conteniendo carne con verduras, potaje de garbanzos, lentejas y espaguetis y cereales infantiles (multicereales con miel y con cacao). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

La Tabla I.4 muestra los resultados obtenidos. Como se puede comprobar, los niveles más altos de nucleótidos se encontraron en alimentos basados en pescado. Los niveles más bajos se encontraron en las muestras basadas en cereales. En consecuencia, los niveles contenidos en los alimentos infantiles fueron cuantificados de forma adecuada sin problemas de sensibilidad usando el procedimiento desarrollado de LC-MS con pares iónicos.

Tabla I.4. Contenido de nucleótidos^a en alimentos infantiles ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Muestra	CMP	UMP	GMP	IMP	AMP
Alimentos infantiles de 4-6 meses de edad					
Pollo con arroz	ND	ND	ND	ND	ND
Cordero con verduras	0,27±0,02	2,0±0,16	0,29±0,02	3,1±0,2	2,7±0,2
Pavo con verduras	0,11±0,01	1,1±0,08	0,24±0,02	0,13±0,01	2,1±0,1
Jamón con guisantes	0,14±0,01	0,91±0,1	0,12±0,01	0,10±0,01	0,56±0,03
Ternera con verduras	0,53±0,03	2,2±0,18	0,51±0,04	2,6±0,1	2,9±0,2
Jamón/Ternera con verduras	0,15±0,01	0,36±0,03	0,07±0,01	0,06±0,01	1,2±0,1
Merluza con arroz	1,7±0,1	2,2±0,3	1,0±0,09	2,2±0,2	3,2±0,2
Verduras	2,5±0,13	3,5±0,3	1,8±0,1	0,36±0,02	4,2±0,2
Plátano, naranja y pera	ND	ND	ND	ND	ND
Melocotón y plátano	1,0±0,09	2,3±0,2	0,59±0,03	0,21±0,01	1,0±0,08
Alimentos infantiles de 12 meses de edad					
Potaje de garbanzos	0,25±0,02	1,7±0,15	0,52±0,04	2,2±0,1	2,1±0,1
Pollo con arroz y verduras	0,94±0,1	1,8±0,2	0,65±0,04	1,4±0,06	1,7±0,05
Lentejas	0,34±0,02	1,5±0,1	0,73±0,05	0,82±0,07	0,83±0,05
Espaguetis con carne	0,85±0,06	1,5±0,1	0,07±0,01	0,57±0,03	0,27±0,02
Cereales infantiles					
Multicereales con miel	0,32±0,02	0,12±0,07	0,13±0,01	ND	ND
Cereales con cacao	0,11±0,01	0,18±0,1	0,27±0,02	ND	ND

^a Media±desviación estándar (n=3). ND significa no detectado

Los dos nucleótidos de interés comercial como potenciadores de sabor, IMP y GMP, también pueden encontrarse en la naturaleza y se han detectado en los alimentos infantiles. Otros nucleótidos, como AMP, también están presentes naturalmente. IMP está asociado primariamente con fuentes animales, mientras que GMP predomina más en alimentos basados en verduras. La mayoría de los animales marinos son fuentes apropiadas de IMP, especialmente cuando se seca el producto [24].

Los perfiles cromatográficos demostraron la ausencia de picos interferentes. Los picos cromatográficos se identificaron en primer lugar comparando los datos de retención obtenidos para los estándares, las muestras y las diferentes muestras fortificadas con los estándares bajo idénticas condiciones. Los picos se identificaron también usando el detector DAD para medir continuamente el espectro mientras el soluto pasa a través de la célula de flujo, confirmando así la identidad y la pureza de los picos. Se encontró buena concordancia entre los espectros UV de los diferentes picos obtenidos para los estándares, las muestras y las muestras fortificadas. Finalmente, se confirmó la identificación usando el nivel de exactitud, aceptado ampliamente para composición elemental, de 5 ppm de tolerancia.

I.12. ESTABILIDAD DE LOS NUCLEÓTIDOS EN ALIMENTOS INFANTILES ACIDIFICADOS

Los microorganismos o enzimas se usan en la producción de alimentos fermentados para producir los cambios bioquímicos deseados y la modificación del sabor y el contenido de nutrientes de los alimentos. Los alimentos beneficiosos para la salud, "alimentos funcionales" de productos derivados de la leche, están basados en las características de las bacterias del ácido láctico [25].

Se llevó a cabo un estudio sobre la estabilidad de los nucleótidos en alimentos infantiles lácteos acidificados. Las muestras se analizaron recién preparadas y después de dos meses, durante un tiempo de vida total de seis meses. Los experimentos se llevaron a cabo en dos condiciones experimentales, a temperatura ambiente (TA) y después de mantener las muestras a 30 °C. Como muestra la Tabla I.5, GMP y UMP no fueron estables en las muestras fermentadas, mientras que CMP y AMP fueron prácticamente estables, especialmente en el caso de las muestras almacenadas a temperatura ambiente.

Tabla I.5. Evolución del contenido de nucleótidos en alimentos infantiles lácteos acidificados, yogur pasteurizado con fórmula de continuación (mg/100 g)

Nucleótido	Declarado	Recién preparado	Después de 2 meses		Después de 4 meses		Después de 6 meses	
			(TA)	(30 °C)	(TA)	(30 °C)	(TA)	(30 °C)
CMP	0,8	0,79	0,83	0,85	0,89	0,78	0,79	0,87
UMP	1,4	1,2	0,94	0,90	0,92	0,90	0,84	0,94
GMP	1,0	0,35	0,31	0,20	0,25	0,17	0,12	0,09
IMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AMP	0,3	0,37	0,34	0,30	0,35	0,16	0,29	0,11

ND significa no detectado

I.13. BIBLIOGRAFÍA

- [1] U.S. Food and Drug Administration. En: Pesticide Analytical Manual Vol. I, Multiresidue Methods, 3rd ed, U.S. Department of Health and Human Services, USA, 1994.
- [2] M. Juárez, A. Olano, F. Morais (Eds.), Alimentos funcionales, Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid, 2005.
- [3] M.J. Playne, L.E. Bennett, G.W. Smithers, Functional dairy foods and ingredients, *Aust. J. Dairy Technol.* 58 (2003) 242-264.
- [4] B. Hinwood, A textbook of science for the health professions, 2nd ed. Chapman & Hall, UK, 1993.
- [5] J.L. Leach, J.H. Baxter, B.E. Molitor, M.B. Ramstack, M.L. Masor, Total potentially available nucleosides of human milk stage of lactation, *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) 1224-1230.
- [6] L. Thorell, L. Sjöberg, O. Hernell, Nucleotides in human milk: sources and metabolism by the newborn infant, *Pediatr. Res.* 40 (1996) 845-852.
- [7] V.Yh. Yu, Scientific rationale and benefits of nucleotide supplementation of infant formula, *J. Pediatr. Child Health* 38 (2002) 543-549.
- [8] Scientific Committee for Food, minutes of the 100th Plenary Session, March 7-8, 1996. En: Commission Directive 96/4/EC amending Directive 91/321/EEC on infant formulae and follow-on formulae, *European Commission of the European Communities*, 1996, 7.
- [9] R. Uauy, Nonimmune system responses to dietary nucleotides, *J. Nutr.* 124 (1994) 157S-159S.
- [10] J.D. Carver, W.A. Walker, The role of nucleotides in human nutrition, *J. Nutr. Biochem.* 6 (1995) 58-72.
- [11] B. Devresse, Nucleotides: a key nutrient for the immune system of shrimp?, *Feed Mix* 8 (2000) 20-22.
- [12] M. Cosgrove, Perinatal and infant nutrition. Nucleotides, *Nutrition* 14 (1998) 748-751.

- [13] W.W. Fish, A method for the quantitation of 5'-mononucleotides in foods and food ingredients, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1098-1101.
- [14] C. Oliveira, I.M. Ferreira, E. Mendes, M.A. Ferreira, Development and application of an HPLC/diode array methodology for determination of nucleotides in infant formulae and follow-up milks, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 571-578.
- [15] E. Schlimme, D. Martin, H. Meisel, Nucleosides and nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum, *British. J. Nutr.* 84 (2000) S59-S68.
- [16] C. Perrin, L. Meyer, C. Mujahid, C.J. Blake, The analysis of 5'-mononucleotides in infant formulae by HPLC, *Food Chem.* 74 (2001) 245-253.
- [17] I.M. Ferreira, E. Mendes, A.M.P. Gomes, M.A. Faria, M.A. Ferreira, The determination and distribution of nucleotides in dairy products using HPLC and diode array detection, *Food Chem.* 74 (2001) 239-244.
- [18] C.D. Mateo, D.N. Peters, H.H. Stein, Nucleotides in cow colostrum and milk at different stages of lactation, *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 1339-1342.
- [19] B.D. Gill, H.E. Indyk, Development and application of a liquid chromatographic method for analysis of nucleotides and nucleosides in milk and infant formulas, *Int. Dairy J.* 17 (2007) 596-605.
- [20] K. Inoue, R. Obara, T. Akiba, T. Hino, H. Oka, Determination of nucleotides in infant formula by ion-exchange liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6863-6867.
- [21] B.D. Gill, H.E. Indyk, Determination of nucleotides and nucleosides in milks and pediatric formulas: A review, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 1354-1364.
- [22] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, S. Martínez-López, I. Vasallo, M. Hernández-Córdoba, Anion exchange liquid chromatography for the determination of nucleotides in baby and/or functional foods, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7245-7249.
- [23] Z. Cai, F. Song, M.S. Yang, Capillary liquid chromatographic-high-resolution mass spectrometric analysis of ribonucleotides, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 135-143.

[24] J.A. Maga, A.T. Tu, Food Additive Toxicology, Marcel Dekker, USA, 1995.

[25] C.E. Steinhart, M.E. Doyle, Food Safety, Marcel Dekker, USA, 1995.

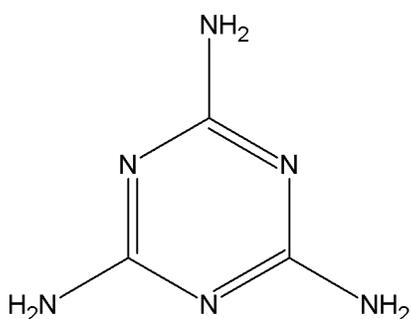
CAPÍTULO II

**CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON IONIZACIÓN
QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y DIODOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE MELAMINA Y SUS
DERIVADOS EN ALIMENTOS**

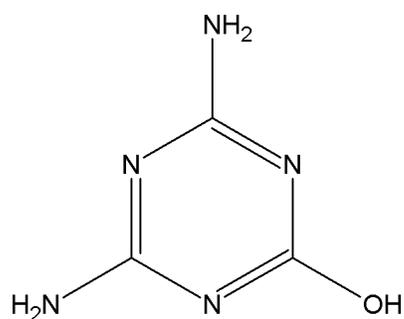
II.1. LA MELAMINA Y COMPUESTOS DERIVADOS

La melamina (MEL, 1,3,5-triazina-2,4,6-triamina) es un compuesto rico en nitrógeno que se utiliza comúnmente para la fabricación de plásticos y resinas [1], y su hidrólisis alcalina produce compuestos químicos relacionados estructuralmente, como amelina (AMN), amelida (AMD) y ácido cianúrico (CA).

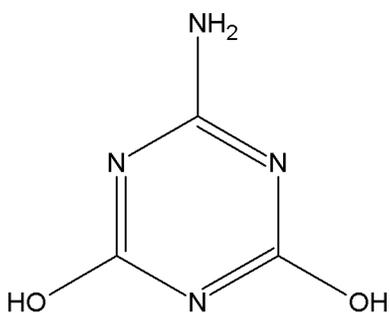
La Figura II.1 muestra las fórmulas químicas de estos compuestos.



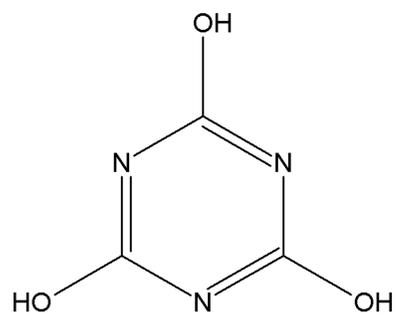
MELAMINA (MEL)



AMELINA (AMN)



AMELIDA (AMD)



ÁCIDO CIANÚRICO (CA)

Figura II.1. Fórmulas químicas de la melamina y sus derivados

Debido a su elevado contenido en nitrógeno, se ha adicionado MEL ocasionalmente a algunos alimentos, con objeto de aumentar el nivel aparente de proteínas que contienen. Además de que esta adición es ilegal, su manipulación representa un riesgo para la salud humana debido a la toxicidad de estos compuestos [2]. Por consiguiente, ninguno de estos cuatro compuestos químicos debería estar presente en los alimentos.

El límite de seguridad para MEL en leche y productos lácteos, de acuerdo con la US Food and Drug Administration (FDA), la Unión Europea y los expertos de la Organización Mundial de la Salud y de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (WHO/FAO), es $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que los expertos WHO/FAO para fórmulas infantiles [3,4] han establecido un límite de 1 mg kg^{-1} . En consecuencia, tiene un gran interés analítico el desarrollo de procedimientos simples y efectivos para la determinación de MEL y compuestos relacionados.

II.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE MELAMINA Y SUS DERIVADOS

Se han desarrollado una variedad de métodos con el propósito de la determinación de MEL y, recientemente, han sido revisados [5,6]. La mayoría están basados en técnicas cromatográficas, como GC-MS [1,7-15], LC con UV o DAD [16-21] y LC-MS [2,14,22-38]. También se ha utilizado TOF-MS acoplada a Ionización por Desorción Láser con Matriz Asistida (MALDI) [39-41] o Análisis Directo en Tiempo Real (DART) [42].

Sin embargo, la mayoría de los procedimientos se refieren a la determinación de MEL o mezclas de MEL y CA en diferentes matrices, pero no abordan el resto de especies mencionadas.

Los compuestos polares se analizan con dificultad por LC-MS en fase reversa y una buena alternativa puede ser el uso de un agente formador de pares iónicos. En tal caso, hay que tener cuidado cuando se usan reactivos de pares de iones en combinación con LC-MS, debido a la posibilidad de supresión por los iones, contaminación de la fuente MS y formación de aductos. Además, puede ser preferible el método de intercambio iónico, por ser compatible con LC-MS para el análisis de analitos polares.

En este Capítulo, se evalúa la aplicación de la técnica LC de intercambio iónico con dos sistemas de detección, APCI-MS y DAD, para la determinación rápida de MEL y

compuestos relacionados estructuralmente, incluyendo AMN, AMD y CA en alimentos. En ambos procedimientos, se utilizó LC de intercambio iónico y elución isocrática. La extracción de las muestras se llevó a cabo por homogeneización con la mezcla acetonitrilo:agua:dietilamina. Se ha validado la linealidad, LODs y LOQs, selectividad, exactitud y precisión de los métodos. Se demostró la especificidad para LC-MS por las características de retención y los espectros MS, mientras que en el caso de LC-DAD se demostró su validez para MEL y AMN, considerando las características de retención y los espectros UV. Las recuperaciones obtenidas para muestras fortificadas fueron satisfactorias para todos los analitos con LC-MS. El procedimiento propuesto, LC-APCI-MS, se aplicó con éxito al análisis de diferentes alimentos infantiles, incluyendo fórmulas infantiles y cereales de desayuno, así como a muestras de harina de arroz, almidón de patata y bebidas de soja y de coco.

II.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

II.3.1. REACTIVOS

Se utilizaron acetonitrilo y metanol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) de calidad LC. El agua destilada se purificó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

La disolución de acetato amónico 10 mM de pH 6,5 se preparó a partir del producto comercial (Panreac, Barcelona, Spain). Otros reactivos fueron hidróxido sódico, ácido fosfórico, fosfato sódico, etanol y dietilamina (Panreac).

Las disoluciones patrón de los estándares se prepararon a partir de los productos comerciales. MEL (Sigma-Aldrich) y AMD (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Germany) se prepararon disolviendo 10 mg en 25 mL de una mezcla metanol:agua 1:1. AMN (Fluka, Buchs, Switzerland) se preparó disolviendo 10 mg en 25 mL de una mezcla metanol:agua 1:1 conteniendo hidróxido sódico 0,05 M y sonicando durante 5 min. CA (Sigma-Aldrich) se preparó disolviendo 10 mg en 50 mL de una mezcla etanol:agua conteniendo hidróxido sódico 0,05 M y sonicando durante 5 min. Todas las disoluciones se mantuvieron en botellas oscuras a 4 °C, excepto AMD que se almacenó a -18 °C. Las disoluciones

estándar de trabajo se prepararon por dilución con disolución reguladora acetato/acético el mismo día de su uso.

II.3.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312A) con una velocidad de flujo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado a temperatura ambiente (Agilent G1316A). El detector de diodos fue un Agilent G1315D operando a dos longitudes de onda de 200 nm para MEL y AMN, y 220 nm para AMD y CA. La columna analítica usada para la técnica de intercambio catiónico para mejorar la resolución fue Spherisorb SCX (15 cm x 4 mm, tamaño de partícula $5 \mu\text{m}$). La inyección ($40 \mu\text{L}$) se llevó a cabo usando un automuestreador (Agilent G1329A).

El sistema LC se acopló a un espectrómetro de masas de trampa de iones (modelo 1036) equipado con una interfase APCI operando en ambos modos de ionización positivo y negativo y en modo de medida SIM. Los parámetros instrumentales fueron: temperatura de secado, $350 \text{ }^\circ\text{C}$; temperatura APCI, $400 \text{ }^\circ\text{C}$; flujo del gas de secado, 6 L min^{-1} y presión del gas nebulizador, 60 psi.

Las disoluciones se almacenaron en viales de vidrio ámbar de 10 mL. Se utilizaron una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) y un baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, Spain). Para filtrar las muestras, se usaron filtros de nailon Econofilter de 25 mm de diámetro ($0,45 \mu\text{m}$) (Agilent).

II.3.3. MUESTRAS

Las muestras de diferentes tipos de alimentos infantiles fueron suministradas por fabricantes locales: tres tipos de fórmulas infantiles (inicio, seguimiento y prebiótica) y cereales de desayuno (multicereales con miel). Otras muestras de harina de arroz, harina de arroz glutinoso, almidón de patata, bebida de soja y bebida de coco se obtuvieron de diferentes proveedores.

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo usando cuatro muestras diferentes (fórmula infantil, cereales de desayuno, harina de arroz y bebida de soja) fortificadas con los cuatro analitos, cuando se usó el método LC-APCI-MS, a niveles de concentración entre 210 ng g^{-1} y $2,4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante al menos media hora antes de comenzar el procedimiento de extracción.

II.3.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se pesó una cantidad de muestra de 0,5 g en un tubo de vidrio y se añadieron 5 mL de una mezcla acetonitrilo:agua:dietilamina 5:4:1. La suspensión se homogeneizó y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Entonces, se recogió la disolución sobrenadante y se filtró a través de un filtro cromatográfico de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$. Se inyectaron alícuotas de $40 \text{ } \mu\text{L}$ en el cromatógrafo con el automuestreador.

La fase móvil usada en condiciones isocráticas fue acetato amónico 10 mM (pH 6,5) a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Se llevó a cabo detección UV-vis en el rango 190-450 nm y el detector de diodos se utilizó a longitudes de onda de 200 nm para MEL y AMN, y 220 nm para AMD y CA.

La respuesta MS óptima se obtuvo con APCI en modo positivo para MEL y AMN, y en modo negativo para AMD y CA. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

II.4. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La melamina es una molécula básica y polar con un pK_a de 5,6 y un valor de log P de -1,37. Debido a su elevada polaridad, los compuestos ionizados son retenidos en menor extensión que las especies neutras en fase reversa. Las especies ionizadas también interactúan con los silanoles expuestos y activados, lo que afecta a la forma de los picos y la reproducibilidad.

La separación se inició utilizando RP-LC usando varias columnas C_{18} y diferentes disoluciones reguladoras como fases móviles. Sin embargo, debido a su naturaleza polar, algunos de los analitos no resultaron retenidos por las columnas en ninguna de las condiciones y, en consecuencia, se descartó la técnica de fase reversa.

Para aumentar la retención de MEL y sus derivados, se ensayó la cromatografía de pares iónicos (IPC). La naturaleza iónica de los compuestos facilitó las interacciones fuertes con reactivos de pares iónicos aniónicos a pH apropiados, aumentando así la retención y la resolución. Sin embargo, cuando se usó la técnica LC-MS, la resolución de la columna en disoluciones reguladoras volátiles es crítica y, por tanto, se descartó el uso de IPC.

Se ensayó la técnica de intercambio catiónico usando una columna Spherisorb SCX (15 cm x 4 mm, 5 μ m).

Se estudió el efecto del pH de la fase móvil en el rango 3-7 sobre los tiempos de retención y las formas de los picos usando disoluciones reguladoras fosfato 50 mM a 0,5 mL min⁻¹. CA no se retuvo en la columna bajo ninguna condición, mientras que la retención del resto de los compuestos aumentó a valores de pH más bajos, especialmente para AMN y MEL.

Se ensayaron fases móviles de mayor volatilidad, en este caso, formiato y acetato. Cuando se trabajó con disolución reguladora de formiato 50 mM, los compuestos fueron retenidos por la columna.

Se obtuvo la mejor resolución usando acetato amónico 10 mM (pH 6,5) a 0,5 mL min⁻¹, siendo el orden de elución: 1, CA (t_R =2,1 min); 2, AMD (t_R =2,2 min); 3, AMN (t_R =3,2 min) y 4, MEL (t_R =5,8 min).

El método usando LC-DAD fue menos selectivo y requirió validación intensiva para asegurar que no se producían interferencias por absorción a las bajas longitudes de onda usadas para la detección, a 200/220 nm. Por otra parte, CA tiene grupos cromóforos mucho más débiles que el resto de los compuestos y, por tanto, un límite de detección más alto. Además, las bandas correspondientes a CA y AMD eluyeron muy cercanas al tiempo muerto y no pudieron ser resueltas.

II.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES APCI-MS

Se llevó a cabo una comparación de los métodos de ionización MS, ESI y APCI, y se seleccionó APCI usando la sonda de nebulización caliente porque fue más sensible que ESI para varios de estos compuestos polares.

La respuesta MS óptima se obtuvo con APCI en modo positivo para MEL y AMN, y en modo negativo para AMD y CA. Hay que tener en cuenta que AMN se puede analizar tanto en modo positivo como en modo negativo. Así, los iones $[M+H]^+$ se usaron como iones target para MEL y AMN, mientras que los iones $[M-H]^-$ se usaron para AMD y CA (Tabla II.1).

El uso de las dos polaridades opuestas significa que es necesario cambiar la polaridad durante cada cromatograma LC-MS, o llevar a cabo dos cromatogramas diferentes, uno en cada modo. Los análisis se llevaron a cabo en dos cromatogramas para mejorar la sensibilidad.

La Tabla II.1 resume también los tiempos de retención, las bandas UV y los datos APCI-MS. Todos los compuestos se identificaron por interpretación de sus espectros de masas obtenidos por APCI-MS y sus espectros de absorción en la región UV.

Tabla II.1. Condiciones LC-DAD y LC-APCI-MS

Compuesto	t_r (min)	Longitud de onda	Modo de ionización	Ión target (m/z)
CA	2,1	220	Negativo	128
AMD	2,2	220	Negativo	127
AMN	3,2	200	Positivo	128
MEL	5,8	200	Positivo	127

La supresión de iones producida por los iones de la disolución reguladora de la fase móvil presentes a concentraciones elevadas es de esperar que no interfieran con la ionización de los analitos que son retenidos con el método LC-APCI-MS. La Figura II.2 muestra los cromatogramas de iones extraídos tanto en modo positivo como en modo negativo, bajo las condiciones seleccionadas.

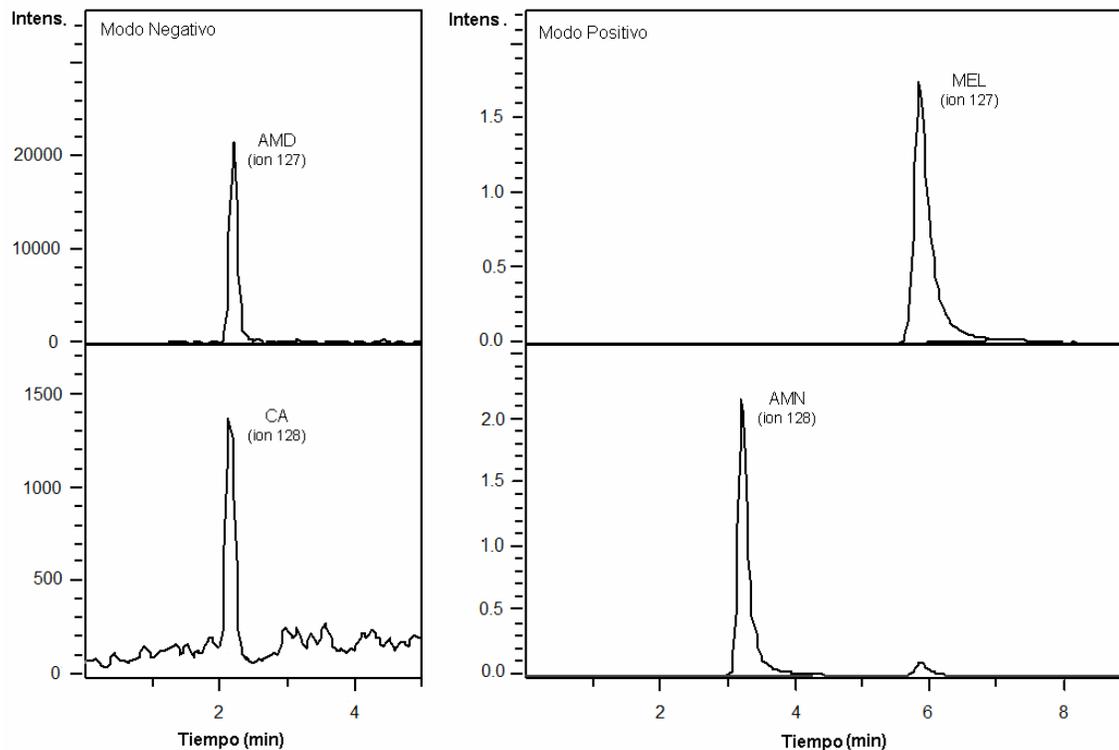


Figura II.2. EICs obtenidos mediante LC-APCI-MS en modo positivo y en modo negativo obtenidos usando una fórmula infantil de inicio fortificada a $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada compuesto

II.6. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA

Ya que los alimentos infantiles y los alimentos funcionales son muestras biológicas altamente complejas, fue necesario utilizar alguna forma de preparación de la muestra para simplificar la matriz y facilitar la interpretación no ambigua de la señal. También hay que tomar precauciones adicionales para asegurar la integridad de la muestra a lo largo del proceso analítico. Esto es particularmente crítico para la determinación de CA, que puede precipitar fácilmente.

La eficiencia de la extracción se evaluó por medio de estudios de recuperación usando la técnica de adiciones estándar.

Por tanto, la muestra se trató con ácidos para eliminar las proteínas. Así, la extracción se llevó a cabo añadiendo TCA al 3% m/v y lavando el precipitado con agua después de la centrifugación. La precipitación de proteínas con ácido, sin neutralización,

tiene la ventaja de ser un proceso de preparación de muestra rápido y eficaz; aunque se producen pérdidas de CA y MEL.

Sin embargo, se obtuvieron buenos resultados cuando se usaron juntos un disolvente orgánico y medio alcalino [22]. Así, se consiguió la extracción óptima usando una mezcla ACN:agua:dietilamina en la proporción 5:4:1 como se propone en el método US FDA [43]. La mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min y se filtró usando un filtro de nailon de 0,45 μm .

II.7. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se validaron los métodos con respecto a su linealidad, LODs y LOQs, selectividad, precisión y exactitud.

Las gráficas de calibrado se obtuvieron por análisis de regresión lineal de las áreas de pico *versus* concentración de analito (ng mL^{-1}) usando seis niveles de concentración. Los parámetros de validación, coeficientes de regresión y rango de linealidad para cada compuesto usando LC-MS y calibrando por el procedimiento de estándar externo se muestran en la Tabla II.2. Los valores de los coeficientes de correlación fueron mayores que 0,99, lo que implica una linealidad excelente para todo el rango estudiado. Los LODs y LOQs se calcularon en base a tres y diez veces, respectivamente, la desviación estándar de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado y los valores también se muestran en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Datos de validación del método LC-APCI-MS

	MEL	AMN	AMD	CA
Intervalo lineal	10-200	10-200	10-200	100-2000
(ng mL^{-1})	(125-2000)	(125-2000)	(150-2000)	(1250-20000)
Coefficiente de regresión	0,983	0,977	0,978	0,997
LOD (ng mL^{-1})	2,2 (32)	2,7 (35)	3,0 (43)	13 (180)
LOQ (ng mL^{-1})	7,3 (106)	9,0 (116)	10 (143)	43 (600)
Precisión (n=10), RSD (%)	9,7	7,6	6,8	5,3

Los valores entre paréntesis corresponden a ng g^{-1}

Se calculó la precisión de los métodos por análisis repetidos, calculando la RSD para diez inyecciones idénticas de la misma muestra fortificada a $1 \mu\text{g g}^{-1}$. Los valores se muestran en la Tabla II.2 e indican que la precisión del método LC-MS fue satisfactoria para análisis de control.

II.8. ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

Se estudió el efecto matriz para los diferentes tipos de muestras analizadas con objeto de evaluar la supresión de la señal producida por la coelución de compuestos de la matriz de la muestra que afecten a la ionización de los analitos. Esto se puede atribuir en la detección MS a desprotonación, a la presencia de componentes no volátiles y, en matrices complejas, a cantidades grandes de especies competitivas por los iones disponibles.

Se compararon las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y de adiciones estándar para las diferentes matrices, obtenidas representando concentración (a cinco niveles) frente a área de pico y realizando un análisis de regresión lineal. La aplicación de un estudio estadístico concluyó que había diferencias significativas para las pendientes al nivel de confianza del 95 %, confirmando que la calibración deberá llevarse a cabo por el método de adiciones estándar para compensar el efecto matriz. La Tabla II.2 muestra los datos obtenidos para la linealidad, LODs y LOQs aplicando el método de adiciones estándar a una fórmula infantil de inicio (datos entre paréntesis). Se llevó a cabo un estudio similar usando LC-DAD para MEL y AMN y también se detectó efecto matriz, proponiendo también el método de adiciones estándar cuando MEL y AMN se cuantifican por LC-DAD.

Se evaluó la selectividad del método LC-APCI-MS analizando seis muestras blanco diferentes con objeto de determinar la posible interferencia de sustancias extrañas. No se observaron picos de impurezas a los tiempos de retención correspondientes a MEL y sus derivados cuando se analizaron las matrices blanco y extractos de las muestras fortificadas. En el caso del método LC-DAD, se llevó a cabo un estudio similar para comprobar la selectividad para MEL y AMN.

Para estudiar la exactitud del método LC-APCI-MS, se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando cuatro muestras (fórmula infantil, cereales de desayuno, harina

de arroz y bebida de soja) a dos niveles de concentración correspondientes a aproximadamente dos y cuatro veces los LOQs. Las recuperaciones de MEL y derivados a partir de muestras fortificadas variaron entre 80 y 103 %, con un valor de recuperación media \pm SD (n=64) de 91 \pm 5. En el caso de LC-DAD, las mismas muestras fueron fortificadas con MEL y AMN a dos niveles de concentración en el rango 260-600 ng g⁻¹, y se obtuvo una recuperación media \pm SD (n=32) de 89 \pm 7.

II.9. ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Se analizaron diferentes alimentos infantiles, correspondientes a tres tipos de fórmulas infantiles (inicio, seguimiento y prebiótica de seguimiento) y un cereal de desayuno (multicereales con miel), usando el procedimiento propuesto LC-APCI-MS. Otras muestras también analizadas fueron harina de arroz, harina de arroz glutinoso, almidón de patata, bebida de soja y bebida de coco. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado. No se detectaron los analitos MEL, AMN, AMD ni CA en ninguna de las muestras por encima de los LODs.

Los perfiles cromatográficos demostraron la ausencia de interferencias. Los picos cromatográficos para muestras fortificadas se identificaron en primer lugar comparando los datos de retención obtenidos para los estándares, las muestras y las diferentes muestras fortificadas bajo condiciones idénticas. Finalmente, se confirmó la identificación usando los espectros MS.

II.10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Li, H.Y. Qi, Y.P. Shi, Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5467-5471.
- [2] W.C. Andersen, S.B. Turnipseed, C.M. Karbiwnyk, S.B. Clark, M.R. Madson, C.M. Gieseke, R.A. Miller, N.G. Rummel, R. Reimschuessel, Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon, and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 4340-4347.

- [3] European Union Commission Decision 2008/798/EC, Imposing special conditions governing the import of products containing milk or milk products originating in or consigned from China, and repealing Commission Decision 2008/757/EC, *Off. J. Eur. Un.* L273 (2008) 18.
- [4] World Health Organization/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Expert meeting to review toxicological aspects of melamine and cyanuric acid, 2008.
- [5] S.A. Tittlemier, Methods for the analysis of melamine and related compounds in food: a review, *Food Addit. Contam. Part A* 27 (2010) 129-145.
- [6] F. Sun, W. Ma, L. Xu, Y. Zhu, L. Liu, C. Peng, L. Wang, H. Kuang, C. Xu, Analytical methods and recent developments in the detection of melamine, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1239-1249.
- [7] H. Miao, S. Fan, Y.N. Wu, L. Zhang, P.P. Zhou, J.G. Li, H.J. Chen, Y.F. Zhao, Simultaneous determination of melamine, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed. Environ. Sci.* 22 (2009) 87-94.
- [8] H.P.O. Tang, S.S.L. Lai, A.Y.H. Lai, W.O. Lee, Improved method for the determination of cyanuric acid in animal feed by GC-MS, *Chromatographia* 70 (2009) 1405-1410.
- [9] X.M. Xu, Y.P. Ren, Y. Zhu, Z.X. Cai, J.L. Han, B.F. Huang, Y. Zhu, Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation, *Anal. Chim. Acta* 650 (2009) 39-43.
- [10] X. Xia, S. Ding, X. Li, X. Gong, S. Zhang, H. Jiang, J.C. Li, J. Shen, Validation of a confirmatory method for the determination of melamine in egg by gas chromatography-mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 651 (2009) 196-200.
- [11] L. Zhao, J. Zhao, W.G. Huangfu, Y.L. Wu, Simultaneous determination of melamine and clenbuterol in animal feeds by GC-MS, *Chromatographia* 72 (2010) 365-368.

- [12] M. Li, L. Zhang, Z. Meng, Z. Wang, H. Wu, Molecularly-imprinted microspheres for selective extraction and determination of melamine in milk and feed using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2333-2338.
- [13] S.H. Tzing, W.H. Ding, Determination of melamine and cyanuric acid in powdered milk using injection-port derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry with furan chemical ionization, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6267-6273.
- [14] P. Lutter, M.C. Savoy-Perroud, E. Campos-Giménez, L. Meyer, T. Goldmann, M.C. Bertholet, P. Mottier, A. Desmarchelier, F. Monard, C. Perrin, F. Robert, T. Delatour, Screening and confirmation methods for the determination of melamine in cow's milk and milk-based powdered infant formula: Validation and proficiency-tests of ELISA, HPLC-UV, GC-MS and LC-MS/MS, *Food Control* 22 (2011) 903-913.
- [15] G. Koh, R.S.C. Chia, Q. Lin, P.S. Cheow, T.L. Teo, T.K. Lee, Determination of melamine in milk powder using gas chromatography - high-resolution isotope dilution mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 3043-3052.
- [16] E.L. Bradley, V. Boughtflower, T.L. Smith, D.R. Speck, L. Castle, Survey of the migration of melamine and formaldehyde from melamine food contact articles available on the UK market, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 597-606.
- [17] S. Ehling, S. Tefera, I.P. Ho, High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammelide, and cyanuric acid, *Food Addit. Contam.* 24 (2007) 1319-1325.
- [18] B. Kim, L.B. Perkins, R.J. Bushway, S. Nesbit, T. Fan, R. Sheridan, V. Greene, Determination of melamine in pet food by enzyme immunoassay, high-performance liquid chromatography with diode array detection, and ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 408-413.
- [19] R. Muñoz-Valencia, S.G. Ceballos-Magaña, D. Rosales-Martínez, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, A. Cubedo-Fernández-Trapiella, R.C. Izquierdo-Hornillos, Method development and validation for melamine and its derivatives in

- rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 523-531.
- [20] Y.B. Zhong, L.J. Zhang, H.C. Zhang, J.X. Liu, J.P. Wang, Immunoaffinity-based solid phase extraction for the determination of melamine in animal-derived foods followed by LC, *Chromatographia* 73 (2011) 1211-1215.
- [21] Y.Y. Chao, C.T. Lee, Y.T. Wei, H.S. Kou, Y.L. Huang, Using an on-line microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer, *Anal. Chim. Acta* 702 (2011) 56-61.
- [22] M.S. Filigenzi, B. Puschner, L.S. Aston, R.H. Poppenga, Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7593-7599.
- [23] W.C. Cheng, S.K. Chen, T.J. Lin, I.J. Wang, Y.M. Kao, D.Y. Shih, Determination of urine melamine by validated isotopic ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1776-1782.
- [24] A. Desmarchelier, M. Guillamón Cuadra, T. Delatour, P. Mottier, Simultaneous quantitative determination of melamine and cyanuric acid in cow's milk and milk-based infant formula by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 7186-7193.
- [25] M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, Determination of melamine in milk-based products and other food and beverage products by ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 649 (2009) 91-97.
- [26] C.M. Karbiwnyk, W.C. Andersen, S.B. Turnipseed, J.M. Storey, M.R. Madson, K.E. Miller, C.M. Giesecker, R.A. Miller, N.G. Rummel, R. Reimschuessel, Determination of cyanuric acid residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 101-111.
- [27] H.W. Tang, K.M. Ng, S.S. Chui, C.M. Che, C.W. Lam, K.Y. Yuen, T.S. Siu, L.C. Lan, X. Che, Analysis of melamine cyanurate in urine using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 3676-3682.

- [28] S.A. Tittlemier, B.P.Y. Lau, C. Ménard, C. Corrigan, M. Sparling, D. Gaertner, K. Pepper, M. Feeley, Melamine in infant formula sold in Canada: occurrence and risk assessment, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 5340-5344.
- [29] Y.T. Wu, C.M. Huang, C.C. Lin, W.A. Ho, L.C. Lin, T.F. Chiu, D.C. Tarng, C.H. Lin, T.H. Tsai, Determination of melamine in rat plasma, liver, kidney, spleen, bladder and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7595-7601.
- [30] J. Zhou, J. Zhao, X. Xue, J. Zhang, F. Chen, Y. Li, L. Wu, C. Li, J. Mi, Hydrophilic interaction chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of melamine in royal jelly and royal jelly lyophilized powder, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 4164-4170.
- [31] Y. Xu, L. Chen, H. Wang, X. Zhang, Q. Zeng, H. Xu, L. Sun, Q. Zhao, L. Ding, Preparation of magnetic strong cation exchange resin for the extraction of melamine from egg samples followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 35-41.
- [32] H. Yu, Y. Tao, D. Chen, Y. Wang, Z. Liu, Y. Pan, L. Huang, D. Peng, M. Dai, Z. Liu, Z. Yuan, Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with pressurized liquid extraction for simultaneous quantification and confirmation of cyromazine, melamine and its metabolites in foods of animal, *Anal. Chim. Acta* 682 (2010) 48-58.
- [33] B.N. Tran, R. Okoniewski, R. Storm, R. Jansing, K.M. Aldous, Use of methanol for the efficient extraction and analysis of melamine and cyanuric acid residues in dairy products and pet foods, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 101-107.
- [34] Y.T. Wu, C.M. Huang, C.C. Lin, W.A. Ho, L.C. Lin, T.F. Chiu, D.C. Tarng, C.H. Lin, T.H. Tsai, Oral bioavailability, urinary excretion and organ distribution of melamine in Sprague-Dawley rats by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 108-111.

- [35] M. Zhang, S. Li, C. Yu, G. Liu, J. Jia, C. Lu, J. He, Y. Ma, J. Zhu, C. Yu, Determination of melamine and cyanuric acid in human urine by a liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 758-762.
- [36] C.C. Jacob, G. Gamboa da Costa, Low-level quantification of melamine and cyanuric acid in limited samples of rat serum by UPLC-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 652-656.
- [37] C. Han, Y. Zhou, B. Xia, Z. Zhuz, C. Liu, Y. Shen, Microwave-assisted extraction and determination of cyanuric acid residue in pet food samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 371-375.
- [38] S. Gosciny, V. Hanot, J.F. Halbardier, J.Y. Michelet, J. Van Loco, Rapid analysis of melamine residue in milk, milk products, bakery goods and flour by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: From food crisis to accreditation, *Food Control* 22 (2011) 226-230.
- [39] J.A. Campbell, D.S. Wunschel, C.E. Petersen, Analysis of melamine, cyanuric acid, ammelide, and ammeline using matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Lett.* 40 (2007) 3107-3118.
- [40] A. Singh, V. Panchagnula, High throughput quantitative analysis of melamine and triazines by MALDI-TOF MS, *Anal. Methods* 3 (2011) 2360-2366.
- [41] A. Arnol, T.N. Arrey, M. Karas, M. Persike, Fast quantitative determination of melamine and its derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (2011) 2844-2850.
- [42] L. Vaclavik, J. Rosmus, B. Popping, J. Hajslova, Rapid determination of melamine and cyanuric acid in milk powder using direct analysis in real time-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4204-4211.
- [43] J.J. Litzau, G.E. Mercer, K.J. Mulligan, GC-MS screen for the presence of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid. Laboratory information bulletin nº 4423, vol. 24 (2008). Food and Drug Administration, Washington, D.C. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/DrugChemicalResiduesMethodology/ucm071759.htm>.

CAPÍTULO III

**DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y
TANINOS HIDROLIZABLES EN GRANADA Y
PRODUCTOS DERIVADOS MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN
POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE
TIEMPO DE VUELO**

III.1. LA GRANADA Y SUS CONSTITUYENTES ESENCIALES

La granada, *Punica granatum*, es una fruta de sabor agradable y color atractivo que ofrece un alimento con importantes propiedades nutricionales y terapéuticas. Desde el punto de vista botánico es el fruto del granado, pequeño árbol caducifolio de 3 a 6 m de altura, perteneciente a la familia de las *Punicaceae*. Las hojas son de color verde brillante, lustrosas por el haz y con el borde entero. Las flores (floración entre mayo y julio) son grandes y de color rojo, y matizadas en blanco, en algunas variedades.

El fruto es una baya globosa, denominada balausta, de color rojo brillante, verde amarillento o blanquecino, lleno de semillas y de cáscara coriácea. Las semillas son gruesas, de consistencia leñosa y testa carnosa o pulposa, de forma prismática, muy jugosas, color que varía desde el rubí intenso hasta blanco y sabor agridulce.

Actualmente su cultivo se extiende principalmente en países de la cuenca mediterránea. España es uno de los principales países productores del mundo y exportador de Europa. Esta producción se concentra fundamentalmente en la zona levantina de Alicante y Murcia. Su cultivo se extiende desde el mes de septiembre hasta enero, si bien los mejores frutos son los recolectados entre los meses de octubre y diciembre [1].

La granada está compuesta mayoritariamente por agua y azúcares, siendo menor su contenido en grasas y proteínas, lo que le confiere un bajo valor calórico (aprox. 75 kcal/100 g). Presenta también una pequeña proporción de fibra alimentaria, localizada fundamentalmente en el piñón (3,1 g/100 g), es rica en potasio y aporta cantidades considerables de calcio, magnesio, hierro y fósforo, siendo pobre en sodio. Contiene, además, vitaminas del grupo B, C y niacina, en concentraciones similares a otras frutas de alto consumo como ciruelas o manzanas.

Gran parte de su importancia organoléptica y sus beneficios para la salud, se deben a la presencia de compuestos fenólicos [2,3], ya que, a nivel organoléptico, los antocianos son los responsables de su atractivo color rojo y los taninos de su sabor astringente (siendo los ácidos orgánicos, cítrico y málico, los responsables del sabor acidulado), mientras que los elagitaninos y, en menor proporción, los antocianos le confieren propiedades antioxidantes.

Los fenoles totales se encuentran en una concentración elevada (aprox. 83 mg/100 g de porción comestible o 250 mg/100 mL), comparable a la del vino tinto (valores medios de 203 mg/100 mL) y muy superior a la del té verde (aprox. 103 mg/100 mL), tan apreciado hoy día por su capacidad antioxidante.

Dentro de esta fracción fenólica, los compuestos mayoritarios pertenecen al grupo de los antocianos (flavonoides coloreados), elagitaninos, derivados del ácido elágico (EA) y otros taninos hidrolizables (HTs) [4].

En el grupo de los compuestos fenólicos coloreados, la granada se caracteriza por la presencia de antocianos, derivados 3-glucósidos y 3,5-diglucósidos de delphinidina, cianidina y pelargonidina. Los derivados de cianidina son los que se encuentran en mayor proporción (por encima del 60 %), otorgando en total una alta concentración de estos flavonoides (alrededor de 13,3 mg/100 g de porción comestible o 40 mg/100 mL de zumo).

Dentro del segundo grupo, los HTs, los compuestos más abundantes son las punicalaginas, que se encuentran naturalmente como dos anómeros reversibles, A y B (PGA y PGB) [5,6], con concentraciones que alcanzan los 52 mg/100 mg de porción comestible (156 mg/100 mL de zumo), EA y sus derivados se encuentran en proporciones algo inferiores (un total de 4 mg/100 mg o 12 mg/100 mL zumo) y el total de otros HTs alcanza valores de 14 mg/100 mg (42 mg/100 mL zumo). No obstante, en algunos zumos comerciales, se han descrito concentraciones mucho más elevadas de los tres últimos grupos de compuestos, alterándose también la proporción de antocianos y EA según la variedad de granada.

Los ácidos fenólicos tales como EA y ácido gálico (GA), productos de la hidrólisis de HTs, también se han detectado en granada. Las concentraciones tan elevadas de

elagitaninos han llevado a la propuesta de diferentes métodos para su aislamiento y purificación a partir de esta fruta [7-10].

En la granada se pueden distinguir distintas partes: cáscara, mesocarpio y las porciones comestibles arilos, con diferente composición polifenólica [2,11,12]. Además, en su composición química influyen diferentes factores, tales como origen geográfico, variedad de las plantas, estado de madurez, condiciones medioambientales o técnicas de cosecha.

En los zumos de granada se han encontrado concentraciones de HTs más elevadas que en los arilos, debido a que en la fabricación del zumo se procesa el fruto completo [11]. Así, no es sorprendente que la mayor parte de la bibliografía encontrada haga referencia a zumos más que a la fruta, debido a su contenido de polifenoles más alto [2].

III.2. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA GRANADA

La importancia de los compuestos fenólicos de la granada es doble, ya que por una parte son responsables de sus características organolépticas, fundamentalmente de su atractivo color rojo, y por otra parte, le confieren su capacidad captadora de radicales libres, lo que hace que sea incluida entre los potenciales promotores de la salud. La Figura III.1 muestra un esquema de los principales compuestos fenólicos presentes en la granada.

Los antocianos son los compuestos responsables de los colores rojos de bayas y ciertos frutos como granada, manzana, ciruela, cereza, uvas, etc. El papel de los antocianos en el consumo de granadas es fundamental, ya que cuanto más rojo sea el grano, mayor es la aceptación. No obstante, el color que otorga este tipo de flavonoides varía con la estructura molecular, ya que si aumenta la hidroxilación, aumenta la coloración azulada. La forma responsable de la coloración roja es la del catión flavilio, aunque dependiendo del pH o de la temperatura, puede desplazarse hacia las otras formas con las que se mantiene en equilibrio, y que son incoloras (pseudobase carbinol y chalcona) o azulada (base quinoidal), produciendo, generalmente, alteraciones indeseables. Así, la forma de catión flavilio predomina a pH bajo (<3) y temperatura de 20 °C, desplazándose el equilibrio hacia las otras formas a medida que aumentamos estos

dos factores. Además, hay otros elementos que influyen en la estabilidad de estos pigmentos, como son el ácido ascórbico, los azúcares, la presencia de copigmentos, enzimas, etc. También se ha demostrado la actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides, lo que hace que un 10 % de la capacidad antioxidante del zumo de granada se deba a la presencia de estos polifenoles.

Pero, sin duda, los compuestos que presentan una mayor capacidad captadora de radicales libres son las PGs, responsables del 50 % de esta actividad en el zumo de granada. La PG es un elagitanino en el cual los ácidos galálgico y elálgico se unen a una molécula de glucosa, siendo los isómeros de la misma los responsables de la coloración amarillenta de la corteza.

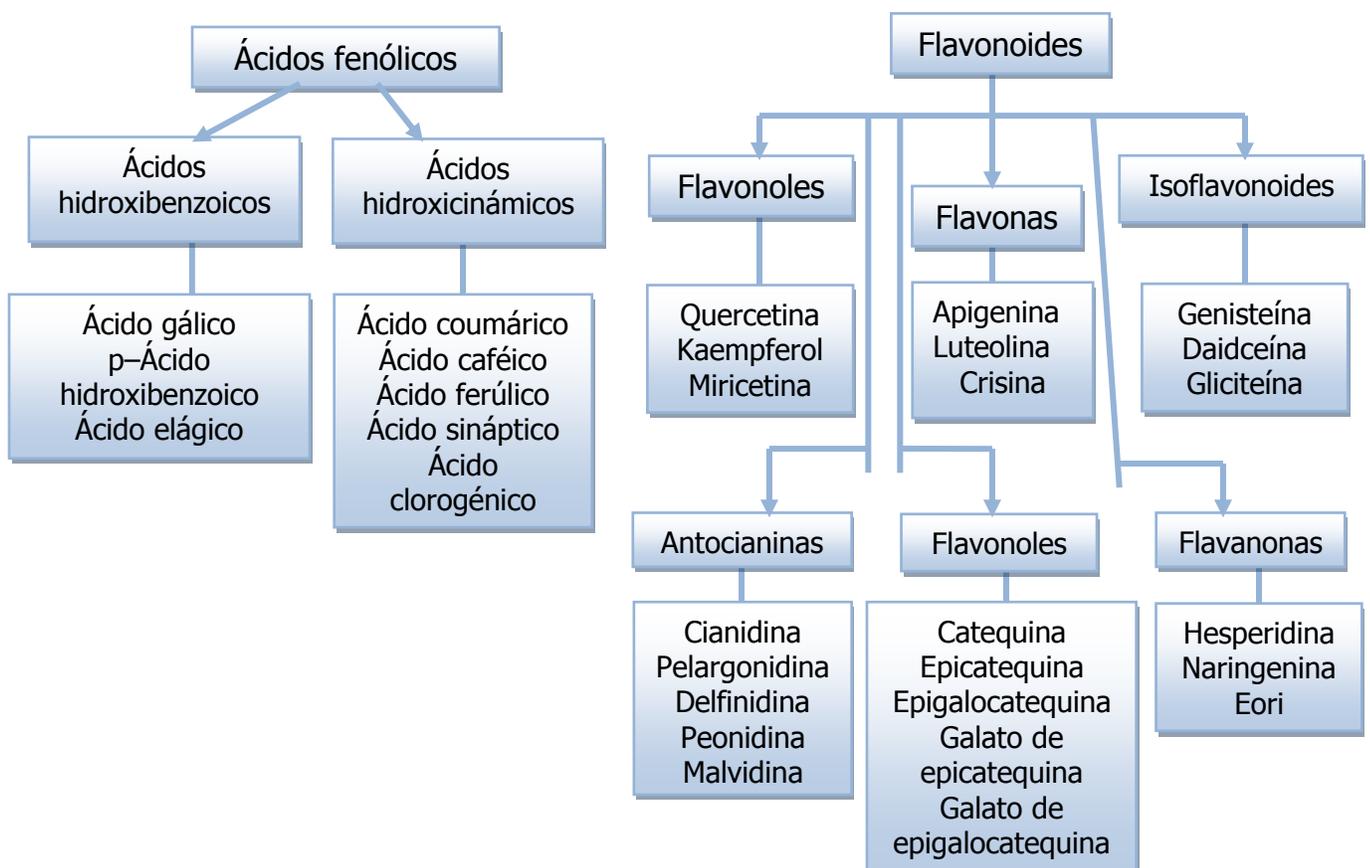


Figura III.1. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

III.3. LA GRANADA COMO ALIMENTO FUNCIONAL

Dentro del mercado de los alimentos funcionales, en continua expansión, se ha considerado a la granada y los productos derivados de ella como alimentos funcionales debido a su acción antioxidante. Este efecto se debe a los antocianos, compuestos fenólicos que protegen frente a los radicales libres y retrasan el proceso de envejecimiento de las células. La actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides ha sido demostrada en distintos estudios. Se estima que la capacidad antioxidante del zumo de granada se debe a la presencia de estos polifenoles, los antocianos. La capacidad antioxidante del zumo de granada es tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde.

Por otra parte, resulta de gran importancia la composición en ácidos grasos esenciales (linoléico, linolénico y araquidónico) y, especialmente, por su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, que juegan un papel muy importante como compuestos preventivos de enfermedades cardiovasculares y de algunos otros problemas de corazón, debido a que este tipo de ácidos grasos reducen considerablemente los niveles de lipoproteínas de alta densidad.

El ácido púnicico tiene efectos antiaterogénicos. Los elagitaninos pueden ser transformados en urolitinas, la urolitina A podría ser el compuesto antiinflamatorio más activo relacionado con la ingesta de granada. PG es el polifenol de mayor peso molecular conocido, que se hidroliza en EA y se metaboliza en el tracto intestinal generándose urolitinas. PGs son los compuestos que presentan mayor capacidad antioxidante o captadora de radicales libres y son responsables aproximadamente del 50 % de esta actividad en el zumo de granada, seguida de otros HTs (33 % de la actividad total) y, en menor medida, del EA (3 %).

Las principales propiedades funcionales de las punicalaginas son:

- Poderoso efecto antioxidante.
- Actividad anticancerígena.
- Efecto protector del sistema cardiovascular.

III.4. PRODUCTOS DERIVADOS DE LA GRANADA

Los productos derivados de la granada como son los zumos, néctares, extractos y mermeladas, aumentan significativamente su comercialización y cuota de mercado fuera de nuestras fronteras. La inmensa mayoría de los productos comercializados en el mercado no indican el origen ni la variedad de la granada con la cual se realizan.

Es muy importante tener en cuenta la influencia que puede tener el procesado sobre los constituyentes promotores de la salud, ya que estos pueden degradarse durante la elaboración de alimentos en la industria o durante su almacenamiento. En general, el principal problema con el que se encuentra la industria dedicada a la elaboración de alimentos derivados de frutos rojos ricos en antocianos, es la pérdida de color o la alteración del mismo, debido a la degradación de los pigmentos por la acción, principalmente, de la alta temperatura a la que se somete el producto durante el tratamiento, a la acción enzimática, a la interacción con ciertos conservantes y a la exposición a la luz durante el almacenamiento. En el caso de la granada, la alteración del color durante la elaboración o almacenamiento de los alimentos procesados, a nivel experimental, no es tan drástica como en otros frutos rojos (por ejemplo, la fresa). Esto se debe, en parte, a la naturaleza de los antocianos característicos de la misma, ya que los diglucosilados son más estables que los monoglucosilados, a la gran concentración de estos pigmentos y a la ausencia de actividad enzimática determinada en el zumo.

Se ha estudiado la influencia del envase en el color y degradación de compuestos bioactivos durante el almacenamiento de los mismos. Las pérdidas durante la elaboración (pasteurización del zumo) son bajas en el caso de los polifenoles totales (2 %), siendo algo más elevadas en el caso de los pigmentos (14 %) y produciéndose un incremento considerable (57 %) en el caso del EA, como consecuencia de la ruptura de elagitaninos.

Cuando se realiza el seguimiento de estos metabolitos bioactivos durante el almacenamiento, se observa que los fenoles no coloreados y el ácido elágico son muy estables durante este período, independientemente del tipo de envase empleado (vidrio verde, transparente o mini-brik). Sin embargo, aquellos envasados en mini-briks pierden más del 50 % de su concentración de antocianos a los dos meses de almacenamiento y el 97 % a los 160 días, con su consiguiente alteración del color, lo cual los hace no aptos para su comercialización en largos períodos de tiempo. Los zumos envasados en vidrio no

sufren esta degradación tan drástica de pigmentos, alargándose considerablemente su vida útil. Todo ello demuestra que la permeabilidad al oxígeno que presentan algunos envases de cartón, tiene una influencia negativa superior a la luz, a la que están expuestos aquellos que se conservan en vidrio transparente. Otro aspecto a destacar es que se comprueba que la actividad antioxidante permanece inalterada durante el procesado y posterior conservación del zumo, lo cual hace del mismo un producto con interesantes beneficios para la salud.

Se ha contemplado la posibilidad de conservar los granos de granada en atmósferas modificadas, para así poder comercializarlo como producto de "cuarta gama". Se describen las alteraciones de color y textura del grano durante su conservación, aunque no se indica nada de la capacidad antioxidante de los mismos durante la conservación.

Además, se han descrito diferentes productos nutracéuticos y suplementos dietéticos que contienen ingredientes naturales extraídos de la granada, minerales y vitaminas, y representan los últimos avances en la ciencia de la nutrición para conseguir buena salud y reducir los efectos del envejecimiento.

III.5. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES Y ÁCIDOS FENÓLICOS

El creciente interés por la identificación individual de los compuestos fenólicos, principalmente en el análisis de alimentos, ha propiciado la sustitución de los métodos tradicionales por aquellos basados en técnicas con elevada eficiencia de separación como las cromatográficas.

Uno de los métodos más ampliamente usados para la cuantificación total de compuestos fenólicos es el método colorimétrico basado en el uso del reactivo Folin-Ciocalteu (FRC). Este reactivo está compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) y ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que, tras la oxidación de los fenoles, se reduce a una mezcla de óxidos de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}) de color azul intenso, siendo la intensidad del color proporcional al número de grupos hidroxilo oxidados. Generalmente se usa GA como estándar de calibración, de modo que los

resultados se expresan como equivalentes de dicho ácido. Una de las principales desventajas de este método colorimétrico es su baja selectividad, ya que otros componentes de la muestra pueden actuar como agentes reductores.

Las técnicas cromatográficas más ampliamente empleadas para la determinación de polifenoles en las muestras que comúnmente contienen dichas especies son LC y GC, combinadas con diferentes sistemas de detección.

El elevado peso molecular y la baja volatilidad de los HTs justifican la ausencia de métodos analíticos basados en GC para su determinación. Por otra parte, el carácter polar de los ácidos fenólicos y su baja volatilidad también limitan el número de métodos GC propuestos en la bibliografía. De hecho, de entre los ácidos hidroxibenzoicos, cuyo estudio se aborda en este trabajo, solo se ha determinado GA mediante GC-MS en muestras de alimentos [13-17], pero no en granada.

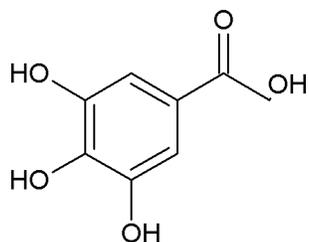
La mayoría de los métodos analíticos para la determinación de HTs y ácidos fenólicos usan LC, aunque también se ha utilizado UPLC [18-20]. Se han acoplado detectores DAD [4,12,21-28], MS/MS [18-20] y la combinación de ambos sistemas de detección [11,29-35] para la determinación de ácidos fenólicos y/o HTs en granada y productos relacionados.

El objetivo de este Capítulo es el desarrollo de un procedimiento simple y rápido para la cuantificación de varios constituyentes esenciales de la granada, tres ácidos fenólicos (GA, EA y 3,4-dihydroxibenzoico (DHBA)) y cuatro HTs (PGA, PGB, punicalina (PC) y corilagina (CG)) en zumos obtenidos de la granada y en diferentes partes de la fruta y el árbol.

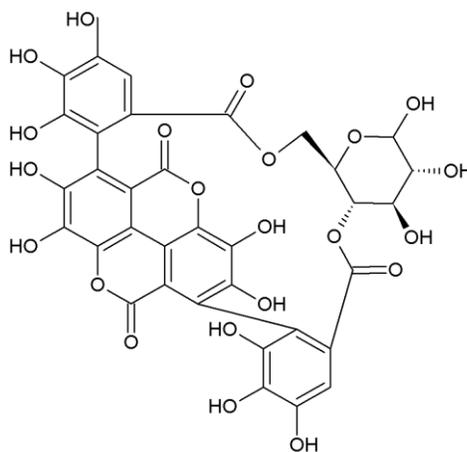
La Figura III.2 muestra las estructuras químicas de estos compuestos.

De entre los polifenoles estudiados en este trabajo, la bibliografía recoge estudios para la determinación de PC, PGs, EA y GA en granada y productos relacionados. Sin embargo, no se han cuantificado DHBA y CG en este tipo de muestras. De hecho, solo se ha abordado la cuantificación de DHBA en una planta medicinal mediante LC-MS [36], mientras que se han encontrado tres métodos LC-DAD para CG en plantas de orígenes diferentes [37-39]. Además, no se ha utilizado el acoplamiento LC-TOF-MS para la determinación de estos compuestos en productos derivados de la granada.

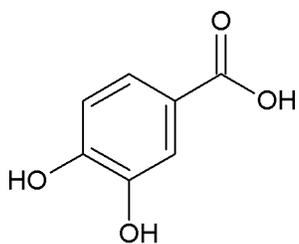
ÁCIDO GÁLICO (GA)



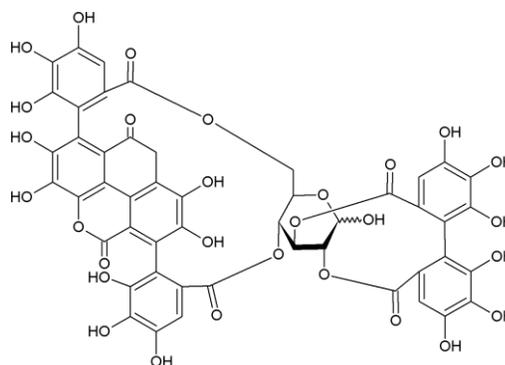
PUNICALINA (PC)



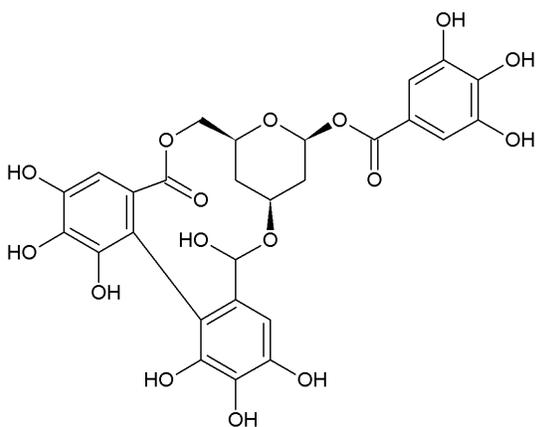
ÁCIDO 3,4-DIHIIDROXIBENZOICO (DHBA)



PUNICALAGINA (PG)



CORILAGINA (CG)



ÁCIDO ELÁGICO (EA)

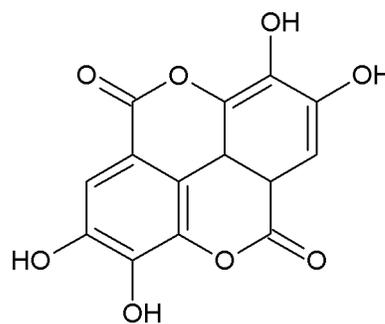


Figura III.2. Estructuras químicas de ácidos fenólicos y taninos hidrolizables

En este estudio, se ha utilizado LC con detector DAD acoplado a ESI-TOF-MS. Para analizar las diferentes partes de la fruta y del árbol de la granada, se sometió la muestra liofilizada a una extracción con metanol durante 2 h. Las bebidas centrifugadas y filtradas se diluyeron con agua en la proporción 1:10 para la cuantificación de CG y DHBA y en la proporción 1:100 para el resto de polifenoles.

Para la cuantificación de las muestras por LC-DAD se utilizó calibración externa frente a estándares acuosos, consiguiendo LODs en el intervalo 1,8-9,2 ng mL⁻¹ (0,2-1,1 ng g⁻¹), dependiendo del compuesto. Para TOF-MS se aplicó la calibración con una muestra como matriz modelo, con LODs entre 0,16 y 1,4 ng mL⁻¹ (0,02-0,17 ng g⁻¹). Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios entre 88 y 110 % para muestras fortificadas (zumos y muestras sólidas) en el intervalo de concentración 5-100 µg mL⁻¹ y 10-100 µg g⁻¹, respectivamente, dependiendo del compuesto, con los dos modos de detección usados. Se encontraron niveles de polifenoles entre 0,3-325 mg mL⁻¹ en las bebidas analizadas y entre 0,04 y 27,82 mg g⁻¹ (en materia seca) en las diferentes partes de la fruta y árbol.

III.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

III.6.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consta de una bomba binaria Agilent G1312A (Agilent, Waldbronn, Germany) operando a una velocidad de flujo de 0,8 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379B). La columna se mantuvo a temperatura ambiente en un compartimento termostatado (Agilent G1316A). La separación se llevó a cabo en una columna Tracer Extrasil ODS2 (Teknokroma) (150 mm x 4 mm, 5 µm), y la inyección (50 µL) se realizó con un automuestreador (Agilent G1329A). Se usaron viales ámbar para el automuestreador de 2 mL de capacidad (Agilent, Waldbronn, Alemania) sellados con tapones de PTFE.

El sistema LC se acopló a un DAD (Agilent 1200, G1315D) operando a 260 nm y a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Agilent G6220A), equipado con fuente ESI operando en modo negativo. Las condiciones de operación del MS fueron: voltaje del

capilar, 1600 V; presión del gas nebulizador, 60 psi; flujo del gas de secado, 12 L min⁻¹; temperatura del gas, 350 °C; voltaje del fragmentador, 180 V; voltaje del skimmer, 65 V; voltaje de radiofrecuencia del octapolo, 250 V. Los espectros de masa exacta se registraron considerando un rango de masas de 50-1200 *m/z*. Para el procesamiento de los datos se usó el software Applied Biosystems/MDS-SCIEX Analyst QS (Frankfurt, Germany). Las medidas de masa exacta de cada pico a partir de los cromatogramas de iones totales (TICs) se obtuvieron por medio de un sistema dispensador de calibrante automatizado que permitió realizar la corrección de las masas. El TOF-MS realiza automáticamente la calibración interna de la masa, usando una fuente de nebulizador dual con un sistema dispensador de calibrante automatizado, que introduce el flujo de la salida del cromatógrafo junto con pequeñas cantidades (cerca de 5 µL min⁻¹) de una disolución calibrante, ES-TOF (Agilent). Se usó el software *Mass Hunter*, versión B-02-00, para el autocalibrado y registro continuo de los resultados de las masas de referencia internas (de valores *m/z* comprendidos entre 112,985587 y 966,000725) y los datos originales. El instrumento proporciona una resolución típica de 10000±2000.

Los análisis se llevaron a cabo usando el cromatograma de iones extraídos de la molécula desprotonada de cada analito con una ventana de 0,2 ppm. Las masas teóricas exactas basadas en la fórmula se calcularon usando las herramientas de cálculo de masa molecular del software *Mass Hunter*. El espectro de masa exacta de los analitos se obtuvo sustrayendo el fondo del EIC. Se utilizó la masa exacta de la molécula desprotonada con propósitos de confirmación. Para la cuantificación se utilizaron como señales analíticas las áreas de pico de los iones extraídos.

Para el tratamiento de las muestras se utilizó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany). También se usaron filtros de membrana hidrofílicos de 25 mm, de polietersulfona (PES) de 0,2 µm (Agilent).

III.6.2. REACTIVOS QUÍMICOS

Se usaron disolventes de grado reactivo analítico, acetonitrilo, metanol y dimetil sulfóxido de Sigma (St. Louis, MO, USA). El ácido fórmico (98 %) fue suministrado por Fluka (Buchs, Switzerland). El agua desionizada se obtuvo con un sistema Milli-Q de purificación de agua (Millipore, Bedford, MA, USA).

Se obtuvieron estándares analíticos de GA (TraceCERT®), CG (>98,8 % de pureza) y EA (>95 % pureza) de Fluka. La mezcla de isómeros de PG (>98 % pureza) y DBHA (>97 % pureza) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). PC (98,6 %) se obtuvo de Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd. (Sichuan, China). Las disoluciones patrón de cada compuesto se prepararon a una concentración de 100 mg L⁻¹ en metanol, excepto EA que se disolvió en dimetil sulfóxido, y se almacenaron en la oscuridad a -18 °C. La mezcla de disoluciones estándar de trabajo se preparó diariamente por dilución con agua desionizada.

III.6.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se obtuvieron tres muestras de zumo de granada. Las muestras 1-2 son zumos obtenidos solamente a partir de los arilos, mientras que la muestra 3 corresponde a un zumo conteniendo también cáscara y mesocarpio. Las bebidas se centrifugaron a 4000 rpm durante 3 min y entonces se filtraron a través de filtros de membrana PES. A continuación, las muestras se diluyeron en las relaciones 1:10 y 1:100 y se inyectaron alícuotas de 50 µL en el sistema LC.

Se separaron las distintas partes del árbol granado, tallos, hojas y flores, así como de la fruta granada (arilos, cáscara y mesocarpios), se liofilizaron y se molieron por medio de un molino de bolas. La pérdida de masa de las muestras en el proceso de liofilización fue del 60, 68, 73, 80, 82 y 83 % para tallos, hojas, cáscara, arilos, mesocarpio y flores, respectivamente. Dichas muestras se almacenaron en botes cerrados de 100 mL de polietileno a 4 °C hasta el análisis.

Para extraer los analitos de las muestras, se pesaron masas entre 20 y 200 mg del material liofilizado, que dependiendo de la matriz, corresponden a 0,05 y 1,2 g del material fresco, y se extrajeron con 10 mL de metanol mediante agitación magnética durante 2 h. A continuación, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm durante 3 min y la disolución sobrenadante se filtró a través de membranas PES de 0,2 µm y se enrasó a 25 mL con agua microfiltrada antes del análisis por LC. Las muestras con altos contenidos en alguno/s de los analitos se sometieron a una dilución adecuada con agua destilada antes de proceder a su análisis.

La fase móvil consistió en un gradiente de elución lineal durante 13 min desde una mezcla 2:98 a una mezcla 22:78 acetonitrilo:ácido fórmico 0,5 % v/v y, seguidamente, un nuevo gradiente lineal desde el 22 hasta el 45 % de acetonitrilo en 0,5 min, manteniendo el 45 % durante 4,5 min. Para obtener los resultados finales, se analizaron separadamente tres porciones de cada muestra.

III.6.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación, se fortificaron zumos de granada (muestras 1 y 3) a niveles de concentración de 5 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DHBA y CG y 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el resto de polifenoles. Las muestras sólidas (arilos, mesocarpio y flores) se fortificaron una vez liofilizadas a dos niveles de concentración en el intervalo 10-100 $\mu\text{g g}^{-1}$, dependiendo de la muestra y el analito. Las muestras fortificadas se equilibraron durante 1 h en la oscuridad a 4 °C antes de proceder al análisis. Se analizaron separadamente tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración.

III.7. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Se ha seleccionado la técnica de LC en fase reversa. Las condiciones de separación óptimas se establecieron inyectando 50 μL de una disolución acuosa estándar conteniendo los analitos a un nivel de concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en una columna Tracer Extrasil ODS2.

Como fase móvil, se ensayaron diferentes mezclas acetonitrilo:agua en modo isocrático a una velocidad de flujo de 0,8 mL min^{-1} . Debido al carácter iónico de los compuestos, se obtuvieron picos muy anchos con tiempos de retención elevados.

La adición de ácido fórmico a la fase móvil consiguió la elución más rápida de los analitos como picos más estrechos. Se varió la concentración de ácido fórmico entre 0,1 y 1% v/v, pero no se observó ninguna variación en el tiempo de retención ni tampoco en el área de los picos. Así, una fase móvil isocrática conteniendo una mezcla 2:98 acetonitrilo:ácido fórmico, permitió una separación y elución adecuadas de GA, DHBA y PC, mientras que el resto de los compuestos fueron retenidos fuertemente por la fase estacionaria. Por tanto, se programó un gradiente de elución lineal: se inicia con el 2 % de

acetonitrilo, que aumenta hasta el 22 % en 13 min. A continuación, el porcentaje se aumenta hasta el 45 % en 0,5 min, manteniéndose durante 4,5 min. Los compuestos eluyeron con tiempos de retención de 5,50; 6,91; 7,91; 9,30; 10,50; 12,22 y 16,31 min para GA, PC, DHBA, PGA, PGB, CG y EA, respectivamente.

III.8. SELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN MS

Se compararon las sensibilidades conseguidas para los compuestos estudiados usando los analizadores TOF-MS e IT-MS/MS.

Se consiguió mayor sensibilidad para todos los compuestos usando TOF-MS y, además, aunque se observó un efecto matriz con ambos analizadores de masas, se comprobó que no existían diferencias significativas entre las pendientes de adiciones estándar obtenidas a partir de diferentes matrices usando TOF-MS, por lo que se seleccionó esta técnica.

III.9. OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Se ensayaron diferentes disolventes para extraer cuantitativamente los analitos de las matrices sólidas: agua, etanol, agua:etanol 30:70, metanol y agua:metanol 30:70. Los experimentos preliminares se llevaron a cabo usando una masa de muestra de aproximadamente 200 mg del material liofilizado que se sometió a agitación magnética durante toda la noche con 50 mL de la disolución extractante. Las mejores eficiencias de extracción para todos los analitos se obtuvieron empleando metanol como disolvente extractante, en consonancia con los resultados obtenidos previamente por otros autores [25]. El tiempo de extracción se varió entre 1 y 12 h empleando metanol como medio de extracción, y se seleccionaron 2 h ya que la sensibilidad no mejoró para tiempos más largos. La eficiencia de extracción no varió cuando se emplearon volúmenes de metanol comprendidos entre 10 y 50 mL y además se comprobó que una segunda etapa de extracción resultaba innecesaria. Asimismo, se estudió el efecto de los ultrasonidos aplicados a través de una sonda directamente sumergida en el medio de extracción, resultando inadecuado su uso ya que la eficiencia de extracción disminuyó para todos los compuestos. El procedimiento de extracción de muestra finalmente adoptado implicaba

masas de muestra comprendidas entre 20 y 200 mg a las que se agregaban 10 mL de metanol, manteniéndose la mezcla en agitación magnética durante 2 h. Seguidamente, se centrifugaba la mezcla a 5000 rpm durante 3 min y el sobrenadante se enrasaba hasta 25 mL con agua.

III.10. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Para estudiar la presencia de efecto matriz se realizó un test ANOVA para comparar las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y las obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a las diferentes muestras (dos zumos de granada y tres matrices sólidas). No se observaron diferencias significativas para el método LC-DAD como muestra la Tabla III.1. Por consiguiente, la cuantificación se llevó a cabo empleando calibración con estándares acuosos.

Tabla III.1. Pendientes^a obtenidas mediante LC-DAD (L mg⁻¹)

Muestra	GA	PC	DHBA	PGA	PGB	CG	EA
Acuosa	153±3	150±3	147±2	52±2	73±1	105±1	385±9
Zumo 1	146±4	157±7	138±10	49±3	88±10	105±2	391±13
Zumo 3	145±6	145±7	150±3	59±7	81±8	104±3	389±11
Arilos	156±3	152±6	158±4	48±4	68±5	97±9	405±15
Cáscara	158±5	141±5	136±6	45±3	79±9	98±3	405±16
Flores	150±8	158±8	144±14	58±6	81±7	110±8	403±12

^a Valor medio±desviación estándar (n=5)

Las gráficas de calibrado se obtuvieron por el procedimiento del estándar externo y análisis de regresión lineal del área de pico *versus* la concentración de analito usando cinco niveles (0,01-5 µg mL⁻¹, dependiendo del compuesto) en experimentos duplicados. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla III.2. Los valores de r² fueron satisfactorios (r²>0,99), demostrando la excelente linealidad para el intervalo estudiado.

La sensibilidad del método se evaluó calculando los LODs, para una relación señal-ruido de 3, que también se muestran en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Parámetros analíticos del método LC-DAD

Compuesto	Coefficiente regresión	Linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD ^a (%)	LOD ^{b,d} (ng mL^{-1})	LOQ ^{c,d} (ng mL^{-1})
GA	0,9992	0,02 – 5,0	3,3	6,1 (0,76)	20,3 (2,5)
PC	0,9976	0,02 – 5,0	6,3	1,8 (0,22)	5,9 (0,74)
DHBA	0,9992	0,02 – 2,5	3,2	3,8 (0,47)	12,6 (1,6)
PGA	0,9892	0,05 – 5,0	5,5	9,2 (1,10)	30,6 (3,8)
PGB	0,9977	0,05 – 5,0	2,1	8,0 (1,00)	26,7 (3,3)
CG	0,9994	0,03 – 2,0	5,0	7,9 (1,00)	26,0 (3,3)
EA	0,9950	0,01 – 2,0	10,2	2,6 (0,32)	8,6 (1,1)

^a Valor medio \pm SD (n=10). ^b Corresponde a S/N=3. ^c Corresponde a S/N=10.
^d Valores entre paréntesis son $\mu\text{g g}^{-1}$ (referido a material seco)

Se llevó a cabo un estudio de precisión en base a la repetitividad, calculando la RSD para diez análisis consecutivos de la muestra de zumo, considerando la dilución 1:10 para DHBA y CG y 1:100 para el resto de compuestos. Los valores de RSD estuvieron en el rango 2,1-10,2 %.

Por otra parte, se detectó un importante efecto matriz cuando se usó LC-ESI-TOF-MS, resultando mayores las pendientes de calibrado de los estándares acuosos para todos los analitos que las pendientes obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a las diferentes muestras. Sin embargo, la aplicación de un test ANOVA de una variable entre las pendientes obtenidas para las diferentes matrices indicó la ausencia de diferencias significativas al nivel de confianza del 95 % (Tabla III.3). Por tanto, se adoptó un método de calibración usando una matriz modelo para la cuantificación de las diferentes muestras por LC-ESI-TOF-MS. Los parámetros de calibración obtenidos por este método se muestran en la Tabla III.4.

Tabla III.3. Pendientes^a ($L\text{ mg}^{-1} \times 10^6$) de las gráficas de calibrado de adiciones estándar usando LC-ESI-TOF-MS

Muestra	GA	PC	DHBA	PGA	PGB	CG	EA
Zumo 1	5,3±0,3	2,7±0,3	2,0±0,1	0,83±0,08	0,95±0,03	32±3	22±2
Zumo 3	5,4±0,2	2,9±0,2	1,9±0,2	0,78±0,05	0,88±0,04	35±2	23±1
Arilos	5,1±0,4	2,8±0,1	2,0±0,2	0,82±0,02	0,93±0,02	33±1	26±1
Cáscara	4,7±0,4	2,7±0,1	2,0±0,1	0,80±0,02	0,96±0,08	32±1	25±1
Flores	4,9±0,3	2,6±0,5	1,8±0,1	0,77±0,03	0,93±0,04	34±1	24±2
Mesocarpio	5,1±0,2	2,9±0,3	1,9±0,1	0,85±0,01	0,86±0,02	31±2	22±2

^a Valor medio±desviación estándar (n=5)

Tabla III.4. Parámetros analíticos del método LC-ESI-TOF-MS

Compuesto	Linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coefficiente regresión	RSD ^a (%)	LOD ^{b, d} (ng mL^{-1})	LOQ ^{c, d} (ng mL^{-1})
GA	0,01 – 5,0	0,9982	5,3	0,84 (0,10)	2,8 (0,35)
PC	0,01 – 5,0	0,9976	6,0	0,27 (0,03)	0,9 (0,11)
DHBA	0,01 – 2,5	0,9990	3,3	1,4 (0,17)	4,6 (0,57)
PGA	0,02 – 5,0	0,9959	4,1	1,3 (0,16)	4,3 (0,54)
PGB	0,02 – 5,0	0,9981	3,8	0,65 (0,08)	2,2 (0,27)
CG	0,005 – 2,0	0,9963	4,9	0,16 (0,02)	0,5 (0,06)
EA	0,005 – 2,0	0,9987	5,9	0,25 (0,03)	0,8 (0,10)

^a Valor medio±desviación estándar (n=10). ^b Corresponde a S/N=3.

^c Corresponde a S/N=10. ^d Valores entre paréntesis son $\mu\text{g g}^{-1}$ de materia seca

Se obtuvo linealidad en los intervalos entre 0,005 y 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, dependiendo del compuesto. Se consiguió mayor sensibilidad para todos los polifenoles con respecto al método LC-DAD, con LODs entre 0,16 y 1,4 ng mL^{-1} . Se ha conseguido una sensibilidad

más elevada que la obtenida en trabajos previos [23,26,34]. Por otra parte, la sensibilidad obtenida por Amakura y col. [21] fue similar a la obtenida en este trabajo para EA, aunque en el método aquí propuesto el tratamiento de la muestra se ha simplificado de forma significativa.

La selectividad del método LC-DAD se comprobó por la ausencia de picos interferentes a los tiempos de retención de los analitos en los cromatogramas de las diferentes muestras. Además, los espectros UV de los polifenoles para las muestras fueron similares a los espectros para los estándares acuosos. Por tanto, se comprobó la ausencia de compuestos coeluyentes que pudieran causar interferencias en las muestras.

Para comprobar la selectividad del método LC-ESI-TOF-MS propuesto, se obtuvieron las masas exactas para todos los estándares, las muestras y las muestras fortificadas en los estudios de recuperación.

La Tabla III.5 muestra el error en las masas calculado usando como referencia la masa teórica, siendo en todos los casos inferior que el nivel de exactitud aceptado de 5 ppm para confirmación de la composición elemental [40]. La Tabla también incluye la fórmula molecular y el ión seleccionado. Además, los patrones isotópicos obtenidos cumplen las relaciones de intensidades esperadas con un error establecido de $\pm 10\%$ con respecto a las relaciones teóricas.

Tabla III.5. Masa exacta obtenida con TOF-MS

Compuesto	Composición elemental	Polaridad [ESI \pm]	Masa teórica (m/z)	Masa calculada (m/z)	Error (ppm)	Error (mDa)
GA	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	170,0215	170,0214	-0,895	-0,1521
PC	C ₃₄ H ₂₂ O ₂₂	[M-H] ⁻	782,0603	782,0583	-2,55	-1,9942
DHBA	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	154,0266	154,0265	-0,762	-0,1174
Isómeros PG	C ₄₈ H ₂₈ O ₃₀	[M-H] ⁻	1084,0665	1084,0647	-1,683	-1,8245
CG	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	634,0806	634,0778	-4,5	-2,8534
EA	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M-H] ⁻	302,0063	302,0060	-1,01	-0,3050

La Figura III.3 muestra los cromatogramas obtenidos usando LC-DAD para una muestra de zumo diluida en las proporciones 1:10 y 1:100.

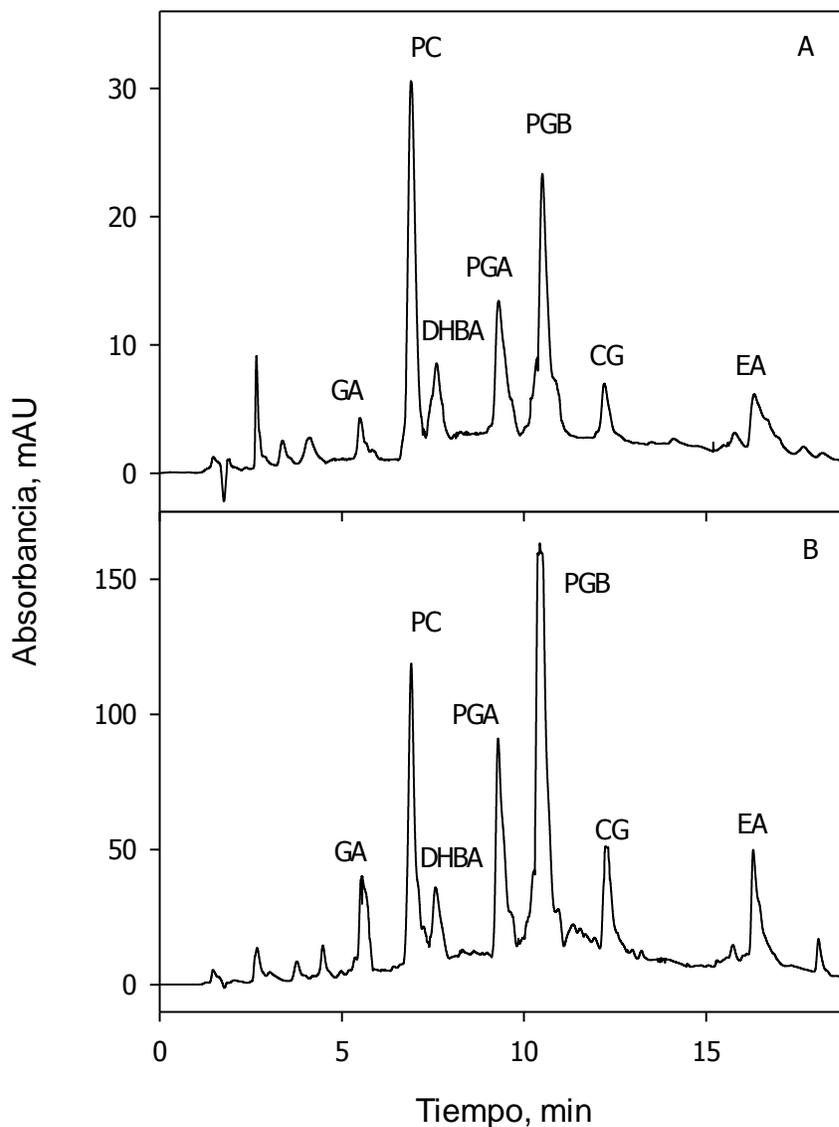


Figura III.3. Perfiles de elución obtenidos para una muestra de zumo diluida en la proporción (A) 1:100 y (B) 1:10 usando el procedimiento LC-DAD

La Figura III.4 muestra los perfiles de elución LC-ESI-TOF-MS, así como los espectros de masas obtenidos a partir de la muestra de zumo diluida en la proporción 1:100.

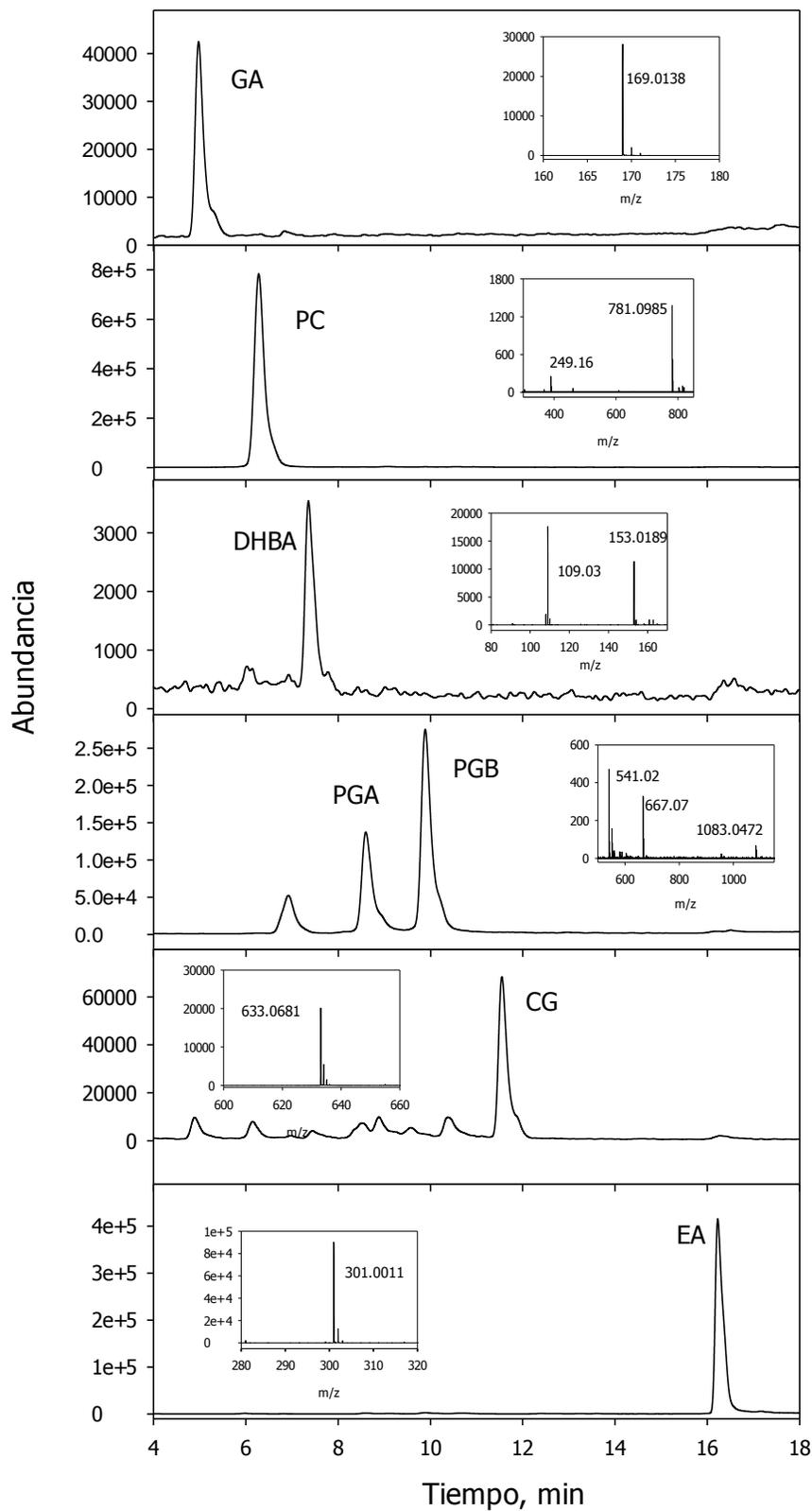


Figura III.4. EICs obtenidos mediante LC-ESI-TOF-MS mostrando el espectro de los compuestos obtenidos para una muestra de zumo diluida en la proporción 1:100

III.11. ANÁLISIS DE MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

La exactitud del método se comprobó fortificando dos zumos de granada a 5 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para DHBA y CG y 50 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para GA, PC, PGA, PGB y EA.

Las recuperaciones obtenidas se encontraron en el intervalo 87,9-110 %, con una recuperación promedio de $97,4\pm 5,4$ para LC-DAD y en el intervalo 88,2-110 %, con una recuperación promedio de $98,6\pm 5,8$ para LC-TOF-MS.

Las muestras de arilos, mesocarpio y flores liofilizadas se fortificaron también a dos niveles de concentración en el intervalo 10-100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (como materia seca). Para estas muestras, así como para los zumos de granada, se obtuvieron valores promedio de recuperación y desviación estándar similares usando LC-DAD y LC-TOF-MS, $96,4\pm 7,4$ y $92,8\pm 6,6$, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el análisis de los zumos de granada por LC-TOF-MS se muestran en la Tabla III.6.

Se puede concluir que PC, PGA y PGB se encuentran presentes a concentraciones más altas que el resto de compuestos en todas las muestras. Los componentes minoritarios son DHBA y CG.

Tabla III.6. Contenidos de polifenoles (mg L^{-1}) en zumos de granada

Compuesto	Zumo 1	Zumo 2	Zumo 3
GA	$24\pm 0,7$	$17,8\pm 1$	$11,2\pm 0,6$
PC	307 ± 8	220 ± 9	120 ± 6
DHBA	$3,8\pm 0,2$	$2,9\pm 0,2$	$1,9\pm 0,2$
PGA	162 ± 6	116 ± 3	325 ± 9
PGB	120 ± 5	130 ± 5	310 ± 6
CG	$6,5\pm 0,3$	$0,9\pm 0,1$	$6,7\pm 0,4$
EA	$27\pm 0,9$	$7,2\pm 0,6$	$14,9\pm 0,9$

Los valores corresponden al valor medio \pm desviación estándar (n=3)

Como se esperaba, no se encontraron diferencias significativas al comparar los resultados del análisis de las muestras por LC-TOF-MS y LC-DAD, como muestra la Figura III.5 para los zumos de granada.

Se obtuvieron resultados similares cuando se compararon los contenidos de polifenoles de las muestras sólidas por DAD y TOF-MS.

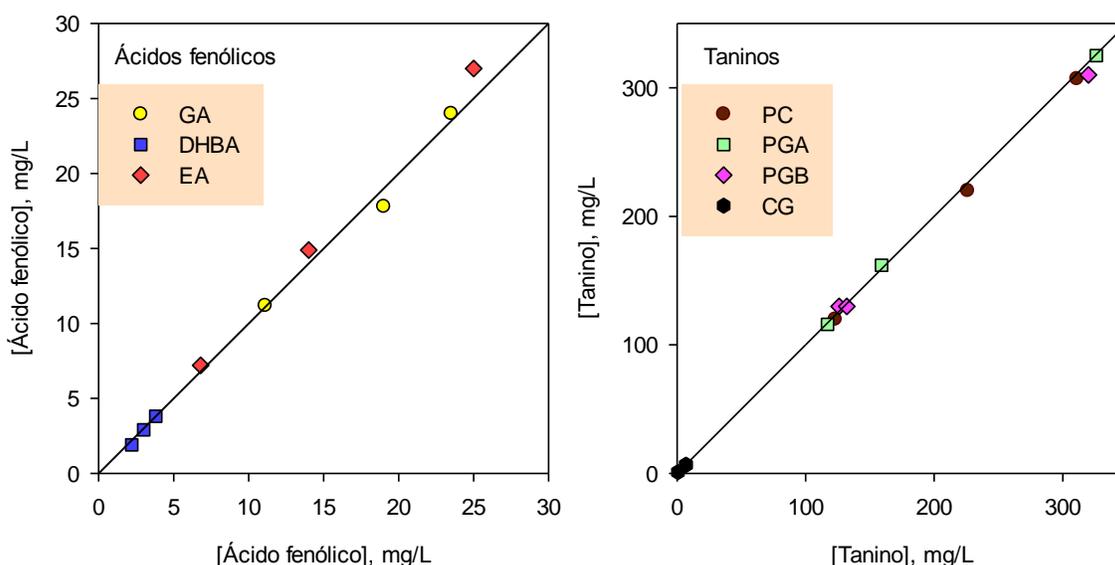


Figura III.5. Correlación de los contenidos de polifenoles encontrados en zumos de granada por LC-DAD y LC-ESI-TOF-MS

Los resultados obtenidos en la cuantificación de las muestras sólidas liofilizadas se muestran en la Tabla III.7, expresadas como materia seca (los contenidos expresados como materia fresca están entre el 60 y 83 % por encima, dependiendo del material analizado).

La cáscara es la parte de la fruta que mostró concentraciones más elevadas para los HTs, excepto para CG. Por otra parte, los niveles más altos de CG se encontraron en las flores, tallo y hojas, por encima de los valores encontrados en la fruta.

Tabla III.7. Contenidos de polifenoles (mg g^{-1}) en las diferentes partes del fruto y el árbol de la granada

Muestra	GA	PC	DBHA	PGA	PGB	CG	EA
Arilos	0,14±0,01	0,79±0,05	0,04±0,01	3,57±0,31	3,73±0,24	1,23±0,06	0,13±0,09
Cáscara	0,39±0,02	21,5±1,94	0,14±0,01	23,14±1,56	20,71±1,22	0,84±0,07	0,84±0,05
Mesocarpio	0,07±0,01	3,4±0,23	0,16±0,02	9,65±0,87	9,46±0,75	0,32±0,02	0,26±0,02
Flores	0,92±0,07	3,92±0,07	0,06±0,01	7,91±0,43	8,03±0,64	3,67±0,32	0,86±0,04
Tallo	0,48±0,03	10,4±1,28	0,07±0,01	22,82±2,84	19,63±2,16	2,21±0,76	0,42±0,02
Hojas	0,63±0,04	0,52±0,03	0,05±0,01	10,88±0,93	15,72±1,14	2,06±0,18	0,72±0,04
Valor medio±desviación estándar (n=3)							

III.12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S.U. Mertens-Talcott, P. Jilma-Stohlawetz, J. Ríos, L. Hingorani, H. Derendorf, Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum L.*) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers, *J. Agric. Food Chem* 54 (2006) 8956-8961.
- [2] M. Viuda-Martos, J.A. Fernández-López, J. Pérez-Álvarez, Pomegranate and its many functional components as related to human health: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9 (2010) 635-654.
- [3] M.G. Miguel, M.A. Neves, M.D. Antunes, Pomegranate (*Punica granatum L.*): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review, *J. Med. Plant Res.* 4 (2010) 2836-2847.
- [4] K.R. Martin, C.G. Krueger, G. Rodriguez, M. Dreher, J.D. Reed, Development of a novel pomegranate standard and new method for the quantitative measurement of pomegranate polyphenols, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 157-162.
- [5] E. Bakkalbaşı, Ö. Menteş, N. Artik, Food ellagitannins - occurrence, effects of processing and storage, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49 (2009) 283-298.
- [6] J.M. Landete, Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1150-1160.
- [7] A.P. Kulkarni, S. Mallikarjuna Aradhya, S. Divakar, Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant - punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit, *Food Chem.* 87 (2004) 551-557.
- [8] N. Seeram, R. Lee, M. Hardy, D. Heber, Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry, *Sep. Purif. Technol.* 41 (2005) 49-55.
- [9] J. Lu, Y. Wei, Q. Yuan, Preparative separation of punicalagin from pomegranate husk by high-speed countercurrent chromatography, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 175-179.

- [10] Y. Wang, H. Zhang, H. Liang, Q. Yuan, Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk, *Food Chem.* 138 (2013) 437-443.
- [11] U.A. Fischer, R. Carle, D.R. Kammerer, Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum L.*) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSn, *Food Chem.* 127 (2011) 807-821.
- [12] W. Elfalleh, N. Tlili, N. Nasri, Y. Yahia, H. Hannachi, N. Chaira, M. Ying, A. Ferchichi, Antioxidant capacities of phenolic compounds and tocopherols from Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) fruits, *J. Food Sci.* 76 (2011) C707-C715.
- [13] L.K. Ng, P. Lafontaine, J. Harnois, Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages - Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 29-38.
- [14] T.Y. Chu, C.H. Chang, Y.C. Liao, Y. Chen, Microwave-accelerated derivatization processes for the determination of phenolic acids by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 54 (2001) 1163-1171.
- [15] A. Kakasy, Zs. Füzfai, L. Kursinszki, I. Molnár-Perl, É. Lemberkovics, Analysis of non-volatile constituents in Dracocephalum species by HPLC and GC-MS, *Chromatographia* 63 (2006) S17-S22.
- [16] A. Mallouchos, G. Lagos, M. Komaitis, A rapid microwave-assisted derivatization process for the determination of phenolic acids in brewer's spent grains, *Food Chem.* 102 (2007) 606-611.
- [17] F. de Souza Dias, M.F. Silva, J.M. David, Determination of quercetin, gallic acid, resveratrol, catechin and malvidin in Brazilian wines elaborated in the vale do São Francisco using liquid-liquid extraction assisted by ultrasound and GC-MS, *Food Anal. Methods* 6 (2013) 963-968.
- [18] P. Mena, L. Calani, C. Dall'Asta, G. Galaverna, C. García-Viguera, R. Bruni, A. Crozier, D. Del Rio, Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic

- compounds in pomegranate (*Punica granatum L.*) juice by UHPLC-MSn, *Molecules* 17 (2012) 14821-14840.
- [19] L. Calani, D. Beghè, P. Mena, D. Del Rio, R. Bruni, A. Fabbri, C. Dall'Asta, G. Galaverna, Ultra-HPLC MSn (poly)phenolic profiling and chemometric analysis of juices from ancient *Punica granatum L.* cultivars: A nontargeted approach, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 5600-5609.
- [20] P. Mena, J.A. Ascacio-Valdés, A. Gironés-Vilaplana, D. Del Rio, D.A. Moreno, C. García-Viguera, Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly)phenolic compounds, *Food Chem.* 145 (2014) 327-334.
- [21] Y. Amakura, M. Okada, S. Tsuji, Y. Tonogai, High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 87-93.
- [22] J. Lu, K. Ding, Q. Yan, Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk, *Chromatographia* 68 (2008) 303-306.
- [23] B. Zhou, Z. Wu, X. Li, J. Zhang, X. Hu, Analysis of ellagic acid in pomegranate rinds by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *Phytochem. Anal.* 19 (2008) 86-89.
- [24] G. Mousavinejad, Z. Emam-Djomeh, K. Rezaei, M.H.H. Khodaparast, Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, *Food Chem.* 115 (2009) 1274-1278.
- [25] M. Cam, Y. Hişil, Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels, *Food Chem.* 123 (2010) 878-885.
- [26] M. Saraji, F. Mousavi, Use of hollow fibre-based liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of phenolic acids in fruit juices, *Food Chem.* 123 (2010) 1310-1317.
- [27] W. Qu, A.P. Breksa III, Z. Pan, H. Ma, Quantitative determination of major polyphenol constituents in pomegranate products, *Food Chem.* 132 (2012) 1585-1591.

- [28] M. Gundogdu, H. Yilmaz, Organic acid, phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars and selected genotypes, *Scientia Horticulturae* 143 (2012) 38-42.
- [29] M.I. Gil, F.A. Tomás-Barberán, B. Hess-Pierce, D.M. Holcroft, A.A. Kader, Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4581-4589.
- [30] G. Borges, W. Mullen, A. Crozier, Comparison of the polyphenolic composition and antioxidant activity of European commercial fruit juices, *Food Funct.* 1 (2010) 73-83.
- [31] U.A. Fischer, J.S. Dettmann, R. Carle, D.R. Kammerer, Impact of processing and storage on the phenolic profiles and contents of pomegranate (*Punica granatum L.*) juices, *Eur. Food Res. Technol.* 233 (2011) 797-816.
- [32] G. Borges, A. Crozier, HPLC-PDA-MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages, *Food Chem.* 135 (2012) 1863-1867.
- [33] E. Sentandreu, M. Cerdán-Calero, J.M. Sendra, Phenolic profile characterization of pomegranate (*Punica granatum*) juice by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to an electrospray ion trap mass analyzer, *J. Food Compos. Anal.* 30 (2013) 32-40.
- [34] A.M. Gómez-Caravaca, V. Verardo, M. Toselli, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, M.F. Caboni, Determination of the major phenolic compounds in pomegranate juices by HPLC-DAD-ESI-MS, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 5328-5337.
- [35] U.A. Fischer, A.V. Jaksch, R. Carle, D.R. Kammerer, Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum L.*) fruits and juices, *Eur. Food Res. Technol.* 237 (2013) 209-221.
- [36] C.V. da Silveira, M.T.S. Trevisan, J.B. Rios, G. Erben, R. Haubner, B. Pfundstein, R.W. Owen, Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia Mart*, *Food Chem. Toxicol.* 48 (2010) 1597-1606.

- [37] Q.Y. Wu, Y. Zhou, X. Jin, Y. Guan, M. Xu, L. Liu, Chromatographic fingerprint and the simultaneous determination of five bioactive components of *Geranium carolinianum* L. water extract by high performance liquid chromatography, *Int. J. Mol. Sci.* 12 (2011) 8740-8749.
- [38] A. Kumaran, R. Karunakaran, Nitric oxide radical scavenging active components from *Phyllanthus emblica* L., *Plant Foods Hum. Nutr.* 61 (2006) 1-5.
- [39] R. Colombo, A. Batista, H. Teles, G. Silva, G. Bomfim, R. Burgos, A. Cavalheiro, V. da Silva Bolzani, D. Silva, C. Pelícia, F. Guimarães, M. Heimberg, Validated HPLC method for the standarization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 573-580.
- [40] M. Mezcuca, O. Malato, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, Accurate-Mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 913-929.

CAPÍTULO IV

**EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN CON BARRAS
AGITADORAS ACOPLADA A CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA PARA EL ANÁLISIS DE FUNGICIDAS
ESTROBILURINAS EN FRUTAS**

IV.1. EXTRACCIÓN POR ADSORCIÓN CON BARRAS AGITADORAS

IV.1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La extracción por adsorción con barras agitadoras (SBSE) fue desarrollada por el grupo de Baltussen y col. [1] con el propósito de superar la limitada capacidad de extracción de las fibras SPME. La idea inicial partió del hecho de que la cantidad de analito extraído en SPME es proporcional al volumen de fase extractante, por tanto, la sensibilidad del procedimiento de extracción podría ser mejorada al aumentar el volumen de dicha fase. La patente de esta técnica es propiedad del Instituto de Investigación para la Cromatografía (Research Institute for Chromatography, RIC, Kortrijk, Bélgica) y data del año 1999.

Básicamente, la técnica consiste, del mismo modo que en SPME, en dos etapas: la extracción de los analitos en una fina capa potencialmente absorbente enlazada, que se halla recubriendo una barrita magnética agitadora, y su posterior desorción. La relación entre fase extractante y fase inicial es mucho mayor que en SPME, alcanzándose por consiguiente, valores de recuperación y de capacidad de extracción superiores. Los analitos extraídos son seguidamente desorbidos, pudiendo llevarse a cabo esta segunda etapa por dos vías diferentes:

- Desorción térmica: Aplicable si los analitos son volátiles. Este tipo de desorción ha de llevarse a cabo en un sistema de desorción especial (Sistema de Desorción Térmica, TDS), desde donde los analitos son conducidos a una columna GC [1].
- Desorción líquida: Esta modalidad de desorción se aplica cuando los analitos no son volátiles, son térmicamente inestables o simplemente no se dispone de un

TDS. Para la desorción líquida se sumerge la barrita en un disolvente o mezcla de disolventes, teniendo lugar la desorción química de los analitos previamente extraídos. El extracto líquido obtenido puede ser analizado mediante LC, GC ó CE [2].

La barra magnética viene encapsulada en una camisa o envoltura de vidrio sobre la que se encuentra el recubrimiento polimérico. La función de la barrita magnética agitadora es transferir el movimiento rotatorio de un agitador magnético a la fase líquida y así facilitar la transferencia de los analitos hasta la fase extractante. La fina envoltura de vidrio es imprescindible para el ensamblaje global del dispositivo y además evita la descomposición de la capa de extractante, que es catalizada por los metales constituyentes de la barra agitadora. Estos dispositivos se comercializan a través de la compañía Gerstel GmbH (Mülheim an der Ruhr, Alemania) y se les denomina comercialmente Twister™. La Figura IV.1 muestra un esquema de este dispositivo de extracción.

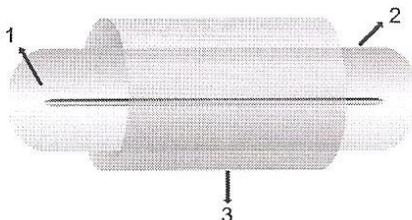


Figura IV.1. Esquema de las barras magnéticas agitadoras empleadas en SBSE: 1, barra magnética; 2, envoltura de vidrio y 3, recubrimiento de PDMS [3]

El primer polímero comercial desarrollado como recubrimiento para las barras agitadoras fue el PDMS y, durante mucho tiempo, fue el único disponible comercialmente. Este material es bien conocido como fase estacionaria en GC, es termoestable, puede ser sometido a un amplio rango de temperatura (20-320 °C) y presenta interesantes propiedades de difusión. Sin embargo, dado que el PDMS presenta carácter apolar, la extracción directa de analitos polares requiere de una etapa de derivatización de los mismos. Teniendo en consideración la limitación más importante de la SBSE que durante mucho tiempo ha sido la disponibilidad comercial de un único tipo de fase extractante, diversas investigaciones se han dirigido hacia el desarrollo de nuevos recubrimientos para

SBSE como los basados en polímeros hidrofílicos [4-6], tecnología sol-gel [7], espuma de poliuretano [8-9] o carbón activado [10].

Los llamados "Twisters de dos fases" han sido propuestos también para mejorar la recuperación de analitos polares, ya que combinan tanto absorción como adsorción [11]. Estas barras agitadoras magnéticas 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. Por otro lado, Lambert y col. llevaron a cabo la extracción de cafeína y sus metabolitos directamente desde matrices biológicas, empleando un material de acceso restringido compatible con fases conteniendo proteínas como fase extractante en SBSE, proponiendo así un método selectivo y sencillo [12]. La extracción de aniones inorgánicos se ha llevado a cabo empleando recubrimientos monolíticos para SBSE [13].

Recientemente, se ha expandido el campo de aplicación de la técnica SBSE con la comercialización de dos fases extractantes más, PA y PEG/PDMS, esta última denominada comercialmente EG/Silicone Twister™. Estos nuevos recubrimientos vienen protegidos por medio de una malla metálica, considerando su menor estabilidad respecto del PDMS. El carácter polar del PA permite la extracción directa de compuestos polares, mientras que el copolímero PEG/PDMS permite la extracción simultánea de compuestos con carácter polar (sobre todo, aquellos capaces de formar enlaces de hidrógeno como los fenoles) y de compuestos de baja polaridad (como ésteres etílicos y ácidos grasos de cadena hidrocarbonada larga), teniendo en cuenta que la matriz del copolímero es PDMS [14].

Al igual que en SPME, la barra agitadora se puede utilizar para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles desde el espacio de cabeza de la muestra (extracción por adsorción en espacio de cabeza, HSSE) y para la extracción de compuestos de baja volatilidad, por DI de la barra en la disolución de la muestra, a este último caso es común referirse simplemente como SBSE, ya que se trata del modo de extracción más ampliamente usado. El esquema básico de trabajo bajo los dos modos de extracción en SBSE queda reflejado en la Figura IV.2. Existen disponibles comercialmente dispositivos especiales para mantener la barra agitadora en el espacio de cabeza. El tiempo de vida útil

de una barra de adsorción oscila entre 20 y más de 50 extracciones, dependiendo del tipo de extracción aplicada (inmersión o espacio de cabeza) y del tipo de matriz de la muestra.

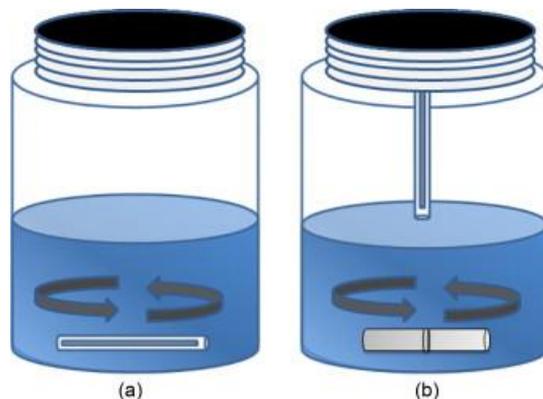


Figura IV.2. Modos de extracción en SBSE: inmersión (a) y espacio de cabeza (b) [15]

En SBSE, al igual que para SPME, los analitos son extraídos desde la matriz de la muestra hasta una fase líquida inmisible, basándose la extracción en el equilibrio de distribución entre dichas fases. A diferencia de las técnicas de adsorción, como por ejemplo SPE, donde los analitos se enlazan en los sitios activos sobre la superficie, la capacidad de extracción viene determinada por la cantidad total de fase extractante y no por el área superficial de la misma.

Las barras agitadoras comerciales recubiertas de PDMS tienen longitudes de 1 y 2 cm y el espesor del recubrimiento puede ser de 0,5 ó 1 mm, estas dimensiones proporcionan volúmenes de fase extractante comprendidos entre 25 y 125 μL . Los nuevos recubrimientos de PA y PEG/PDMS solamente existen disponibles en barras de 1 cm de longitud con volúmenes de fase extractante de 25 y 32 μL , respectivamente [16]. Alternativamente, se han diseñado otros dispositivos de extracción por SBSE con longitudes de hasta 8 cm y recubiertos de hasta 250 μL de PDMS [17], aunque no han sido comercializados.

Como ya se indicó al comienzo de este Capítulo, existen dos métodos para llevar a cabo la desorción de los analitos. Cuando SBSE se combina con GC, es preferible aplicar la desorción térmica para recuperar los analitos absorbidos en la barra de agitación. Este tipo

de desorción no solamente evita el uso de disolventes orgánicos, sino que además permite la transferencia total de los analitos al sistema cromatográfico. La desorción térmica se lleva a cabo a temperaturas entre 150 y 300 °C, siendo mayor la duración (hasta 15 min) que en SPME. Ya que la cantidad de fase extractante es mayor en SBSE, el proceso de desorción es más lento que en las fibras de SPME. Si bien la desorción térmica de las fibras de SPME no requiere ningún accesorio instrumental adicional, ya que tiene lugar directamente en el puerto de inyección del GC, no es así para SBSE, que requiere un módulo para llevar a cabo la desorción térmica (TDS).

El proceso global de desorción térmica se lleva a cabo de forma totalmente automatizada en el TDS, que consiste básicamente en dos inyectores de vaporización de temperatura programable (PTV) conectados en serie. El primero consta de un tubo en el que se introduce la barra magnética agitadora para llevar a cabo la desorción térmica propiamente dicha. Los analitos desorbidos son arrastrados al segundo PTV. Este se mantiene a temperaturas bajas (de hasta -150 °C) para retener los analitos desorbidos en el primer PTV. Una vez finalizada la desorción en el primer PTV, se procede a aumentar la temperatura del segundo, siendo así introducidos los analitos en la columna cromatográfica por un flujo de gas.

La Figura IV.3 muestra un esquema de la unidad de desorción térmica comercial. En caso de no disponerse de TDS, si se va a emplear GC para llevar a cabo las medidas instrumentales, se emplea el modo de inyección de grandes volúmenes (LVI) por medio de PTV [18].

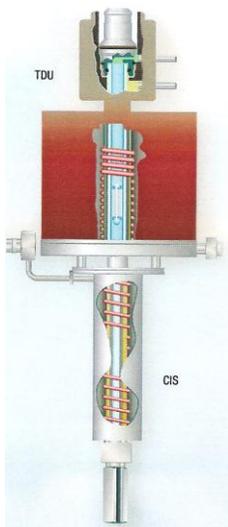


Figura IV.3. TDS para SBSE comercializado por Gerstel [19]

IV.1.2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE SBSE

Considerando PDMS como fase extractante, que además fue la única disponible comercialmente durante mucho tiempo, SBSE se basa en el mismo principio que SPME, un reparto del soluto entre la matriz acuosa de la muestra y la fase extractante, controlado por el coeficiente de partición correspondiente. Este coeficiente de partición ha sido relacionado con el coeficiente de distribución octanol-agua, $K_{o/w}$ [20-21]. Aunque no es del todo correcto, $K_{o/w}$ predice con gran acierto si un soluto va a ser extraído mediante SBSE así como la eficiencia de extracción del mismo [22]. El coeficiente de distribución entre PDMS y la fase acuosa, $K_{PDMS/w}$, se define como la relación entre la concentración del soluto en la fase PDMS, C_{PDMS} , y en la fase acuosa, C_w , en el equilibrio. Esta relación es igual a la relación de masa de soluto en PDMS, m_{PDMS} , y en la fase acuosa, m_w , multiplicada por la relación de volúmenes, β , como se muestra en la ecuación IV.1:

$$K_{o/w} \approx K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \beta \quad (IV.1)$$

A través de la ecuación IV.1 queda reflejado el hecho de que el equilibrio de absorción depende de la cantidad de fase extractante, como anteriormente se ha indicado.

La recuperación, expresada como la relación entre la masa de soluto extraído, m_{PDMS} , y la masa que originalmente existía en la fase acuosa ($m_0 = m_w + m_{PDMS}$), depende del coeficiente de distribución $K_{PDMS/w}$ y de β (ecuación IV.2):

$$\frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{K_{PDMS/w} / \beta}{1 + (K_{PDMS/w} / \beta)} = \frac{K_{PDMS/w}}{K_{PDMS/w} + \beta} \quad (IV.2)$$

A partir de la ecuación IV.2 es posible calcular la recuperación teórica para un soluto del que se conoce su $K_{o/w}$ considerando un determinado valor de β . Obsérvese que solamente dos términos afectan a la recuperación del soluto: $K_{PDMS/w}$ y β . A mayor $K_{PDMS/w}$, manteniendo constante el valor de β , mayor será la recuperación (Figura IV.4a). Por otra parte, a mayor volumen de fase acuosa, mayor será β y menor la eficiencia de extracción, para un valor constante de $K_{PDMS/w}$ (Figura IV.4b).

Según los datos mostrados en las Figuras IV.4a y IV.4b, las recuperaciones son mejores cuando se usan relaciones de volúmenes pequeñas para extraer compuestos de baja polaridad.

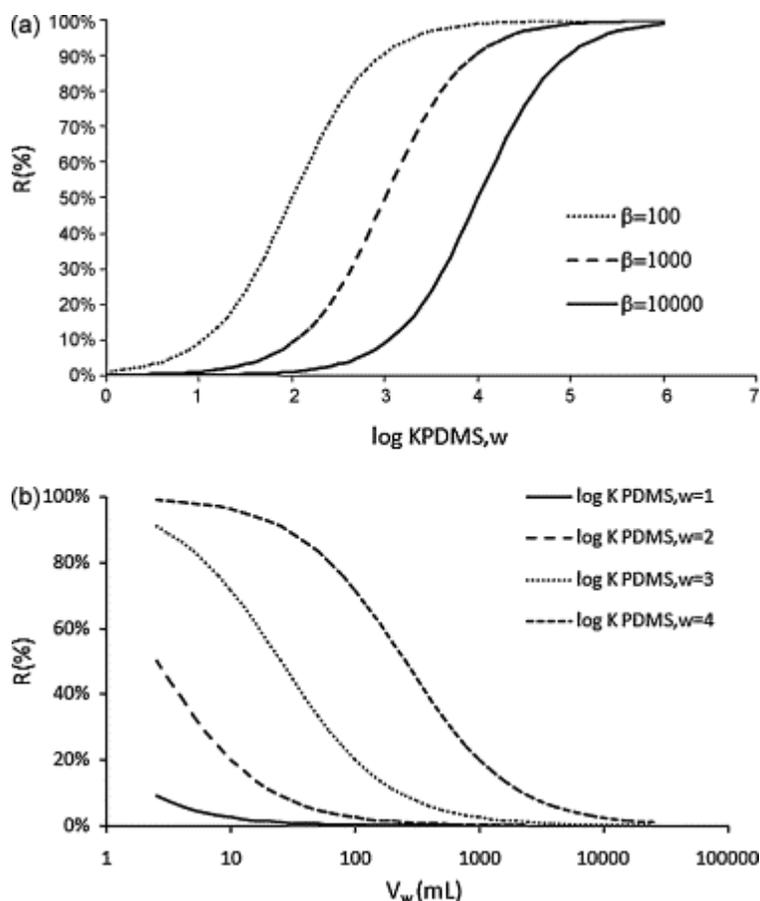


Figura IV.4. Recuperación teórica obtenida en función (a) de $K_{PDMS/w}$ a relaciones de volúmenes constantes y (b) del volumen de fase acuosa para un V_{PDMS} de 25 μL y una concentración inicial de analito en la fase acuosa de 1 ng mL^{-1} [15]

Mientras que en SBSE el volumen de fase extractante menor es de 25 μL , en SPME el volumen de la fibra es del orden de 0,5 μL , lo que significa que en las condiciones más habituales de extracción (10 mL de fase acuosa), β toma un valor aproximado de 400 para SBSE y de 20000 para SPME y, por tanto, las recuperaciones son mucho más altas con SBSE. En el caso de usar fibras de PDMS en SPME, las recuperaciones son muy bajas para analitos con $K_{o/w}$ inferiores a 10^4 . Sin embargo, en SBSE, al contener mayor cantidad de PDMS (entre 50 y 250 veces más), se consigue la recuperación cuantitativa de analitos, de modo que una barra magnética recubierta con 100 μL de PDMS, que no corresponde al valor máximo, puede extraer cuantitativamente solutos con valores de $K_{o/w}$ mayores de 500 para valores de β igual a 100 [17,21-22]. En la Fig. IV.5 queda patente que en SBSE el 100 % de extracción se alcanza con valores mucho más bajos de $K_{o/w}$ que en SPME.

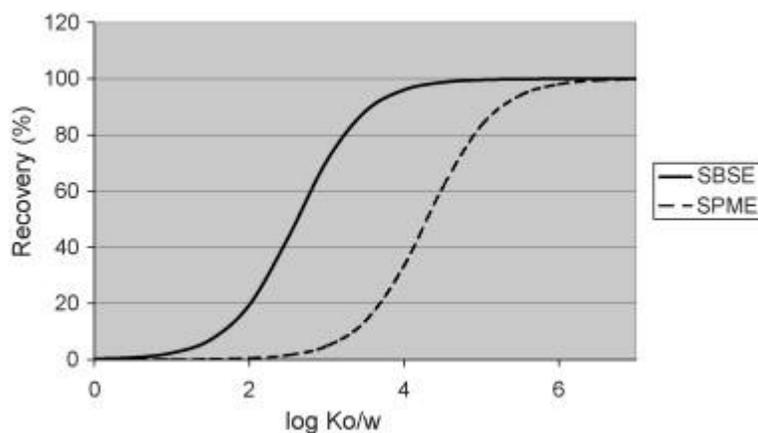


Figura IV.5. Recuperación teórica en función del log $K_{o/w}$ del analito para SPME (0,5 μ L PDMS) y para SBSE (25 μ L) y un volumen de muestra de 10 mL, alcanzando el equilibrio de extracción [17]

Las recuperaciones teóricas en el equilibrio pueden calcularse usando programas informáticos para un soluto dado, considerando unos volúmenes determinados de muestra y de fase extractante [17].

IV.1.3. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCEDIMIENTO SBSE

El proceso SBSE se puede ver afectado por una serie de factores experimentales que pueden modificarse para incrementar la eficacia del proceso de extracción. Estos factores van a ser detallados a continuación distinguiendo las dos etapas principales del proceso SBSE: etapa de extracción y etapa de desorción.

IV.1.3.1. Etapa de extracción

Los parámetros que deben optimizarse en la etapa de extracción en SBSE son análogos a los de SPME. Durante la extracción, la barra agitadora recubierta con el polímero se pone en contacto con los solutos por inmersión en la disolución acuosa, que es agitada hasta alcanzar el equilibrio de partición, o se mantiene en la atmósfera en contacto con la muestra, en caso de aplicarse HSSE. El tiempo de extracción viene determinado por la cinética del proceso, que a su vez depende del volumen de fase

acuosa, velocidad de agitación de la muestra, temperatura y dimensiones de la fase extractante, debiéndose optimizar estos parámetros para cada aplicación particular.

Las variables más importantes que afectan a la eficiencia de extracción en SBSE son: tiempo de extracción, pH, fuerza iónica, adición de modificador orgánico y velocidad de agitación. Otras variables a considerar, aunque de menor importancia, son: temperatura, volumen de muestra, volumen de fase extractante y dilución de la muestra.

pH de la disolución de muestra. El pH de la disolución influye en la eficiencia de extracción de aquellos analitos que tienen propiedades ácidas o básicas. En estos casos, se ajusta el pH de modo que el soluto se encuentre parcial o totalmente en forma no iónica. Sin embargo, no se recomienda nunca trabajar a valores de pH inferiores a 2 ni superiores a 9, para evitar la degradación del polímero extractante, cuando se va a emplear el modo de extracción por DI.

Efecto de la adición de sales. La adición al medio de extracción de sales inertes, como cloruro sódico, con el fin de modificar la fuerza iónica de la disolución, de forma general ha incrementado la eficiencia de extracción en SBSE para analitos de elevado carácter polar, al reducirse su solubilidad en la fase acuosa. Cuando los compuestos a extraer presentan baja polaridad ($\log K_{o/w} > 3,5$), la adición de sal no mejora la eficiencia de extracción o, en algunos casos, puede llegar a reducirla. En la bibliografía se encuentran distintas explicaciones para esta disminución en la eficiencia de extracción [15]:

- el "efecto aceite" provocado por la presencia de sal que promueve el movimiento de los compuestos apolares hacia la superficie de la disolución acuosa,
- el aumento de la viscosidad de la disolución que ralentiza la cinética de extracción de los compuestos,
- la ocupación parcial de la superficie del polímero extractante por sales iónicas o
- interacciones electrostáticas o de pares de iones entre los analitos y la sal.

Sin embargo, en cada caso particular se recomienda estudiar el comportamiento de los compuestos a analizar en presencia de distintas concentraciones de sal, ya que se han encontrado conductas contrarias a las anteriormente descritas.

Influencia de la adición de modificadores orgánicos. La adición al medio de extracción de modificadores orgánicos como metanol o acetonitrilo puede reducir la adsorción de los analitos sobre las paredes internas de los recipientes de vidrio. Sin embargo, la presencia de estos modificadores puede aumentar la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, disminuyendo por tanto la eficiencia de extracción. De forma general, el modificador orgánico :

- evita la adsorción de los analitos sobre el vidrio, si estos presentan valores de $\log K_{o/w}$ superiores a 5,
- mientras que aumenta la solubilidad en la fase acuosa de compuestos cuyo $\log K_{o/w}$ es inferior a 2,5.

Si bien la adición de metanol ha mejorado la eficiencia de extracción de compuestos como PAHs, PBDEs ó bifenilos polibromados (PBBs), se ha detectado un efecto contrario para pesticidas organofosforados de elevado carácter polar. Además, para algunos compuestos se observa un incremento en la eficiencia de extracción para concentraciones bajas de metanol, disminuyendo al adicionar cantidades mayores del disolvente orgánico [15]. En consecuencia, igual que ocurre con el efecto de las sales inertes, la adición de modificadores orgánicos debe ser experimentalmente estudiada para cada caso particular.

Temperatura de extracción. Otra variable importante a considerar es la temperatura a la que se mantiene la disolución de muestra. El equilibrio de extracción se alcanza más rápidamente a temperaturas elevadas; sin embargo, el coeficiente de partición $K_{o/w}$ disminuye al aumentar la temperatura. Además, algunos autores han detectado un acortamiento en la vida útil de la fase extractante (PDMS) cuando la etapa de extracción se lleva a cabo a temperaturas superiores a 40 °C. En este sentido, varios estudios han encontrado un aumento en la eficiencia de extracción al trabajar a temperaturas de hasta 40-60 °C, y disminución si las temperaturas aplicadas excedían los 70 °C. Si bien la eficiencia de extracción mejora al incrementar la temperatura, sobre todo para analitos volátiles extraídos desde el espacio de cabeza, también se recomienda su estudio en cada caso concreto.

Velocidad de agitación de la disolución. La velocidad de agitación puede acelerar la extracción y, por tanto, incrementar la señal analítica para un tiempo de extracción fijo.

Este comportamiento se explica considerando que al aumentar la velocidad de agitación, disminuye el espesor de la capa de difusión adyacente a la fase extractante. Sin embargo, si se aplican agitaciones muy rápidas, la fase polimérica de la barra de extracción puede sufrir daños físicos por contacto directo con el fondo del vial de extracción. Algunos autores han encontrado un aumento de la sensibilidad al aplicar velocidades de agitación entre 500 y 750 rpm, no observando variaciones a velocidades mayores. Otros autores han detectado un descenso en la extracción al agitar a velocidades superiores a 750 rpm, aunque se han llegado a encontrar eficiencias de extracción elevadas agitando a altas velocidades (1000-1250 rpm) [15].

Volumen de disolución de muestra. Como ya se indicó anteriormente, la cantidad total de soluto extraída depende de la relación de volúmenes de las fases implicadas ($\beta = V_w/V_{PDMS}$). Si nos centramos en el volumen de muestra, la eficiencia de extracción disminuye cuando se trabaja con grandes volúmenes de muestra, aunque la señal analítica obtenida de la medida instrumental aumente, como consecuencia del incremento de la masa de analito extraída. Esta predicción se cumple para analitos de baja polaridad ($\log K_{o/w} > 3,5$), mientras la influencia del volumen de muestra es mínima para analitos polares [23]. En general, el volumen de muestra suele ser del orden de 10 mL.

Volumen de fase extractante. Según el principio teórico de SBSE, el volumen de PDMS también influye en la eficiencia de extracción. Sin embargo, se recomienda optimizar en cada caso concreto este parámetro pues se han observado distintos comportamientos: desde no verse afectada la sensibilidad del procedimiento al emplear los cuatro volúmenes distintos de PDMS disponibles comercialmente (de 25 a 125 μ L) [24], hasta observarse un aumento de sensibilidad importante con el volumen de PDMS para analitos de alta polaridad, mientras que dicho aumento fue muy pequeño para analitos apolares [25].

Tiempo de extracción. El tiempo de extracción se estudia generalmente cuando el resto de variables han sido fijadas y siempre buscando que se alcancen las condiciones de equilibrio, ya que estas garantizan la máxima sensibilidad, así como la mejor precisión. Sin embargo, en ocasiones se prefiere sacrificar sensibilidad y precisión con objeto de disminuir el tiempo de análisis, adoptando tiempos de extracción para los que no se ha

alcanzado el equilibrio. En general, los tiempos de extracción aplicados se hallan en el intervalo de 1 a 6 horas.

Tras la extracción, se retira la barra SBSE de la disolución acuosa con ayuda de unas pinzas o tenacillas, se lava con agua microfiltrada, para eliminar azúcares, proteínas, sales u otros componentes de la disolución de extracción que pudiesen haber sido adsorbidos, y se seca con un pañuelo que no libere fibras. La limpieza de las barras con el pañuelo no supone pérdidas de analito ya que este se halla absorbido dentro de la fase extractante y no adsorbido sobre su superficie.

IV.1.3.2. Etapa de desorción

Esta etapa puede llevarse a cabo de dos modos diferentes: desorción térmica y desorción líquida.

Desorción térmica

La temperatura aplicada al primer PTV para la desorción propiamente dicha depende de la volatilidad de los analitos y normalmente se encuentra entre 150 y 300 °C. Generalmente se observa un aumento de la señal analítica al incrementar la temperatura; sin embargo, algunos autores optan por no seleccionar la máxima temperatura de trabajo recomendada por el fabricante, con el fin de alargar la vida útil de las barras de agitación, así como para minimizar posibles variaciones en la línea base. De forma similar, el tiempo de desorción generalmente presenta un efecto positivo sobre la señal analítica o simplemente no es significativo, aunque generalmente se fija en valores altos con objeto de minimizar los posibles efectos de memoria en análisis sucesivos. Los tiempos normalmente aplicados oscilan entre 5 y 15 min, manteniendo un flujo de helio de entre 10 y 50 mL min⁻¹ [15]. Algunos autores proponen etapas de desorción de larga duración y a temperaturas no elevadas, para preservar la fase extractante. No obstante, se recomienda optimizar estas variables para cada caso particular.

Mientras los analitos están siendo desorbidos en el primer PTV, se mantiene el segundo inyector a una temperatura baja, de unos -150 °C si se dispone de corriente de nitrógeno para criogenización. Una alternativa para analitos de no muy alta volatilidad es el uso de sistemas Peltier para enfriar el segundo PTV, aunque en este caso las

temperaturas de enfriamiento son cercanas a la temperatura ambiente. El atrapamiento o focalización de los analitos antes de entrar en la columna cromatográfica mejora notablemente la sensibilidad, a la vez que minimiza la anchura de los picos cromatográficos. La temperatura de atrapamiento de los analitos en el segundo inyector, así como la de su posterior desorción también son variables a estudiar en cada caso.

Desorción líquida

Las variables más importantes a considerar en la optimización de la desorción líquida son: naturaleza del disolvente, volumen del mismo, así como temperatura y tiempo de desorción [15].

Los disolventes más empleados son acetonitrilo, metanol, agua, disoluciones reguladoras o mezclas de los mismos. Recientemente, se ha ensayado la adición de líquidos iónicos como modificadores del disolvente de desorción, empleando barritas de agitación recubiertas en el laboratorio con una película de metacrilato de metilo/dimetilacrilato de etilenglicol y PDMS Twister™ [26].

El volumen de disolvente ha de garantizar la inmersión total de la fase extractante. Con el fin de minimizar el consumo de disolvente, es común llevar a cabo la desorción líquida en un inserto de vidrio de 250 μL , que se acopla a los viales comunes de 2 mL empleados para inyección de muestras por medio del muestreador automático. Así pues, los volúmenes de disolvente generalmente se encuentran en el intervalo de 100 a 200 μL , cuando se emplea el inserto de vidrio y hasta 5 mL cuando no se usa este.

Los tiempos de desorción generalmente aplicados a temperatura ambiente oscilan entre 5 y 10 min, aunque en la bibliografía encontramos tiempos de 30 min [27] y hasta 1 hora [28] dependiendo del tipo de recubrimiento de la barrita y de la naturaleza de los analitos, entre otros factores. La agitación mecánica, la aplicación de ultrasonidos o temperaturas de entre 50 y 70 °C han conducido en determinados casos a acortar la etapa de desorción.

IV.1.4. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN SBSE. EFECTO MATRIZ

Como ocurre con otras técnicas de preparación de muestra para análisis de trazas, la eficiencia de extracción en SBSE puede verse seriamente afectada por la complejidad de

la matriz de la disolución de la muestra. Se han descrito interferencias provocadas por materia de carácter orgánico e inorgánico, disuelta o suspendida. Del mismo modo, en alimentos, la variabilidad de la fuerza iónica, pH, contenido en grasas, azúcares, etc. provoca que la eficiencia de extracción varíe mucho de una muestra a otra.

Un modo de minimizar el efecto matriz es el uso de estándares internos adecuados, añadidos a la muestra desde el comienzo del proceso analítico. Si la eficiencia de extracción disminuye para el analito y para el estándar interno en una extensión similar, la señal del estándar interno puede emplearse para compensar el efecto matriz. En este sentido, los estándares internos marcados isotópicamente son ideales. Aunque, en ciertos casos, el uso de este tipo de estándares no compensa el efecto matriz. Otra forma de minimizar el efecto matriz, es la aplicación del método de adiciones estándar a las muestras para su cuantificación, aunque suele evitarse por ser tedioso cuando el número de muestras bajo análisis es elevado. Si el efecto matriz es similar en las muestras estudiadas, es posible calibrar empleando una matriz seleccionada como modelo. Sin embargo, aún cuando es posible llevar a cabo la cuantificación de las muestras aunque presenten efecto matriz, siempre es recomendable eliminar esos compuestos que lo provocan ya que su presencia reduce la sensibilidad del método. Cuando se analizan muestras con contenidos analíticos muy bajos, es posible obtener resultados negativos falsos.

Por otra parte, lógicamente se puede llevar a cabo la cuantificación frente a patrones externos cuando las muestras no presentan efecto matriz, lo que normalmente ocurre con muestras de matrices muy simples, como por ejemplo aguas [15].

IV.1.5. APLICACIONES DE SBSE

La técnica de extracción-preconcentración SBSE ha sido aplicada al análisis de muy diferentes tipos de muestras que incluyen desde alimentos, muestras ambientales, fármacos y muestras biomédicas [15,29-30]. En estas muestras, no solamente han sido cuantificados de forma directa analitos de carácter apolar empleando los recubrimientos convencionales de PDMS, sino que la implicación de etapas de derivatización o el desarrollo de nuevos recubrimientos ha permitido también la cuantificación de analitos

polares. Además, la reciente incorporación en el mercado de los nuevos recubrimientos polares (PA y EG/Silicona) expandirá aún más el campo de aplicación de la técnica SBSE.

IV.2. LOS PLAGUICIDAS

Según la FAO, se entiende por plaguicida, cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluyendo los sectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas y animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que puedan administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas (PGRs), defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de la fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte [31].

Los plaguicidas se utilizan tanto en agricultura como en salud pública en la lucha contra enfermedades de transmisión. La actividad en la que el consumo de plaguicidas es mayor es la agricultura, aunque también se utilizan importantes cantidades en el sector forestal, en ganadería y en jardinería.

Los plaguicidas presentan composiciones muy variadas, pudiéndose clasificar desde distintos puntos de vista. La clasificación más básica consiste en dividirlos en orgánicos e inorgánicos [32]:

- Plaguicidas orgánicos: Incluyen los derivados halogenados, compuestos organofosforados, carbamatos, derivados de la urea y compuestos heterocíclicos.
- Plaguicidas inorgánicos: Incluyen los insecticidas fluorados, insecticidas arsenicales, fungicidas inorgánicos y fumigantes halogenados alifáticos.

Los plaguicidas se usan para muchos propósitos diferentes. Los productos químicos usados en el control de invertebrados incluyen insecticidas, molusquicidas para el control de caracoles y babosas y nematocidas para el control de lombrices microscópicas. Los

vertebrados son controlados por rodenticidas que matan a los roedores, los avicidas se usan para repeler a los pájaros y los piscidas son usados para el control de los peces indeseables en estanques o granjas acuícolas. Los herbicidas se usan para matar plantas indeseables o maleza, aplicándose como reguladores de crecimiento, defoliantes y desecantes de las plantas para varios propósitos durante el cultivo de especies deseables. Los fungicidas se usan contra los hongos, los bactericidas contra las bacterias y los alguicidas contra las algas.

La producción de insecticidas ha permanecido casi constante durante las últimas tres o cuatro décadas. Sin embargo, los fungicidas e insecticidas son los plaguicidas más importantes con respecto a la exposición humana a través de los alimentos porque se aplican poco antes o incluso después de las cosechas.

IV.2.1. DINÁMICA DE LOS PLAGUICIDAS EN EL MEDIO AMBIENTE

Los efectos que puede causar el uso indiscriminado de plaguicidas sobre los cultivos se clasifican en: agro-ecológicos, ecológico-ambientales, de salud y económicos. Las consecuencias agro-económicas se refieren a efectos sobre los cultivos, principalmente envenenamiento o efecto indirecto sobre enemigos naturales, estímulo de reproducción de la plaga, desarrollo de resistencia y destrucción de animales polinizadores. Los efectos ecológico-ambientales hacen referencia a contaminación de ecosistemas ambientales, especialmente cauces de ríos y suelos.

El comportamiento de un plaguicida en el ambiente está directamente relacionado con las propiedades físico-químicas de su molécula, los mecanismos de transporte implicados, así como las características medioambientales y la geografía del lugar donde se halle. De hecho, debido a la gran complejidad y cantidad de datos requeridos, los científicos no siempre pueden predecir exactamente lo que ocurrirá con el plaguicida cuando entre en el medio ambiente. A este problema, se suma el hecho de que los datos obtenidos en los estudios científicos de predicción del comportamiento son calculados a partir de condiciones de laboratorio controladas y con cantidades conocidas de plaguicida, cuestiones que no pueden controlarse en la naturaleza. Aún así, se han determinado los factores que afectan a la degradación y persistencia de los plaguicidas en el medio ambiente [33]:

- Presión de vapor: Este parámetro mide la volatilidad de una sustancia química en estado puro y es un factor determinante de la velocidad de volatilización al aire desde suelos o aguas superficiales. La presión de vapor está directamente relacionada con la temperatura a través de una relación de proporcionalidad directa.
- Constante de la Ley de Henry: Describe la tendencia de un plaguicida a volatilizarse desde el agua o suelo húmedo.
- Persistencia: Se define como la capacidad de cualquier plaguicida para retener sus características físicas, químicas y funcionales en el medio en el que es transportado o distribuido, durante un período limitado después de su emisión.
- Vida media: Se define como el tiempo requerido para que la mitad del plaguicida presente después de una aplicación se descomponga en productos de degradación. La descomposición depende de varios factores como la temperatura, el pH del medio, los microorganismos presentes en el medio, clima, así como la exposición a la luz, agua y oxígeno.
- Solubilidad en agua: Indica la máxima masa de un plaguicida que se disuelve por unidad de volumen de agua, y generalmente varía de 1 a 10^5 ppm. Los plaguicidas muy solubles en agua presentan muy baja afinidad para adsorberse sobre los suelos y, por tanto, son fácilmente transportados alcanzando las masas de aguas superficiales y subterráneas.
- Coefficiente de adsorción de carbono orgánico: Es una medida de la tendencia del plaguicida a adsorberse en los suelos o sedimentos.
- Coefficiente de partición octanol/agua: Es una medida de la distribución del plaguicida entre dos disolventes inmiscibles, el agua (de carácter polar) y el octanol (relativamente no polar, que representa las grasas). Este parámetro se usa frecuentemente para predecir los modelos de distribución de una sustancia química en tejido de grasa animal.

Una vez que los plaguicidas son incorporados a suelos o vegetales, estos pueden pasar a las masas hídricas o a los cursos de agua por diferentes caminos [34]:

- Aplicación directa, por ejemplo, tras su administración en orillas de ríos o zonas pantanosas.
- Escorrentía superficial debido a las lluvias.
- Infiltración hacia los acuíferos.
- Arrastre por erosión.
- Transporte atmosférico, en tratamientos aéreos.

IV.2.2. TOXICIDAD DE LOS PLAGUICIDAS

Los efectos ecológicos de los plaguicidas en el agua o alimentos están determinados por los siguientes criterios:

A. Toxicidad: Puede definirse como la capacidad inherente del plaguicida para producir daños. Por lo que a sus efectos más inmediatos se refiere, se consideran tres tipos de toxicidad, siendo obligatoria su determinación de forma previa a la presentación del plaguicida en el mercado:

- Toxicidad oral aguda: Expresada en términos de Dosis Letal Media (DL-50), que significa la concentración que provoca la muerte de la mitad de los organismos de ensayo durante un período especificado de prueba. Esta dosis se expresa, normalmente, en miligramos por kg de peso del animal ensayado. Cuanto más baja sea la DL-50, mayor es la toxicidad del plaguicida.
- Toxicidad dérmica: Se refiere a los riesgos tóxicos debidos al contacto y absorción del plaguicida a través de la piel. Al igual que la anterior se expresa en términos de DL-50 y en mg/kg de peso. Estos ensayos se efectúan por aplicación del producto sobre la piel afeitada del animal ensayado que puede ser el conejo o la rata.
- Toxicidad crónica: A través de dietas alimentarias preparadas con dosis variadas del tóxico que se estudia, se averiguan los niveles de riesgo del plaguicida al ser administrado diariamente a los animales de ensayo a lo

largo del tiempo. Generalmente, los ensayos duran un par de años, aunque también se hacen a más corto plazo. En este tipo de estudios se busca el denominado Nivel Sin Efecto (NSE) que representa aquella cantidad de pesticida que, ingerida diariamente durante todo el tiempo de duración del ensayo, no produce ningún efecto tóxico, ni dañino, ni anomalía alguna en el animal estudiado.

- Las tres toxicidades anteriormente citadas deben considerarse básicas, pero además es también práctica habitual considerar otras clases de riesgos como son:
 - Toxicidad por inhalación: expresada como CL-50 (Concentración letal media).
 - Efectos en piel, ojos y sensibilización dérmica.
 - Neurotoxicidad. Los estudios sobre neurotoxicidad se realizan sobre gallinas, por ser los animales más sensibles a este efecto.
 - Mutagénesis, carcinogenia. La determinación del poder mutagénico de un producto se lleva a cabo sobre microorganismos como *Escherichia sp.* o *Salmonella sp.*
 - Reproducción, teratogenia. Estos estudios se realizan sobre tres generaciones de ratas, a las que se alimenta con dietas conteniendo el plaguicida en dosis variadas.

B. Persistencia: se define como el tiempo necesario para que la concentración ambiental del plaguicida disminuya en un 50 %. La persistencia está determinada por procesos bióticos y abióticos de degradación. Los procesos bióticos son la biodegradación y el metabolismo, mientras que los abióticos son, principalmente, hidrólisis, fotólisis y oxidación.

C. Destino o comportamiento (ambiental): Depende de la afinidad natural del producto químico con respecto a uno de los cuatro compartimentos ambientales: materia sólida, líquida, gaseosa y biota. Para prever la evolución ambiental del plaguicida se determinan los siguientes parámetros: coeficiente de adsorción del suelo, solubilidad, constante de Henry y K_{ow} .

D. Productos degradados: El proceso de degradación puede conllevar la formación de estos productos, cuya toxicidad puede ser menor, igual o mayor que la del plaguicida original.

IV.2.3. EFECTOS ECOLÓGICOS DE LOS PLAGUICIDAS

Los efectos ecológicos de los plaguicidas son muy variados y están con frecuencia interrelacionados. Se considera que los efectos producidos en los organismos y en el medio ambiente constituyen una advertencia de las posibles repercusiones en la salud humana. Los principales tipos de efectos se enumeran a continuación, variando según el organismo investigado y el tipo de plaguicida. Los distintos plaguicidas provocan efectos muy diferentes en la vida acuática, por lo que es difícil formular afirmaciones de alcance general. Es importante destacar que muchos de estos efectos son crónicos (no letales), y pasan con frecuencia desapercibidos para el observador aunque pueden tener consecuencias en toda la cadena trófica. Algunos de estos efectos son:

- Muerte del organismo.
- Cáncer, tumores y lesiones en peces y animales.
- Inhibición o fracaso reproductivo.
- Supresión del sistema inmunitario.
- Efectos teratogénicos.

En reconocimiento del uso indebido de plaguicidas y de sus efectos sobre el medio ambiente y la salud pública, los países europeos han adoptado diversas medidas entre las que figuran [35]:

- Reducción del uso de plaguicidas.
- Prohibición de determinados ingredientes activos.
- Revisión de los criterios de registro de plaguicidas.
- Capacitación y necesidad de licencias para las personas que aplican los pesticidas.

- Reducción de la dosis y mejor programación de la aplicación de plaguicidas para atenderse mejor a las necesidades de los cultivos y reducir las pulverizaciones preventivas.
- Comprobación y aprobación del equipo de pulverización.
- Limitaciones de la pulverización aérea.
- Promoción del uso de alternativas mecánicas y biológicas en sustitución de los plaguicidas.

IV.3. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS FUNGICIDAS ESTROBILURINAS

Las estrobilurinas son una clase importante de fungicidas que han tenido un enorme impacto en la agricultura. Entre las estrobilurinas se encuentran metominostrobin, kresoxim-metilo, trifloxistrobin y azoxistrobin, y las más recientes, picoxistrobin, dimoxistrobin y piraclostrobin. Estas últimas son derivados sintéticos del compuesto natural estrobilurina A, que proviene principalmente del hongo *Strobilurus tenacellus* [36]. Como fungicidas, poseen altos niveles de actividad frente a un amplio rango de enfermedades de los cultivos, lo cual permite que se puedan controlar combinaciones de infecciones, usando sólo un fungicida específico, tarea que antes solo era posible con la mezcla de uno o más fungicidas.

La forma de actuar de estos fungicidas consiste en inhibir la respiración mitocondrial del hongo, interrumpiendo el ciclo energético y la producción de trifosfato de adenosina (ATP) [37]. Se han establecido los niveles de plaguicidas permitidos en aguas de consumo humano [38].

La Tabla IV.1 muestra las estructuras químicas así como las fórmulas empíricas y los nombres asignados por la IUPAC a los diferentes fungicidas analizados.

La Tabla IV.2 muestra valores de los factores que afectan a la degradación y persistencia en el medio ambiente [33] para los fungicidas objeto de estudio en este Capítulo. Por último, la Tabla IV.3 presenta los datos de toxicidad de los siete fungicidas objeto de análisis [39-40].

Tabla IV.2. Parámetros que afectan a la degradación y persistencia en el medio ambiente de las estrobilurinas

Análito	Solubilidad en agua 20°C (mg L ⁻¹)	pK _{o/w}	Presión de vapor, 25°C (mPa)	Constante Henry 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹)	Vida media (días)			
					En suelo	Acuoso fotólisis, pH 7	Acuoso hidrólisis, pH 7	Coefficiente adsorción (mg L ⁻¹)
Azoxistrobina	6,7 (Bajo)	2,5 (Bajo)	1,1 x 10 ⁻⁷ (No volátil)	7,30 x 10 ⁻⁹ (No volátil)	70 (Persistente moderado)	8,7 (Moderado rápido)	Estable (Persistente muy alta)	423
Dimoxistrobina	4,3 (Bajo)	3,59 (Alto)	6 x 10 ⁻⁴ (Estado intermedio)	4,55 x 10 ⁻⁸ (No volátil)	210 (Persistente)	30 (Estable)	Estable (Persistente muy alta)	486
Kresoxim-metilo	2 (Bajo)	3,4 (Alto)	2,3 x 10 ⁻³ (Volátil)	3,6 x 10 ⁻⁴ (No volátil)	16 (No persistente)	28 (Lento)	34 (Persistente moderado)	308
Metominostrobin	128 (Moderado)	2,32 (Bajo)	0,018 (Volátil)	-	98 (Persistente moderado)	-	-	5853
Picoxistrobina	3,1 (Bajo)	3,6 (Alto)	5,5 x 10 ⁻³ (Volátil)	6,5 x 10 ⁻⁴ (No volátil)	20 (No persistente)	21 (Lento)	Estable (Persistente muy alta)	898
Piraclostrobina	1,9 (Bajo)	3,99 (Alto)	2,6 x 10 ⁻⁵ (Estado intermedio)	5,3 x 10 ⁻⁶ (No volátil)	32 (Persistente moderado)	1,7 (Moderado rápido)	Estable (Persistente muy alta)	11000
Trifloxistrobina	0,61 (Bajo)	4,5 (Alto)	3,4 x 10 ⁻³ (Volátil)	2,3 x 10 ⁻³ (No volátil)	7 (No persistente)	2,7 (Moderado rápido)	40 (Persistente moderado)	2377

Los comentarios entre paréntesis se refieren al valor cualitativo de cada parámetro en cuestión

Tabla IV.3. Datos de toxicidad^a de los fungicidas estrobilurinas

Analito	Oral aguda LD-50 (mg kg ⁻¹)	Dérmica LD-50 (mg kg ⁻¹)	Por inhalación CL-50 (mg L ⁻¹)
Azoxistrobina	> 5000 (Bajo)	> 2000	0,69
Dimoxistrobina	> 5000 (Bajo)	> 2000	1,3
Kresoxim-metilo	> 5000 (Bajo)	> 2000	5,6
Metominostrobin	708 (Moderado)	> 2000	1,88
Picoxistrobina	> 5000 (Bajo)	> 2000	2,12
Piraclostrobina	> 5000 (Bajo)	> 2000	0,69
Trifloxistrobina	> 5000 (Bajo)	> 2000	4,65

^a Datos obtenidos en mamíferos

IV.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ESTROBILURINAS EN ALIMENTOS

Las estrobilurinas son fungicidas considerados muy seguros desde un punto de vista medioambiental, que muestran una amplia actividad contra una gran variedad de hongos patógenos para las plantas. En este Capítulo se estudian siete compuestos químicos (metominostrobin, azoxistrobina, dimoxistrobina, kresoxim-metilo, picoxistrobina, piraclostrobina y trifloxistrobina) que son derivados sintéticos del compuesto natural estrobilurina A, que presenta un modo de acción novedoso si se compara con otros grupos de fungicidas, consistente en la inhibición de la respiración por interferencia con la función de una enzima localizada en la membrana mitocondrial interna de los hongos, llevando a la ruptura del ciclo de energía [41].

Una monitorización adecuada de residuos de pesticidas en alimentos es crucial para la evaluación de la exposición humana a estos agroquímicos. Teniendo en cuenta la importancia para la salud de las frutas, varias directivas de la EU han fijado MRLs para los pesticidas analizados en este estudio: azoxistrobina (0,05-2 µg g⁻¹), kresoxim-metilo (0,05-1 µg g⁻¹), picoxistrobina (0,05 µg g⁻¹), piraclostrobina (0,2-1 µg g⁻¹) y trifloxistrobina (0,2-5 µg g⁻¹), dependiendo del tipo de fruta, y no se ha especificado MRL en el caso de

metominostrobin [42,43]. Los bajos MRLs han llevado al desarrollo de métodos analíticos sensibles para alcanzar este requerimiento.

Las técnicas cromatográficas GC [44-57] y LC [58-78] son las más ampliamente utilizadas en el análisis de trazas de pesticidas estrobilurinas en muestras de alimentos y bebidas. Una proporción importante de los procedimientos propuestos en la bibliografía son métodos multiresiduos (MRMs) [46-48,51,59,61,67,69-74,76-78] que analizan un gran número de pesticidas de familias químicas muy diferentes e implican métodos clásicos de extracción, la mayoría de ellos usando disolventes orgánicos y etapas de limpieza de los extractos por SPE.

Los procedimientos de tratamiento de la muestra son catalogados como tediosos ya que consumen mucho tiempo y son muy laboriosos, siendo su mayor desventaja que están en desacuerdo con la metodología de química limpia relativa al uso de disolventes orgánicos. Las nuevas técnicas de microextracción han sido aplicadas para la determinación de algunos fungicidas estrobilurinas en alimentos y bebidas. Las técnicas usadas han sido SPME [55,57-58,79-81] y LPME [78].

La técnica de preparación de muestra SBSE implica la extracción de los analitos orgánicos desde matrices acuosas en un recubrimiento polimérico sobre una barra magnética agitadora, y cubre los objetivos primarios de la GAC [82-83]. Aunque la bibliografía incluye algunos trabajos relativos a la aplicación de SBSE para el análisis cromatográfico de pesticidas en matrices de alimentos [84-92], la técnica no ha sido aplicada para la determinación simultánea de los fungicidas estudiados en este Capítulo.

En este estudio, se describe un procedimiento rápido para la determinación de metominostrobin, azoxistrobin, dimoxistrobin, kresoxim-metilo, picoxistrobin, piraclostrobin y trifloxistrobin, usando un sistema acoplado común en todos los laboratorios de análisis, LC-DAD, y aplicando un tratamiento de muestra simple que implica la extracción de los analitos desde la muestra de fruta sólida y su preconcentración por SBSE, lo que representa el hecho más significativo de este trabajo. Se optimizaron cuidadosamente los parámetros que afectan a la extracción de la muestra (disolvente de extracción y masa de muestra) y las etapas de enriquecimiento de la muestra (fuerza iónica y pH del medio, disolvente de desorción, tiempos de absorción y desorción y temperaturas). Los extractos diluidos obtenidos de las muestras sometidas a un

tratamiento con ultrasonidos en presencia de etanol y el uso del fungicida oxazol como estándar interno, permitió la cuantificación de las muestras usando estándares acuosos. Bajo las condiciones optimizadas, los LODs estuvieron en el rango de 1 a 5 ng g⁻¹, correspondiendo a trifloxistrobina y metominostrobin, respectivamente. El análisis SBSE-LC-DAD proporcionó buena repetitividad (RSD por debajo del 11% en todos los casos) y las recuperaciones se encontraron en el intervalo 80-105 % para las muestras fortificadas. El método se aplicó con éxito al análisis de diferentes muestras, encontrándose residuos de piraclostrobina y trifloxistrobina en dos de las muestras analizadas.

IV.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

IV.5.1. REACTIVOS

Se utilizaron acetonitrilo y metanol (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) de calidad LC. El agua destilada se purificó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Cloruro sódico y ácido acético (99,8 % v/v) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Switzerland) y acetato sódico de Riedel-de-Häen (Steinheim, Germany).

Se incluyeron en la optimización del procedimiento siete fungicidas estrobilurinas disponibles comercialmente (Riedel-de-Häen, >99 %): metominostrobin, azoxistrobin, dimoxistrobin, kresoxim-metilo, picoxistrobin, piraclostrobina y trifloxistrobin. Se prepararon disoluciones estándar individuales de los compuestos sólidos usando metanol como disolvente (100 µg mL⁻¹) y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C en botellas oscuras selladas con tapones de PTFE/silicona. Estas disoluciones fueron estables durante, al menos, tres meses. Se preparó una mezcla de los estándares diariamente diluyendo con agua.

IV.5.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312A) operando a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado a 60 °C (Agilent G1316A). El detector de

diodos fue un Agilent G1315D operando a 200 nm. La separación se llevó a cabo con una columna Spherisorb ODS2 (Teknokroma) (150 mm x 4 mm, 5 µm). La inyección (20 µL) se llevó a cabo usando un automuestreador (Agilent G1367C).

Para SBSE, se utilizaron barras agitadoras de 10 mm de longitud recubiertas con una capa de 0,5 mm de PDMS obtenidas de Gerstel (Twister™, Gerstel GmbH, Müllheim an der Ruhr, Germany). Las barras agitadoras se mantuvieron en acetone nitrilo puro antes de su uso. Los análisis se llevaron a cabo en viales de vidrio ámbar de 15 mL y las disoluciones se agitaron con un agitador magnético (IKA RH KT/C, Supelco) a 2000 rpm. Para prevenir la evaporación de los analitos, los viales se sellaron con tapones de PTFE/silicona. Para el calentamiento, se utilizó un dispositivo construido en los Servicios de Instrumentación de la Universidad de Murcia, consistente en un bloque taladrado y provisto de un sistema electrónico de control de la temperatura. La etapa de desorción se llevó a cabo utilizando microinsertos de vidrio (3 cm longitud, 4 mm d.i) en viales HPLC de 2 mL y se inyectaron alícuotas de 20 µL en el sistema cromatográfico.

Se utilizaron una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) y un homogeneizador IKA A11 (IKA, Staufen, Germany) para el tratamiento de las muestras. Para la extracción de los analitos de las matrices de las muestras se utilizó una sonda ultrasónica UP 200H con una salida...

a efectiva de 200 W en medio líquido (Dr. Hielscher, Teltow, Germany) equipado con una sonda de titanio (13 mm d.e.). La sonda ultrasónica se usó en modo continuo a 100 % de potencia, correspondiente a una frecuencia de operación de 24 kHz.

IV.5.3. MUESTRAS

Se obtuvieron de un supermercado local diferentes muestras de frutas frescas (manzana, pera, uva, naranja, limón, melocotón y ciruela). Las muestras de limón y naranja se pelaron antes de la molienda y el análisis se realizó sobre la pulpa. Las muestras se molieron y fueron almacenadas en frascos cerrados de polietileno de 100 mL a 4 °C hasta su análisis.

IV.5.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se pesó una cantidad de muestra de 5 g en un tubo de centrifuga de vidrio y se añadieron 2 mL de etanol para la extracción. Se sumergió directamente en la mezcla, mantenida a temperatura ambiente, la sonda de ultrasonidos durante 1 min (50 % de amplitud), y entonces se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La disolución sobrenadante se recogió y se diluyó a 15 mL con disolución reguladora acetato/acético (0,04 M) y se añadió cloruro sódico hasta una concentración del 5 % m/v. El procedimiento SBSE consistió en introducir el Twister™ en la disolución mientras se mantenía en agitación a 2000 rpm a una temperatura de extracción de 45 °C durante 20 min. Después de la extracción, el Twister se lavó con agua destilada y las gotas de agua restantes se secaron con papel de celulosa. Para la desorción líquida de los analitos, se introdujo la barra agitadora en un vial con un microinserto de vidrio y se extrajo con un volumen de 100 µL de una mezcla 50:50 acetonitrilo:agua durante 15 min. Entonces, se sacó la barra agitadora y la muestra líquida se analizó por LC inyectando una alícuota de 20 µL con el automuestreador. La fase móvil en condiciones isocráticas fue una mezcla 50:50 acetonitrilo:agua operando a una velocidad de flujo de 1 mL min⁻¹. Cada muestra se inyectó por triplicado. Se realizaron ocasionalmente análisis blanco de las barras agitadoras para evitar efectos de memoria.

IV.5.5. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Ya que no se dispone de materiales de referencia para la validación del método, se llevó a cabo un estudio de recuperación. Las muestras se fortificaron con concentraciones entre 5 y 10 veces los LOQs correspondientes a cada compuesto. Las muestras fortificadas se dejaron reposar durante 5 horas a temperatura ambiente para equilibrarse antes de proceder al análisis como se ha descrito anteriormente. El procedimiento se aplicó a tres muestras de frutas, cada una incluida en una familia botánica diferente [93], manzana (*Rosaceae sp.*), limón (*Rutaceae sp.*) y uva (*Vitaceae sp.*), a dos niveles de concentración y analizando dos duplicados en cada caso, correspondientes a dos alícuotas de cada muestra fortificada independientemente y analizada. Las muestras usadas para los estudios de recuperación se chequearon para comprobar que estaban libres de los analitos estudiados, al menos por encima de los LODs correspondientes.

IV.6. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se seleccionó cromatografía de reparto en fase reversa. Las condiciones óptimas para la separación de los fungicidas estrobilurinas se establecieron inyectando 20 μL de una disolución acuosa conteniendo los analitos a un nivel de concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sobre una columna Spherisorb ODS de 15 cm de longitud, 4 mm de diámetro y 5 μm de tamaño de partícula.

Se ensayaron diferentes mezclas acetonitrilo:agua como fase móvil en modo isocrático con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} . Como era de esperar, la retención disminuyó para todos los compuestos al aumentar la proporción de acetonitrilo. Concentraciones más altas del 50 % para el disolvente orgánico produjeron el solapamiento de los picos de kresoxim-metilo y picoxistrobina. Por otra parte, cuando disminuyó la concentración por debajo del 50 %, se alcanzó un tiempo de retención muy largo para trifloxistrobina. La separación no mejoró cuando se ensayaron diferentes velocidades de flujo comprendidas entre 0,5-1 mL min^{-1} para mezclas acetonitrilo:agua 60:40, 55:45 y 50:50, manteniéndose sin resolver el solapamiento entre kresoxim-metilo y picoxistrobina.

Cuando se sustituyó el agua por una disolución reguladora de acetato sódico 5 mM de pH entre 3 y 8, tampoco se observaron mejoras en la separación. Se observó un ensanchamiento de los picos para piraclostrobina y trifloxistrobina a pH 8, y apareció una deriva en la línea base para valores de pH inferiores a 5. Por tanto, se descartó el uso de disoluciones reguladoras en la fase móvil.

Se estudió el efecto de la temperatura termostatando el compartimento de la columna entre temperatura ambiente y 60 $^{\circ}\text{C}$, que es la máxima recomendada para la fase estacionaria usada, y usando diferentes mezclas acetonitrilo:agua (60:40, 55:45 y 50:50) como fase móvil. Al aumentar la temperatura de la columna, disminuyen tanto la anchura de pico como la presión de la columna, obteniendo parámetros cromatográficos adecuados cuando se usó una fase móvil 50:50 acetonitrilo:agua y termostatando la columna a 60 $^{\circ}\text{C}$.

Los compuestos eluyeron en el siguiente orden: metominostrobin (2,53 min), azoxistrobin (3,32 min), dimoxistrobin (4,87 min), kresoxim-metilo (5,79 min), picoxistrobin (6,24 min), piraclostrobina (7,54 min) y trifloxistrobin (11,1 min). Se

obtuvieron valores para los factores de retención (k) entre 1,98 y 11,65, factores de separación (α) en el rango 1,09-1,53 y factores de resolución (R_s) entre 1,72 y 9,63.

Para la cuantificación de los fungicidas, se usó el método del estándar externo y se construyeron las gráficas de calibrado representando concentración frente a área de pico usando diez niveles de concentración y análisis de regresión lineal. La Tabla IV.4 muestra los datos analíticos obtenidos: rangos de linealidad, pendientes, coeficientes de regresión y LODs y LOQs calculados en base a tres y diez veces la SD de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado, respectivamente.

Tabla IV.4. Datos analíticos para las estrobilurinas usando el método LC-DAD

Compuesto	Linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Pendiente \pm SD ^a ($\text{mL } \mu\text{g}^{-1}$)	r^2	LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})
Metominostrobin	0,01 – 5	229,1 \pm 0,5	0,9998	5	17
Azoxistrobin	0,01 – 5	222,9 \pm 0,7	0,9989	5	17
Dimoxistrobin	0,01 – 5	218,3 \pm 0,3	0,9993	5	17
Kresoxim-metilo	0,01 – 5	205,8 \pm 0,7	0,9995	5	17
Picoxistrobin	0,03 – 5	116,6 \pm 0,2	0,9987	10	35
Piraclostrobin	0,02 – 5	180,9 \pm 0,9	0,9994	7,5	25
Trifloxistrobin	0,03 – 5	127,3 \pm 1,4	0,9991	10	35

^a(n= 10)

IV.7. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA SBSE

Para optimizar el procedimiento SBSE, se llevaron a cabo experiencias preliminares usando 15 mL de una mezcla de estándares acuosos a un nivel de concentración de las estrobilurinas de 25 ng mL^{-1} . El único polímero disponible comercialmente en el momento de realizar este estudio como recubrimiento para las barras agitadoras era PDMS, un recubrimiento no polar que se utilizó para extraer los siete compuestos en estudio.

Cuando se varió la temperatura de extracción en el rango 25-60 °C, se consiguió la mayor sensibilidad a 40 °C para los cuatro compuestos menos retenidos en la columna cromatográfica y a 50 °C para los tres compuestos más retenidos en la columna. Ya que no se observaron grandes diferencias en la sensibilidad entre 40 y 50 °C para ningún

compuesto (Figura IV.6A), se seleccionó finalmente una temperatura de 45 °C como valor de compromiso.

El tiempo de extracción en SBSE es crítico para establecer el equilibrio entre la disolución de la muestra y el material del recubrimiento SBSE. Cuando se varió la duración de la etapa de extracción entre 5 y 60 min, como muestra la Figura IV.6B, aumentó la sensibilidad hasta 30 min y entonces se mantuvo prácticamente constante. Teniendo en cuenta que el aumento de la señal analítica entre 20 y 30 min no fue significativo para ninguno de los compuestos, se seleccionó un tiempo de extracción de 20 min con objeto de acortar el procedimiento analítico.

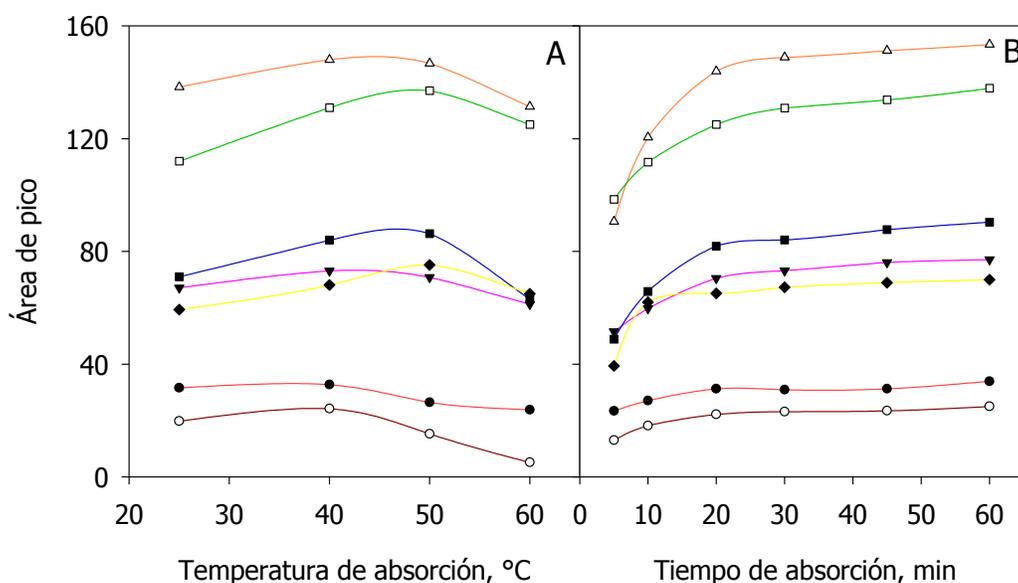


Figura IV.6. Influencia de (A) la temperatura y (B) el tiempo de extracción sobre la sensibilidad. (●) Metominostroquina, (○) azoxistrobina, (▼) dimoxistrobina, (Δ) kresoxim-metilo, (■) picoxistrobina, (□) piraclostroquina y (◆) trifloxistrobina

Se estudió la influencia de la velocidad de agitación entre 0 y 2000 rpm, aumentando la sensibilidad hasta 850 rpm y entonces permaneció constante para metominostroquina, azoxistrobina y dimoxistrobina (Figura IV.7A). Para el resto de los compuestos la señal aumentó hasta 2000 rpm, por lo que se seleccionó este valor.

El efecto del pH del medio de extracción se estudió entre 3 y 9, añadiendo 0,5 mL de disolución reguladora de acetato 1 M (para valores de pH hasta 5,5) y 0,5 mL de disolución reguladora de fosfato 1 M (para valores de pH entre 6 y 9). Como se puede

observar en la Figura IV.7B, no se apreciaron diferencias de sensibilidad significativas para los fungicidas a valores de pH entre 3 y 7, mientras que el área de pico disminuyó para la mayoría de los compuestos a valores de pH superiores a 7. Finalmente se seleccionó un valor de pH 5.

La influencia de la fuerza iónica de la disolución de extracción se estudió añadiendo 0-5,25 g de cloruro sódico a 15 mL de la disolución reguladora seleccionada, en las condiciones optimizadas. La presencia de sal disminuyó la eficiencia de extracción para picoxistrobina, piraclostrobina y trifloxistrobina, mientras que para el resto de los analitos la señal aumentó hasta 5, 15 ó 25 % m/v dependiendo del compuesto, y entonces disminuyó (Figura IV.7C). Se seleccionó una concentración de NaCl del 5 % m/v como un valor de compromiso.

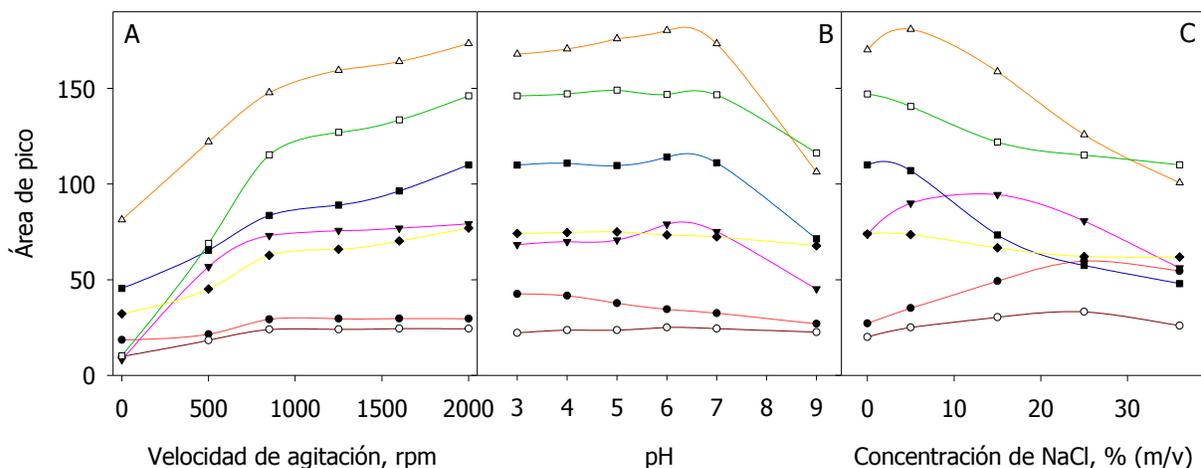


Figura IV.7. Efecto de (A) velocidad de agitación, (B) pH y (C) concentración de cloruro sódico sobre la sensibilidad de (●) metominostrobin, (○) azoxistrobin, (▼) dimoxistrobin, (Δ) kresoxim-metilo, (■) picoxistrobin, (□) piraclostrobina y (◆) trifloxistrobin

La mezcla estándar de los fungicidas se preparó en disolución reguladora acetato (pH 5) usando volúmenes de 15 y 40 mL, en presencia de 5 % m/v de cloruro sódico y se sometió a la preconcentración SBSE. Se consiguió la sensibilidad más alta para los siete compuestos cuando se utilizó un volumen de muestra de 15 mL.

La desorción líquida de los compuestos se llevó a cabo introduciendo la barra agitadora en un vial con un microinserto de vidrio y se optimizaron tanto el disolvente

como el tiempo de desorción. Los disolventes ensayados para la desorción fueron acetonitrilo puro, diferentes mezclas acetonitrilo:agua (4:1, 3:2 y 1:1) y mezclas acetonitrilo:reguladora acetato (pH 5) (4:1 y 1:1). Se obtuvieron los mejores resultados en todos los casos con las mezclas acetonitrilo:agua, no observando diferencias significativas entre las diferentes relaciones ensayadas, como se muestra en la Figura IV.8. La mezcla 1:1 fue finalmente seleccionada.

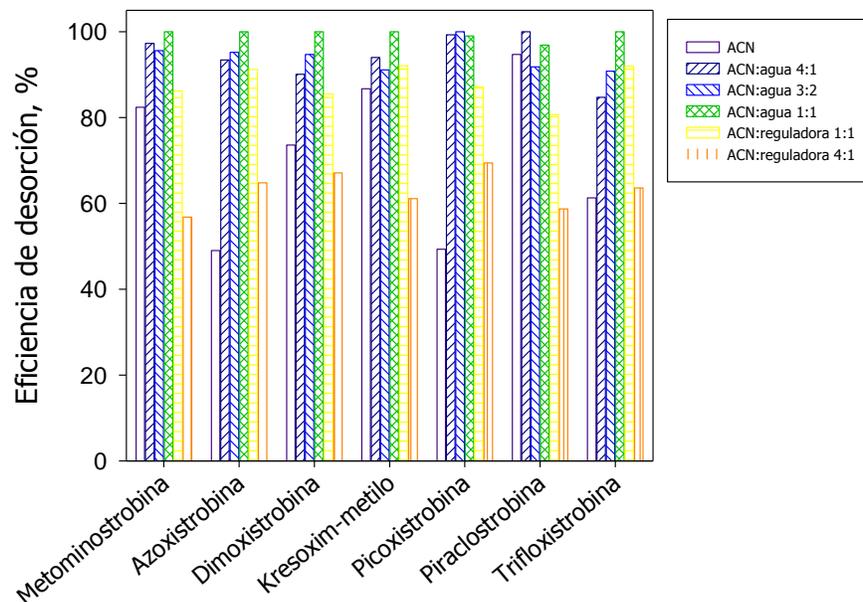


Figura IV.8. Influencia de la composición de la disolución de desorción

Seguidamente, se optimizó el tiempo de desorción para conseguir la desorción total de los analitos y evitar así efectos de memoria. La Figura IV.9 muestra la variación de las eficiencias de extracción obtenidas para un tiempo de desorción total de 20 min, completado en intervalos de 5 min.

Los valores de 100 % de desorción corresponden a la suma de las señales analíticas obtenidas en los cuatro intervalos de tiempo estudiados. En todos los casos se comprobó que 20 min eran suficientes para la desorción total de los analitos. Se seleccionó un tiempo de 15 min para la etapa de desorción.

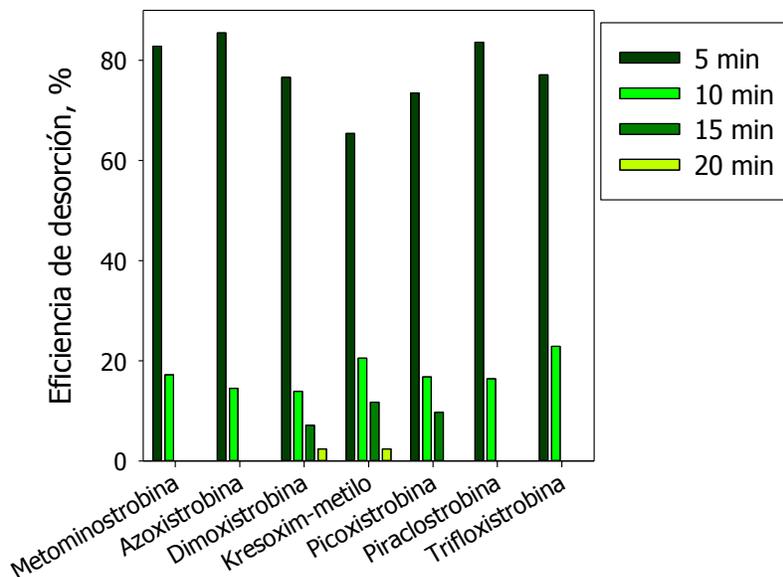


Figura IV.9. Influencia del tiempo de desorción en la eficiencia de extracción

IV.8. OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA SÓLIDA

El tratamiento de la muestra de fruta se optimizó usando muestras fortificadas al nivel de concentración de analitos de 150 ng g^{-1} . La extracción directa mediante DI de la barra agitadora en una suspensión conteniendo la muestra sólida no es posible, ya que las partículas suspendidas podrían ensuciar e incluso dañar el material del recubrimiento. Por tanto, se requirió una etapa de extracción previa y el extracto líquido se sometió posteriormente al procedimiento SBSE.

Para seleccionar el disolvente de extracción se realizaron diversas experiencias preliminares utilizando 5 g de una muestra de manzana triturada y someténdola a ultrasonidos por medio de una sonda introducida directamente en la mezcla de la muestra durante 1 min en presencia de 2 mL de diferentes disolventes (agua, disolución reguladora acetato/acético, acetonitrilo, metanol y etanol).

Se obtuvieron los valores de extracción más altos, para todos los compuestos, con metanol y etanol, que dieron lugar a resultados similares, por tanto, se seleccionó etanol debido a su menor toxicidad. La sensibilidad obtenida no mejoró al emplear volúmenes de disolvente orgánico más altos o una mayor duración de la etapa de sonicación.

Se estudió el efecto de la masa de muestra en el rango 2-8 g. Se seleccionó una masa de 5 g, ya que para masas mayores se observó una disminución de la sensibilidad.

IV.9. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Para estudiar la importancia del efecto matriz, se compararon las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos con las obtenidas al aplicar el método de adiciones estándar a cuatro muestras de fruta usando el test-t de medidas repetidas (Tabla IV.5).

Se confirmó la existencia de un efecto matriz porque los valores "p" fueron menores que 0,05 para todos los analitos.

Los valores de los LODs obtenidos a partir de las gráficas de calibrado acuosas para el procedimiento SBSE-LC-DAD confirmaron un aumento de la sensibilidad con respecto a la ausencia de la etapa de preconcentración, entre 4 y 50 veces para metominostrobin y trifloxistrobin, respectivamente.

Se ensayó la adición de un estándar interno, el fungicida drazoxolón, comprobándose previamente que todas las muestras estuvieran libres de él. Este compuesto resulta útil para este propósito porque su comportamiento cromatográfico es similar al de los analitos y también lo es su comportamiento de extracción SBSE.

Cuando se añadió el estándar interno al nivel de 25 ng mL⁻¹ (70 ng g⁻¹), las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y las obtenidas por medio de adiciones estándar a las muestras no mostraron diferencias significativas al nivel de confianza del 95 % (los valores "p" variaron entre 1 y 0,046), estos valores de pendientes se muestran en la Tabla IV.5. Por tanto, se puede concluir que el uso de este compuesto como estándar interno compensó el efecto matriz, evitando el método tedioso de adiciones estándar para la cuantificación.

Tabla IV.5. Pendientes de las gráficas de calibrado de adiciones estándar (mL μg^{-1})

Compuesto	Acuoso	Manzana	Pera	Uva	Limón
Metominostrobin	1288±19	983±11	1151±13	1012±18	912±12
	(28,6±2,1)	(27,7±2,0)	(26,7±1,9)	(26,2±2,1)	(26,1±2,4)
Azoxistrobin	1581±28	1179±15	1341±10	1292±38	1050±9
	(35,1±2,8)	(32,7±3,0)	(32,2±2,3)	(31,0±3,7)	(30,0±4,8)
Dimoxistrobin	4522±38	4189±20	4218±6	4213±5	3250±9
	(100±5,8)	(108±7,7)	(98,1±5,4)	(100±6,7)	(92,8±7,1)
Kresoxim-metilo	7580±47	7179±53	7397±54	6966±51	5530±59
	(168±5,9)	(178±8,8)	(172±6,6)	(166±8,1)	(158±9,4)
Picoxistrobin	4688±56	4047±33	4560±26	4199±48	3994±9
	(103±6,1)	(112±8,7)	(106±8,9)	(99,9±7,9)	(114±9,7)
Piraclostrobin	7538±25	6412±36	6851±57	6700±35	6224±22
	(167±8,8)	(178±9,1)	(159±8,3)	(159±9,5)	(178±10)
Trifloxistrobin	8876±26	7460±105	8232±34	7948±55	7315±85
	(197±9,1)	(207±8,5)	(191±7,4)	(189±8,7)	(209±10)

Los valores son media±desviación estándar (n=6). Los valores entre paréntesis corresponden al método del estándar interno

La Tabla IV.6 muestra los parámetros de calibración obtenidos para cada analito cuando se analizaron muestras de 5 g de fruta (a cinco niveles de concentración diferentes) por duplicado bajo las condiciones adoptadas en presencia del estándar interno.

Los coeficientes de regresión obtenidos mostraron una relación directamente proporcional entre la cantidad de analito extraído y su concentración en la disolución de la muestra, siendo en todos los casos superiores a 0,996.

Los LODs y LOQs calculados en base a tres y diez veces la desviación estándar de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado, respectivamente, se muestran en la Tabla IV.6. Se puede asegurar que para las estrobilurinas en muestras de fruta se pueden alcanzar los MRLs establecidos por la Unión Europea [42-43].

La repetitividad se calculó usando la RSD para 10 análisis sucesivos de una muestra de melocotón fortificada a un nivel de concentración de 20 veces los LOQs correspondientes. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla IV.6.

La repetitividad se calculó también bajo el mismo criterio para una mezcla de estándares acuosos obteniendo valores de RSD menores que 7,5 % en todos los casos.

Hay que hacer notar que la sensibilidad para cada compuesto dependió en gran extensión de su afinidad por el recubrimiento de PDMS de la barra agitadora SBSE.

Tabla IV.6. Características analíticas del método con estándar interno

Compuesto	Coefficiente regresión	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	RSD ^a (%)
Metominostrobin	0,9986	6,0	16,6	10,7
Azoxistrobin	0,9994	4,2	14,0	9,1
Dimoxistrobin	0,9990	1,2	4,0	9,5
Kresoxim-metilo	0,9983	0,8	2,7	7,0
Picoxistrobin	0,9968	1,5	5,0	7,7
Piraclostrobin	0,9979	1,0	3,3	8,8
Trifloxistrobin	0,9978	0,9	3,2	6,5

^a Calculado a un nivel de concentración de 20 veces el LOQ correspondiente (n=10)

IV.10. ANÁLISIS DE MUESTRAS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El procedimiento optimizado se aplicó al análisis de 15 muestras de frutas diferentes. De todas ellas, en 13 muestras analizadas no se encontraron los fungicidas estrobilurinas por encima de los LODs correspondientes a los distintos analitos.

Se encontró piraclostrobin en una muestra de pera a una concentración de 4,0±0,4 ng g⁻¹ y trifloxistrobin en la misma muestra y en una muestra de limón a concentraciones de 3,5±0,4 y 25±2 ng g⁻¹, respectivamente.

Los estudios de recuperación se llevaron a cabo con objeto de verificar la exactitud del método propuesto fortificando tres muestras de fruta (pera, limón y uva) por duplicado

a dos niveles de concentración correspondientes a aproximadamente diez y veinticinco veces los LOQs. Los resultados se muestran en la Tabla IV.7. Se obtuvo una recuperación media±desviación estándar (n=84) de 93,8±6,2.

Tabla IV.7. Recuperaciones^a a partir de diferentes frutas

Compuesto	Nivel fortificado (ng g ⁻¹)	Pera	Limón	Uva
Metominostrobin	160	89 ± 5	93 ± 8	91 ± 3
	410	92 ± 6	98 ± 2	98 ± 6
Azoxistrobin	140	94 ± 3	88 ± 6	95 ± 2
	350	96 ± 3	92 ± 7	94 ± 7
Dimoxistrobin	40	88 ± 7	90 ± 6	89 ± 9
	100	91 ± 7	95 ± 4	93 ± 4
Kresoxim-metilo	30	93 ± 7	91 ± 3	92 ± 6
	70	94 ± 5	95 ± 4	97 ± 4
Picoxistrobin	50	90 ± 7	95 ± 3	94 ± 2
	125	99 ± 4	98 ± 3	101 ± 4
Piraclostrobin	30	100 ± 3	94 ± 3	92 ± 5
	80	98 ± 5	99 ± 5	95 ± 3
Trifloxistrobin	30	89 ± 6	91 ± 6	91 ± 3
	80	94 ± 7	98 ± 4	95 ± 6

^a Valor medio±SD (n=4)

La Figura IV.10 muestra el perfil de elución SBSE-LC-DAD obtenido para una muestra de limón fortificada con una mezcla de estándares de los fungicidas estrobilurinas, bajo las condiciones seleccionadas.

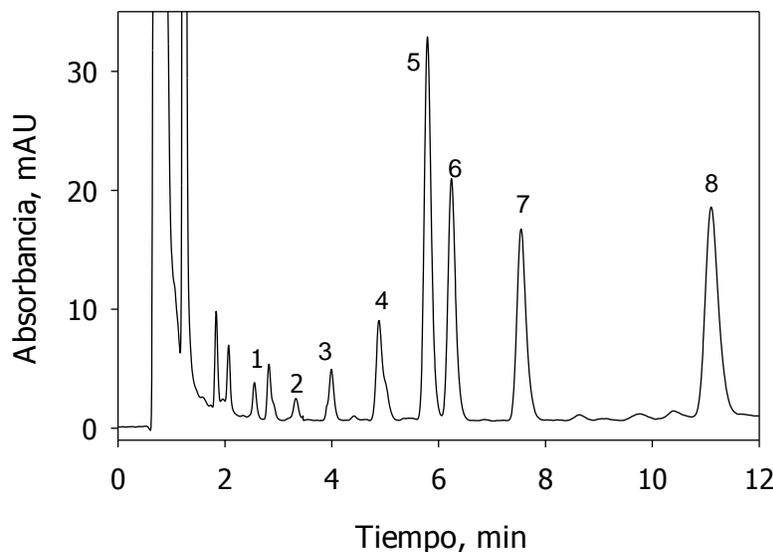


Figura IV.10. Cromatograma SBSE-LC-DAD obtenido a partir de una muestra de limón fortificado con una mezcla de estándares a niveles de concentración de: (1) metominostrobina, 30 ng g^{-1} ; (2) azoxistrobina, 20 ng g^{-1} ; (3) drazoxolón, 70 ng g^{-1} ; (4) dimoxistrobina, 50 ng g^{-1} ; (5) kresoxim-metilo, 110 ng g^{-1} ; (6) picoxistrobina, 120 ng g^{-1} ; (7) piraclostrobina, 75 ng g^{-1} y (8) trifloxistrobina, 100 ng g^{-1}

IV.11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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) 737-474.
- [2] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1-9.
- [3] F.M. Lancas, M.E.E. Queiroz, P. Grossi, I.R.B. Olivares, Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 813-824.
- [4] D. Bratkowska, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, F. Borrull, N. Fontanals, Development and application of a polar coating for stir bar sorptive extraction of emerging pollutants from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta* 707 (2011) 135-142.

- [5] X.J. Huang, N.N. Qiu, D.X. Yuan, Q.M. Lin, Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2667-2673.
- [6] D. Bratkowska, N. Fontanals, P.A.G. Cormack, F. Borrull, R.M. Marce, Preparation of a polar monolithic stir bar based on methacrylic acid and divinylbenzene for the sorptive extraction of polar pharmaceuticals from complex water samples, *J. Chromatogr. A* 1225 (2012) 1-7.
- [7] W. Liu, H. Wang, Y. Guan, Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 15-22.
- [8] R.M. Silva, F.C.M. Portugal, J.M.F. Nogueira, Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 10-16.
- [9] R.C.P. Sequeiros, N.R. Neng, F.C.M. Portugal, M.L. Pinto, J. Pires, J.M.F. Nogueira, Development and application of stir bar sorptive extraction with polyurethane foams for the determination of testosterone and methenolone in urine matrices, *J. Chromatogr. Sci.* 49 (2011) 297-302.
- [10] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques- novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7303-7310.
- [11] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P. Sandra, Dual-phase twisters: a new approach to headspace sorptive extraction and stir sorptive extraction, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 9-16.
- [12] J.P. Lambert, W.M. Mullett, E. Kwong, Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 43-49.
- [13] X.J. Huang, J.B. Lin, D.X. Yuan, A new anionic exchange stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for the extraction of inorganic anion, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4898-4903.

- [14] Gerstel, Using three types of twister phases for stir bar sorptive extraction of whisky, wine and fruit juice, *Global Analytical Solutions*, Application Note 3/2011.
- [15] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: a view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642-2666.
- [16] http://www.gerstel.com/en/Supplies_Twister_en.htm.
- [17] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 54-69.
- [18] I. Carpinteiro, M. Ramil, I. Rodríguez, J.M.F. Nogueira, Combining stir-bar sorptive extraction and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of benzotriazole UV stabilizers in wastewater matrices, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 459-467.
- [19] Thermal desorption unit TDU en <http://www.gerstel.com/pdf/TDU-Flyer-EN.pdf>.
- [20] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Nakazawa, A. Takatsu, Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 280-293.
- [21] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, Sorptive sample preparation - a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3-22.
- [22] M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 500-508.
- [23] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices, *LCGC North Am.* 21 (2003) 108-118.
- [24] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: I. Method optimisation, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91-101.

- [25] C. Franc, F. David, G. de Revel, Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 3318-3327.
- [26] C.Z. Talebpour, M. Taraji, N. Adib, Stir bar sorptive extraction and high performance liquid chromatographic determination of carvedilol in human serum using two different polymeric phases and an ionic liquid as desorption solvent, *J. Chromatogr. A* 1236 (2012) 1-6.
- [27] T.N. Nguyen Kieu, C. Scapolla, M. Di Carro, E. Magi, Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction, *Talanta* 85 (2011) 2375-2384.
- [28] X.J. Huang, J.B. Lin, D.X. Yuan, Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stir bar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2138-2144.
- [29] A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, Use of experimental design in the optimisation of stir bar sorptive extraction followed by thermal desorption for the determination of brominated flame retardants in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 739-748.
- [30] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, M. Cano-Pavón, A review of stir bar sorptive extraction, *Chromatographia* 69 (2009) S79-S94.
- [31] FAO, 1997a. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Manual de Procedimiento, Ed. FAO, Italia, 1997.
- [32] J.L. Valverde, J.J. Pérez, Manual de Toxicología Medioambiental Forense, Ed. Ramón Areces, España, 2001.
- [33] S. Navarro, A. Barba, Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente. Hojas divulgadoras nº 9/95 HD. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica, Madrid, España.

- [34] K. Cooper, Effects of pesticides on wildlife. En: Handbook of pesticide toxicology. Vol. I. General principles. E.J. Hayes Jr. y E.R. Laws Jr., Academic Press, USA, 1991.
- [35] FAO/CEPE (Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa) Conferencia sobre estadísticas agrícolas y alimentarias en Europa, Ed. FAO, Roma, Italia, 1991.
- [36] D.W. Bartlett, J.M. Clough, J.R. Godwin, A.A. Hall, M. Hamer, B. Parr-Dobrzanski, The strobilurin fungicides, *Pest. Manag. Sci.* 58 (2002) 649-662.
- [37] D.W. Bartlett, J.M. Clough, C. Gogfrey, J.R. Godwin, A.A. Hall, S. Heaney, S. Maund, Understanding the strobilurin fungicides, *Pesticides outlook* (2001) 143-148.
- [38] Real Decreto 140/2003 de 7 de Febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. BOE nº 45.
- [39] The PPDD: Pesticide Properties Database. <http://www.herts.ac.uk/aeru/footprint>. Último acceso en Enero de 2010.
- [40] The e-Pesticide Manual. A World Compendium. 13rd ed., C.D.S. Tomlin (Ed.). User Manual Version 3.1.2004-05.
- [41] C.D.S. Tomlin, The Pesticide Manual, 12th ed., British Crop Protection Council, UK, 2000.
- [42] <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/lmrs/conlmr.asp>. Último acceso en Enero de 2010.
- [43] http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Último acceso en Enero de 2010.
- [44] H.B. Christensen, K. Granby, Method validation for strobilurin fungicides in cereals and fruit, *Food. Addit. Contam.* 18 (2001) 866-874.
- [45] A. Navalón, A. Prieto, L. Araujo, J.L. Vílchez, Determination of pyrimethanil and kresoxim-methyl in green groceries by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 355-360.
- [46] J.W. Wong, M.G. Webster, D.Z. Bezabeh, M.J. Hengel, K.K. Nigim, A.J. Drynitsky, S.E. Ebeler, Multiresidue determination of pesticides in malt beverages by capillary

- gas chromatography with mass spectrometry and selected ion monitoring, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6361-6372.
- [47] A. Garrido Frenich, I. Martínez Salvador, J.L. Martínez Vidal, T. López-López, Determination of multiclass pesticides in food commodities by pressurized liquid extraction using GC-MS/MS and LC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 1106-1118.
- [48] S.J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, P. Van Bodegraven, Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection, *J. AOAC. Int.* 88 (2005) 595-614.
- [49] A. Hercegová, M. Dömötöröová, E. Matisová, M. Kirchner, R. Otrekal, V. Stefuca, Fast gas chromatography with solid phase extraction clean-up for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food, *J. Chromatogr. A* 1084 (2005) 46-53.
- [50] A. Hercegová, M. Dömötöröová, D. Kruzlicová, E. Matisová, Comparison of sample preparation methods combined with fast gas chromatography-mass spectrometry for ultratrace analysis of pesticide residues in baby food, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1102-1109.
- [51] S. Walorczyk, B. Gnusowski, Fast and sensitive determination of pesticide residues in vegetables using low-pressure gas chromatography with a triple quadrupole mass spectrometer, *J. Chromatogr. A* 1128 (2006) 236-243.
- [52] E.D. Bempelou, K.S. Liapis, Validation of a multi-residue method for the determination of pesticide residues in apples by gas chromatography, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86 (2006) 63-68.
- [53] J. Oliva, P. Payá, M.A. Cámara, A. Barba, Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes, *J. Environ. Sci. Health Part B* 42 (2007) 775-781.
- [54] Y. Park, A.M. Abd El-Aty, J.H. Choi, S.K. Cho, D.H. Shin, J.H. Shim, Pesticide multiresidue analysis in Panax ginseng (C. A. Meyer) by solid-phase extraction and gas chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 29-39.

- [55] D.T. Likas, N.G. Tsiropoulos, G.E. Miliadis, Rapid gas chromatographic method for the determination of famoxadone, trifloxystrobin and fenhexamid residues in tomato, grape and wine samples, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 208-214.
- [56] J. Ticha, J. Hajslova, M. Jech, J. Honzicek, O. Lacina, J. Kohoutkova, V. Kocourek, M. Lansky, J. Kloutvorova, V. Falta, Changes of pesticide residues in apples during cold storage, *Food Control* 19 (2008) 247-256.
- [57] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, Method development and validation for strobilurin fungicides in baby foods by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 140-146.
- [58] C. Falqui-Cao, Z. Wang, L. Urruty, J. Pommier, M. Montury, Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/HPLC/DAD, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5092-5097.
- [59] M.J. Taylor, K. Hunter, K.B. Hunter, D. Lindsay, S. Le Bluhellec, Multi-residue method for rapid screening and confirmation of pesticides in crude extracts of fruits and vegetables using isocratic liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 982 (2002) 225-236.
- [60] R. Rial Otero, B. Cancho Grande, J. Simal Gándara, Multiresidue method for fourteen fungicides in white grapes by liquid-liquid and solid-phase extraction followed by liquid chromatography–diode array detection, *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 121-131.
- [61] L. Alder, S. Lüderitz, K. Lindtner, H. Stan, The ECHO technique - the more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 67-79.
- [62] M.J. Teixeira, A. Aguiar, C.M.M. Afonso, A. Alves, M.M.S.M. Bastos, Comparison of pesticides levels in grape skin and in the whole grape by a new liquid chromatographic multiresidue methodology, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 333-340.
- [63] A. Sannino, L. Bolzoni, M. Bandini, Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation

- of pesticides in processed fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 161-169.
- [64] S. de Melo Abreu, M. Correia, P. Herbert, L. Santos, A. Alves, Screening of grapes and wine for azoxystrobin, kresoxim-methyl and trifloxystrobin fungicides by HPLC with diode array detection, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 549-556.
- [65] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, M. Mezcua, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba, Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 81-90.
- [66] M. Rabolle, N.H. Spliid, K. Kristensen, P. Kudsk, Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (*Botrytis cinerea*), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 900-908.
- [67] G. Pang, Y. Liu, C. Fan, J. Zhang, Y. Cao, X. Li, Z. Li, Y. Wu, T. Guo, Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 1366-1408.
- [68] S. de Melo Abreu, P. Caboni, P. Cabras, V.L. Garau, A. Alves, Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine, *Anal. Chim. Acta* 573 (2006) 291-297.
- [69] F. Hernández, O.J. Pozo, J.V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch, Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 242-252.
- [70] I.R. Pizzutti, A. de Kok, R. Zanella, M.B. Adaime, M. Hiemstra, C. Wickert, O.D. Prestes, Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization, *J. Chromatogr. A* 1142 (2007) 123-136.
- [71] M. Hiemstra, A. de Kok, Comprehensive multi-residue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 3-25.

- [72] J. Wang, D. Wotherspoon, Determination of pesticides in apples by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry and estimation of measurement uncertainty, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 550-567.
- [73] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98-109.
- [74] C.C. Leandro, P. Hancock, R.J. Fussell, B.J. Keely, Ultra-performance liquid chromatography for the determination of pesticide residues in foods by tandem quadrupole mass spectrometry with polarity switching, *J. Chromatogr. A* 1144 (2007) 161-169.
- [75] M.J. Hengel, M. Miller, Analysis of pesticides in dried hops by liquid chromatography - tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 6851-6856.
- [76] B. Kmellár, P. Fodor, L. Pareja, C. Ferrer, M.A. Martínez-Uroz, A. Valverde, A.R. Fernández-Alba, Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1215 (2008) 37-50.
- [77] M.J. Taylor, G.A. Keenan, K.B. Reid, D. Uría Fernández, The utility of ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry for multi-residue determination of pesticides in strawberry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2731-2746.
- [78] P. Plaza Bolaños, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, Application of hollow fibre liquid phase microextraction for the multiresidue determination of pesticides in alcoholic beverages by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1208 (2008) 16-24.
- [79] L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, Pesticide analysis in rose wines by micellar electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3240-3246.

- [80] L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, Multiple pesticide analysis in wine by MEKC combined with solid-phase microextraction and sample stacking, *Electrophoresis* 28 (2007) 4072-4081.
- [81] L.M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, T.M. Borges-Miquel, M.A. Rodríguez-Delgado, Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines, *Food Chem.* 111 (2008) 764-770.
- [82] P.T. Anastas, Green chemistry and the role of analytical methodology development, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 167-175.
- [83] J. Namiesnik, Green analytical chemistry - some remarks, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 151-153.
- [84] C. Bicchi, C. Cordero, P. Rubiolo, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction (SBSE) in sample preparation from heterogeneous matrices: determination of pesticide residues in pear pulp at ppb (ng/g) level, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 449-456.
- [85] P. Sandra, B. Tienpont, F. David, Multi-residue screening of pesticides in vegetables, fruits and baby food by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299-309.
- [86] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77-85.
- [87] A. Juan-García, J. Mañes, G. Font, Y. Picó, Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low- $\mu\text{g kg}^{-1}$ levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 119-127.
- [88] N. Ochiai, K. Sasamoto, H. Kanda, T. Yamagami, F. David, B. Tienpont, P. Sandra, Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1083-1092.

- [89] W. Liu, Y. Hu, J. Zhao, Y. Xu, Y. Guan, Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 1-7.
- [90] A. Kende, Z. Csizmazia, T. Rikker, V. Angyal, K. Torkos, Combination of stir bar sorptive extraction-retention time locked gas chromatography-mass spectrometry and automated mass spectral deconvolution for pesticide identification in fruits and vegetables, *Microchem. J.* 84 (2006) 63-69.
- [91] E.D. Guerrero, R. Castro Mejías, R.N. Marín, C.G. Barroso, Optimization of stir bar sorptive extraction applied to the determination of pesticides in vinegars, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 144-150.
- [92] M. Barriada-Pereira, P. Serôdio, M.J. González-Castro, J.M.F. Nogueira, Determination of organochlorine pesticides in vegetable matrices by stir bar sorptive extraction with liquid desorption and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry towards compliance with European Union directives, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 119-126.
- [93] J.A.T. Pennington, R.A. Fisher, Classification of fruits and vegetables, *J. Food Comp. Anal.* 225 (2009) S23-S31.

CAPÍTULO V

MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES EN MUESTRAS DE MIEL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

V.1. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO

V.1.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE DLLME

La técnica DLLME fue introducida en 2006 por Assadi y col. [1] y Rezaee y col. [2]. DLLME es una técnica de microextracción simple y rápida basada en el uso de un extractante apropiado, esto es, unos pocos microlitros de un disolvente orgánico con alta densidad tal como tetraclorometano, cloroformo, disulfuro de carbono, nitrobenzeno, bromobenceno, clorobenceno o 1,2-diclorobenceno y un disolvente dispersante altamente miscible tanto con la fase extractante como con la acuosa, tal como metanol, etanol, acetonitrilo o acetona (Figura V.1) [3].

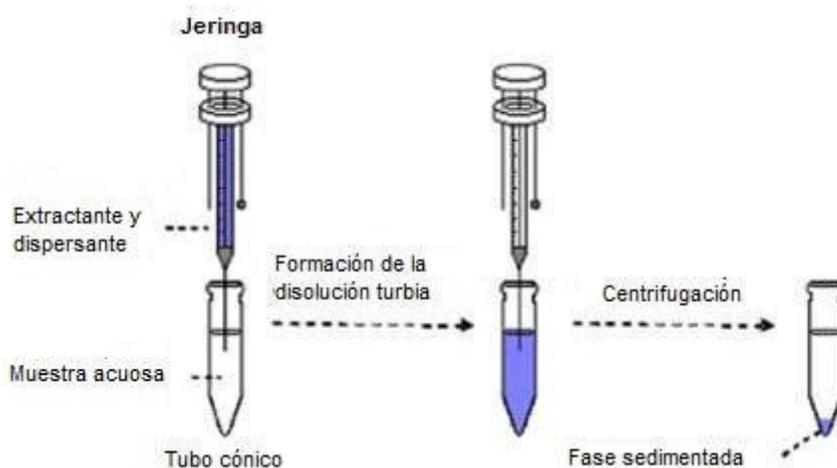


Figura V.1. Representación esquemática del procedimiento de DLLME

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 la formación 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 [4]. 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 [5].

Las dos etapas de extracción de DLLME se ilustran en la Figura V.2 [6].

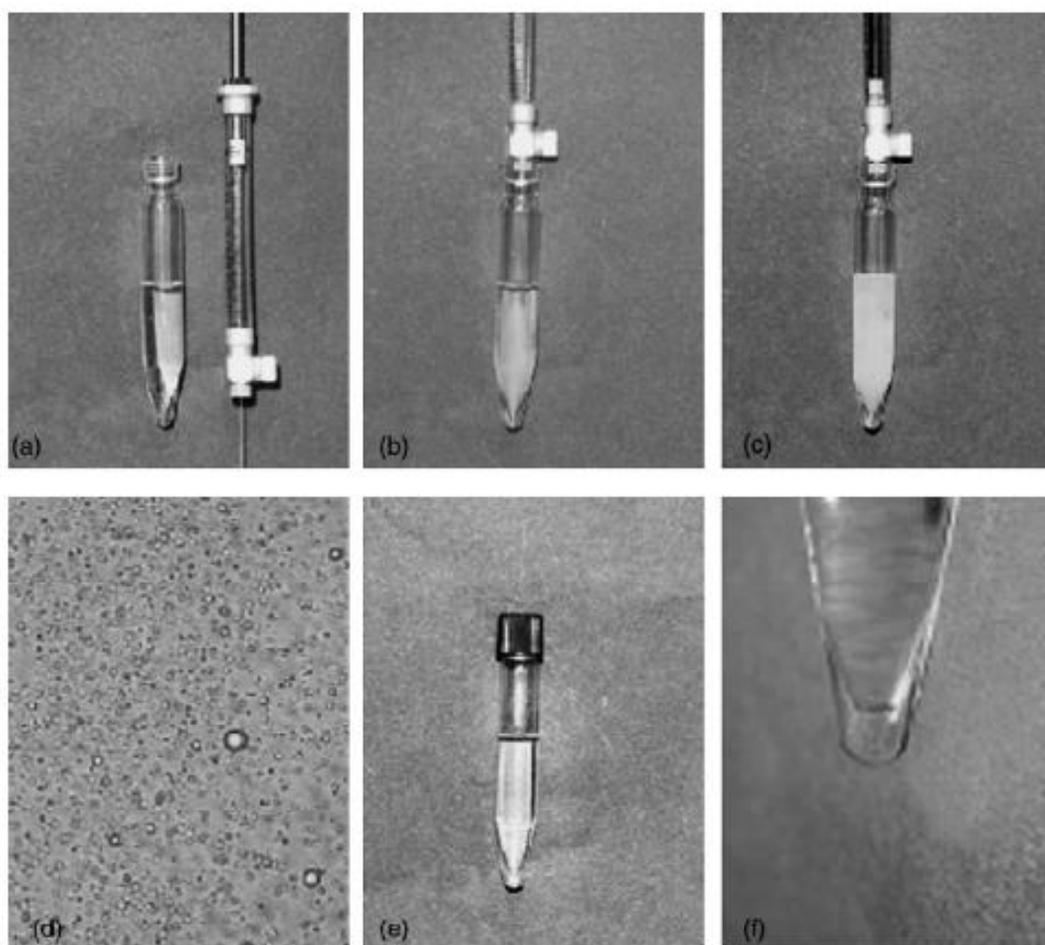


Figura V.2. Fotografía de las diferentes etapas de DLLME: (a) antes de la inyección de la mezcla del disolvente dispersante (acetona) y el disolvente de extracción (C_2Cl_4) en la disolución de la muestra, (b) inicio de la inyección, (c) final de la inyección, (d) fotografía al microscopio óptico, magnitud 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 la gran área interfacial debida a la dispersión que facilita la transferencia de masa y la velocidad de reacción [7]. La turbidez se forma en la fase acuosa debido a la fina dispersión del extractante distribuido a través de la muestra acuosa, que es facilitada por el disolvente dispersante. Después de la formación de la disolución turbia, el área superficial entre el disolvente de extracción y la muestra acuosa es muy grande, así el estado de equilibrio se alcanza rápidamente y, por tanto, el tiempo de extracción es muy corto. Después de centrifugar la disolución turbia, se recupera la fase sedimentada en el fondo de un tubo cónico y se usa con la técnica analítica más apropiada. En DLLME, a diferencia de SDME, la jeringa no se usa como soporte de la gota durante el proceso de extracción sino para coleccionar e inyectar el extracto, evitando así problemas tales como la deslocalización de la gota. No obstante, 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. Además, esta técnica de microextracción parece difícil de automatizar.

V.1.2. PARÁMETROS QUE AFECTAN EN DLLME

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

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

Como en LLE, es muy importante la selección de una fase extractante apropiada en SDME, HF-LPME y 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 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.

El volumen del disolvente extractante tiene un efecto importante sobre el factor de preconcentración o enriquecimiento (EF). Al aumentar el volumen del disolvente extractante, aumenta el volumen de la fase sedimentada obtenida por centrifugación, llevando a una disminución del EF. Por tanto, el volumen óptimo del disolvente extractante debe asegurar tanto valores altos de EFs como suficiente volumen de la fase sedimentada para el análisis posterior después de la centrifugación.

Se necesita una relación pequeña fase extractante/muestra 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 EFs (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.

En DLLME, la fase extractante deber tener mayor densidad que el agua, extraer eficientemente los compuestos, formar una disolución turbia estable y tener baja solubilidad en agua. Por otra parte, el disolvente dispersante debería ser miscible tanto con el disolvente de extracción como con la muestra acuosa. Los disolventes dispersantes más utilizados son acetona, metanol y acetonitrilo. El volumen del disolvente dispersante afecta directamente a la formación de la disolución turbia (agua/disolvente dispersante/disolvente extractante), al grado de dispersión del disolvente extractante en la fase acuosa y, en consecuencia, a la eficiencia de extracción. La variación del volumen del disolvente dispersante cambia el volumen de la fase sedimentada. Así, es necesario cambiar los volúmenes del disolvente dispersante y del disolvente extractante simultáneamente para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada. El volumen útil del disolvente dispersante para obtener una disolución bastante 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:

- (1) solubilidad del disolvente extractante en agua,
- (2) volumen de la disolución de la muestra,
- (3) volumen del disolvente dispersante y
- (4) volumen del disolvente extractante.

Desde el punto de vista experimental, para obtener el volumen de la fase sedimentada deseado, deben hacerse algunos tests 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 (ILs) a temperatura ambiente 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 y miscibilidad con disolventes acuosos y orgánicos y, por tanto, fase de extracción respetuosa con el medio ambiente. Por tanto, son útiles en diversas técnicas de LPME, además de en LLE y SPME [8].

Muy recientemente, Shemirani y col. han desarrollado una modificación de la DLLME llamada Microextracción por Agregación Inducida por Frío (Cold-Induced Aggregation Microextraction, CIAME) [9]. El procedimiento implica la adición de un IL, un surfactante no iónico y un reactivo derivatizante, si es necesario, a una muestra acuosa

colocada en un tubo de centrifuga de fondo cónico. La disolución del IL en la muestra se consigue por calentamiento del tubo de centrifuga en un baño termostataado. Después de esto, el tubo de centrifuga 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. Como la solubilidad del IL aumenta al hacerlo el contenido salino en la muestra, se puede emplear el efecto del ión 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 antiagregante ya que los ILs se adhieren a la pared del tubo después de la centrifugación.

V.1.3. 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.

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}):

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

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

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

V.1.4. APLICACIONES DE DLLME

DLLME se ha aplicado ampliamente para muestras medioambientales de matriz simple como aguas, pero su aplicación al análisis de matrices complejas como fluidos biológicos resulta de mayor dificultad.

A pesar de las ventajas de DLLME, no es muy compatible para la extracción de analitos de muestras biológicas. Debido a la interacción de los componentes de la matriz en este tipo de muestras con disolventes orgánicos, no es posible producir una fase sedimentada útil para la inyección en instrumentos analíticos tales como GC. Para obtener una fase sedimentada útil, se necesita la dilución de la muestra. También, la dilución de muestras reales provoca cambios en las propiedades inherentes de la matriz, pero bajo esta condición, el método es aplicable sólo para las muestras conteniendo concentraciones altas de los analitos.

V.1.4.1. 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 con 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.

V.1.4.2. 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.

V.1.4.3. 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 electrotrémica (ETAAS) necesita microcantidades de la muestra para el 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. Entonces, se lleva a cabo DLLME usando los disolventes extractante y dispersante apropiados.

V.1.4.4. 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 [6]. De hecho, la elución de los analitos con disolventes como metanol o acetonitrilo, permite el uso de los mismos como disolvente dispersante en la etapa de microextracción. La combinación SPE-DLLME ha sido aplicada en este Capítulo para la determinación de neonicotinoides en miel, simplificando la matriz de la muestra de forma previa a su preconcentración.

V.1.4.5. DLLME combinada con SFO

DLLME consume 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 LPME-SFO [10,11] no utiliza 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 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 su análisis [6].

V.1.4.6. 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 antes de DLLME, 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. A veces, es imposible llevar a cabo DLLME para la extracción de analitos de matrices complejas. SFE se ha adoptado como un medio para extraer diferentes sustancias de matrices sólidas y es una combinación útil, SFE y DLLME, como método de preparación de la muestra. 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 EFs 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 [6].

V.2. LOS INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES

Los neonicotinoides, también conocidos como cloronicotinilos, son un grupo de insecticidas con un rango amplio de propiedades químicas y biológicas, por lo que se usan en todo el mundo para la protección de cosechas y en medicina veterinaria [12]. Estos productos químicos actúan como agonistas del receptor de acetilcolina, llevando al insecto a la parálisis y la muerte. El amplio espectro de su actividad insecticida, su modo de acción y su baja toxicidad para los vertebrados, hace que hayan abarcado el 15-20 % del mercado de insecticidas mundial, siendo imidacloprid (IMI) el insecticida más vendido en el mundo [13]. A pesar de ello, los resultados obtenidos en estudios toxicológicos recientes han sugerido que tiametoxam (TMX) e IMI pueden tener efectos negativos sobre la salud humana [14,15]. Por tanto, en varios países se ha restringido el uso de varios insecticidas neonicotinoides debido a una posible relación entre ellos y el colapso de las colonias de abejas productoras de miel, una hipótesis con peso por la toxicidad demostrada de los insecticidas neonicotinoides sobre las colmenas [16].

La preservación de las colonias de abejas tiene gran importancia ya que juegan un papel esencial en la agricultura, fertilizando plantas por transporte de los granos de polen a las plantas de las flores femeninas. Además, cerca de una tercera parte de la producción de la agricultura europea depende de la polinización por insectos, fundamentalmente abejas [17].

La Figura V.3 muestra las fórmulas químicas de los insecticidas neonicotinoides determinados en este Capítulo.

En años recientes, se ha incrementado considerablemente el consumo de miel debido a sus propiedades saludables. Por tanto, la determinación de pesticidas en miel es importante no solo debido a los posibles riesgos serios para la salud humana, sino también porque sus niveles pueden reflejar el riesgo al cual está expuesta la agricultura en general.

Con la excepción de nitempiran, los niveles de residuos de pesticidas en miel han sido fijados por regulaciones de la EU [18], los MRLs para miel (jalea real y polen) son $0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ para la suma de TMX y clotianidina (CLO) (expresados como TMX), $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ para tiacloprid (THIA) y $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para acetamiprid (ACE) e IMI. En consecuencia, se requiere el desarrollo de métodos analíticos simples, rápidos, robustos y económicos.

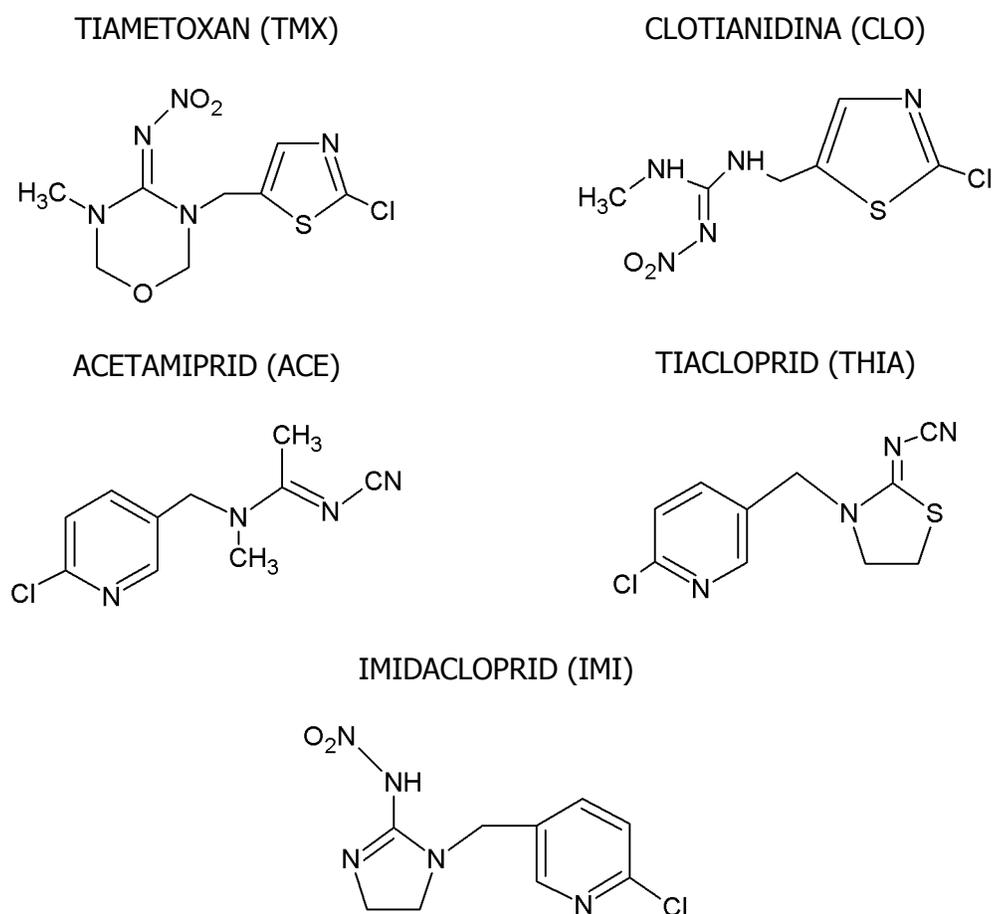


Figura V.3. Fórmulas químicas de insecticidas neonicotinoides

V.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE INSECTICIDAS NEONICOTINOIDES

Los insecticidas neonicotinoides se han determinado fundamentalmente por LC acoplada a diferentes sistemas de detección, siendo el detector más común DAD [19-29] y también MS [30-44]. La baja volatilidad, termolabilidad y elevada polaridad de estos compuestos hacen que GC se haya utilizado en raras ocasiones [45-50]. Por otra parte,

debido a la solubilidad en agua y a la estructura asimétrica de los neonicotinoides, también ha resultado útil para su análisis el método Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), que ha sido aplicado para la determinación de IMI [51-54], ACE [55] y TMX [56].

Mientras que la mayoría de los métodos de LC se han aplicado al análisis de verduras y/o frutas [19,20,23,25-31,36,37,39,43], se han desarrollado muy pocos métodos para muestras de miel [34,38,40,41,44].

La complejidad de las matrices de miel y la necesidad de conseguir LOQs en el intervalo inferior a ng g^{-1} hace necesario incluir una etapa de preparación de la muestra en el procedimiento analítico. A este respecto, se han aplicado SPE [34,38,40,44] y la metodología QuEChERS [41].

DLLME, que usa volúmenes muy pequeños de un disolvente extractante, se ha aplicado con éxito para la extracción y determinación de muchos compuestos orgánicos en muestras acuosas. Se han obtenido EFs elevados con DLLME, pero la complejidad de la matriz de la miel hace que no se puedan conseguir LODs bajos para estas muestras.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es la combinación de SPE y DLLME como método de preparación de muestra para la determinación de varios insecticidas neonicotinoides en muestras de miel por LC con detección DAD y MS/MS. Dos de los cinco neonicotinoides analizados son compuestos de segunda generación, IMI y ACE, y los otros tres están incluidos en la subclase de compuestos tianicotinílicos, TMX, THIA y CLO [12].

En la bibliografía consultada, no se ha hecho referencia a la combinación SPE-DLLME, y además la sensibilidad obtenida es más alta que la de los métodos descritos previamente. Así, después de una etapa de limpieza con cartuchos DSC-18Lt, los analitos son eluidos usando 1,5 mL de acetonitrilo. DLLME se llevó a cabo inyectando rápidamente el extracto de acetonitrilo en 10 mL de agua conteniendo NaCl al 10 % m/v y 100 μL de CHCl_3 . La fase orgánica sedimentada obtenida después de la centrifugación se evaporó, se reconstituyó en acetonitrilo y se sometió a LC con detección DAD y APCI-IT-MS/MS.

Se evaluó el efecto matriz y la cuantificación se llevó a cabo usando calibración por estándar externo con disoluciones acuosas cuando se utilizó DAD, mientras que se aplicó el método de calibración con matriz de la muestra para MS/MS. Se obtuvieron LODs en los

intervalos 0,2–1,0 y 0,02–0,13 ng g⁻¹, usando DAD y MS/MS, respectivamente. El método se aplicó para el análisis de diferentes muestras de miel y en ninguna de ellas se encontraron residuos a niveles de concentración superiores a los LODs correspondientes para cada insecticida.

V.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

V.4.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312B) operando a una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent 1100, G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado (Agilent 1200, G1316B). La separación se realizó en una columna Spherisorb ODS2 (Teknokroma) (150 mm x 4 mm, 5 µm). La inyección (20 µL) se realizó usando un automuestreador (Agilent 1200, G1367C) con viales de 2 mL de capacidad suministrados con microinsertos de 250 µL con pie polimérico.

El detector de diodos fue un Agilent 1100 (G1315C) operando a tres longitudes de onda de 245, 253 y 270 nm.

El espectrómetro de masas fue una IT (Agilent VL-01036) equipada con una fuente APCI que opera en modo de ionización positivo a 400 °C. El nebulizador (60 psi) y el gas de secado (5 L min⁻¹) se calentaron a 400 y 350 °C, respectivamente. El voltaje de la fuente interna se mantuvo a 86,1 V. El tiempo de acumulación máximo para la IT se fijó a 300 ms, el conteo del target a 30000 y el espectro de los iones producto se midió entre 90 y 320 *m/z*. El espectrómetro operó en el modo de monitorización de reacciones múltiples con medida de dos transiciones de iones precursor/producto para cada analito. Ambas transiciones se usaron para cuantificación y confirmación. Se aplicaron energías de colisión entre 20 y 200 % para asegurar el máximo rendimiento de fragmentación.

SPE se llevó a cabo utilizando cartuchos Discovery DSC-18Lt (500 mg) obtenidos de Supelco (Bellefonte, PA, USA) por medio de un sistema de vacío Visipreb SPE (Supelco).

Se usó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) a la máxima velocidad soportada por los tubos de vidrio cónicos, 4000 rpm.

V.4.2. REACTIVOS

Los reactivos acetamiprid ((E)-*N*¹-[(6-cloro-3-piridil)metil]-*N*²-ciano-*N*¹-metilacetamida) (99,9 %, ACE), tiametoxan (3-[(2-cloro-1,3-tiazol-5-il)metil]-5-metil-*N*-nitro-1,3,5-oxadiazinan-4-imina) (99,7 %, TMX), tiacloprid ((Z)-3-(6-cloro-3-piridilmetil)-1,3-tiazolidin-2-ilideneamida) (99,9 %, THIA) y clotianidina ((E)-1-(2-cloro-1,3-tiazol-5-ilmetil)-3-metil-2-nitroguanidina) (99,9 %, CLO) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Switzerland). Imidacloprid (1-(6-cloro-3-piridilmetil)-*N*-nitroimidazolidin-2-ilideneamina) (estándar analítico certificado, 99,0 %, IMI) se obtuvo de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Las disoluciones estándar de los compuestos (1000 µg mL⁻¹) se prepararon usando metanol grado LC como disolvente y se almacenaron en la oscuridad a -18 °C. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente y se almacenaron a 4 °C.

Otros reactivos, cloruro sódico (99,5 %) y dihidrógeno fosfato de potasio (99 %) se obtuvieron de Merck (NJ, USA) y Fluka, respectivamente. Los disolventes de grado reactivo analítico metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,1,2,2-tetracloroetano se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El agua se purificó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

V.4.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se obtuvieron un total de trece muestras de miel de diferentes suministradores. Estas muestras estaban etiquetadas como de eucalipto (1-3), brezo (4-6), azahar (7-9), romero (10-11) y mil flores (12-13), pero no se hizo verificación del origen floral.

Los cartuchos de fase sólida se equilibraron con 3 mL de acetonitrilo y después con 2 mL de disolución de ácido fórmico al 0,1 % v/v, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se disolvieron 2 g de miel en 10 mL de agua y se pasaron por el cartucho a una velocidad de flujo de 5 mL min⁻¹. Entonces se lavaron los cartuchos con 10 mL de agua Milli-Q y se secaron con un sistema de vacío durante 2 min.

Los analitos se eluyeron entonces con 1,5 mL de acetonitrilo, que se usó como disolvente dispersante en la etapa posterior de DLLME. Para ello, se situaron 10 mL de una disolución acuosa conteniendo 10 % m/v de cloruro sódico en un tubo de vidrio de centrífuga con fondo cónico de 15 mL y se añadieron 100 μL de CHCl_3 (disolvente extractante). A continuación, el extracto de 1,5 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) recolectado del SPE se inyectó rápidamente en la disolución acuosa usando una jeringa. Se formó así una disolución turbia, resultante de la dispersión de las finas gotas de CHCl_3 en la disolución acuosa. Después de la extracción durante unos segundos, la mezcla se centrifugó durante 2 min a 4000 rpm y las gotas orgánicas dispersadas sedimentaron al fondo del tubo cónico. Finalmente, la fase depositada se recogió utilizando una microjeringa y se evaporó hasta sequedad usando un flujo suave de nitrógeno y del residuo, reconstituido con 50 μL de acetonitrilo, se inyectó una alícuota de 20 μL en el sistema LC.

Los experimentos de recuperación se realizaron usando muestras de miel fortificadas con una mezcla estándar de los insecticidas a concentraciones correspondientes a 5 y 50 veces el LOQ de cada compuesto. Las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante al menos 30 min antes de aplicar el procedimiento optimizado a masas de muestra de 2 g. El procedimiento de fortificación se aplicó a tres muestras diferentes de miel a dos niveles de concentración y se analizaron tres muestras idénticas en cada caso.

V.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

La optimización de la fase móvil se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,5 mL min^{-1} usando mezclas de metanol y acetonitrilo con agua y disolución de ácido fórmico a diferentes concentraciones (0-0,1 % v/v). La resolución más elevada se consiguió para los tres compuestos menos retenidos (TMX, CLO e IMI) usando una mezcla 40:60 acetonitrilo:ácido fórmico (0,1 % v/v). Sin embargo, no fue posible usar elución isocrática porque algunos picos no aparecieron bien resueltos y/u otros compuestos fueron retenidos fuertemente. Por tanto, se ensayó la elución por gradiente, y el programa optimizado fue el siguiente: gradiente lineal durante 9 min desde una mezcla 20:80 hasta 45:55 acetonitrilo:ácido fórmico (0,1 % v/v), y entonces un nuevo gradiente de elución lineal

desde 45:55 hasta 55:45 en 2 min. El volumen de inyección también se estudió entre 5 y 20 μL , y se seleccionó un volumen de 20 μL , ya que proporcionó la mejor sensibilidad sin solapamiento de los picos cromatográficos con el programa de elución seleccionado finalmente.

El orden de elución, las longitudes de onda para la medida de cada insecticida cuando se usa DAD y las transiciones de los iones precursor/producto se muestran en la Tabla V.1. Los factores de retención (k) se encuentran entre 1,3 y 2,51, los factores de separación (α) en el intervalo 1,12-1,25 y la resolución (R_s) entre 2,9 y 3,6.

Tabla V.1. Resumen de parámetros experimentales

Compuesto	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	λ (nm)	Ión precursor (m/z)	Iones producto (m/z)
TMX	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_3\text{S}$	6,48	253	292	129
				292	175
CLO	$\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}$	7,38	270	250	169
				250	132
IMI	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}_5\text{O}_2$	8,39	270	256	209
				256	175
ACE	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$	9,29	245	223	126
				223	187
THIA	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{S}$	10,03	245	253	126
				253	226

V.6. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES SPE

Se utilizó SPE como método de aislamiento y purificación para las muestras de miel. Como fase estacionaria, se seleccionaron cartuchos DSC-18Lt. Los cartuchos se acondicionaron primero como se ha indicado en la sección Experimental y pasando a través del mismo una muestra de 2 g de miel disuelta previamente en 10 mL de agua.

Para la elución de los analitos se usó acetonitrilo y se ensayaron diferentes volúmenes (0,5; 0,75; 1,5 y 3 mL) a velocidades de flujo en el intervalo 1-5 mL min^{-1} . Volúmenes de 0,5 y 0,75 mL fueron insuficientes para eluir los compuestos retenidos. Se

consiguieron recuperaciones totales con 1,5 mL de acetonitrilo. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes velocidades de flujo para la elución en el rango estudiado y se seleccionó 5 mL min⁻¹.

V.7. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DLLME

Se llevaron a cabo experimentos previos para optimizar el procedimiento DLLME usando 1,5 mL de acetonitrilo conteniendo los insecticidas neonicotinoides a un nivel de concentración de 250 ng mL⁻¹.

Cuando se ensayaron disolventes extractantes de densidad mayor que el agua, se acumularon rápidamente en el fondo del tubo cónico y fueron muy fáciles de recolectar. Se probó el efecto de CCl₄, CHCl₃, CH₂Cl₂ y C₂H₂Cl₄. Se recuperaron volúmenes bien definidos con CCl₄, CHCl₃ y 1,1,2,2-tetracloroetano, usando 100 µL de extractante y 1,5 mL de acetonitrilo como disolvente dispersante. No se obtuvo fase sedimentada cuando se usó CH₂Cl₂ y las recuperaciones más altas se obtuvieron con CHCl₃ que fue el disolvente seleccionado.

Con objeto de estudiar el efecto del volumen del disolvente extractante, se sometieron 1,5 mL de acetonitrilo conteniendo volúmenes diferentes de CHCl₃ (50, 100, 150 y 200 µL) al procedimiento DLLME. Se observó un efecto de dilución para volúmenes elevados, obteniendo los mejores resultados con 100 µL del extractante orgánico.

La influencia de la fuerza iónica se evaluó a concentraciones de cloruro sódico entre 0 y 30 % m/v en la fase acuosa (10 mL). No se pudieron utilizar niveles de concentración superiores a 20 % m/v porque no se producía sedimentación de la fase orgánica. Mientras que se obtuvo un ligero aumento de sensibilidad para TMX, CLO e IMI al aumentar la concentración de NaCl hasta el 20 % m/v, se produjo el efecto opuesto para ACE y THIA. Por tanto, se seleccionó como valor de compromiso el 10 % m/v.

Para evaluar la influencia del pH de la fase acuosa, se ajustaron alícuotas de agua ultrapura a valores de pH entre 3 y 8 con una disolución reguladora de fosfato 0,01 M, en presencia de la concentración optimizada de NaCl. El volumen de la fase sedimentada del disolvente orgánico no varió y tampoco se apreciaron diferencias en la señal analítica para los analitos. Por tanto, las muestras se analizaron sin ajuste del pH de la fase acuosa.

Se agitaron manualmente mezclas del disolvente extractante, el dispersante y la fase acuosa durante tiempos diferentes entre unos pocos segundos y 5 min, antes de someter la mezcla a centrifugación durante 5 min a 4000 rpm. En todos los casos se obtuvieron áreas de pico similares, indicando que el procedimiento DLLME fue prácticamente independiente del tiempo, siendo esta una de las principales ventajas de la técnica. En consecuencia, se necesitaron sólo unos pocos segundos para extraer a los analitos.

Ni el volumen de la fase sedimentada ni la sensibilidad para los analitos se modificó cuando se centrifugaron las muestras durante diferentes tiempos en el intervalo 1-10 min a 4000 rpm, o a diferentes velocidades de centrifugación comprendidas entre 2000 y 6000 rpm durante 2 min. Las condiciones de centrifugación adoptadas finalmente fueron 4000 rpm y 2 min. El volumen de la fase sedimentada fue $80 \pm 5 \mu\text{L}$.

V.8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Para investigar la posibilidad de la existencia de efecto matriz, se utilizó el método de adiciones estándar. La Tabla V.2 muestra las pendientes para diferentes muestras de miel usando las condiciones experimentales optimizadas y el área de pico como parámetro analítico, así como las pendientes obtenidas para estándares acuosos, utilizando tanto DAD como MS/MS. Se llevó a cabo un estudio estadístico para comparar los valores de las pendientes usando el test-t de una muestra, que operó comparando las diferentes pendientes obtenidas para las muestras de miel con la pendiente acuosa para cada analito.

Cuando se utilizó detección DAD, las pendientes de las gráficas de calibrado de adiciones estándar con niveles de fortificación de 5-500 ng g^{-1} , dependiendo del compuesto, fueron similares a las de la calibración acuosa (valores de p en el rango 0,22-0,83) en todos los casos, confirmando que la matriz no interfiere y que la calibración se puede llevar a cabo utilizando estándares acuosos. Los coeficientes de regresión fueron mayores que 0,996.

Sin embargo, cuando se usó detección MS/MS, la coelución de compuestos de la matriz suprimió parcialmente la ionización de los analitos, con la excepción de ACE y THIA

en algunas matrices de miel, como se puede observar en la Tabla V.2. Así, se usó el método de calibración con una matriz de la muestra de miel exenta de analitos para la cuantificación de las muestras, ya que la comparación de las pendientes de las gráficas de calibrado de adiciones estándar, con niveles de fortificación en el rango 0,5-100 ng g⁻¹, dependiendo del compuesto, no mostraron diferencias significativas entre ellas (valores de p entre 0,49 y 0,75).

Tabla V.2. Pendientes^a de las gráficas de calibrado de adiciones estándar (mL ng⁻¹)

Compuesto	Estándares acuosos	Miel de eucalipto	Miel de brezo	Miel de azahar	Miel mil flores
LC-DAD					
TMX	2,72±0,18	2,64±0,21	2,79±0,27	2,81±0,21	2,89±0,32
CLO	3,27±0,20	3,21±0,44	3,14±0,30	3,08±0,35	3,31±0,39
IMI	9,32±0,62	8,99±0,85	9,37±0,73	9,13±0,94	8,85±0,78
ACE	23,9±1,6	23,6±1,9	24,3±2,1	22,8±1,9	24,1±1,8
THIA	24,3±1,8	23,6±1,7	24,0±1,9	22,9±2,1	23,5±1,9
LC-MS/MS					
TMX	4739±349	3975±210	3915±139	3862±195	3840±186
CLO	5679±635	4297±264	4278±198	4380±241	4199±216
IMI	32531±6120	23241±3026	21972±1661	24698±2370	22667±2740
ACE	19732±3368	16349±1984	16958±1205	16277±1811	15234±2154
THIA	50460±6202	43029±3824	41290±3340	44016±4209	44422±3983

^a Valor medio±desviación estándar (n=4).

Se obtuvo linealidad en los intervalos de concentración entre 1 y 7500 ng g⁻¹ cuando se usó DAD y entre 0,1 y 1000 ng g⁻¹, cuando se usó MS/MS. Los coeficientes de regresión fueron mayores que 0,996 en todos los casos. Los LODs y LOQs se calcularon en base a tres y diez veces la SD de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado, calibración con estándares acuosos para DAD y con una matriz de miel de romero para MS/MS (Tabla V.3). La repetitividad se calculó usando la RSD del área de pico para diez fortificaciones sucesivas de una muestra de miel a dos niveles de concentración (Tabla V.3).

El procedimiento SPE-DLLME-LC-MS/MS optimizado permite obtener un aumento importante de la sensibilidad, dependiente del compuesto, y un menor consumo de muestra respecto de trabajos previos que utilizan DSPE [41] y SPE [34,40].

Tabla V.3. Características analíticas de los métodos

Compuesto	Linealidad (ng g ⁻¹)	Ordenada en el origen ^a	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	RSD ^b (%)	
LC-DAD						
TMX	2,5-7500	2,21±0,18	1,0	3,3	6,4 (25)	4,1 (100)
CLO	2,5-7500	3,06±0,17	0,8	2,7	6,8 (25)	5,3 (100)
IMI	1-5000	2,90±0,25	0,4	1,3	5,7 (10)	4,6 (50)
ACE	1-5000	3,98±0,31	0,2	0,7	4,5 (10)	3,8 (50)
THIA	1-5000	4,01±0,33	0,2	0,7	3,8 (10)	3,2 (50)
LC-MS/MS						
TMX	0,5-1000	943±34	0,13	0,43	7,1 (5)	5,1 (25)
CLO	0,5-1000	791±35	0,12	0,40	7,0 (5)	4,8 (25)
IMI	0,1-500	2268±44	0,03	0,10	4,9 (1)	3,7 (10)
ACE	0,1-500	1567±45	0,04	0,13	5,3 (1)	3,9 (10)
THIA	0,1-500	3221±57	0,02	0,07	3,2 (1)	2,8 (10)

^a Valor medio±SD (n=4). ^b n=10. Los valores entre paréntesis corresponden a concentraciones en ng g⁻¹

V.9. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

El método SPE-DLLME-LC-MS/MS se aplicó al análisis de diferentes muestras de miel y en ninguna de ellas se encontraron los insecticidas por encima de sus LODs. En consecuencia, las mieles analizadas cumplen las regulaciones de la EU relativas a los insecticidas neonicotinoides [18].

La validez de ambos procedimientos optimizados se evaluó mediante estudios de recuperación para tres muestras de miel diferentes fortificadas a dos niveles de concentración. Las recuperaciones de los insecticidas de las muestras de miel fortificadas variaron entre 90 y 104 %, con una recuperación promedio±SD (n=90) de 96±4, como se puede comprobar en la Tabla V.4, para el método LC-MS/MS.

No se observaron diferencias significativas en los valores de RSD obtenidos para las recuperaciones de los distintos insecticidas en cada muestra de miel analizada, variando los valores entre 1,5 y 10 % para miel de eucalipto y miel de brezo, respectivamente. Cuando se llevaron a cabo estudios de recuperación a las mismas muestras de miel fortificadas a concentraciones de 10 y 100 ng g⁻¹ para TMX y CLO y de 5 y 50 ng g⁻¹ para IMI, ACE y THIA, usando el método LC-DAD, se obtuvo un valor de recuperación promedio±SD (n=90) de 94±8.

Tabla V.4. Recuperaciones^a de los insecticidas en muestras de miel fortificadas usando el método LC-MS/MS

Compuesto	Nivel fortificado (ng g ⁻¹)	Miel de eucalipto	Miel de brezo	Miel de romero
TMX	2,0	94 ± 7	96 ± 4	91 ± 4
	2,0	103 ± 5	98 ± 4	97 ± 6
CLO	2,0	91 ± 6	91 ± 8	90 ± 6
	20	98 ± 6	95 ± 5	96 ± 6
IMI	0,5	97 ± 5	90 ± 5	97 ± 5
	5,0	98 ± 5	94 ± 8	102 ± 6
ACE	0,5	92 ± 8	99 ± 10	94 ± 7
	5,0	101 ± 1	102 ± 4	104 ± 3
THIA	0,5	94 ± 4	90 ± 5	94 ± 5
	5,0	103 ± 3	99 ± 6	99 ± 5

^a Valor medio±SD (n=3)

La Figura V.4 muestra los cromatogramas obtenidos usando SPE-DLLME-LC-DAD para una muestra de miel fortificada. Cuando se usó DAD, los picos se identificaron midiendo continuamente el espectro mientras el soluto pasa a través de la célula de flujo, confirmando así la identidad y pureza de los picos. Se consiguió una buena concordancia entre los espectros de los diferentes picos obtenidos para los estándares acuosos y las muestras fortificadas.

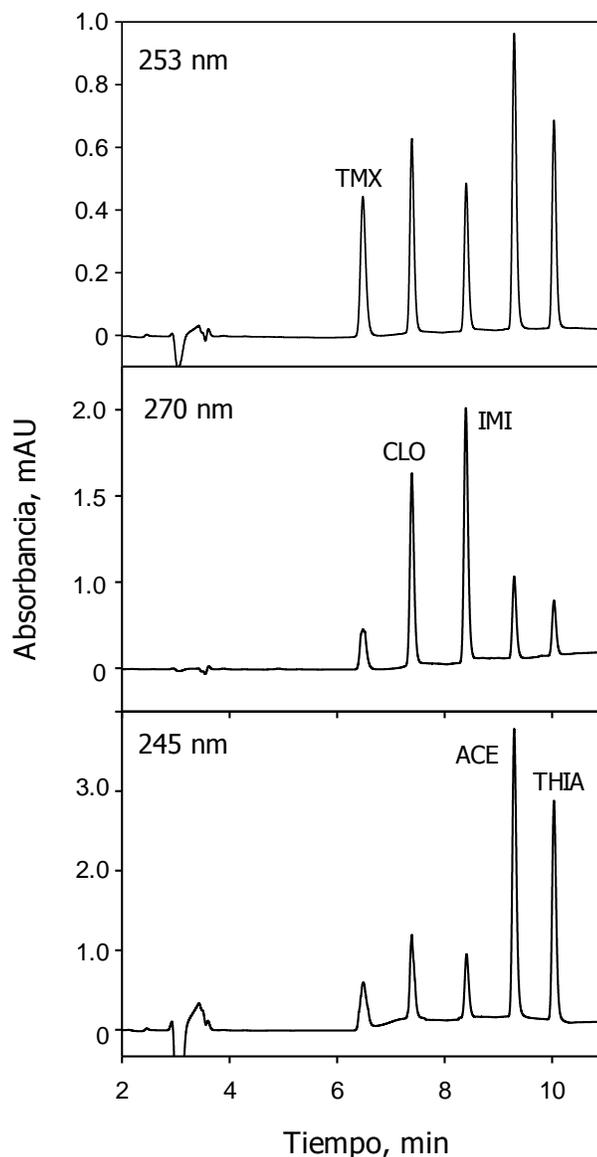


Figura V.4. Perfiles de elución obtenidos de una muestra de miel fortificada usando el procedimiento SPE-DLLME-LC-DAD. Las concentraciones de la miel fortificada son: 6 ng g⁻¹ para TMX y CLO y 2,5 ng g⁻¹ para IMI, ACE y THIA

La Figura V.5 muestra el cromatograma de iones totales obtenido para la misma muestra de miel fortificada, usando el procedimiento optimizado SPE-DLLME-LC-MS/MS, a niveles de concentración correspondientes a aproximadamente 5 veces el LOQ de cada compuesto. La identidad de los analitos se confirmó comparando el tiempo de retención y las relaciones de intensidad de la señal de las dos transiciones MS/MS en las muestras de miel con las obtenidas usando estándares acuosos. Los cromatogramas obtenidos para

diferentes muestras de miel no fortificadas mostraron la ausencia de picos interferentes a los tiempos de retención de los analitos, con ambos sistemas de detección DAD y MS/MS.

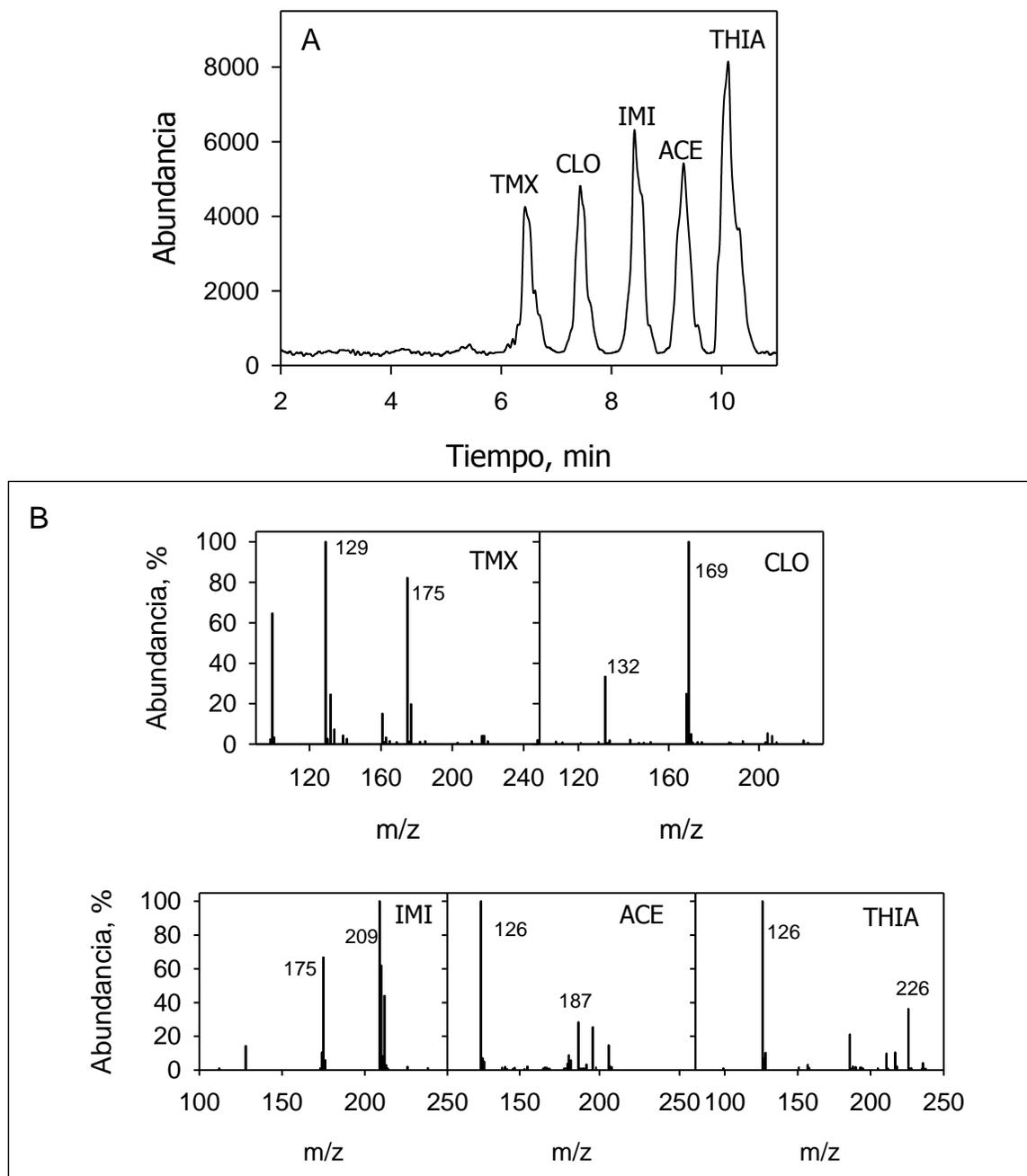


Figura V.5. (A) Cromatograma de iones totales obtenido usando SPE-DLLME combinado con LC-APCI-IT-MS/MS para una muestra de miel fortificada a un nivel de concentración de aproximadamente 5 veces los LOQs correspondientes. (B) Espectros de masas de los compuestos bajo las condiciones seleccionadas

V.10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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.
- [2] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. 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.
- [3] 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.
- [4] L.L. Schramm, Emulsions, Foams, and Suspensions. Fundamentals and Applications, Willey-VCH, Alemania, 2005.
- [5] 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.
- [6] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
- [7] 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.
- [8] J.F. Liu, J.A. Jonsson, G.B. Jiang, Application of ionic liquids in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20-27.
- [9] M. Baghdadi, F. Shemirani, Cold-induced aggregation microextraction: a novel sample preparation technique based on ionic liquids, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 56-63.
- [10] 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.
- [11] L. Ramos, J.J. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Miniaturization in sample treatment for environmental analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119-140.

- [12] P. Maienfisch, H. Huerlimann, A. Rindlisbacher, L. Gsell, H. Dettwiler, J. Haettenschwiler, E. Sieger, M. Walti, The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid, *Pest. Manag. Sci.* 57 (2001) 165-176.
- [13] T. Xu, C.M. Jacobsen, I.K. Cho, A.H. Hara, Q.X. Li, Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of imidacloprid in wiliwili tree, *Erythrina sandwicensis* O. Deg, for control of the wasp *Quadrastichus erythrinae*, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 8444-8449.
- [14] T. Green, A. Toghill, R. Lee, F. Waechter, E. Weber, R. Peffer, J. Noakes, M. Robinson, Thiametoxam induced mouse liver tumors and their relevance to humans. Part 2: Species differences in responses, *Toxicol. Sci.* 86 (2005) 48-55.
- [15] V. Duzguner, S. Erdogan, Acute oxidant and inflammatory effects of imidacloprid in the mammalian central nervous system and liver in rats, *Pest. Biochem. Physiol.* 97 (2010) 13-18.
- [16] R. Nauen, U. Ebbinghaus-Kintscher, R. Schmuck, Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae), *Pest. Manag. Sci.* 57 (2001) 577-586.
- [17] I. Williams, Insect pollination and crop production: A European perspective. En: P. Kevan, V.L. Imperatriz Fonseca, (Eds), *Pollination bees - The conservation link between agriculture and nature*, Ministry of Environment, Brasil, 2002.
- [18] EU Pesticides database, Pesticide EU-MRLs Regulation (EC), 2008.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Último acceso en Febrero de 2013.
- [19] H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, Determination of acetamiprid, imidacloprid, and nitenpyram residues in vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 4464-4467.
- [20] S.B. Singh, G.D. Foster, S.U. Khan, Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of thiametoxam, imidacloprid, and carbendazim residues in fresh and cooked vegetable samples, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 105-109.

- [21] S. Rossi, A.G. Sabatini, R. Cenciarini, S. Ghini, S. Girotti, Use of high-performance liquid chromatography-UV and gas chromatography-mass spectrometry for determination of the imidacloprid content of honeybees, pollen, paper filters, grass, and flowers, *Chromatographia* 61 (2005) 189-195.
- [22] Q. Zhou, Y. Ding, J. Xiao, Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1520-1525.
- [23] E. Watanabe, K. Baba, H. Eun, Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in agricultural samples by solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography equipped with diode-array detection, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 3798-3804.
- [24] S. Seccia, P. Fidente, D. Montesano, P. Morrica, Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine milk samples by solid-phase extraction clean-up and liquid chromatography with diode-array detection, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 115-120.
- [25] K.A. Ford, J.E. Casida, Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven neonicotinoid insecticides in spinach, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 10168-10175.
- [26] M. Gupta, A. Shanker, Persistence of acetamiprid in tea and its transfer from made tea to infusion, *Food Chem.* 111 (2008) 805-810.
- [27] M.L. Chin-Chen, J. Esteve-Romero, S. Carda-Broch, Determination of the insecticide imidacloprid in fruit juices using micellar high-performance liquid chromatography, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 1551-1556.
- [28] A. Tapparo, C. Giorio, M. Marzaro, D. Marton, L. Soldà, V. Girolami, Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedling obtained from coated seeds, *J. Environ. Monitor.* 13 (2011) 1564-1568.
- [29] Q. Wu, Z. Li, C. Wang, C. Wu, W. Wang, Z. Wang, Dispersive solid-phase extraction clean-up combined with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of neonicotinoid insecticides in vegetable samples by high-performance liquid chromatography, *Food Anal. Methods* 4 (2011) 559-566.

- [30] C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, J. Mañes, Simultaneous determination of imidacloprid, carbendazim, methiocarb and hexythiazox in peaches and nectarines by liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 109-116.
- [31] H. Obana, M. Okihashi, K. Akutsu, Y. Kitagawa, S. Hori, Determination of neonicotinoid pesticide residues in vegetables and fruits with solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2501-2505.
- [32] J.M. Bonmatin, I. Moineau, R. Charvet, C. Fleche, M.E. Colin, E.R. Bengsch, A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2027-2033.
- [33] A. Marín, J.L. Martínez Vidal, F.J. Egea González, A. Garrido Frenich, C.R. Glass, M. Sykes, Assessment of potential (inhalation and dermal) and actual exposure to acetamiprid by greenhouse applicators using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 804 (2004) 269-275.
- [34] P. Fidente, S. Seccia, F. Vanni, P. Morrica, Analysis of nicotinoid insecticides residues in honey by solid matrix partition clean-up and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 175-178.
- [35] S. Seccia, P. Fidente, D. Attard Barbini, P. Morrica, Multiresidue determination of nicotinoid insecticide residue in drinking water by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 21-26.
- [36] I. Ferrer, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba, Quantitation and accurate mass analysis of pesticides in vegetables by LC/TOF-MS, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2818-2825.
- [37] A. Di Muccio, P. Fidente, D. Attard Barbini, R. Dommarco, S. Seccia, P. Morrica, Application of solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry to the determination of neonicotinoid pesticide residues in fruits and vegetables, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 1-6.
- [38] C. Pirard, J. Widart, B.K. Nguyen, C. Deleuze, L. Heudt, E. Haubruge, E. De Pauw, J.F. Focant, Development and validation of a multi-residue method for pesticide

- determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 116-123.
- [39] M. Mezcuá, C. Ferrer, J.F. García-Reyes, M.J. Martínez-Bueno, M. Albarracín, M. Claret, A.R. Fernández-Alba, Determination of selected non-authorized insecticides in peppers by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1384-1392.
- [40] A. Kamel, Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 5926-5931.
- [41] G. Tanner, C. Czerwenka, LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 12271-12277.
- [42] Z. Xiao, X. Li, X. Wang, J. Shen, S. Ding, Determination of neonicotinoid insecticides residues in bovine tissues by pressurized solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 117-122.
- [43] W. Xie, C. Han, Y. Qian, H. Ding, X. Chen, J. Xi, Determination of neonicotinoid pesticides residues in agricultural samples by solid-phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4426-4433.
- [44] A. Martel, C. Lair, Validation of a highly sensitive method for the determination of neonicotinoid insecticides residues in honeybees by liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 978-988.
- [45] A. Navalón, A. González-Casado, R. El-Khattabi, J.L. Vilchez, A.R. Fernández-Alba, Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 122 (1997) 579-581.
- [46] R.G. Lodevico, Q.X. Li, Determination of total imidacloprid residues in coffee by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Lett.* 35 (2002) 315-326.

- [47] M. Mateu-Sánchez, M. Moreno, F.J. Arrebola, J.L. Martínez Vidal, Analysis of acetamiprid in vegetables using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Sci.* 19 (2003) 701-704.
- [48] Y. Ono, T. Yamagami, T. Nishina, T. Tobino, Pesticide multiresidue analysis of 303 compounds using supercritical fluid extraction, *Anal. Sci.* 22 (2006) 1473-1476.
- [49] L. Liu, Y. Hashi, Y. Qin, H. Zhou, J. Lin, Development of automated online gel permeation chromatography-gas chromatograph mass spectrometry for measuring multiresidual pesticides in agricultural products, *J. Chromatogr. B* 845 (2007) 61-68.
- [50] B. Zhang, X. Pan, L. Venne, S. Dunnum, S.T. McMurry, G.P. Cobb, T.A. Anderson, Development of a method for the determination of 9 currently used cotton pesticides by gas chromatography with electron capture detection, *Talanta* 75 (2008) 1055-1060.
- [51] E. Watanabe, H. Eun, K. Baba, T. Arao, Y. Ishii, S. Endo, M. Ueji, Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA, *Anal. Chim. Acta* 521 (2004) 45-51.
- [52] H. Kim, W.L. Shelver, Q.X. Li, Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid, *Anal. Chim. Acta* 509 (2004) 111-118.
- [53] S. Girotti, E. Maiolini, S. Ghini, S. Eremin, J. Mañes, Quantification of imidacloprid in honeybees: development of a chemiluminescent ELISA, *Anal. Lett.* 43 (2010) 466-475.
- [54] R. Wang, Z. Wang, H. Yang, Y. Wang, A. Deng, Highly sensitive and specific detection of neonicotinoid insecticide imidacloprid in environmental and food samples by a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 1253-1260.
- [55] E. Watanabe, S. Miyake, K. Baba, H. Eun, S. Endo, Immunoassay for acetamiprid detection: application to residue analysis and comparison with liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1441-1448.

- [56] H. Kim, S. Liu, Y. Keum, Q.X. Li, Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide thiamethoxam, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1823-1830.

CAPÍTULO VI

**DETERMINACIÓN DE LACTONAS
MACROCÍCLICAS EN LECHE USANDO
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-
LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON
DETECCIÓN POR DIODOS Y ESPECTROMETRÍA
DE MASAS EN TÁNDEM CON IONIZACIÓN
QUÍMICA A PRESIÓN ATMOSFÉRICA Y TRAMPA
DE IONES**

VI.1. LACTONAS MACROCÍCLICAS

Las avermectinas y las milbemicinas pertenecen a la familia de las lactonas macrocíclicas, también llamadas endectocidas macrólidos, compuestos que se originan a partir de la fermentación de microorganismos del suelo del género *Streptomyces*. Más específicamente, las avermectinas se han aislado a partir de cultivos de *S. avermitilis* y las milbemicinas a partir de *S. cyanogrise* o *S. hygroscopicus* [1].

Abamectina (ABA), doramectina (DOR), eprinomectina (EPRI) e ivermectina (IVM) son avermectinas e incluyen sustituyentes tipo sacárido en la posición C13 en su molécula. Por otra parte, la moxidectina (MOX) es una milbemicina con una estructura que es similar a las avermectinas pero sin los sustituyentes sacárido. La Figura VI.1 muestra sus estructuras químicas.

Estos compuestos se usan como antihelmínticos contra infecciones en animales productores de alimentos, así como en agricultura, siendo ABA e IVM los más ampliamente utilizados. Tanto las avermectinas como las milbemicinas tienen el mismo modo de acción, interactuando con los canales del receptor para la inhibición de los neurotransmisores. Considerando su efectividad incluso a dosis bajas contra ecto- y endoparásitos así como su baja toxicidad para los mamíferos, se ha extendido su uso en granjas de ganado [1,2]. Cuando se administran en forma correcta a las dosis recomendadas, no presentan un riesgo para la salud humana y garantizan la seguridad de la cadena alimentaria.

La demanda de los consumidores implica que estos compuestos químicos deben ser controlados en alimentos de origen animal, especialmente aquellos incluidos comúnmente en la dieta diaria, como es el caso de la leche. La elevada liposolubilidad de los endectocidas macrólidos significa que pueden ser excretados fácilmente por la leche. Así, la Unión Europea ha establecido MRLs en leche, 40 ng g⁻¹ para MOX y 20 ng g⁻¹ para

EPRI. En el caso de ABA, DOR e IVM, se ha establecido tolerancia cero ya que no tienen licencia para ser aplicados en especies en lactancia en la EU [3-5].

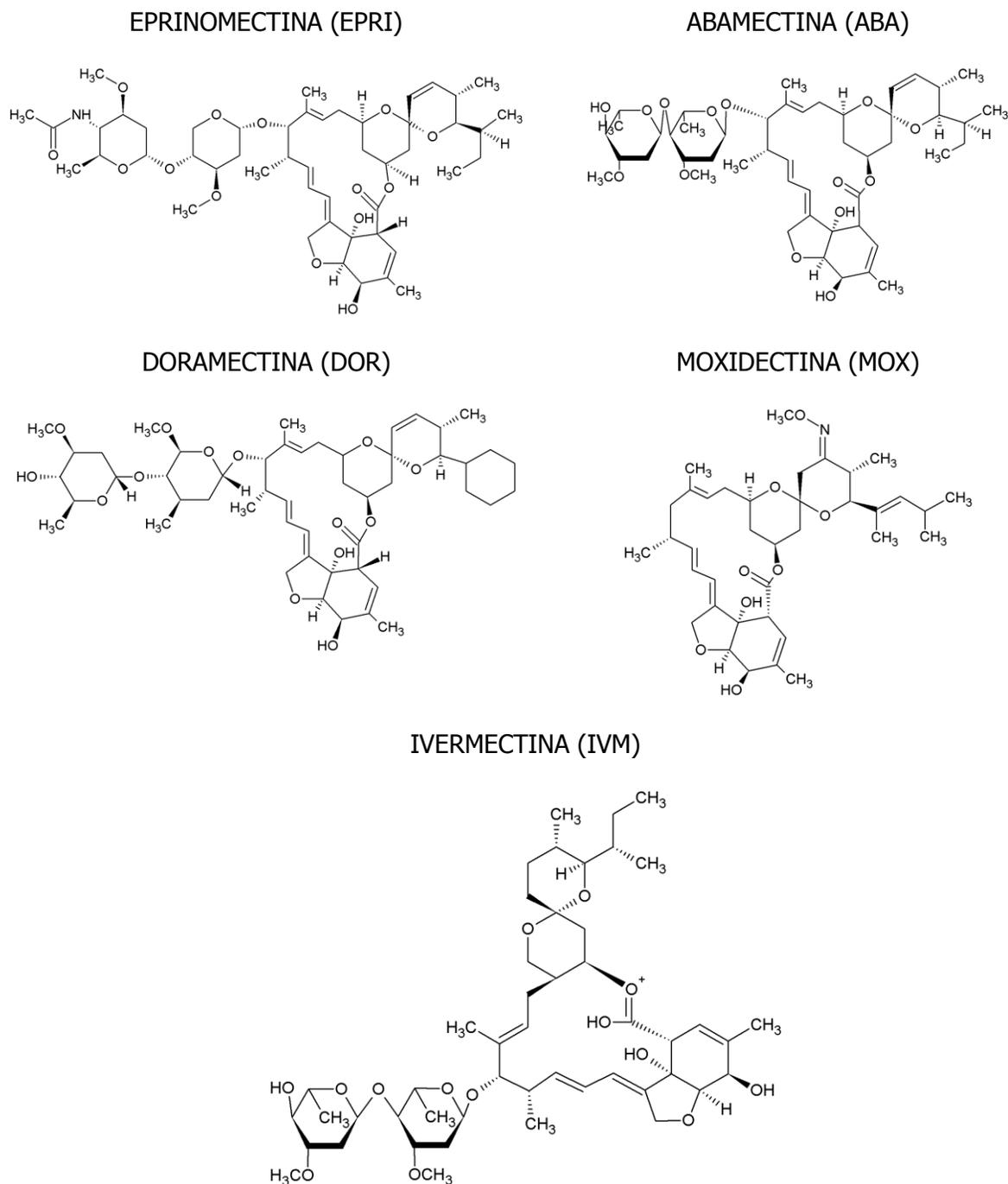


Figura VI.1. Estructuras químicas de las lactonas macrocíclicas

VI.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE LACTONAS MACROCÍCLICAS

Se ha revisado la metodología analítica para la determinación de lactonas macrocíclicas en diferentes matrices biológicas incluyendo leche [2]. Considerando el carácter no volátil así como el elevado peso molecular de estos compuestos, la técnica más ampliamente usada es LC, especialmente acoplada con detección UV [6,7], FLD [8-18] y MS [19-31]. Aunque FLD proporciona LODs mejores que MS, requiere la inclusión de una etapa de derivatización en el procedimiento.

La mayoría de métodos para el análisis de leche incluyen una etapa de SPE [10,11,14-16,19-22,24] o LLE [6,8,12,17,18,23] para purificación y preconcentración de los extractos una vez que se han aislado las proteínas de la matriz de la muestra. Para este propósito se ha mostrado muy efectiva la metodología QuEChERS [26,29,30].

A pesar de las ampliamente probadas ventajas de las técnicas de extracción miniaturizadas, que permiten la extracción selectiva de los analitos de acuerdo con su naturaleza físico-química y con un consumo muy bajo o incluso nulo de disolvente orgánico, solo se ha encontrado en la bibliografía un procedimiento para la determinación de endectocidas macrólidos basado en la medida de los niveles de IVM en aguas usando la técnica de extracción de fibra hueca soportada en membrana líquida (HF-SLM) [25].

DLLME es una técnica de extracción basada en el uso de un sistema de disolventes ternario [32-36], que presenta varias ventajas sobre HF-SLM, incluyendo un ahorro sustancial de tiempo y mayor simplicidad. Comparada con otras técnicas miniaturizadas en las que los analitos son extraídos sobre una fase sólida, por ejemplo SPME y SBSE, las principales ventajas de DLLME son su rapidez, bajo costo y ausencia de efectos de memoria.

En este Capítulo se aborda la determinación de cinco lactonas macrocíclicas, EPRI, ABA, DOR, MOX e IVM en muestras de leche combinando DLLME con LC-DAD-MS/MS. Las proteínas de la leche se eliminaron por precipitación con TCA y se preconcentraron los analitos usando 2 mL de acetonitrilo conteniendo 200 μ L de cloroformo como medio de extracción. Se evaluó el efecto de diversos parámetros sobre la eficiencia de DLLME. Para llevar a cabo la cuantificación se utilizaron gráficas de calibrado en presencia de la matriz, obteniendo en todos los casos coeficientes de regresión mejores que 0,997 y LOQs entre 1,0 y 4,7 ng g^{-1} y entre 0,1 y 2,4 ng g^{-1} , cuando se usó DAD y MS, respectivamente. El

método optimizado se aplicó con éxito al análisis de diferentes muestras de leche y en ninguna de ellas se detectaron los analitos estudiados. Las recuperaciones para muestras de leche fortificadas a niveles de concentración comprendidos entre 0,5 y 50 ng g⁻¹, dependiendo del compuesto, se encontraron entre 89,5 y 105 %, con RSDs menores del 9 % (n=135). Son ventajas importantes del método la simplicidad, rapidez y robustez, además de que la etapa de preparación de la muestra puede considerarse como respetuosa medioambientalmente.

VI.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VI.3.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312A) con una velocidad de flujo de 0,8 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado a 45 °C (Agilent G1316A). La columna analítica usada fue Tracer Extrasil ODS2 (Teknokroma, Barcelona, Spain) (150 mm x 4 mm, 5 µm). La inyección (20 µL) se llevó a cabo usando un automuestreador (Agilent G1329A).

El detector de diodos fue un Agilent G1315D operando a la longitud de onda de 245 nm.

El espectrómetro de masas fue una IT (Agilent VL-01036) equipada con una fuente APCI operando en modo de ionización negativo a 400 °C. El nebulizador (60 psi) y el gas de secado (5 L min⁻¹) se calentaron a 400 y 350 °C, respectivamente. El voltaje de la fuente interna se mantuvo a -109 V. El tiempo de acumulación máximo para la trampa de iones se fijó a 300 ms, el conteo del ión target a 30000 y el espectro de los iones producto se midió entre 300 y 1200 *m/z*. Las masas de los iones producto se definieron en ventanas de tiempo separadas o en períodos de tiempo de 2.0 unidades de masa para cada compuesto cuando eluyen de la columna LC (Tabla VI.1). Se aplicaron energías de colisión entre 20 y 200 % para asegurar el máximo rendimiento de fragmentación. Los patrones de fragmentación estuvieron en concordancia con los espectros de masas

descritos previamente para las lactonas macrocíclicas [20]. Para la cuantificación de las muestras se usaron los cromatogramas de iones totales.

Se utilizó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany) y una centrífuga (Selecta, Barcelona, Spain).

Tabla VI.1. Parámetros de detección para el análisis LC-MS/MS de los endectocidas

Compuesto	Ión precursor m/z [M-H] ⁻	Iones producto (m/z)	Ventana de tiempo (min)
EPRI	913,5	830,4 / 565,3	3,6 – 5,2
ABA	872,0	789,6 / 565,8	5,2 – 6,5
DOR	899,0	816,4 / 592,3	6,5 – 7,5
MOX	639,0	594,5 / 528,5	8,1 – 9,2
IVM	874,0	791,7 / 567,8	9,2 – 10,5

VI.3.2. REACTIVOS

ABA y DOR fueron suministrados por Fluka (Buchs, Switzerland). IVM y MOX por Sigma (St. Louis, MO, USA) y Dr. Ehrenstorfer GmbH (Ausburg, Germany), respectivamente. La pureza de estos compuestos estuvo entre 94,8 y 97,6 %. EPRI fue suministrado como disolución individual en acetonitrilo ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) por Fluka. Las disoluciones estándar individuales ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) se prepararon usando acetonitrilo grado LC como disolvente y se almacenaron en la oscuridad a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Otros reactivos fueron cloruro sódico (99,5 %) y TCA, obtenidos de Merck (NJ, USA) y Sigma, respectivamente.

Se utilizaron metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono y 1,1,2,2-tetracloroetano obtenidos de Sigma. El agua destilada se purificó usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

VI.3.3. MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Se obtuvieron en supermercados locales seis muestras comerciales de leche líquida (leche entera, semidesnatada y desnatada) almacenadas en recipientes tetrabrik y producidas por diferentes compañías. Un fabricante local suministró cuatro muestras de fórmula infantil en polvo de inicio almacenada en lata y dos fórmulas infantiles líquidas de seguimiento.

Ya que no se dispone de materiales de referencia para la validación del método, se prepararon muestras fortificadas. Los experimentos de recuperación se llevaron a cabo usando muestras de leche fortificadas a concentraciones de 5, 10 y 25 veces los LOQs correspondientes para el detector APCI-IT-MS/MS. Las muestras se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante al menos 30 min antes de la aplicación del procedimiento optimizado. El procedimiento de fortificación se aplicó a tres muestras diferentes de leche y a tres niveles de concentración y se analizaron por triplicado en cada caso.

VI.3.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Las muestras se prepararon pesando 2 g en un tubo de centrifuga de 10 mL y diluyendo con 4 mL de agua. Entonces se añadieron 4 mL de TCA al 3 % m/v, y se dejó reposar la mezcla durante 15 min para permitir la precipitación de las proteínas y, a continuación se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se recuperó la disolución sobrenadante y se diluyó a 10 mL con agua en un matraz aforado.

Entonces se transfirió a un tubo de centrifuga de vidrio de 15 mL con fondo cónico, conteniendo 0,5 g de cloruro sódico. Después de disolver la sal por agitación vigorosa, se añadieron rápidamente 2 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) conteniendo 200 μ L de cloroformo (disolvente extractante), inyectándolos en la disolución de la muestra usando una jeringa, y la mezcla se agitó manualmente durante varios segundos. Se obtuvo una disolución turbia consistente en gotas muy finas de CHCl_3 dispersadas a través de la disolución de la muestra y los analitos se extrajeron en las finas gotas.

Tras centrifugar durante 5 min a 3000 rpm, el disolvente extractante sedimentado en el fondo del tubo cónico (volumen aproximado 60 μ L) se transfirió usando una

microjeringa de 100 μL a un vial de 2 mL conteniendo un microinserto y se evaporó usando un flujo suave de gas nitrógeno.

El extracto seco fue reconstituido finalmente añadiendo 50 μL de acetonitrilo y se inyectó una alícuota de 20 μL en el cromatógrafo por medio del automuestreador.

La fase móvil usada en condiciones isocráticas fue una mezcla de 75 % de acetonitrilo y 25 % de agua. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 0,8 mL min^{-1} . Cada medida se realizó por triplicado.

VI.4. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se seleccionó cromatografía en fase reversa. La optimización de la fase móvil se llevó a cabo a una velocidad de flujo de 0,8 mL min^{-1} usando diferentes mezclas acetonitrilo:agua.

Cuando se varió el porcentaje del disolvente orgánico entre 70 y 90 %, se obtuvieron los mejores valores para los parámetros cromatográficos usando la mezcla 75:25. La elución y las características de retención para los analitos, expresadas como tiempo de retención (t_R) y factor de retención (k), fueron: 1, EPRI ($t_R=4,21$ min; $k=2,51$); 2, ABA ($t_R=5,68$ min; $k=3,73$); 3, DOR ($t_R=6,80$ min; $k=4,67$); 4, MOX ($t_R=8,50$ min; $k=6,08$) y 5, IVM ($t_R=9,71$ min; $k=7,09$). Los valores para los factores de separación (α) estuvieron en el intervalo 1,17-1,49 y la resolución (R_S) entre 1,55 y 2,81. La duración total del cromatograma fue corta (alrededor de 10 min) y se consiguió una buena resolución usando elución isocrática.

VI.5. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Previamente a la etapa DLLME, se llevaron a cabo varios experimentos con objeto de simplificar la matriz altamente compleja de las muestras de leche. Los experimentos preliminares se realizaron usando una muestra de leche entera fortificada a un nivel de concentración de 200 ng g^{-1} para todos los compuestos, y se utilizó acetonitrilo para precipitar las proteínas, con el propósito de usar esta disolución orgánica como disolvente dispersante en la etapa posterior de DLLME.

Los experimentos consistieron en añadir diferentes volúmenes, de 1 a 4 mL, del disolvente orgánico a 2 g de leche, dejando reposar la mezcla durante 15 min y entonces centrifugar durante 10 min a 4000 rpm. En todos los casos, se diluyó la disolución sobrenadante a 10 mL con agua y se añadieron 200 μ L de cloroformo (disolvente extractante). No se obtuvo una gota sedimentada en ningún caso después de centrifugar la mezcla durante 5 min a 3000 rpm, incluso cuando las disoluciones sobrenadantes, obtenidas del tratamiento con acetonitrilo, se filtraron antes de la etapa DLLME.

Se intentó precipitar las proteínas usando acetonitrilo en presencia de diferentes proporciones de dietilamina para aumentar el pH de la mezcla, pero los sobrenadantes también presentaban partículas suspendidas que evitaban la formación de la fase sedimentada. La filtración de los sobrenadantes orgánicos no resolvió el problema; además, se detectaron pérdidas de analito incluso cuando se usaron filtros de jeringa de diferentes materiales y diámetros de poro. En consecuencia, se descartó la precipitación de las proteínas con acetonitrilo.

Las investigaciones se dirigieron entonces a eliminar las proteínas con un medio ácido, TCA al 3 % m/v. Cuando se añadieron diferentes volúmenes del ácido (0,5-5 mL) a 2 g de la leche fortificada, se obtuvieron los mejores resultados con volúmenes mayores de 4 mL. Se intentó la centrifugación de la muestra antes de añadir el ácido al sobrenadante para disminuir la cantidad de ácido necesaria para conseguir eliminar las proteínas de forma efectiva, pero volúmenes inferiores a 4 mL no permitieron obtener fases sedimentadas bien definidas. Por tanto, se escogió la adición de 4 mL de TCA a 2 g de leche.

VI.6. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DLLME

Una vez optimizada la extracción de la muestra, el sobrenadante obtenido por adición de 4 mL de TCA al 3 % m/v a 2 g de la muestra de leche fortificada se diluyó hasta 10 mL, y se usó para optimizar los parámetros que afectan al procedimiento DLLME: tipos de disolventes extractante y dispersante, así como sus volúmenes, adición de sal y tiempo y velocidad de centrifugación.

En todos los casos, se evaporó la fase sedimentada por medio de un flujo de nitrógeno y se reconstituyó con 50 μL de acetonitrilo.

Considerando las propiedades requeridas para el disolvente extractante (densidad mayor que el agua, baja solubilidad en agua, capacidad de extracción elevada y comportamiento cromatográfico adecuado), se probaron tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano y 1,1,2,2-tetracloroetano usando 200 μL de cada disolvente y 1,5 mL de acetonitrilo como disolvente dispersante. Se descartó 1,1,2,2-tetracloroetano porque el tiempo necesario para evaporar la fase sedimentada fue demasiado largo. La elevada solubilidad de diclorometano en agua impidió que se formara una fase sedimentada discernible. Entre tetracloruro de carbono y cloroformo, se seleccionó este último porque proporcionó una fase sedimentada de mayor volumen (40 μL) y mejores resultados de extracción.

Se probó el efecto de acetonitrilo, metanol y acetona como disolventes dispersantes usando 1,5 mL de cada uno y 200 μL de cloroformo como disolvente extractante. Se descartó acetona por la elevada absorbancia obtenida en el tiempo muerto. También se descartó metanol porque proporcionó volúmenes inferiores a 20 μL para la fase sedimentada. Por tanto, se eligió acetonitrilo como disolvente dispersante.

El efecto del volumen de cloroformo se estudió entre 150 y 300 μL . Cuando se probaron volúmenes de extracción inferiores a 200 μL , no apareció la fase sedimentada. Por otra parte, al aumentar de 200 a 300 μL , disminuyó el área de pico para algunos compuestos, y así se seleccionó un valor de 200 μL .

Los volúmenes de disolvente dispersante se variaron entre 1 y 3 mL. Cuando se usaron volúmenes mayores no se observó una fase orgánica discernible después de la centrifugación de la mezcla. De acuerdo con la Fig. VI.2A, la eficiencia de extracción aumentó hasta 2 mL y entonces disminuyó, probablemente debido al aumento de la solubilidad en agua de las endectocidas. La inyección rápida de 2 mL de acetonitrilo conteniendo 200 μL de cloroformo permitió conseguir de forma eficiente el estado turbio y, por tanto, conseguir una sensibilidad elevada.

Para investigar la influencia de la fuerza iónica sobre la eficiencia de la extracción DLLME, se probaron diferentes cantidades de cloruro sódico (0-30 % m/v). Los resultados obtenidos para concentraciones entre 0 y 20 % m/v se muestran en la Fig. VI.2B, todos

los compuestos mostraron un comportamiento similar. Para concentraciones de sal mayores que 20 % m/v no se pudo recolectar la fase sedimentada. Una concentración del 5 % m/v redujo ligeramente la solubilidad de todos los compuestos, aumentando la solubilidad en la fase orgánica y por ello se seleccionó este valor.

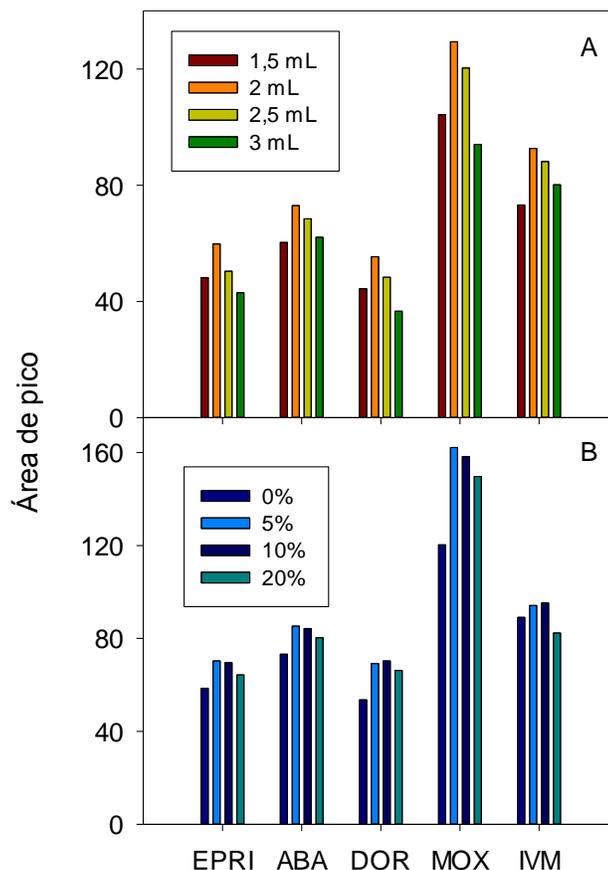


Figura VI.2. Influencia del volumen de acetonitrilo (A) y la concentración de sal (B) sobre la sensibilidad de las endectocidas por DLLME. Condiciones de extracción: fase acuosa, 10 mL; volumen de cloroformo, 200 μ L; tiempo y velocidad de centrifugación, 3 y 3000 rpm; concentración de los analitos, 200 ng g⁻¹

Una de las ventajas más importantes de la técnica DLLME es que el proceso de extracción es muy rápido, lo que significa que el intervalo de tiempo entre la inyección de la mezcla de los disolventes dispersante y extractante, y la etapa de centrifugación no tiene efecto sobre la eficiencia de extracción.

La etapa de centrifugación debe ser optimizada con objeto de romper el estado turbio y recolectar la fase sedimentada. Por esta razón, la velocidad de centrifugación se

estudió en el rango 1000-3000 rpm, variando el tiempo entre 1 y 5 min para cada velocidad usada. No se obtuvo fase sedimentada cuando se centrifugó a 1000 rpm para diferentes tiempos. Los mejores resultados se obtuvieron para 3000 rpm y 5 min. Bajo las condiciones seleccionadas finalmente, se recuperaron volúmenes de fase sedimentada de $60 \pm 3 \mu\text{L}$.

El tiempo requerido para llevar a cabo el procedimiento DLLME propuesto es similar al empleado por la metodología QuEChERS cuando se aplica para la determinación de lactonas macrocíclicas en muestras de leche [26,29]. Sin embargo, DLLME muestra ventajas sobre QuEChERS ya que utiliza un volumen mucho menor de disolvente orgánico [26,29,30].

VI.7. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Se compararon las pendientes de las gráficas de calibrado para estándares acuosos con las pendientes obtenidas al aplicar el método de adiciones estándar a cuatro muestras de leche diferentes (tres muestras líquidas: leche entera, leche desnatada y fórmula infantil de seguimiento, y una fórmula infantil de inicio en polvo). Se obtuvieron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas, lo que reveló la presencia de un efecto matriz.

También se obtuvieron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas para las diferentes muestras de leche analizadas por el método de adiciones estándar ($p < 0,05$ en todos los casos) usando tanto DAD como MS/MS, como muestra la Figura VI.3. En consecuencia, se utilizó el método de adiciones estándar para llevar a cabo la cuantificación de los analitos.

Para DLLME, se define EF como la relación entre la concentración de analito en la fase sedimentada y la concentración inicial de analito en la muestra. Las pendientes de las gráficas de calibrado obtenidas con estándares acuosos mediante DLLME-LC-DAD indicaron valores de EFs de 90, 100, 65, 200 y 190 para EPRI, ABA, DOR, MOX e IVM, respectivamente. Estos datos indican que MOX y DOR son los compuestos preconcentrados de forma más eficiente por el procedimiento DLLME propuesto, mientras que DOR muestra una afinidad menor por la fase extractante.

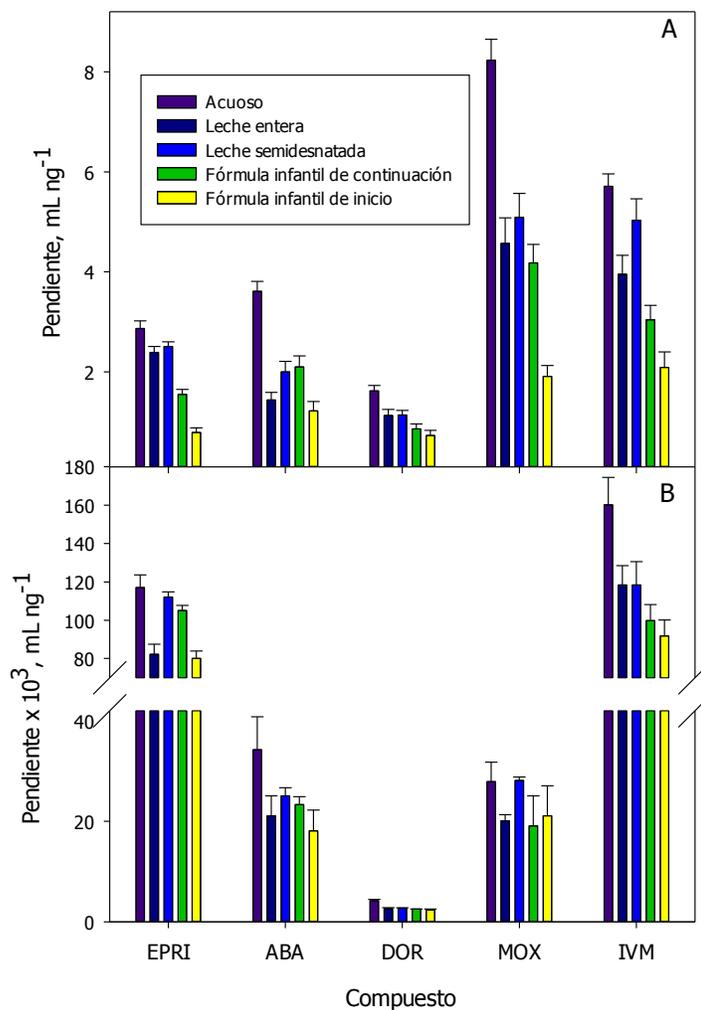


Figura VI.3. Comparación de las pendientes obtenidas usando calibración con estándares acuosos y aplicando el método de adiciones estándar a cuatro muestras de leche diferentes usando (A) DLLME-LC-DAD y (B) DLLME-LC-APCI-IT-MS/MS. Las barras de error indican las desviaciones estándar correspondientes (n=4)

Se validó la linealidad, LODs y LOQs, selectividad, exactitud y precisión de los dos métodos optimizados usando una muestra de leche semidesnatada. La Tabla VI.2 muestra los resultados. Se obtuvieron coeficientes de regresión mayores que 0,997, con respuestas lineales en todo el intervalo de concentraciones, calculadas considerando una masa de muestra de 2 g. Los LODs y LOQs se calcularon en base a tres y diez veces, respectivamente, la relación señal-ruido. La sensibilidad del método permite cumplir con la regulación EU para lactonas macroclícicas en muestras de leche comerciales. El tratamiento optimizado para la muestra incrementa notablemente la sensibilidad alcanzada

previamente con DAD [6,7] y MS [26,29] para muestras de leche. Para comprobar la repetitividad del método, se llevaron a cabo 10 análisis idénticos de una muestra de leche semidesnatada fortificada al nivel de concentración de 10 ng g⁻¹. Se obtuvieron en todos los casos valores de RSD inferiores al 14 % (Tabla VI.2) que indicaron que la precisión del método fue satisfactoria para análisis de control.

Tabla VI.2. Características analíticas de los endectocidas macrólidos usando el método DLLME-LC para una muestra de leche semidesnatada

Compuesto	Linealidad (ng g ⁻¹)	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	RSD ^b (%)
LC-DAD				
EPRI	2 - 1000	0,6	2,0	10
ABA	2 - 1000	0,5	1,7	9,9
DOR	5 - 2500	1,4	4,7	12
MOX	1 - 500	0,3	1,0	7,4
IVM	1 - 500	0,3	1,0	8,6
LC-MS/MS				
EPRI	0,1 - 250	0,04	0,13	7,9
ABA	0,5 - 2500	0,12	0,40	9,8
DOR	2,5 - 2500	0,72	2,40	14
MOX	0,5 - 500	0,11	0,37	11
IVM	0,1 - 250	0,03	0,10	7,7

^b n=10

VI.8. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Cuando se aplicó el método optimizado DLLME-LC-MS/MS al análisis de doce muestras de leche diferentes, no se detectó ninguno de los compuestos estudiados. Ya que no se disponía de materiales de referencia certificados para la validación del método, se comprobó su exactitud mediante estudios de recuperación realizados sobre tres muestras de leche diferentes (leche entera, leche semidesnatada y fórmula infantil) fortificadas a tres niveles de concentración diferentes, correspondientes aproximadamente a 5, 10 y 25 veces los LOQs correspondientes para cada compuesto. Las recuperaciones

para las muestras fortificadas variaron de 89,5 a 105 %, con una recuperación media \pm SD (n=135) de 97 \pm 4, como puede comprobarse en la Tabla VI.3.

Tabla VI.3. Recuperaciones^a de los endectocidas macrólidos en muestras fortificadas usando el método DLLME-LC-MS/MS

Compuesto	Nivel fortificado (ng g ⁻¹)	Leche entera	Leche semidesnatada	Fórmula infantil
EPRI	0,5	90,2 \pm 7,0	95,1 \pm 6,6	92,6 \pm 8,3
	1,0	92,8 \pm 3,9	98,6 \pm 5,9	103 \pm 5,1
	2,5	95,3 \pm 3,1	97,6 \pm 4,2	95,8 \pm 3,9
ABA	2,0	90,9 \pm 5,4	92,4 \pm 5,2	89,5 \pm 7,2
	4,0	95,3 \pm 2,9	97,3 \pm 4,8	97,5 \pm 8,6
	10	96,5 \pm 2,0	95,7 \pm 8,7	96,5 \pm 5,2
DOR	10	104 \pm 5,3	93,2 \pm 6,1	98,9 \pm 8,0
	20	96,8 \pm 3,9	101 \pm 3,4	96,8 \pm 5,1
	50	98,2 \pm 4,1	97,5 \pm 4,3	105 \pm 6,1
MOX	2,0	98,0 \pm 7,8	92,9 \pm 7,2	103 \pm 4,5
	4,0	101 \pm 3,5	98,5 \pm 6,1	98,2 \pm 6,8
	10	98,3 \pm 3,1	101 \pm 5,2	99,1 \pm 5,2
IVM	0,5	91,5 \pm 5,0	94,1 \pm 5,9	96,9 \pm 7,6
	1,0	97,1 \pm 3,3	103 \pm 3,8	98,2 \pm 4,0
	2,5	95,6 \pm 4,2	96,3 \pm 4,1	98,6 \pm 3,8

^a Valor medio \pm SD (n=3)

La Figura VI.4A muestra el cromatograma obtenido para una muestra de leche semidesnatada fortificada usando el método DLLME-LC-DAD optimizado. Los picos se identificaron mediante el detector DAD midiendo continuamente el espectro mientras el soluto pasa a través de la célula de flujo, confirmando así la identidad y la pureza de los picos. Se encontró una buena concordancia entre los espectros UV de los diferentes picos obtenidos para los estándares acuosos y las muestras fortificadas. Cuando se analizaron alícuotas no fortificadas de las diferentes muestras de leche, no se encontraron picos a los tiempos de retención de los analitos.

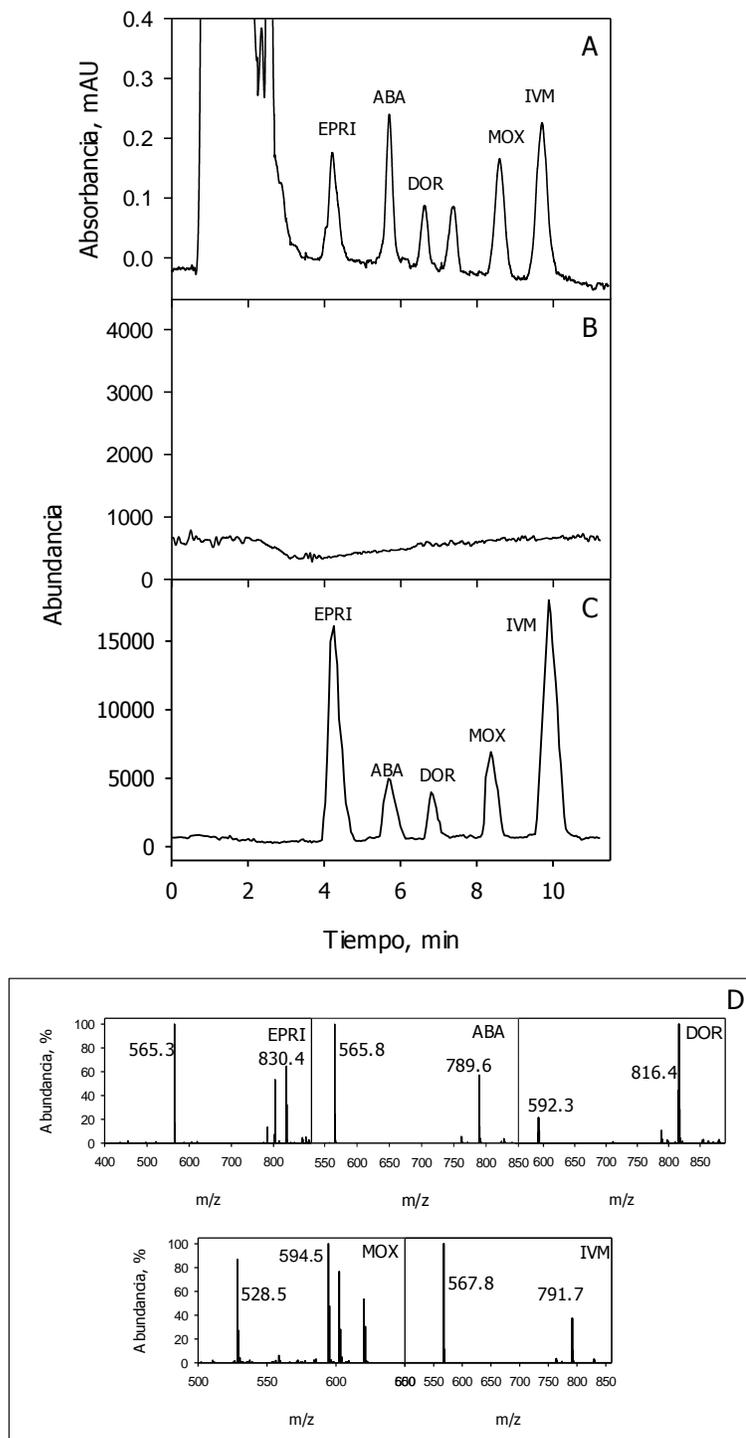


Figura VI.4. Cromatogramas obtenidos usando DLLME combinada con: LC-DAD para una muestra de leche semidesnatada fortificada (A), y LC-APCI-IT-MS/MS para la leche semidesnatada no fortificada (B) y fortificada (C). Las concentraciones de lactonas macrocíclicas en las muestras fortificadas corresponden aproximadamente a 5 veces los LOQs de cada método. (D) Espectros de masas de los compuestos

Las Figuras VI.4B y C muestran los cromatogramas obtenidos tanto para una muestra de leche no fortificada (B) como fortificada (C) usando el método DLLME-LC-MS/MS. La selectividad de este método se confirmó también por la ausencia de picos interferentes coeluyendo con los analitos para cromatogramas blanco de diferentes muestras no fortificadas. La identidad de los analitos se confirmó comparando el tiempo de retención, identificando los iones producto, y comparando las relaciones entre los dos iones producto más abundantes tanto en las muestras de leche como en las disoluciones acuosas de los estándares. Finalmente, la Figura VI.4D muestra los espectros de masas de los diferentes compuestos.

VI.9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Vercruyssen, R.S. Rew (Eds.), *Macrocyclic lactones in antiparasitic therapy*, CABI Publishing, Oxon, UK, 2000.
- [2] M. Danaher, L.C. Howells, S.R.H. Crooks, V. Cerkvenik-Flajs, M. O'Keeffe, Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices, *J. Chromatogr. B* 844 (2006) 175-203.
- [3] EC Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Commun.* L224 (1990) 1.
- [4] EC Regulation (EC) No. 470/2009 of European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council, *Off. J. Eur. Commun.* L152 (2009) 11.
- [5] EC Regulation (EU) No. 37/2010 of 22 December 2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, *Off. J. Eur. Commun.* L15 (2010) 1.

- [6] M.A. García-Mayor, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 76-83.
- [7] M.A. García-Mayor, A. Gallego-Pico, R.M. Garcinuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, Matrix solid-phase dispersion method for the determination of macrolide antibiotics in sheep's milk, *Food Chem.* 134 (2012) 553-558.
- [8] F.J. Schenck, H. Lagman, Multiresidue determination of abamectin, doramectin, ivermectin, and moxidectin in milk using liquid chromatography and fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1340-1344.
- [9] M. Danaher, M. O'Keeffe, J.D. Glennon, L. Howells, Development and optimisation of an improved derivatisation procedure for the determination of avermectins and milbemycins in bovine liver, *Analyst* 126 (2001) 576-580.
- [10] A. Anastasio, M. Esposito, M. Amorena, P. Catellani, L. Serpe, M.L. Cortesi, Residue study of ivermectin in plasma, milk, and mozzarella cheese following subcutaneous administration to buffalo (*Bubalus bubalis*), *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5241-5245.
- [11] F.A. Imperiale, J. Sallovitz, A. Lifschitz, C.E. Lanusse, Determination of ivermectin and moxidecin residues in bovine milk and examination of the effects of these residues on acid fermentation of milk, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 810-818.
- [12] M. Pollmeier, S. Maier, K. Moriarty, P. DeMontigny, High-performance liquid chromatographic assay for the determination of a semisynthetic avermectin analog (eprinomectin) in bovine milk at parts per billion levels - method development and validation, *J. Chromatogr. B* 772 (2002) 99-105.
- [13] F.A. Imperiale, M.R. Buseti, V.H. Suárez, C.E. Lanusse, Milk excretion of ivermectin and moxidectin in dairy sheep: Assessment of drug residues during cheese elaboration and ripening period, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 6205-6211.
- [14] V. Cerkvenik Flajs, I. Grabnar, N.K. Kožuh Eržen, I. Marc, U. Požgan, M. Gombač, L. Kolar, M. Pogačnik, Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 353-359.

- [15] B.J.A. Berendsen, P.P.J. Mulder, H.J.A. van Rhijn, The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: New insights and improvement of the procedure, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 126-133.
- [16] V. Cerkvénik-Flajs, L. Milčinski, A. Süssinger, L. Hodošček, M. Danaher, J. AntoniĆ, Trace analysis of endectocides in milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 165-171.
- [17] L. Giannetti, A. Giorgi, F. Necci, G. Ferretti, F. Buiarelli, B. Neri, Validation study on avermectine residues in foodstuffs, *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 11-15.
- [18] G. Rübensam, F. Barreto, R. Barcellos Hoff, T. Ledur Kist, T. Mara Pizzolato, A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 705 (2011) 24-29.
- [19] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, H.S. Rupp, S.A. Gonzales, A.P. Pfenning, J.A. Hurlbut, Confirmation of avermectin residues in food matrices with negative-ion atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 493-499.
- [20] L. Howells, M.J. Sauer, Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MSn, *Analyst* 126 (2001) 155-160.
- [21] S.B. Turnipseed, J.E. Roybal, W.C. Andersen, L.R. Kuck, Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 159-165.
- [22] S.B. Turnipseed, W.C. Andersen, C.M. Karbiwnyk, J.E. Roybal, K.E. Miller, No-discharge atmospheric pressure chemical ionization: evaluation and application to the analysis of animal drug residues in complex matrices, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 1231-1239.
- [23] R. Sheridan, L. Desjardins, Determination of abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, and moxidectin in milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1088-1094.

- [24] D.A. Durden, Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 134-146.
- [25] J. Raich-Montiu, K.A. Krogh, M. Granados, J.A. Jönsson, B. Halling-Sørensen, Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 275-280.
- [26] M.M. Aguilera-Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) 10-16.
- [27] D.A. Durden, J. Wotske, Quantitation and validation of macrolide endectocides in raw milk by negative ion electrospray MS/MS, *J. AOAC Int.* 92 (2009) 580-596.
- [28] D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edder, Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2363-2374.
- [29] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196-207.
- [30] M. Whelan, B. Kinsella, A. Furey, M. Moloney, H. Cantwell, S.J. Lehotay, M. Danaher, Determination of anthelmintic drug residues in milk using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with rapid polarity switching, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4612-4622.
- [31] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Talanta* 85 (2011) 991-1000.

- [32] M. Rezaee, Y. Assadi, M. 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.
- [33] C. Bosch Ojeda, F. Sánchez-Rojas, Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review, *Chromatographia* 69 (2009) 1149-1159.
- [34] A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M.A. Rodríguez-Delgado, Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 728-751.
- [35] M. Rezaee, Y. Yamini, J. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
- [36] A. Zgoła-Grześkowiak, T. Grześkowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382-1399.

CAPÍTULO VII

**CROMATOGRFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA
DE MASAS DE TIEMPO DE VUELO EN
COMBINACIÓN CON MICROEXTRACCIÓN
DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA
DETERMINACIÓN DE CITOQUININAS EN FRUTAS
Y VERDURAS**

VII.1. SUSTANCIAS REGULADORAS DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

Las sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas (PGRs), también llamadas hormonas vegetales o fitohormonas, son segregadas químicamente en las plantas. Estas sustancias pueden definirse como moléculas producidas en determinadas localizaciones de la planta en concentraciones muy bajas y que causan alteraciones en los procesos naturales de determinadas células. Los procesos afectados pueden ser la división y/o diferenciación celular, elongación de las células, germinación de las semillas, crecimiento de capullos en dormancia, floración y maduración de los frutos, entre otros. Las concentraciones de hormonas vegetales que provocan efectos en las plantas son muy bajas (10^{-6} - 10^{-5} M) si se comparan con los requerimientos normales de minerales y vitaminas. Los niveles de producción de hormonas en cada planta varían a lo largo de las distintas etapas de su crecimiento. Las PGRs se clasifican en cinco clases principales: citoquininas, auxinas, giberelinas, etileno y ácido abscísico [1]. Otras PGRs son los jasmonatos, el ácido salicílico, los brasinoesteroides, el óxido nítrico, las estrigolactonas y las fitohormonas polipeptídicas. La mayoría de estos compuestos regulan el crecimiento de las plantas o destruyen las partes indeseables de las mismas.

Las PGRs sintéticas se utilizan ampliamente en agricultura ya que son más baratas y presentan mayor estabilidad que los homólogos naturales [2], aunque su empleo en la Unión Europea está regulado por la Directiva del Consejo 91/414/EEC [3]. Las PGRs sintéticas más usadas en agricultura incluyen citoquininas (CKs) sintéticas como 6-bencil aminopurina y forclorfenurón (CPPU), el retardador del crecimiento paclobutrazol, que es un triazol, y el estimulador del crecimiento isoprotiolano.

Las PGRs son muy usadas en viticultura siendo pulverizadas sobre las hojas o sumergiendo los racimos de uva para optimizar el crecimiento de la vid y la calidad de las uvas en términos de tamaño, forma (redonda, elongada, etc.) o peso del racimo, para cumplir con los requisitos de los estándares nacionales o internacionales de calidad. En la

mayoría de los casos, la necesidad de una aplicación exógena de PGRs en una etapa específica del crecimiento, depende de la previa experiencia o de observaciones visuales de los agricultores. En ocasiones, estas decisiones pueden ser engañosas, ya que los síntomas que pudieran asociarse a la necesidad de aplicación exógena de PGRs pueden aparecer debido a otros motivos, como deficiencias nutricionales o desórdenes fisiológicos. Parece, por tanto, de gran importancia conocer los niveles endógenos de PGRs que justifican la administración exógena, ya que una administración en exceso de estos compuestos podría tener efectos adversos sobre la salud de la planta.

VII.2. LAS CITOQUININAS

Las CKs, que se descubrieron durante la década de 1950s, juegan un papel importante en varias fases del desarrollo y crecimiento de las plantas, y se utilizan para acelerar el cuaje del fruto, aumentar el tamaño del fruto así como el rendimiento de las diferentes cosechas. Recientemente, se han revisado las funciones de los receptores CK en las plantas [4].

El grupo de las CKs comprende dos tipos de compuestos: derivados de adenina y de fenilurea [5]. Las fenilureas están formadas por un grupo de compuestos sintéticos, siendo el primero identificado 1,3-difenilurea (1,3-DPU), mientras que CPPU y TDZ fueron sintetizados posteriormente y muestran mayor actividad que otros PGRs naturales, tales como la citoquinina zeatina que es del tipo adenina [5].

El efecto más importante de CPPU consiste en aumentar el tamaño de las frutas (por ejemplo, kiwi, uva y manzana, entre otras) y promover el desarrollo del ovario en la fruta sin fertilización o formación de semillas. CPPU actúa de forma sinérgica con las auxinas. La aplicación correcta de este compuesto no presenta riesgo para la salud humana y, además, se ha clasificado a CPPU como un compuesto que no presenta propiedades cancerígenas ni es disruptor endocrino para el hombre [6]. En 2006, CPPU se incluyó en el Anexo I de la Directiva 91/414/EEC de la Unión Europea como un PGR autorizado para kiwi, con un MRL de 50 ng g⁻¹ [7].

TDZ, que también ha sido clasificado como compuesto no cancerígeno para el hombre, se ha utilizado para la defoliación química antes del cosechado mecánico del

algodón y para promover el crecimiento de la planta [8,9]. Se ha descrito el efecto de 1,3-DPU en la inducción de callos sobre la superficie de ciertas plantas [10], así como su efecto estimulador sobre las plantas [11], aunque su actividad como CK es 10000 veces inferior a la de CPPU.

La Figura VII.1 muestra las estructuras químicas de estos compuestos.

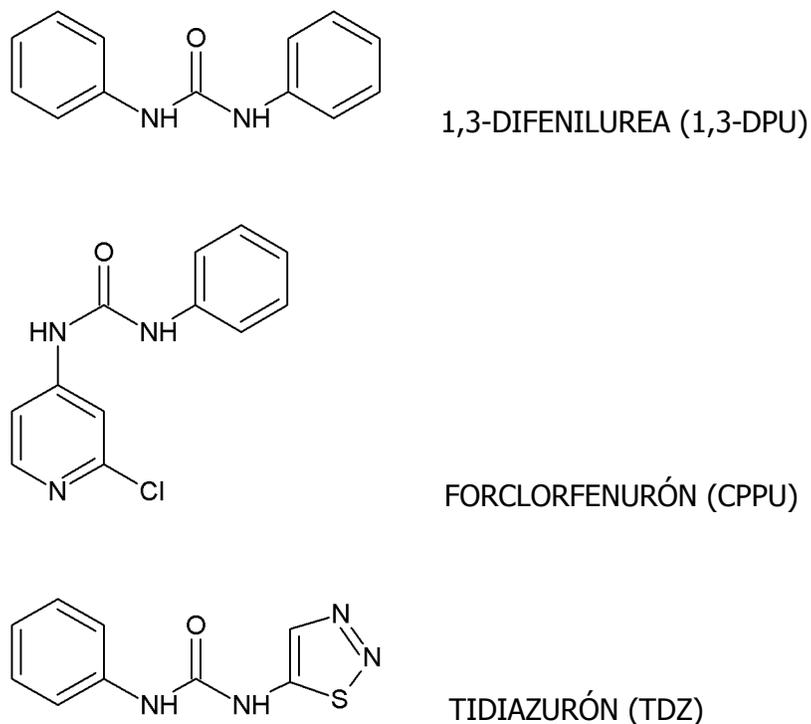


Figura VII.1. Estructuras químicas de las citoquininas

VII.3. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE CITOQUININAS

CPPU ha sido determinado en frutas y verduras mediante procedimientos de inmunoensayo [12,13], usando LC con detección UV [14-16], MS/MS [17-21] y TOF-MS [22,23].

Sin embargo, la bibliografía recoge solo dos métodos analíticos para la determinación de TDZ en frutas y verduras: LC-UV [24] y LC-MS/MS [17], este último

también incluye la determinación de CPPU. Por otra parte, se ha cuantificado TDZ en aguas [8,25,26] y fertilizantes [2].

Los tratamientos de la muestra utilizados en las citadas referencias incluyen la extracción de los analitos en un disolvente orgánico y la limpieza por LLE [14], SPE [15,16,21,22] y DSPE [20,23]. También se han obtenido resultados satisfactorios con la extracción simultánea y limpieza usando la metodología QuEChERS [17,19,22].

En este estudio se presenta un nuevo procedimiento para la determinación de tres CKs, TDZ, 1,3-DPU y CPPU, en frutas y verduras mediante extracción de los analitos con un disolvente y la preconcentración del extracto mediante una técnica miniaturizada que ofrece muchas ventajas como son rapidez, eficacia, bajo coste y ausencia de efectos de memoria, DLLME [27-30].

DLLME solo se ha aplicado para la determinación de TDZ en muestras de agua [26]. Por tanto, se trata del primer estudio que aborda la determinación simultánea de los tres compuestos CKs derivados de fenilurea. El tratamiento de las muestras de frutas y vegetales mediante DLLME se acopla con la determinación mediante LC-ESI-TOF-MS.

Los analitos se extrajeron de la matriz de la muestra con etanol y el extracto, después de su dilución con agua, se sometió a DLLME. Se utilizaron acetonitrilo y 1,2-dicloroetano como disolventes extractante y dispersante, respectivamente.

Se estudió la influencia de los siguientes parámetros experimentales usando un diseño de Plackett-Burman: volumen de los disolventes extractante y dispersante, masa de muestra y tiempo y velocidad de la etapa de centrifugación. Las mejores condiciones analíticas fueron 250 μL de 1,2-dicloroetano, 1,5 mL de acetonitrilo, 5 g de masa de muestra y centrifugación a 3000 rpm durante 3 min.

El método optimizado proporcionó LODs en el intervalo 0,02–0,05 ng g^{-1} , dependiendo del compuesto. Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios entre 89 y 106 % para muestras fortificadas (kiwi, sandía, uva y tomate) en el intervalo de concentración 0,2–1,0 ng g^{-1} , dependiendo del compuesto. No se detectó ninguno de los analitos en las muestras analizadas.

VII.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VII.4.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Germany) (G1312A) con una velocidad de flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379A). La columna se mantuvo en un compartimento termostataado (Agilent G1316A). La columna analítica usada fue Tracer Extrasil ODS2 (Teknokroma, Barcelona, Spain) ($150 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$). La inyección ($20 \mu\text{L}$) se llevó a cabo usando un automuestreador (Agilent G1367A) con viales de 2 mL de capacidad suministrados con microinsertos de $250 \mu\text{L}$ con pie polimérico.

El sistema LC se acopló a un TOF-MS (Agilent G6220A), equipado con una fuente ESI operando en modo de ionización positivo y en el modo de medida SIM, usando los siguientes parámetros de operación: voltaje capilar, 3000 V ; presión de gas nebulizador, 60 psi ; flujo de gas de secado, 11 L min^{-1} ; temperatura de gas de secado, $350 \text{ }^\circ\text{C}$; voltaje del fragmentador, 150 V ; voltaje del skimmer, 65 V ; RF octapolo, 250 V . Los espectros de masa exacta se registraron considerando un intervalo de masas de $100\text{--}1000 \text{ } m/z$. Para procesar los datos se utilizó el software Applied Biosystems/MDS-SCIEX Analyst QS (Frankfurt, Germany). Las medidas de masa exacta de cada pico a partir de los TICs se obtuvieron por medio de un sistema automatizado de calibración que proporciona la corrección de las masas. El TOF-MS lleva a cabo la calibración de masas interna automáticamente, usando una fuente de ionización dual con un sistema automático de suministro de calibrante, que introduce el flujo del exterior del cromatógrafo junto con pequeñas cantidades (alrededor de $5 \mu\text{L min}^{-1}$) de una disolución calibrante, mezcla de referencia ES-TOF (Agilent), en modo ESI positivo. Se usan diez masas de referencia entre m/z $118,0862$ y $2721,8948$. Se usa el software Mass Hunter, versión B-02-00, para autocalibrado y para registrar continuamente los resultados de las masas de referencia internas y los datos.

Los análisis se llevaron a cabo usando el EIC de la molécula protonada de cada analito: m/z $221,0492$; $213,1028$ y $248,0585$ para TDZ ($\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{SO} + \text{H}$), 1,3-DPU ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O} + \text{H}$) y CPPU ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O} + \text{H}$), respectivamente, con una ventana de 20 ppm .

Las masas exactas teóricas basadas en la fórmula se calcularon usando las herramientas de calculadora de masa molecular del software Mass Hunter. El espectro de masa exacta de los analitos se obtuvo sustrayendo el fondo del EIC. La masa exacta de la molécula protonada se usó con propósitos de cuantificación y confirmación. Las señales analíticas para cuantificación fueron las áreas de pico de los EICs.

Para el tratamiento de las muestras se utilizó una trituradora IKA A11 (IKA, Staufen, Germany) y una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany). Para filtrar los extractos etanólicos de las muestras se usaron filtros de membrana hidrofílicos, ésteres de celulosa mixtos, de 8,0 μm .

VII.4.2. REACTIVOS

Forclorfenurón (1-(2-cloro-4-piridil)-fenilurea, $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClN}_3\text{O}$, CPPU, 99,9 %), tidiazurón (1-fenil-3-(1,2,3-tidiazol-5-il)urea, $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_4\text{SO}$, TDZ, 99,9 %) y 1,3-difenilurea ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}$, 1,3-DPU, 98 %) se obtuvieron de Fluka (Buchs, Switzerland). Las disoluciones estándar de cada compuesto se prepararon a 1000 mg L^{-1} con metanol y se almacenaron en la oscuridad a 4 °C. La mezcla estándar de trabajo se preparó diariamente diluyendo las disoluciones concentradas con agua purificada.

Los disolventes de grado reactivo analítico etanol, metanol, acetonitrilo, acetona, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, USA). El agua desionizada se consiguió con un sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Cloruro sódico y sulfato amónico se obtuvieron de Fluka (Buchs, Switzerland).

VII.4.3. MUESTRAS

Se obtuvieron varias muestras de frutas y verduras frescas (kiwi, melón, sandía, uva y tomate) de supermercados locales. Las muestras de kiwi, melón y sandía se pelaron antes de ser trituradas, y todos los análisis se llevaron a cabo con la pulpa. Después de triturarlas, las muestras se almacenaron en botes cerrados de polietileno de 100 mL a 4 °C hasta su análisis.

VII.4.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Para la extracción de los analitos a partir de las muestras, se pesaron 5 g de los homogeneizados en tubos de centrifuga de vidrio con rosca de 15 mL y se añadieron 3 mL de etanol. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. La disolución sobrenadante se recuperó y se filtró a través de filtros hidrofílicos de 8,0 μm , el filtrado se diluyó a 10 mL con agua y se colocó en un tubo de rosca de vidrio de 15 mL con fondo cónico. A continuación, se inyectó rápidamente con una jeringa una mezcla de extracción, formada por 1,5 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) y 250 μL de 1,2-dicloroetano (disolvente extractante) en el extracto diluido de la muestra. Esta disolución se agitó manualmente durante unos 20 s.

La disolución turbia formada como consecuencia de la dispersión de las gotículas del disolvente orgánico extractante en la disolución acuosa, se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm, sedimentando la fase de 1,2-dicloroetano en el fondo del tubo cónico. La fase sedimentada se aisló y se evaporó hasta sequedad usando un flujo suave de argón y el residuo se reconstituyó en 50 μL de acetonitrilo. Se inyectó una alícuota de 20 μL en el sistema LC. La fase móvil usada en condiciones isocráticas es una mezcla 40:60 acetonitrilo:agua con una velocidad de flujo de 0,8 mL min^{-1} . Para obtener los resultados finales, se analizaron separadamente tres alícuotas de cada muestra.

VII.4.5. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para llevar a cabo los estudios de recuperación, se fortificaron las muestras añadiendo diferentes volúmenes de una disolución estándar conteniendo los analitos a 20 g de muestra, lo que implica niveles de fortificación en el intervalo 0,2-1,0 ng g^{-1} , dependiendo del compuesto. Las muestras fortificadas se dejaron equilibrar durante 1 h a temperatura ambiente antes de llevar a cabo los análisis. El procedimiento de fortificación se aplicó a cuatro muestras diferentes (kiwi, sandía, uva y tomate) a tres niveles de concentración. Se analizaron separadamente tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración. Se comprobó previamente que las muestras usadas para los estudios de recuperación estaban exentas de los analitos estudiados.

VII.5. SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Se ha seleccionado cromatografía de reparto en fase reversa. Las condiciones de separación óptimas se establecieron inyectando 20 μL de una disolución estándar acuosa conteniendo los analitos a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, en una columna Tracer Extrasil ODS2.

Se ensayaron diferentes mezclas acetonitrilo:agua como fase móvil en modo isocrático a una velocidad de flujo de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, y la mejor separación se consiguió con la mezcla 40:60. En estas condiciones, los compuestos eluyeron con tiempos de retención de 4,06; 9,46 y 11,25 min para TDZ, 1,3-DPU y CPPU, respectivamente.

VII.6. OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra sólida se trató usando diferentes disolventes, capaces de extraer los analitos cuantitativamente de las matrices.

Se ensayaron tres disolventes, metanol, etanol y acetonitrilo. Los experimentos preliminares se llevaron a cabo usando 5 g de una muestra de kiwi fortificada a un nivel de concentración de 15 ng g^{-1} de cada compuesto y 2 mL del disolvente orgánico, sometiendo la mezcla a ultrasonidos por medio de una sonda inmersa directamente en la mezcla.

Cuando se aplicaron ultrasonidos, incluso a baja potencia, los tejidos vegetales se disgregaron de forma extrema y los extractos orgánicos fueron muy difíciles de filtrar. En consecuencia, la extracción de los analitos de las matrices se llevó a cabo mediante agitación manual. La mejor eficiencia de extracción se consiguió con etanol y, después de la centrifugación, el extracto etanólico se llevó hasta 10 mL con agua, antes de ser sometido a preconcentración.

VII.7. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DLLME

La primera etapa en la optimización del procedimiento DLLME fue la selección de los disolventes extractante y dispersante más apropiados. Para ello, se utilizaron 10 mL de agua conteniendo el extracto etanólico de la muestra (obtenido a partir de una muestra

de kiwi fortificada al nivel de 3 ng g⁻¹ para TDZ y 0,3 ng g⁻¹ para 1,3-DPU y CPPU) y 20 µL de la fase sedimentada se inyectaron en el LC.

La selección correcta del disolvente extractante debe realizarse teniendo en cuenta las siguientes propiedades: densidad mayor que el agua para conseguir una recolección fácil de la fase sedimentada, elevada capacidad de extracción, baja solubilidad en agua y buen comportamiento cromatográfico. Así, se ensayaron los disolventes 1,1,2,2-tetracloroetano, tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano y 1,2-dicloroetano, usando 100 µL del disolvente extractante y 1 mL de acetonitrilo como disolvente dispersante. La elevada solubilidad del diclorometano en agua (13 g L⁻¹ a 20 °C) no permitió discernir la fase sedimentada. Se descartó también el uso de CHCl₃ porque se obtuvieron volúmenes de la fase sedimentada inferiores a 20 µL. Comparando las señales analíticas obtenidas con C₂H₂Cl₄, CCl₄ y C₂H₄Cl₂, el último disolvente proporcionó mayor sensibilidad para los tres analitos.

El principal parámetro a considerar para la selección del disolvente dispersante es su miscibilidad en el disolvente extractante y en la fase acuosa. En este estudio se chequearon acetonitrilo, metanol y acetona usando 1,0 mL de cada uno y 100 µL de 1,2-dicloroetano como disolvente extractante. No se observaron diferencias significativas entre los tres disolventes dispersantes utilizados, seleccionando finalmente acetonitrilo que se utiliza también como disolvente en la fase móvil.

La presencia de sal en la fase acuosa generalmente reduce la solubilidad de los compuestos orgánicos polares y aumenta el coeficiente de partición entre el disolvente orgánico y el agua. Se utilizaron cloruro sódico y sulfato amónico para aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa. Las concentraciones de sal superiores al 5 % m/v no permitieron observar la fase sedimentada y, cuando se ensayaron porcentajes de sal inferiores al 5 % m/v, las señales analíticas para los compuestos estudiados disminuyeron ligeramente con respecto a las obtenidas en ausencia de sal. Por tanto, se descartó la adición de sal.

El tiempo de extracción, definido como el tiempo que transcurre entre la adición de los disolventes dispersante y extractante y el principio de la etapa de centrifugación, se varió entre 20 s y 3 min y, como se esperaba, no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad para ninguno de los compuestos estudiados, confirmando la característica de la técnica DLLME de ser independiente del tiempo, que es una de sus

ventajas más relevantes. En consecuencia, se adoptó el mínimo tiempo necesario para formar la disolución turbia (aproximadamente 20 s).

Para evaluar los principales factores que afectan a la eficiencia de la etapa DLLME, se utilizó un diseño Plackett-Burman, usando un paquete estadístico para generar las matrices experimentales y evaluar los resultados. En los diseños Plackett-Burman el número de experimentos es un múltiplo de cuatro y excede por uno el número de factores.

En este estudio, se consideraron los efectos principales de cinco factores: volumen de disolvente extractante (1,2-dicloroetano), volumen de disolvente dispersante (acetonitrilo), masa de muestra, tiempo de centrifugación y velocidad de centrifugación, para la aproximación multivariante, considerando cada uno a dos niveles (bajo y alto). Los valores correspondientes a cada nivel de los distintos factores se muestran en la Tabla VII.1, así como los 28 experimentos realizados incluidos cuatro puntos centrales.

Con objeto de identificar las variables que afectan de forma significativa a la respuesta de los analitos, se llevó a cabo un estudio de análisis de la varianza al nivel de confianza del 95 % y los resultados medios obtenidos se representan por medio de las gráficas de Pareto (Figura VII.2), en las cuales la longitud de las barras es proporcional al valor absoluto de los efectos estimados.

La línea roja vertical representa el 95 % del intervalo de confianza y los efectos que cruzan esta línea son valores significativos con respecto a la respuesta. Cada barra tiene un valor numérico que también indica la magnitud y si el factor tiene un efecto positivo o negativo sobre la respuesta.

Los tres analitos mostraron un comportamiento similar y la Figura VII.2 representa los resultados obtenidos para TDZ. Se obtuvo un efecto positivo (de valores bajos a altos) para los cinco factores estudiados, siendo la masa de muestra el factor más significativo para los tres analitos, seguida por los volúmenes de los disolventes extractante y dispersante. De acuerdo con los resultados, tanto el tiempo como la velocidad de centrifugación no presentaron efectos significativos en la eficiencia de extracción y, por tanto, fueron eliminados del estudio posterior, seleccionando en todos los casos los valores correspondientes al punto máximo, 3 min y 3000 rpm.

Tabla VII.1. Factores, códigos y niveles en la matriz del diseño Plackett-Burman

Factores	Nivel	
	Bajo (-1)	Alto (+1)
(F ₁) Volumen de 1,2-dicloroetano (μL)	150	250
(F ₂) Volumen de acetonitrilo (mL)	1,0	2,0
(F ₃) Tiempo de centrifugación (min)	1,0	3,0
(F ₄) Velocidad de centrifugación (rpm)	1000	3000
(F ₅) Masa de muestra (g)	3	7

Experimento	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
1	+1	+1	-1	+1	-1
2	0	0	0	0	0
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	-1	-1	-1	-1	-1
5	-1	+1	+1	+1	-1
6	+1	+1	-1	+1	+1
7	+1	-1	+1	-1	-1
8	-1	-1	-1	+1	+1
9	-1	+1	+1	+1	-1
10	+1	+1	-1	+1	-1
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	-1	-1	-1	+1	+1
14	-1	-1	+1	+1	+1
15	-1	+1	-1	-1	-1
16	0	0	0	0	0
17	+1	-1	+1	-1	-1
18	-1	+1	+1	-1	+1
19	-1	+1	+1	-1	+1
20	-1	-1	-1	-1	-1
21	+1	-1	+1	+1	-1
22	+1	+1	+1	-1	+1
23	+1	+1	-1	+1	+1
24	-1	-1	+1	+1	+1
25	+1	-1	+1	+1	-1
26	+1	-1	-1	-1	+1
27	+1	-1	-1	-1	+1
28	+1	+1	+1	-1	+1

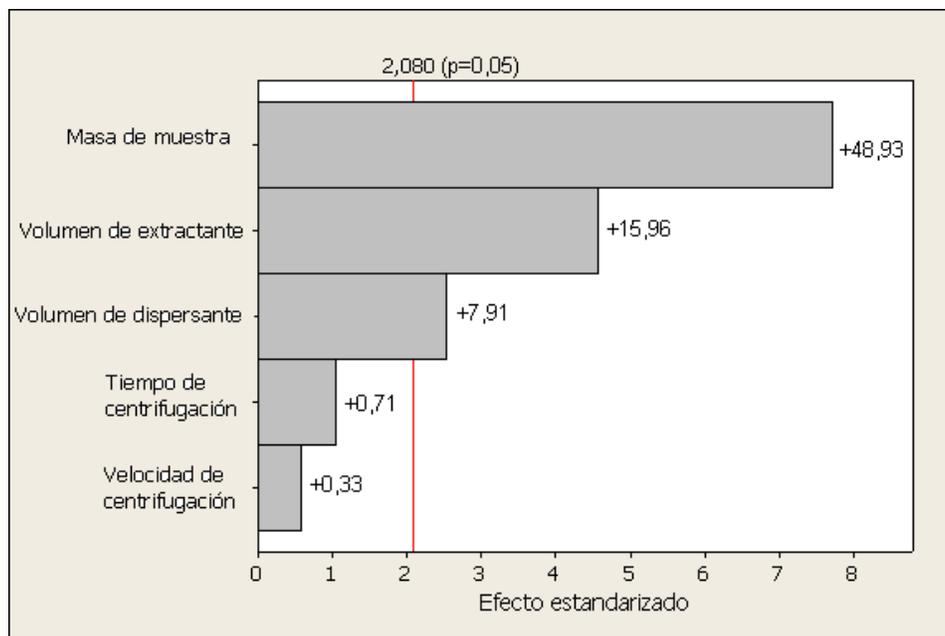


Fig. VII.2. Gráfica de Pareto para el efecto principal estandarizado para el diseño Plackett-Burman. La línea vertical en la gráfica define el nivel de confianza del 95%

Dado que los volúmenes de los disolventes extractante y dispersante fueron parámetros significativos, se llevó a cabo un estudio más detallado para conseguir la eficiencia máxima. Así, se ensayaron diferentes volúmenes de 1,2-dicloroetano en el intervalo 150-300 μL usando volúmenes de acetonitrilo de 1 a 2,5 mL. Las señales analíticas más altas se obtuvieron con 1,5 mL de acetonitrilo y 250 μL del disolvente extractante.

Para chequear el rendimiento del procedimiento, se sometieron a extracción distintas masas de muestra de 2 a 7 g. Se recomienda una masa de muestra de 5 g, ya que, como se observa en la Figura VII.3, valores más elevados no conducen a los aumentos de sensibilidad esperados. Bajo las condiciones seleccionadas finalmente para la extracción de los analitos de las muestras y para la etapa de preconcentración DLLME, se recuperaron fases sedimentadas de aproximadamente 200 μL . Estas fueron entonces evaporadas y reconstituidas en 50 μL de acetonitrilo, que corresponde al volumen mínimo necesario para que opere el automuestreador usando los microinsertos de los viales.

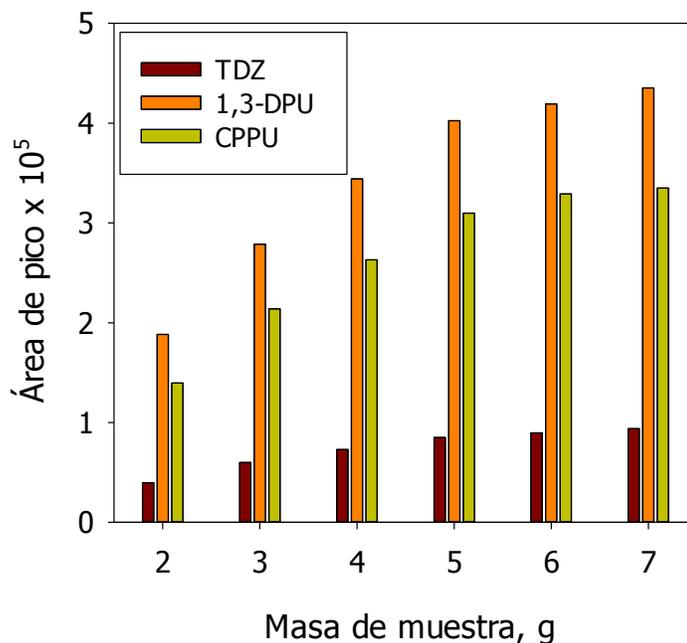


Fig. VII.3. Influencia de la masa de muestra sobre la sensibilidad del procedimiento

VII.8. SELECCIÓN DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN MS

Una vez optimizadas la extracción de la muestra y la etapa de preconcentración DLLME, se compararon las sensibilidades conseguidas para los compuestos estudiados usando TOF-MS e IT-MS/MS.

Se obtuvo mayor sensibilidad para todos los compuestos usando TOF-MS tanto para las disoluciones de los estándares acuosos como para una muestra de sandía. Las pendientes fueron 10-27 veces y 30-45 veces más elevadas para las gráficas de calibrado con estándares acuosos que para las gráficas de adiciones estándar, respectivamente, cuando se usó TOF-MS comparado con IT-MS/MS. Por tanto, se seleccionó TOF-MS.

VII.9. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Para estudiar la posibilidad de existencia de un efecto matriz, se usó un test ANOVA para comparar las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y las obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a los diferentes tipos de muestras estudiadas. Los resultados se muestran en la Tabla VII.2. Se confirmó la presencia de

efecto matriz ya que se obtuvieron valores de "p" inferiores que 0,05 para los tres analitos en las cinco muestras.

Sin embargo, el test ANOVA no mostró diferencias significativas entre las pendientes obtenidas al aplicar el método de adiciones estándar a las diferentes muestras (los valores de p variaron entre 0,051 y 0,645) (Tabla VII.2). En consecuencia, se usó el método de calibración con una matriz de la muestra para cuantificar los analitos.

Las gráficas se prepararon en los intervalos de concentración de 0,2-20 ng g⁻¹ para 1,3-DPU y CPPU y 0,5-50 ng g⁻¹ para TDZ. Los coeficientes de regresión obtenidos bajo las condiciones seleccionadas fueron en todos los casos superiores a 0,995.

Tabla VII.2. Pendientes^a de las gráficas de calibrado de adiciones estándar (mL ng⁻¹)

Muestra	TDZ	1,3-DPU	CPPU
Acuosa	845805±82775	2469689±92239	2563891±32164
Kiwi	491555±38834	2249110±59961	1650394±48663
Sandía	496936±26658	2317880±61529	1761177±66564
Melón	475809±37210	2297084±57876	1765323±86404
Uva	505849±40530	2285966±36090	1691227±97953
Tomate	482877±36389	2289127±37978	1677055±73157

^a Los valores son media±SD (n=6)

Los LODs y LOQs se calcularon, respectivamente, sobre la base de tres y diez veces la SD de la ordenada en el origen de las gráficas de calibrado obtenidas para los estándares en la matriz de la muestra. Los datos obtenidos para los LODs se muestran en la Tabla VI.3. Se obtuvieron LOQs de 0,17; 0,07 y 0,12 ng g⁻¹, para TDZ, 1,3-DPU y CPPU, respectivamente.

La repetitividad se calculó usando la RSD para diez análisis sucesivos de una muestra de sandía fortificada a un nivel de concentración de 0,5 ng g⁻¹ para todos los compuestos (Tabla VII.3).

Las pendientes obtenidas para calibración con estándares acuosos mediante DLLME-LC-TOF-MS revelan un aumento de sensibilidad comparada con las pendientes

obtenidas en ausencia de etapa de preconcentración, de entre 50 y 130 veces para TDZ y CPPU, respectivamente.

Así, el procedimiento desarrollado mostró una sensibilidad más elevada que los descritos previamente para el análisis de muestras de frutas y verduras usando MS/MS [17-21] o TOF-MS [22,23] como sistemas de detección para LC.

Tabla VII.3. Características analíticas del método propuesto

Compuesto	Coefficiente de regresión	LOD ^a (ng g ⁻¹)	RSD ^b (%)
TDZ	0,9920	0,050	11,5
1,3-DPU	0,9938	0,020	7,2
CPPU	0,9953	0,035	8,5

^a Usando la desviación estándar de la ordenada en el origen. ^b Calculada a un nivel de concentración de 0,5 ng g⁻¹ para cada compuesto (n=10)

VII.10. ANÁLISIS DE MUESTRAS Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El procedimiento optimizado se aplicó a un total de 15 muestras diferentes correspondientes a 5 tipos distintos de frutas y verduras.

No se encontraron residuos de los compuestos analizados en ninguna de las muestras, al menos por encima de los correspondientes LODs.

Se llevaron a cabo estudios de recuperación para verificar la exactitud del método propuesto fortificando cuatro muestras (kiwi, sandía, uva y tomate) por triplicado, a tres niveles de concentración en el intervalo 0,2-5,0 ng g⁻¹, dependiendo del compuesto. Los resultados se muestran en la Tabla VII.4 y están en concordancia con los criterios de validación establecidos para el análisis de residuos de pesticidas [31].

Se obtuvo un valor de recuperación media±desviación estándar (n=108) de 96±5. No se observaron diferencias en los valores de RSD entre las cuatro matrices diferentes, variando entre 1 y 8 %.

En los estudios de recuperación, se obtuvieron las masas exactas para todos los estándares y las muestras analizadas fortificadas. El error de la masa se calculó usando

como referencia los valores de masa de m/z 220,0419; 212,0950 y 247,0512 para TDZ, 1,3-DPU y CPPU, respectivamente, suministrados por el software del TOF. Los errores obtenidos estuvieron para todos los estándares y las muestras fortificadas entre -1,8 y 0,3 ppm para TDZ, -2,8 y 2,4 ppm para 1,3-DPU, y entre -4,7 y -0,1 ppm para CPPU. Estos valores fueron en todos los casos inferiores al nivel de exactitud aceptado de 5 ppm para confirmación de la composición elemental [32].

Tabla VII.4. Recuperaciones^a a partir de diferentes muestras

Compuesto	Fortificado (ng g ⁻¹)	Kiwi	Sandía	Uva	Tomate
TDZ	0,5	94±6	98±5	93±6	93±4
	1,0	96±3	105±4	97±4	96±4
	5,0	89±7	91±6	101±5	91±6
1,3-DPU	0,2	92±5	90±5	95±5	90±5
	0,5	101±4	97±4	103±5	92±4
	5,0	96±7	92±5	90±7	98±3
CPPU	0,2	90±6	92±5	90±6	102±5
	0,5	104±4	95±4	105±3	106±3
	1,0	93±5	97±3	95±4	98±4

^a Valor medio±desviación estándar (n=3)

La Figura VII.4 muestra los perfiles de elución DLLME-LC-ESI-TOF-MS así como los espectros de masas obtenidos para una muestra de kiwi fortificada con una mezcla estándar de los analitos, en las condiciones seleccionadas.

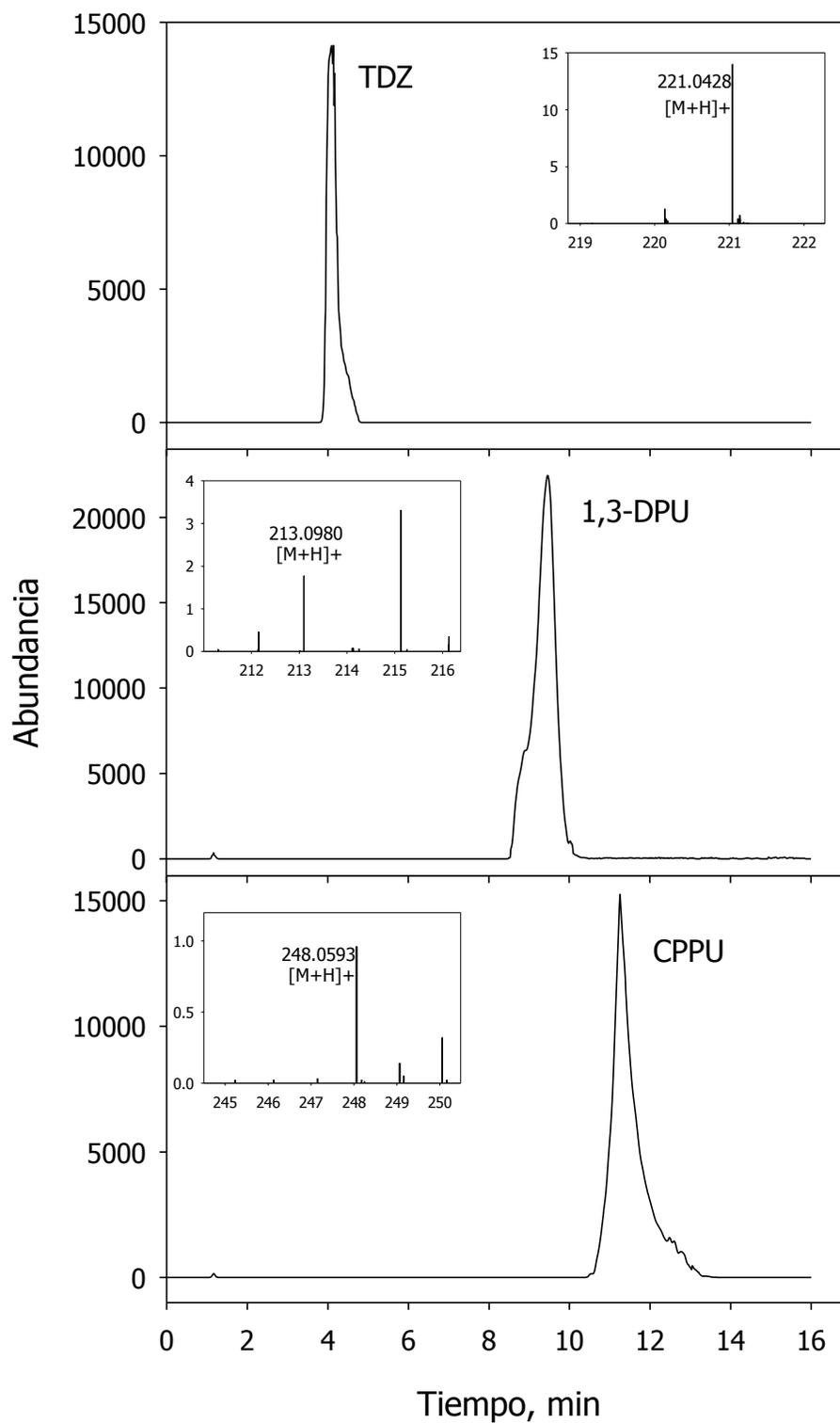


Figura VII.4. Cromatogramas de iones extraídos para DLLME-LC-ESI-TOF-MS mostrando los espectros de masas de los compuestos obtenidos de una muestra de kiwi fortificada con una mezcla de los estándares a un nivel de concentración de $3,0 \text{ ng g}^{-1}$ para TDZ y $0,3 \text{ ng g}^{-1}$ para 1,3-DPU y CPPU

VII.11. BIBLIOGRAFÍA

- [1] P.J.J. Hooykass, M.A. Hall, K.R. Libbenga, *Biochemistry and molecular biology of plant hormones*, Elsevier, Países Bajos, 1999.
- [2] G.L. Gambino, P. Pagano, M. Scordino, L. Sabatino, E. Scollo, P. Traulo, G. Gagliano, Determination of plant hormones in fertilizers by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection: method development and single-laboratory validation, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 1245-1256.
- [3] Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC. http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/plant_health_checks/sa0016_en.htm. Último acceso en Febrero de 2013.
- [4] A. Heyl, M. Riefler, G.A. Romanov, T. Schmülling, Properties, functions and evolution of cytokinin receptors, *Eur. J. Cell Biol.* 91 (2012) 246-256.
- [5] D.W.S. Mok, M.C. Mok, Cytokinin metabolism and action, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 89-118.
- [6] United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-128819_01-Sep-04.pdf. Último acceso en Febrero de 2013.
- [7] EU Commission Directive 2006/10/EC of 27 January 2006, amending Council Directive 91/414/EC to include forchlorfenuron and indoxacarb as active substances, *Off. J. Eur. Un.* L25 (2010) 24.
- [8] T.L. Potter, L. Marti, S. Belflower, C.C. Truman, Multiresidue analysis of cotton defoliant, herbicide, and insecticide residues in water by solid-phase extraction and GC-NPD, GC-MS, and HPLC-diode array detection, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4103-4108.
- [9] United States Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/thidiazuron_factsheet.pdf. Último acceso en Febrero de 2013.

- [10] F. Kaczyna, R. Megnet, The effects of glycerol and plant-growth regulators on *Gracilaria verrucosa* (Gigartinales, Rhodophyceae), *Hydrobiologia* 268 (1993) 57-64.
- [11] A. Piotrowska, R. Czerpak, J. Adamowicz, A. Biedrzycka, M. Potocka, Comparison of stimulatory effect of cytokinins adenine and urea derivatives on the level of some components in *Wolffia arrhiza* (L.) Wimm. (Lemnaceae), *Acta Soc. Bot. Pol.* 74 (2005) 111-118.
- [12] C. Suárez-Pantaleón, J.V. Mercader, C. Agulló, A. Abad-Somovilla, A. Abad-Fuentes, Hapten synthesis and polyclonal antibody-based immunoassay development for the analysis of forchlorfenuron in kiwifruit, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 8502-8511.
- [13] C. Suárez-Pantaleón, F.A. Esteve-Turrillas, J.V. Mercader, C. Agulló, A. Abad-Somovilla, A. Abad-Fuentes, Development and validation of a direct competitive monoclonal antibody-based immunoassay for the sensitive and selective analysis of the phyto regulator forchlorfenuron, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 2019-2026.
- [14] D. Sharma, M.D. Awasthi, Behaviour of forchlorfenuron residues in grape, soil and water, *Chemosphere* 50 (2003) 589-594.
- [15] J.Y. Hu, J.Z. Li, Determination of forchlorfenuron residues in watermelon by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1635-1640.
- [16] M. Kobayashi, I. Takano, Y. Tamura, S. Tomizawa, Y. Tateishi, N. Sakai, K. Kamijo, A. Ibe, T. Nagayama, Clean-up method of forchlorfenuron in agricultural products for HPLC analysis, *Food Hyg. Soc. Jpn.* 48 (2007) 148-152.
- [17] X. Shi, F. Jin, Y. Huang, X. Du, C. Li, M. Wang, H. Shao, M. Jin, J. Wang, Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 60-65.
- [18] J. Wang, D. Wotherspoon, Determination of pesticides in apples by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry and estimation of measurement uncertainty, *J. AOAC Int.* 90 (2007) 550-567.

- [19] A. Valverde, L. Piedra, A. Aguilera, M. Boulaid, F. Camacho, Analysis and residue levels of forchlorfenuron (CPPU) in watermelons, *J. Environ. Sci. Health Part B* 42 (2007) 801-807.
- [20] K. Banerjee, D.P. Oulkar, S. Dasgupta, S.B. Patil, S.H. Patil, R. Savant, P.G. Adsule, Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1173 (2007) 98-109.
- [21] D.P. Oulkar, K. Banerjee, M.S. Ghaste, S.D. Ramteke, D.G. Naik, S.B. Patil, M.R. Jadhav, P.G. Adsule, Multiresidue analysis of multiclass plant growth regulators in grapes by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 94 (2011) 968-977.
- [22] A. Valverde, A. Aguilera, C. Ferrer, F. Camacho, A. Cammarano, Analysis of forchlorfenuron in vegetables by LC/TOF-MS after extraction with the buffered QuEChERS method, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 2818-2823.
- [23] D.P. Oulkar, K. Banerjee, S. Kulkarni, Multiresidue analysis of plant growth regulators in grapes by triple quadrupole and quadrupole-time of flight-based liquid chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 94 (2011) 1715-1721.
- [24] J. Hu, Y. Hu, Y. Chen, T. Yang, High performance liquid chromatography method for residues analysis of thidiazuron in apple and soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87 (2011) 448-451.
- [25] Y. Li, J.E. George, C.L. McCarty, S.C. Wendelken, Compliance analysis of phenylurea and related compounds in drinking water by liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry coupled with solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1134 (2006) 170-176.
- [26] M. Saraji, N. Tansazan, Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of phenylurea herbicides in water samples by HPLC-diode array detection, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 4186-4192.
- [27] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. 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.

- [28] C. Bosch Ojeda, F. Sánchez Rojas, Separation and preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review, *Chromatographia* 69 (2009) 1149-1159.
- [29] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342-2357.
- [30] M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Perez, M.A. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, Liquid phase microextraction applications in food analysis, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7415-7437.
- [31] European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection. Document SANCO/10684/2009, implemented in January 2010. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed.
- [32] M. Mezcua, O. Malato, J.F. García-Reyes, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, Accurate-mass databases for comprehensive screening of pesticide residues in food by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Chem.* 81 (2009) 913-929.

CAPÍTULO VIII

**DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN MIEL
MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA
LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CORMATOGRAFÍA LÍQUIDA
CON DETECCIÓN POR DIODOS Y
ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIEMPO DE
VUELO**

VIII.1. FLAVONOIDES

En los últimos años, la sociedad ha experimentado un interés creciente hacia los alimentos funcionales cambiando incluso la forma de ver la alimentación. Los alimentos funcionales pueden ser naturales o pueden obtenerse por modificación de alimentos naturales; por ejemplo, la adición de diversos nutrientes a alimentos y bebidas con objeto de cubrir recomendaciones dietéticas o para solucionar deficiencias de nutrientes específicos [1,2]. La miel, que inicialmente se usaba en alimentación por su poder endulzante, es hoy ampliamente consumida debido a sus probadas propiedades beneficiosas sobre la salud, que comparte con el própolis y la jalea real, que han conducido a que todos estos productos sean considerados como alimentos funcionales naturales [3].

Las propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias, antitrombóticas y antialérgicas de la miel, el própolis y la jalea real se atribuyen a diferentes factores como son su pH, contenido en azúcares, peróxido de hidrógeno y compuestos fenólicos. Los polifenoles muestran una actividad antioxidante incluso mayor que la de las vitaminas C y E. La mayor parte de los compuestos fenólicos se hallan en forma de flavonoides [3].

El término flavonoide viene del latín "flavus" que significa amarillo. Son los pigmentos responsables del color otoñal de las hojas y de muchas gamas de amarillo, naranja, rojo y azul en flores. En el grupo de los flavonoides se incluyen todos los compuestos fenólicos cuyo esqueleto está formado por quince carbonos, distribuidos en tres anillos: dos anillos bencénicos de 6 carbonos (anillos A y B), conectados mediante un anillo heterocíclico (anillo central C) de seis miembros incluyendo tres átomos de carbono y oxígeno. Las modificaciones en el anillo central dividen a los flavonoides en diferentes clases: flavonas (ej. luteolina), flavonoles (ej. quercetina), flavanonas (ej. hesperetina), isoflavonoides (ej. dadzeína), antocianinos (ej. cianidina), flavanoles (también llamados

flavan-3-oles, ej. catequina, epicatequina, proantocianidinas y taninos condensados), chalconoides (ej. chalcona), dihidrochalconas (ej. floretina) y auronas (ej. aureusidina) [4]. De entre los distintos grupos, los flavonoles y los flavanoles son los más extendidos en el reino vegetal.

Los flavonoides constituyen el grupo de sustancias fitoquímicas más grande y diverso, ciertamente se han descrito más de 5000 flavonoides naturales. Estos compuestos muestran un amplio espectro de funciones, incluyendo pigmentación, interacción con patógenos, fertilidad y protección contra la radiación UV.

Los flavonoides pueden encontrarse en forma libre, a los que solemos referirnos como agliconas, o unidos a azúcares (los más frecuentes son glucosa, galactosa, ramnosa, y arabinosa), hablando entonces de glucósidos o heterósidos. La unión de los azúcares puede darse a través de oxígeno (O-glucósidos) o a través de carbono (C-glucósidos), siendo generalmente los O-glucósidos más frecuentes. Las agliconas son antioxidantes más potentes que sus correspondientes glicósidos, ya que la O-glicosilación de los anillos A o B disminuye el poder antioxidante. Los flavonoides se encuentran en las plantas predominantemente en forma de glucósidos, aunque también pueden encontrarse como ésteres.

Los efectos beneficiosos sobre la salud de los flavonoides son consecuencia de su capacidad para complejar los cationes divalentes de los metales de transición implicados en procesos de formación de radicales. La capacidad de los flavonoides para inhibir los radicales libres está relacionada con su estructura química. Esta relación estructura-actividad ha sido demostrada a través de diferentes estudios [4]. El mecanismo de captura de radicales implica la donación de un átomo de hidrógeno, para estabilizar el radical, y reestructuración estructural.

Los flavonoles son el grupo más ubicuo en alimentos, siendo los compuestos más representativos quercetina y kaempferol, ambos en forma de glucósidos. La actividad biológica de la quercetina ha sido atribuida a su habilidad para neutralizar radicales libres *in vivo*. Otros flavonoles, como miricetina, y flavonas, como luteolina y apigenina, también son relevantes.

Los flavanoles pueden estar presentes en los alimentos en forma de monómeros, de oligómeros e incluso como moléculas de gran tamaño molecular, como la elagitanina y la punicalagina.

Entre los alimentos más ricos en flavonas se encuentran los cítricos, donde se encuentran presentes en forma de C- y O-glucósidos en la piel de estas frutas, mientras que otras flavonas no glucosiladas, concretamente flavonas polimetoxiladas, se encuentran en los aceites esenciales de la piel. La fruta completa puede contener hasta cinco veces más flavanonas que los zumos obtenidos a partir de ella, porque las partes sólidas de estas frutas presentan las concentraciones más altas para estos compuestos.

Con la globalización del mercado de la miel, que actualmente incluye aproximadamente a 150 países, la identificación de su origen junto con la prueba de su autenticidad, resultan de gran importancia. Puesto que la miel presenta una matriz muy compleja, la búsqueda de compuestos químicos que indiquen su origen floral y/o geográfico ha sido objeto de numerosos estudios en las últimas dos décadas, especialmente desde que el etiquetado con el origen botánico del producto se halla protegido legalmente [4,5].

La composición de la miel depende no solo de las plantas que proporcionan el néctar, sino también de otros factores como la especie de abeja, el área geográfica, la estación del año, el modo de almacenamiento y la forma en que se lleva a cabo su recolección. El análisis de polifenoles en miel resulta una herramienta muy útil para identificar el origen floral; por ejemplo, kaempferol es un indicador de miel de romero, quercetina de miel de girasol, mientras que naringenina y luteolina lo son de miel de lavanda. Por otra parte, se han encontrado flavonoides característicos del própolis, concretamente pinocembrina, pinobanksina y quercetina, en mieles europeas [4].

En este Capítulo se presenta la determinación de ocho flavonoides: dos flavonas (baicaleína y crisina), dos flavanonas (hesperetina y naringenina) y cuatro flavanoles (fisetina, miricetina, quercetina y kaempferol).

La Figura VIII.1 muestra las estructuras químicas de estos compuestos.

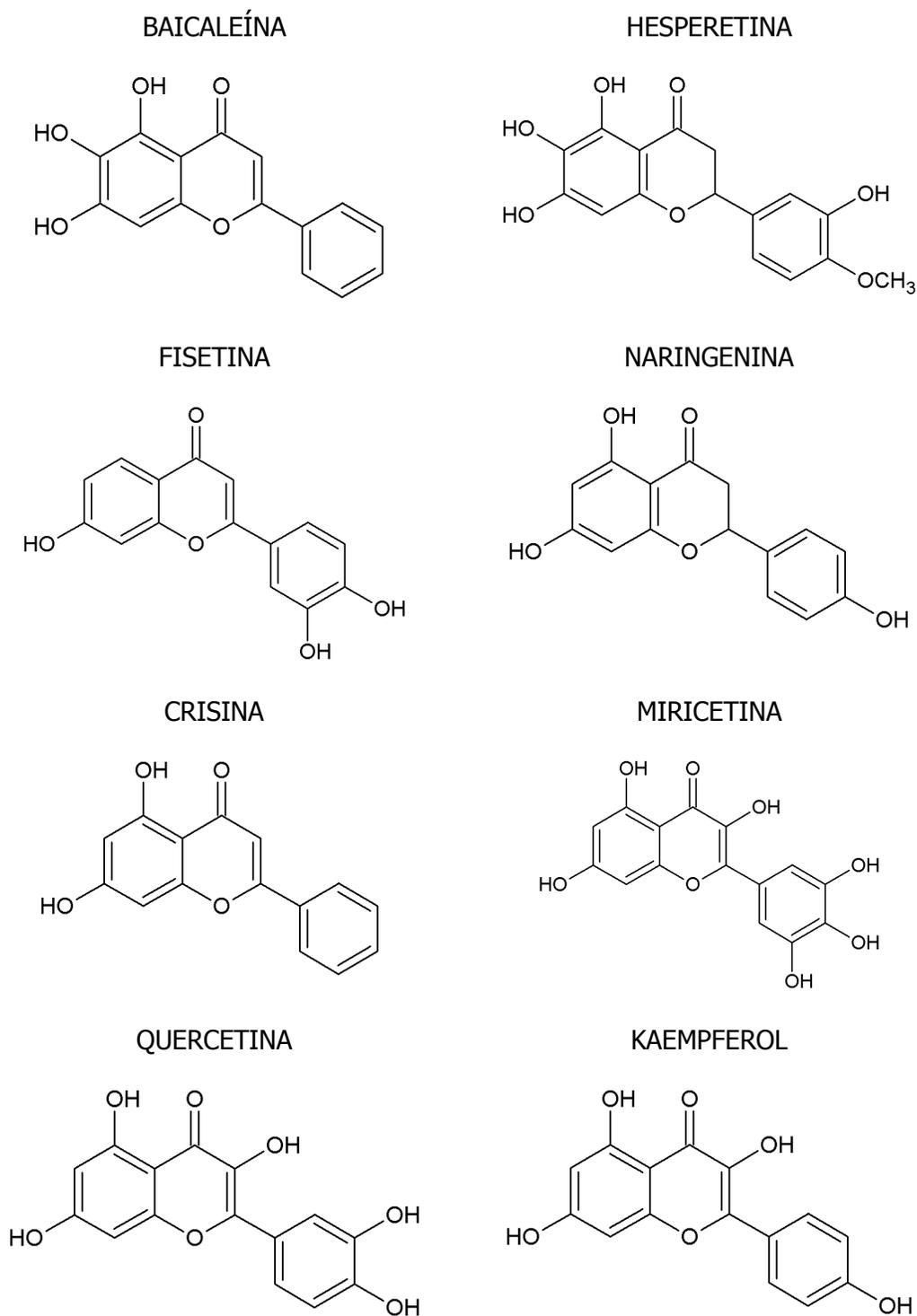


Figura VIII.1. Estructuras químicas de los flavonoides

VIII.2. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES EN MIEL

La bibliografía recoge varias revisiones relativas al análisis de flavonoides en miel y productos relacionados [6-8]. El número de métodos basados en GC para estas determinaciones es muy reducido debido a la baja volatilidad de los flavonoides, que obliga a la inclusión de una etapa de derivatización en el procedimiento analítico [9-12], aunque algunos análisis se han llevado a cabo omitiendo esta etapa [13]. Si bien CE también se ha propuesto para estas determinaciones [14], LC es, con diferencia, el método más ampliamente usado acoplado a detectores UV/visible [15-28], electroquímicos [29], de MS [30-33] o combinación de dos sistemas de detección [34-41], aunque en este último caso, uno de los detectores suele emplearse con fines de identificación de los compuestos encontrados [34-36,41].

La complejidad de la matriz de la miel, rica en compuestos polares como los azúcares y las proteínas, hace necesaria una etapa de tratamiento de la muestra antes de proceder a su análisis mediante LC. La bibliografía muestra diferentes métodos de preparación de muestra, siendo el más ampliamente aplicado el descrito por Ferreres y col. [42], que combina filtración a través de la resina polimérica no iónica, Amberlita XAD-2, para eliminar los compuestos polares y una etapa adicional de limpieza mediante extracción con éter etílico [14-18,22,23,25,26,33,37]. También se han empleado los sorbentes poliméricos de fase reversa para aislar los flavonoides de la matriz de la miel [19,21,32,34-36,38,39] a través de procedimientos más simples, ya que la etapa de LLE tras la filtración con Amberlita es omitida. Otros autores usan LLE como única etapa de limpieza [20,31]. La disolución de la miel en medio acuoso y su filtración para eliminar partículas sólidas, sin someter la mezcla a ningún tipo de tratamiento para separar azúcares y proteínas, también se ha propuesto para análisis mediante LC acoplado a DAD [27], detección electroquímica [29] y MS/MS [30].

En los últimos años, las metodologías de preconcentración miniaturizadas, cumpliendo los principios de la química analítica verde, han revolucionado muchas etapas del tratamiento de la muestra en diferentes aspectos. En este sentido, las técnicas LPME son una interesante alternativa a los métodos tradicionales de tratamiento de muestra ya que son rápidas, baratas y amigables con el medio ambiente [43]. Desde su introducción, DLLME se ha empleado para la preconcentración de una amplia variedad de compuestos

químicos en diferentes matrices incluidos los alimentos [44]. En la bibliografía solo hemos encontrado dos referencias en las que se aplica DLLME para la determinación de compuestos polifenólicos en miel [27,41]. Ranjbari y col. [27] aplican DLLME inversa para la preconcentración de quercetina, mientras que Campone y col. [41] preconcentran ácidos fenólicos y cinco de los flavonoides cuantificados en el presente estudio mediante DLLME convencional. Estos dos métodos usan LC-DAD para la cuantificación de las muestras, siendo MS empleado [41] solamente con fines de identificación. La bibliografía no muestra ninguna aplicación de otro método LPME distinto de DLLME para la determinación de flavonoides en miel.

En este Capítulo se ha utilizado LC acoplada a detector DAD y a ESI-TOF-MS, siendo los dos métodos de detección empleados con fines cuantitativos. Para la cuantificación de las muestras por LC-DAD se utilizó calibración externa frente a estándares acuosos, consiguiendo LODs en el intervalo 0,4-4,1 ng g⁻¹, dependiendo del compuesto. Para TOF-MS se aplicó la calibración con una matriz de la muestra, obteniendo LODs entre 0,05 y 0,91 ng g⁻¹. Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios entre 80 y 111 % para muestras fortificadas en el intervalo de concentración 15-1500 ng g⁻¹, dependiendo del compuesto, con los dos modos de detección usados. Se encontraron niveles de flavonoides de hasta 3800 ng g⁻¹ en las muestras analizadas.

VIII.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

VIII.3.1. INSTRUMENTACIÓN

El sistema LC consta de una bomba binaria Agilent G1312A (Agilent, Waldbronn, Germany) operando a una velocidad de flujo de 0,8 mL min⁻¹. Los disolventes se desgasificaron usando un sistema de membrana en línea (Agilent G1379B).

La columna se mantuvo a temperatura ambiente en un compartimento termostataado (Agilent G1316A). La separación se llevó a cabo en una columna Discovery HS PEG (Supelco) (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), y la inyección (20 µL) se realizó con un automuestreador (Agilent G1329A). Se usaron viales ámbar para el automuestreador de

2,0 mL de capacidad (Agilent, Waldbronn, Alemania) sellados con tapones de PTFE, provistos de microinsertos de vidrio de 250 μL de capacidad y con pie polimérico.

El sistema LC se acopló a un DAD (Agilent 1200, G1315D) operando a 280 y 370 nm y a un TOF-MS (Agilent G6220A), equipado con fuente ESI operando en modo negativo. Las condiciones de operación del espectrómetro fueron: voltaje del capilar, 2500 V; presión del gas nebulizador, 60 psi; flujo del gas de secado, 12 L min^{-1} ; temperatura del gas de secado, 350 $^{\circ}\text{C}$; voltaje del fragmentador, 180 V; voltaje del skimmer, 65 V; voltaje de RF del octapolo, 250 V. Los espectros de masa exacta se registraron considerando un rango de masas de 100-1200 m/z .

Para el procesamiento de los datos se usó el software Applied Biosystems/MDS-SCIEX Analyst QS (Frankfurt, Germany). Las medidas de masa exacta de cada pico a partir de los TICs se obtuvieron por medio de un sistema automatizado dispensador de calibrante que permitió realizar la corrección de las masas. El TOF-MS realiza automáticamente la calibración de la masa interna, usando una fuente ESI con un sistema automatizado dispensador de calibrante, que introduce el flujo de la salida del cromatógrafo junto con pequeñas cantidades (cerca de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$) de una disolución calibradora, ES-TOF (Agilent). Se usó el software *Mass Hunter*, versión B-02-00, para el autocalibrado y registro continuo de los resultados de las masas de referencia internas (112,985587 y 966,000725) y los datos originales.

Los análisis se llevaron a cabo usando EIC de la molécula desprotonada de cada analito. Las masas teóricas exactas basadas en la fórmula se calcularon usando las herramientas de cálculo de masa molecular del software *Mass Hunter*. El espectro de masa exacta de los analitos se obtuvo sustrayendo el fondo del EIC. Se utilizó la masa exacta de la molécula desprotonada tanto con propósitos de cuantificación como de confirmación. Para la cuantificación se utilizaron como señales analíticas las áreas de pico de los EICs.

Para el tratamiento de las muestras se utilizó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Germany). También se usaron filtros de membrana hidrofílicos de 25 mm, de PES de 0,2 μm (Agilent).

VIII.3.2. REACTIVOS

Se usaron disolventes de grado reactivo analítico, etanol, metanol, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, tetracloroetano, 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, tolueno, hexano, isooctano, 2-octanona y 2-undecanona de Sigma (St. Louis, MO, USA). Los ácidos, fórmico (98 %) y acético concentrado, así como las sales cloruro sódico y acetato sódico fueron suministrados por Fluka (Buchs, Switzerland). El agua desionizada se obtuvo con un sistema Milli-Q de purificación de agua (Millipore, Bedford, MA, USA).

Se obtuvieron estándares analíticos de baicaleína (5,6,7-trihidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_5$, 98 %), naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona, $C_{15}H_{12}H_5$, ≥ 95 %), miricetina (3,3',4',5,5',7-hexahidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_8$, ≥ 96 %) y kaempferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_6$, 97 %) de Sigma. Hesperetina (3',5,7-trihidroxio-4'-metoxiflavanona, $C_{16}H_{14}O_6$, ≥ 98 %), fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_6 \cdot H_2O$, ≥ 98 %), crisina (5,7-dihidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_4$, ≥ 98 %) y quercetina (3,3',4',5,6-pentahidroxiflavona, $C_{15}H_{10}O_7$, 98 %) fueron proporcionados por Fluka. Las disoluciones patrón de cada compuesto se prepararon a una concentración de 500 mg L^{-1} en metanol, y se almacenaron en la oscuridad a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. La disolución estándar de trabajo mezcla de todos los analitos se preparó diariamente por dilución con agua desionizada.

VIII.3.3. MUESTRAS

Se obtuvieron en un supermercado local ocho muestras de miel de diferente origen floral, según sus etiquetas (lavanda, azahar, tomillo, brezo, eucalipto, castaño, romero y flores), aunque no se llevó a cabo ninguna identificación de dicho origen. Se obtuvieron asimismo tres muestras comerciales de própolis y una de jalea real.

VIII.3.4. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se pesó una cantidad de muestra de 1 g en un tubo de centrifuga de vidrio y se disolvió en 10 mL de disolución reguladora acetato/acético 0,01 M de pH 3. Seguidamente se añadió de forma muy rápida y usando una jeringa una mezcla conteniendo 1,5 mL de acetonitrilo (disolvente dispersante) y 150 μL de cloroformo

(disolvente extractante), formándose una nube de microgotas de la fase extractante en el seno de la fase acuosa. Tras unos pocos segundos de extracción, se centrifugó la mezcla durante 1 min a 3400 rpm, sedimentando las gotas de cloroformo en el fondo del tubo cónico. La fase sedimentada, cuyo volumen osciló entre 110 y 125 μL dependiendo de la muestra, se recolectó por medio de una microjeringa y se evaporó hasta sequedad empleando una corriente suave de argón. El residuo seco se reconstituyó en el mínimo volumen de acetonitrilo necesario (50 μL) para inyectar esta fase en el sistema LC por medio del muestreador automático. El volumen de inyección en el sistema cromatográfico fue de 20 μL . La separación se llevó a cabo empleando una fase móvil compuesta inicialmente por una mezcla 30:70 de acetonitrilo:ácido fórmico (1 % v/v), incrementando el porcentaje de acetonitrilo hasta un 33 % en 5 min y después hasta 45 % en 10 min, manteniendo esta última concentración durante 3 min. Para obtener los resultados finales, se analizaron separadamente tres porciones de cada muestra.

VIII.3.5. ENSAYOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación se emplearon tres tipos de muestras diferentes (miel de romero, própolis y jalea real). Para ello, se fortificaron masas de muestra de 20 g a niveles de concentración del orden de 10 y 100 veces los LOQs obtenidos mediante el procedimiento LC-DAD, correspondiente a cada analito. Las muestras fortificadas se equilibraron durante 1 h en la oscuridad a 4 °C antes de proceder al análisis mediante LC-DAD-ESI-TOF-MS. Se analizaron separadamente tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración.

VIII.4. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Se ha seleccionado la técnica de LC en fase reversa. Las condiciones de separación óptimas se establecieron inyectando 20 μL de una disolución acuosa conteniendo los analitos a un nivel de concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La aplicación de distintas mezclas acetonitrilo:agua y acetonitrilo:ácido fórmico como fases móviles, tanto en modo isocrático como en gradiente, empleando una columna Tracer Spherisorb C_{18} ODS2, no proporcionó una separación eficiente de los flavonoides. Sin embargo, el empleo de una columna Discovery HS PEG y elución por gradiente permitió la separación de los ocho analitos con

una velocidad de flujo de la fase móvil de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. La fase móvil inicial fue una mezcla 30:70 acetonitrilo:ácido fórmico al 1 % v/v, incrementando la proporción del disolvente orgánico de forma lineal hasta un 33 % en 5 min y luego hasta un 45 % en 10 min, manteniéndose esta última proporción durante 3 min. Todos los analitos fueron eluidos durante el segundo gradiente lineal, excepto kaempferol, que eluyó en la última etapa, cuando la proporción de acetonitrilo en la fase móvil alcanzó el 45 %. Aunque se probaron distintas condiciones experimentales con objeto de eliminar el primer gradiente lineal, la resolución entre los picos siempre empeoró por lo que se mantuvo en el programa de elución final.

El orden de elución de los distintos compuestos y sus características de retención, expresadas como tiempo de retención (t_R) y factor de retención (k), calculados a partir de los cromatogramas obtenidos mediante LC-DAD fueron: (1) baicaleína ($t_R=8,97 \text{ min}$; $k=2,38$); (2) hesperetina ($t_R=9,97 \text{ min}$; $k=2,76$); (3) fisetina ($t_R=10,07 \text{ min}$; $k=3,28$); (4) naringenina ($t_R=11,6 \text{ min}$; $k=3,38$); (5) crisina ($t_R=12,46 \text{ min}$; $k=3,70$); (6) miricetina ($t_R=12,69 \text{ min}$; $k=3,80$); (7) quercetina ($t_R=14,52 \text{ min}$; $k=4,49$) y (8) kaempferol ($t_R=16,02 \text{ min}$; $k=5,06$). Los factores de separación (α) se encontraron en el intervalo de 1,1 a 1,2 y los factores de resolución (R_s) entre 1,45 y 2,51 para aquellos analitos que eran monitorizados a 280 nm (baicaleína, hesperetina, naringenina y crisina), y en los intervalos 1,1-1,4 y 2,1-4,8, respectivamente, para los flavonoides detectados a 370 nm (fisetina, miricetina, quercetina y kaempferol).

VIII.5. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES DLLME

La primera etapa en la optimización de DLLME fue la selección de los disolventes extractante y dispersante más adecuados. Para ello, se disolvió 1 g de miel de lavanda previamente fortificada a la concentración de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ para todos los compuestos, en 10 mL de agua, y esta fase acuosa se sometió a preconcentración empleando 1 mL de acetonitrilo y 150 μL de diferentes disolventes orgánicos que actuaron como extractantes.

Con los disolventes orgánicos ensayados de menor densidad que el agua (1-undecanol, 1-dodecanol, 1-octanol, 2-octanona, 2-undecanona, tolueno, hexano e isoocetano) se obtuvieron eficiencias de extracción menores que las encontradas con disolventes de densidad mayor (tetracloruro de carbono, 1,1,2,2-tetracloroetano,

cloroformo, tetracloroetano, 1,2-dicloroetano y diclorometano). El diclorometano fue descartado ya que, debido a su alta solubilidad en agua, no se formó gota sedimentada tras la etapa de centrifugación. Por otro lado, el uso de 1,1,2,2-tetracloroetano también se descartó pues la evaporación de la fase sedimentada requirió tiempos muy largos. El cloroformo mostró mayor capacidad de preconcentración que 1,2-dicloroetano y que 1,1,2,2-tetracloroetano (Fig. VIII.2), por tanto fue seleccionado como disolvente extractante.

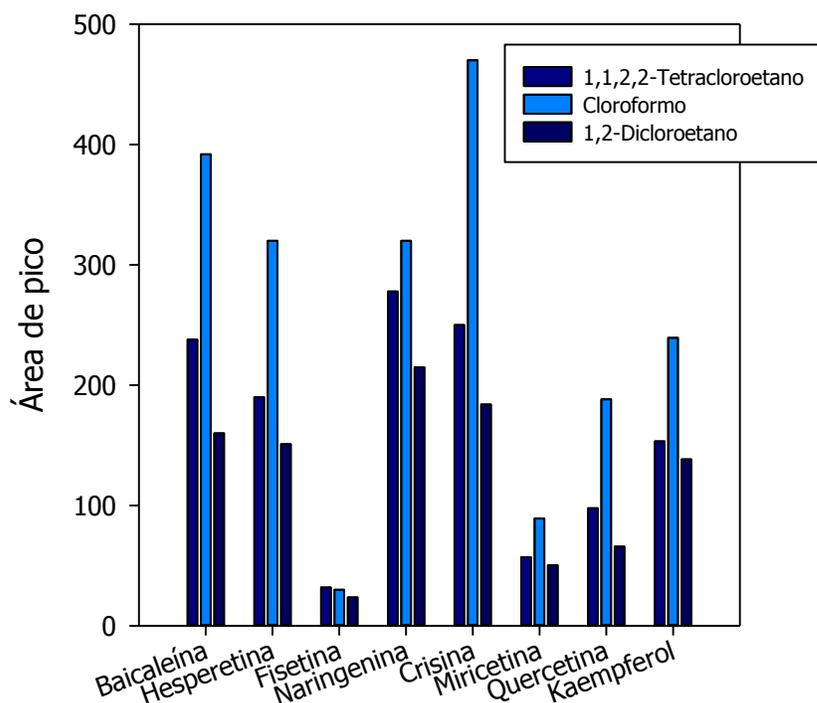


Figura VIII.2. Selección del disolvente de extracción. Volumen de fase acuosa, 10 mL; volumen de extractante, 150 μ L; disolvente dispersante, 1 mL acetonitrilo

El principal parámetro considerado en la selección del disolvente dispersante fue su miscibilidad tanto en el disolvente extractante como en la fase acuosa. Acetonitrilo, metanol y etanol cumplen este requisito y fueron ensayados empleando 1 mL de cada uno y 150 μ L de cloroformo como extractante. La fase sedimentada más discernible respecto de la fase acuosa se consiguió con acetonitrilo, disolvente que además se encontró en mayor consonancia con la fase móvil, por lo que fue seleccionado.

Se aplicó el método experimental Taguchi, basado en un diseño ortogonal, para estudiar la posible influencia de seis factores (cada uno de ellos estudiado a tres niveles) sobre el rendimiento del procedimiento DLLME.

Las variables estudiadas fueron el volumen de los disolventes extractante y dispersante, la masa de miel, el pH, la concentración de cloruro sódico en la fase acuosa y el tiempo de centrifugación. Para este propósito, se emplearon 10 mL de una fase acuosa conteniendo diferentes masas de muestra, comprendidas entre 0,5 y 1,5 g, previamente fortificada al nivel de concentración de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ para todos los analitos. Los volúmenes de los disolventes extractante y dispersante se variaron en los intervalos 50-150 μL y 0,5-1,5 mL, respectivamente. El efecto de la fuerza iónica en la fase acuosa se estudió con concentraciones de NaCl comprendidas entre 0 y 5 % m/v y el pH entre 3 y 6. Para romper la dispersión formada, se aplicaron tiempos de centrifugación de 1, 3 y 5 min a 3400 rpm. En todos los casos, la fase sedimentada se evaporó y el residuo se reconstituyó agregando 50 μL de acetonitrilo.

La Fig. VIII.3 muestra los efectos de los seis factores estudiados a tres niveles diferentes sobre la respuesta media para la eficiencia de extracción de los ocho analitos.

Cuando se incrementó la masa de miel desde 0,5 a 1,0 g, el valor medio de la respuesta aumentó y luego disminuyó ligeramente hasta 1,5 g, por tanto, se seleccionó una masa de miel de 1,0 g.

Los máximos valores de eficiencia de extracción se obtuvieron empleando 1,5 mL de acetonitrilo y 150 μL de cloroformo. La variación del pH entre 3 y 6, con disoluciones reguladoras de concentración 0,01 M, mostró los mejores resultados a pH 3, siendo el valor seleccionado. La eficiencia de extracción fue mayor para todos los analitos en ausencia de cloruro sódico en la fase acuosa, por tanto, se descartó la adición de sal.

El tiempo de centrifugación requerido para romper la nube de gotas de cloroformo y que estas sedimenten mostró no ser un factor significativo sobre la eficiencia de extracción, por tanto, la mezcla se centrifugó durante 1 min a la máxima velocidad soportada por los tubos cónicos de centrífuga.

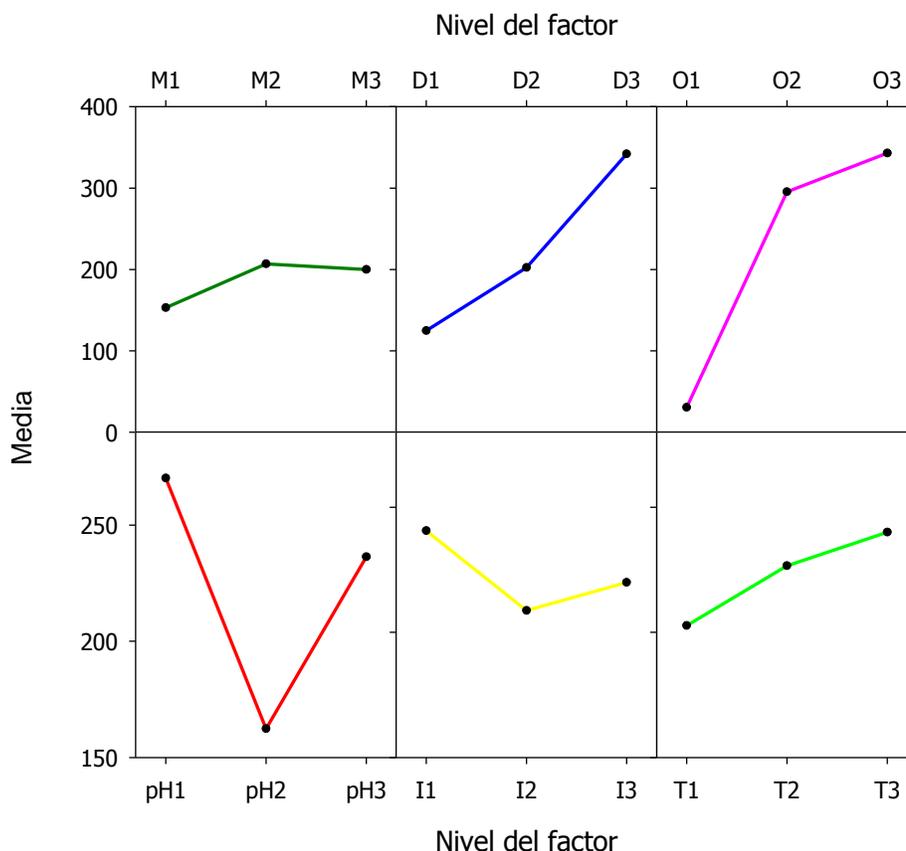


Figura VIII.3. Efecto de los distintos niveles ensayados para la masa de muestra (M), volumen de dispersante (D), volumen de extractante (O), pH de la fase acuosa (pH), concentración de cloruro sódico (I) y tiempo de centrifugación (T) sobre el valor medio de la respuesta de los flavonoides

Se llevó a cabo un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para discriminar aquellos parámetros que afectaban de forma significativa a la eficiencia de extracción (Tabla VIII.1).

A partir de los datos obtenidos para F, puede deducirse que solo uno de los factores considerados en el diseño experimental afectaba de forma significativa, al 95 % de nivel de confianza, a la eficiencia de extracción. Todos los valores obtenidos para F fueron superiores al valor crítico. Esta variable fue el volumen de disolvente extractante. La contribución del error residual a la variabilidad de la señal indica la validez del diseño experimental aplicado.

Tabla VIII.1. Resultados del análisis de la varianza para la respuesta media

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	P	Contribución (%)
Masa de muestra	2	30773	15386	0,32	0,733	3,7
Volumen de dispersante	2	217756	108878	2,25	0,142	26,4
Volumen de extractante	2	510370	255185	5,27	0,020	61,9
pH	2	54481	27240	0,56	0,582	6,6
Fuerza iónica	2	4717	2358	0,05	0,953	0,6
Tiempo de centrifugación	2	6437	3219	0,07	0,936	0,8
Error	14	677814	48415			
Total	26	1502348				

VIII.6. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO

Para estudiar la presencia de efecto matriz se realizó un test ANOVA comparando las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y las obtenidas aplicando el método de adiciones estándar a tres muestras diferentes de miel (eucalipto, tomillo y azahar).

Se confirmó la ausencia de efecto matriz para el método LC-DAD ya que los valores de p obtenidos fueron superiores a 0,05 en todos los casos. Por tanto, la cuantificación de las muestras mediante DLLME-LC-DAD se llevó a cabo calibrando frente a patrones acuosos.

Los parámetros analíticos para este método aparecen en la Tabla VIII.2, donde podemos observar que la repetitividad, calculada como la RSD para diez análisis sucesivos de la muestra de miel de brezo fortificada a 300 ng g⁻¹ para todos los compuestos, proporcionó valores inferiores al 11 %.

Tabla VIII.2. Características analíticas del método DLLME-LC-DAD

Compuesto	λ (nm)	Pendiente ^a (mL ng ⁻¹)	Coefficiente de regresión	LOD ^b (ng g ⁻¹)	RSD ^c (%)
Baicaleína	280	3,50±0,10	0,9958	0,4	5,1
Hesperetina	280	3,10±0,08	0,9951	0,5	6,2
Fisetina	370	0,35±0,02	0,9963	3,9	11
Naringenina	280	2,83±0,11	0,9984	0,8	7,3
Crisina	280	4,84±0,18	0,9970	0,4	4,9
Miricetina	370	0,44±0,03	0,9959	4,1	11
Quercetina	370	1,42±0,06	0,9984	1,3	8,3
Kaempferol	370	2,81±0,10	0,9978	0,7	6,0

^a Valor medio±desviación estándar (n=5). ^b Calculado para S/N=3. ^c Calculado a la concentración de 300 ng g⁻¹ para cada compuesto (n=10).

Por otra parte, cuando se empleó el método DLLME-LC-ESI-TOF-MS se detectó la presencia de efecto matriz al comparar las pendientes de las rectas de calibración acuosa frente a las obtenidas mediante el método de adiciones estándar a las muestras y que se muestran en la Tabla VIII.3.

Sin embargo, la aplicación de un test ANOVA para las pendientes de adiciones estándar para las diferentes muestras de miel mostró la ausencia de diferencias significativas al nivel de confianza del 95 % (Tabla VIII.3). Los valores de p variaron entre 0,047 y 0,808, dependiendo del compuesto.

En consecuencia, se propuso la cuantificación de las muestras mediante DLLME-LC-ESI-TOF-MS utilizando los parámetros de calibración obtenidos para una de las muestras de miel. La comparación de las desviaciones estándar de las pendientes obtenidas para cada analito en las distintas matrices mostró la ausencia de diferencias significativas al 95 % de nivel de confianza. Se encontraron valores de F comprendidos entre 0,366 y 2,92.

Tabla VIII.3. Pendientes^a de las gráficas de calibración acuosa y adiciones estándar a las muestras mediante DLLME-LC-ESI-TOF-MS (mL ng⁻¹).

Muestra	Baicaleína	Hesperetina	Fisetina	Naringenina	Crisina	Miricetina	Quercetina	Kaempferol
Acuosa	38904±1230	59006±2408	6504±202	165000±6300	395008±11103	5320±234	45032±2202	132175±6582
Miel de eucalipto	32781±1864	59459±5126	5260±412	50219±4945	267062±12777	4440±421	33296±2863	104344±7521
Miel de brezo	31679±1795	62998±4932	6100±566	51162±5500	253111±13254	4569±398	34727±3025	107240±8066
Miel de tomillo	30342±2003	62824±5257	5658±430	55631±5901	283680±17389	4381±459	30213±2542	102904±7066
Própolis 1	33004±1651	62543±4395	5246±460	49884±4251	256801±15388	4254±439	31760±2919	108398±9079
Jalea real	31058±1598	61836±5912	5313±621	50439±2658	270521±19325	4621±489	35021±3514	105430±8780

^a Valor medio±desviación estándar (n=5).

La Figura VIII.4 muestra los perfiles de elución obtenidos mediante el procedimiento DLLME-LC-DAD en el análisis de una disolución estándar de los analitos de concentraciones comprendidas entre 10 y 150 ng mL⁻¹ para crisina y fisetina, respectivamente.

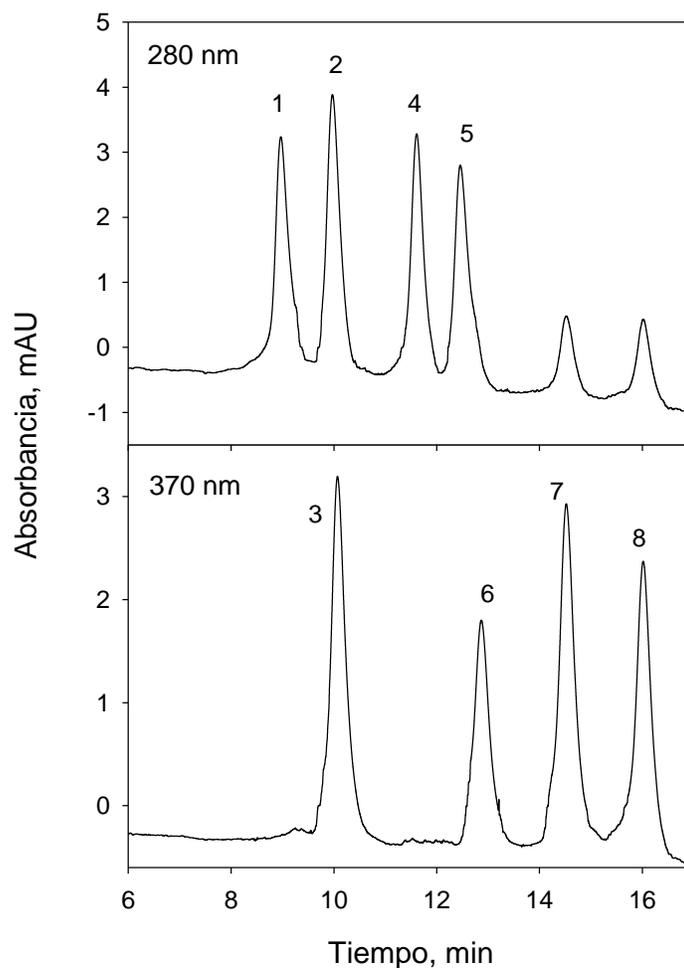


Figura VIII.4. Cromatogramas obtenidos mediante DLLME-LC-DAD para una disolución estándar acuosa. (1) Baicaleína, 15 ng mL⁻¹; (2) hesperetina, 20 ng mL⁻¹; (3) fisetina, 150 ng mL⁻¹; (4) naringenina, 20 ng mL⁻¹; (5) crisina, 10 ng mL⁻¹; (6) miricetina, 60 ng mL⁻¹; (7) quercetina, 40 ng mL⁻¹ y (8) kaempferol, 20 ng mL⁻¹

Los LODs y LOQs obtenidos mediante DLLME-LC-ESI-TOF-MS se calcularon de acuerdo al criterio de relación señal-ruido igual a 3 y 10, respectivamente. Los valores obtenidos para los LODs aparecen en la Tabla VIII.4 y se encontraron entre 0,05 y 0,91 ng g⁻¹, mientras que los LOQs variaron entre 0,17 y 3,0 ng g⁻¹, dependiendo del

compuesto. Los coeficientes de regresión obtenidos bajo las condiciones seleccionadas fueron en todos los casos superiores a 0,997, mostrando una excelente relación de proporcionalidad entre la cantidad de analito extraído y la señal analítica obtenida.

Tabla VIII.4. Datos de masa y de calibración mediante DLLME-LC-ESI-TOF-MS

Compuesto	Composición elemental	Masa teórica (m/z)	Masa calculada (m/z)	Error (ppm)	LOD ^a (ng g ⁻¹)
Baicaleína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270,0528	270,0523	-1,89	0,06
Hesperetina	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302,0790	302,0795	1,44	0,08
Fisetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0477	286,0478	0,28	0,40
Naringenina	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272,0685	272,0689	1,39	0,09
Crisina	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254,0579	254,0586	2,68	0,05
Miricetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,0376	318,0376	0,49	0,91
Quercetina	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0427	302,0427	0,24	0,22
Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0477	286,0478	0,28	0,13

^a Calculado para una relación señal-ruido igual a 3

Cuando se compararon los LODs obtenidos usando DAD y ESI-TOF-MS, se observó un incremento en la sensibilidad de entre 4,5 y 10 veces, dependiendo del compuesto, en favor de MS. Los LODs obtenidos mediante DLLME-LC-DAD fueron similares para quercetina con respecto al valor obtenido por Ranjbari y col. [27], pudiendo destacar el menor consumo de muestra implicado en el procedimiento propuesto en este Capítulo. Por otro lado, se han alcanzado LODs menores para hesperetina, quercetina, crisina, miricetina y kaempferol que los obtenidos por Campone y col. [41], lo que puede explicarse teniendo en cuenta el mayor volumen de inyección en el sistema cromatográfico, así como reconstitución del residuo enriquecido en los analitos en un menor volumen de disolvente orgánico.

Las pendientes de calibración acuosa obtenidas usando DLLME-LC-DAD-ESI-TOF-MS fueron comparadas con aquellas obtenidas omitiendo la etapa de preconcentración, concluyendo que DLLME aportó un incremento de sensibilidad de entre 10 (para fisetina y miricetina) y 80 veces (para crisina).

VIII.7. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

El procedimiento optimizado se aplicó al análisis de ocho muestras de miel, tres muestras de própolis y una de jalea real. La Tabla VIII.5 muestra los resultados obtenidos empleando el método DLLME-LC-ESI-TOF-MS, que fueron similares a los encontrados mediante detección por DAD. No se encontró miricetina en ninguna de las muestras analizadas, por encima de su LOD ($0,9 \text{ ng g}^{-1}$), mientras que se encontró baicaleína en cuatro de las doce muestras analizadas a concentraciones comprendidas en el intervalo de 33 a 622 ng g^{-1} . La miel de lavanda fue la muestra con menores contenidos en los flavonoides estudiados, ya que solo se detectó crisina. Por otra parte, la miel de romero presentó los niveles más altos de hesperetina, fisetina, naringenina, crisina y kaempferol entre todas las muestras de miel analizadas.

Ya que no se disponía de materiales de referencia certificados para la validación del método, se comprobó su exactitud mediante estudios de recuperación realizados sobre tres muestras diferentes (miel de romero, muestra de própolis 2 y jalea real) fortificadas a dos niveles de concentración, comprendidos entre 15 y 1500 ng g^{-1} , dependiendo del compuesto. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla VIII.6. Las recuperaciones para las muestras fortificadas variaron de 80 a 111 %, con una recuperación media \pm desviación estándar ($n=144$) de $97,2 \pm 7,3$. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de RSD obtenidos para las distintas muestras, que variaron entre 5 y 14 %.

Los flavonoides encontrados en las muestras se identificaron en base a la comparación de sus tiempos de retención, sus espectros de absorción UV y sus masas moleculares con los valores obtenidos para los estándares comerciales, así como en muestras fortificadas. Las masas exactas se obtuvieron para todos los estándares, muestras sin fortificar y muestras fortificadas, apareciendo en la Tabla VIII.4 los valores medios. Además, también se calculó el error en la masa obtenida para cada analito usando como referencia la masa teórica proporcionada por el software y que aparece en la Tabla VIII.4, donde puede apreciarse que los errores encontrados oscilaron entre -1,88 y 2,8 ppm, siendo por tanto en todos los casos inferiores a 5 ppm, que es el valor generalmente aceptado como máximo con fines de confirmación.

Tabla VIII.5. Contenidos^a de flavonoides en las muestras de miel analizadas (ng g⁻¹)

Muestra	Baicaleína	Hesperetina	Fisetina	Naringenina	Crisina	Quercetina	Kaempferol
Miel							
Lavanda	ND	ND	ND	ND	214±20	ND	ND
Azahar	ND	620±35	475±32	23±2	630±14	72±	714±36
Romero	ND	82±6	1650±66	49±9	813±34	126±11	3806±100
Brezo	ND	66±3	116±10	ND	619±25	13±1	143±6
Eucalipto	ND	65±4	417±22	ND	425±31	1350±55	241±13
Castaño	214±15	30±3	99±12	14±2	284±25	1108±60	455±22
Tomillo	ND	32±3	73±10	16±1	205±11	206±10	101±11
Flores	33±4	35±4	292±11	35±4	125±12	132±13	901±15
Jalea real	622±48	2,0±0,3	149±15	41±3	65±5	205±14	294±15
Própolis 1	ND	466±23	867±70	25±3	846±58	1885±83	498±20
Própolis 2	ND	61±5	47±5	75±3	267±19	101±8	339±17
Própolis 3	266±23	207±15	714±36	12±1	63±4	474±29	60±3

^aValor medio±desviación estándar (n=3). ND significa no detectado.

Tabla VIII.6. Estudios de recuperación

Compuesto	Nivel fortificado (ng g ⁻¹)	Concentración encontrada ^a (ng g ⁻¹)		
		Miel de romero	Própolis 2	Jalea real
Baicaleína	15	13±1	12±2	629±43
	150	155±17	141±12	754±67
Hesperetina	15	78±7	81±8	18±2
	150	205±15	199±21	165±15
Fisetina	150	229±26	187±16	283±31
	1500	1512±121	1404±126	1684±121
Naringenina	25	21±3	109±9	60±7
	250	267±24	308±27	316±28
Crisina	15	606±58	271±14	69±7
	150	748±81	431±38	201±19
Miricetina	150	163±18	141±11	138±14
	1500	1436±168	1534±98	1416±129
Quercetina	50	70±8	160±12	241±25
	500	532±47	628±53	679±55
Kaempferol	25	153±14	355±37	298±27
	250	410±39	603±48	518±37

^a Valor medio±desviación estándar (n=3).

La Figura VIII.5 muestra los EICs obtenidos para la miel de flores fortificada a 400 ng g⁻¹ mediante DLLME-LC-ESI-TOF-MS.

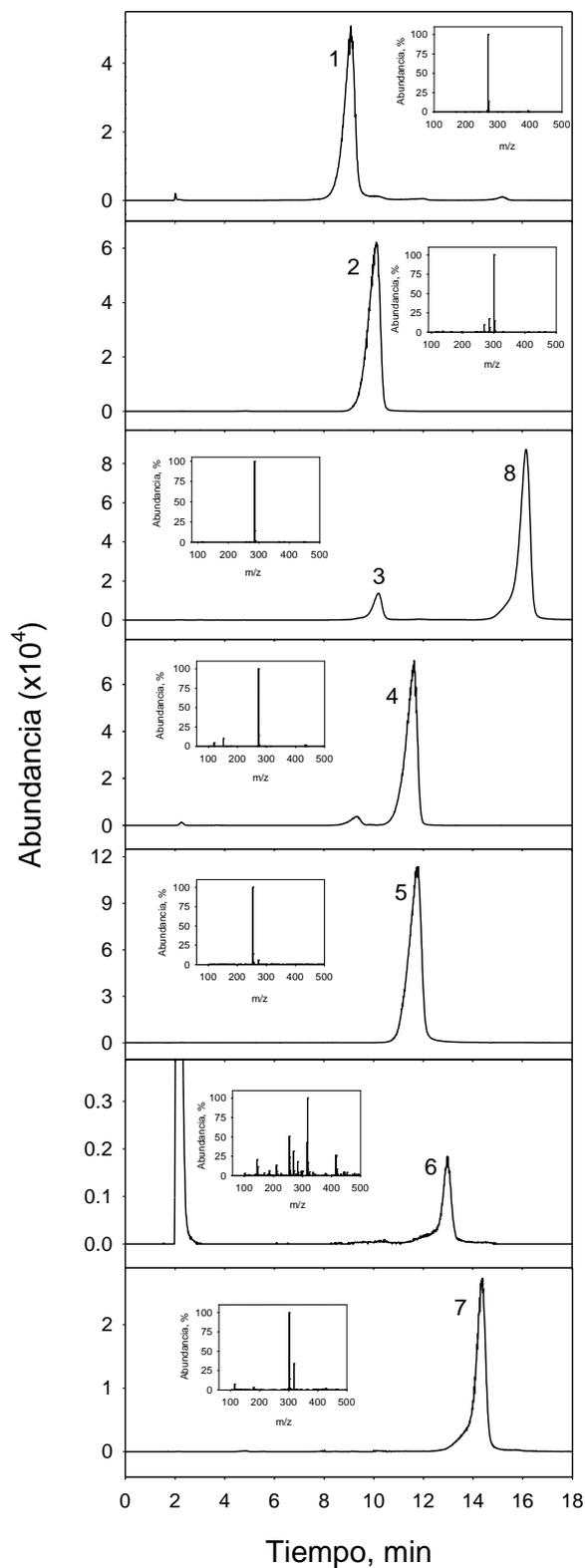


Figura VIII.5. EICs obtenidos para la miel de flores fortificada a 400 ng g⁻¹ para todos los compuestos. (1) Baicaleína, (2) hesperetina, (3) fisetina, (4) naringenina, (5) crisina, (6) miricetina, (7) quercetina y (8) kaempferol

VIII.8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] 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, Health promoting compounds in vegetables and fruits: A systematic approach for identifying plant components with impact on human health, *Trends Food Sci. Technol.* 15 (2004) 384-393.
- [2] C. Sánchez-Moreno, L. Plaza, B. de Ancos, P. Cano, Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices, *J. Sci. Food Agric.* 83 (2003) 430-439.
- [3] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, J.A. Pérez-Álvarez, Functional properties of honey, propolis, and royal jelly, *J. Food Sci.* 73 (2008) R117-R124.
- [4] R.R. Watson (Ed.), *Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and extract preparation*, Elsevier, Países Bajos, 2014.
- [5] V. Kaskoniene, P.R. Venskutonis, Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 9 (2010) 620-634.
- [6] H.M. Merken, G.R. Beecher, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 577-599.
- [7] A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1220-1234.
- [8] K. Pyrinska, M. Biesaga, Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey, *Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 893-902.
- [9] A. Uzel, K. Sorkun, O. Oncag, D. Cogulu, O. Gencay, B. Salih, Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples, *Microbiol. Res.* 160 (2005) 189-195.
- [10] M. Campo Fernández, O. Cuesta-Rubio, A. Rosado Pérez, R. Montes De Oca Porto, I. Márquez Hernández, A. Lisa Piccinelli, L. Rastrelli, GC-MS determination of

- isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 9927-9932.
- [11] V.A. Isidorov, A.G. Isidorova, L. Szczepaniak, U. Czyzewska, Gas chromatographic-mass spectrometric investigation of the chemical composition of beebread, *Food Chem.* 115 (2009) 1056-1063.
- [12] N. Kalogeropoulos, S.J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou, V.T. Karathanos, Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus, *Food Chem.* 116 (2009) 452-461.
- [13] W. Maciejewicz, M. Daniewski, K. Bal, W. Markowski, GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis, *Chromatographia* 53 (2001) 343-346.
- [14] D. Arráez-Román, A.M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1648-1656.
- [15] I. Martos, F. Ferreres, L.H. Yao, B. D'Arcy, N. Caffin, F.A. Tomás-Barberán, Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4744-4748.
- [16] L.H. Yao, Y.M. Jiang, B. D'Arcy, R.T. Singanusong, N. Datta, N. Caffin, K. Raymont, Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian eucalyptus honeys, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 210-214.
- [17] L. Estevinho, A.P. Pereira, L. Moreira, L.G. Dias, E. Pereira, Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3774-3779.
- [18] M.O. Iurlina, A.I. Saiz, R. Fritz, G.D. Manrique, Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys, *Food Chem.* 115 (2009) 1141-1149.

- [19] E. Pichichero, L. Canuti, A. Canini, Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 609-616.
- [20] M.R. Hadjmohammadi, S. Nazari, K. Kamel, Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design, *Chromatographia* 69 (2009) 1291-1297.
- [21] R. Socha, L. Juszczak, S. Pietrzyk, T. Fortuna, Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys, *Food Chem.* 113 (2009) 568-574.
- [22] I. Escriche, M. Kadar, M. Juan-Borras, E. Domenech, Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys, *Food Res. Int.* 44 (2011) 1504-1513.
- [23] M.I. Isla, A. Craig, R. Ordóñez, C. Zampini, J. Sayago, E. Bedascarrasbure, A. Álvarez, V. Salomon, L. Maldonado, Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina, *LWT-Food Sci. Technol.* 9 (2011) 1922-1930.
- [24] O. Escuredo, L.R. Silva, P. Valentao, M.C. Seijo, P.B. Andrade, Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity, *Food Chem.* 130 (2012) 671-678.
- [25] A. Cavazza, C. Corradini, M. Musci, P. Salvadeo, High-performance liquid chromatographic phenolic compound fingerprint for authenticity assessment of honey, *J. Sci. Food Agric.* 93 (2013) 1169-1175.
- [26] I. Escriche, M. Kadar, M. Juan-Borras, E. Domenech, Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment, *Food Chem.* 142 (2014) 135-143.
- [27] E. Ranjbari, P. Biparva, M.R. Hadjmohammadi, Utilization of inverted dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV as a sensitive and efficient method for the extraction and determination of quercetin in honey and biological samples, *Talanta* 89 (2012) 117-123.
- [28] A. Perna, I. Intaglietta, A. Simonetti, E. Gambacorta, A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin, *Int. Food Sci. Technol.* 48 (2013) 1899-1908.

- [29] Y. Liang, W. Cao, W.J. Chen, X.H. Xiao, J.B. Zheng, Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection, *Food Chem.* 114 (2009) 1537-1541.
- [30] M. Biesaga, K. Pyrzynska, Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6620-6626.
- [31] A. Ciric, H. Prosen, M. Jelkic-Stankov, P. Durdevic, Evaluation of matrix effect in determination of some bioflavonoids in food samples by LC-MS/MS method, *Talanta* 99 (2012) 780-790.
- [32] S. Keckes, U. Gasic, T.C. Velickovic, D. Milojkovic-Opsenica, M. Natic, Z. Tesic, The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 32-40.
- [33] I. Sergiel, P. Pohl, M. Biesaga, Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 145 (2014) 404-408.
- [34] N. Gheldof, X.H. Wang, N.J. Engeseth, Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5870-5877.
- [35] K. Petrus, H. Schwartz, G. Sontag, Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2555-2563.
- [36] A. Michalkiewicz, M. Biesaga, K. Pyrzynska, Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 18-24.
- [37] P. Truchado, E. Tourn, L.M. Gallez, D.A. Moreno, F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, Identification of botanical biomarkers in Argentinean diplotaxis honeys: flavonoids and glucosinolates, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12678-12685.

- [38] J.M. Álvarez-Suárez, A.M. González-Paramas, C. Santos-Buelga, M. Battino, Antioxidant characterization of native monofloral Cuban honeys, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 9817-9824.
- [39] J. Bertoncelj, T. Polak, U. Kropf, M. Korosec, T. Golob, LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey, *Food Chem.* 127 (2011) 296-302.
- [40] J.H. Zhou, L.H. Yao, Y. Li, L.Z. Chen, L.M. Wu, J. Zhao, Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis, *Food Chem.* 145 (2014) 941-949.
- [41] L. Campone, A.L. Piccinelli, I. Pagano, S. Carabetta, R. Di Sanzo, M. Russo, L. Rastrelli, Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1334 (2014) 9-15.
- [42] F. Ferreres, F.A. Tomás-Barberán, C. Soler, C. García Viguera, A. Ortiz, F. Tomás Lorente, A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis, *Apidologie* 25 (1994) 21-30.
- [43] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84-98.
- [44] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2067-2099.

CONCLUSIONES

La Conclusión General que se puede extraer de esta Tesis Doctoral es que se han obtenido excelentes resultados al estudiar diferentes combinaciones instrumentales entre LC como método de separación y DAD y MS empleando fuentes de ionización API (ESI y APCI), así como analizadores TOF e IT. Se han acoplado además con distintos procedimientos de tratamiento de la muestra basados en los principios de "química limpia", como DLLME y SBSE. Se proponen distintos métodos de análisis para la determinación de diferentes tipos de compuestos orgánicos de carácter tóxico, tales como melamina y sus derivados, fungicidas, insecticidas, lactonas macrocíclicas y citoquininas en distintos tipos de alimentos. También se ha llevado a cabo el análisis de otros compuestos beneficiosos para la salud, como nucleótidos y compuestos polifenólicos, en diferentes alimentos.

Las Conclusiones Concretas que se han obtenido en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La técnica de separación cromatográfica empleada en todos los métodos optimizados es LC, ya que los compuestos estudiados presentan baja volatilidad.
2. El modo cromatográfico más utilizado para la separación de los analitos mediante LC ha sido fase reversa. Se utilizaron diferentes fases estacionarias y distintos disolventes como fases móviles, incluyendo agua, metanol, acetonitrilo y mezclas de los anteriores, así como disoluciones de ácidos y reguladoras. Se ha trabajado en elución isocrática o mediante elución por gradiente.
3. La cromatografía de pares iónicos permitió la separación de cinco nucleótidos monofosfato autorizados, CMP, UMP, AMP, GMP e IMP, con valores muy adecuados para los factores de retención y de resolución, aplicándose con éxito al análisis de una gran variedad de alimentos infantiles y/o funcionales y cereales infantiles, incluyendo un estudio de la estabilidad de los nucleótidos en alimentos lácteos acidificados.

4. LC de intercambio catiónico ha permitido el control de la presencia de MEL y sus derivados (AMN, AMD y CA) en alimentos. Aunque DAD permite la determinación de MEL y AMN, esta forma de detección no resulta útil para CA y AMD. La detección por MS permite una cuantificación adecuada de los cuatro analitos, mejorando también la sensibilidad.
5. En la mayoría de los procedimientos propuestos se ha usado detección dual acoplada al sistema LC, empleando ambos detectores con fines cuantitativos así como de identificación. Las estrategias de detección dual aplicadas han combinado un detector de flujo no destructivo, DAD, con MS, obteniendo así información estructural complementaria, a la vez que pueden ser comparados los resultados de cuantificación obtenidos mediante ambos sistemas de detección. La combinación del tiempo de retención en un sistema LC bien definido, la coincidencia del espectro UV, los espectros de masas y la masa molecular (y posible información estructural) de MS han sido especialmente útiles para confirmar la identidad de los compuestos analizados.
6. Se propone un modo de detección dual para la separación por LC de siete polifenoles, tres ácidos fenólicos y cuatro HTs, en zumos de granada y diferentes partes de la fruta y el granado, proporcionando una sensibilidad elevada. Se lleva a cabo una extracción simple con metanol para las muestras sólidas liofilizadas, mientras que se requiere dilución con agua para los zumos. Los componentes minoritarios en los zumos son DHBA y CG. De entre las distintas partes de la fruta, excepto para CG, los contenidos más elevados se encuentran en la cáscara.
7. Siempre que ha sido posible, es decir, que las propiedades físico-químicas de los analitos lo han permitido, se han aplicado con éxito los principios de la Química Analítica Verde al diseño de nuevas técnicas de preparación de muestra caracterizadas por ser limpias y selectivas, rápidas y eficaces, baratas, sencillas y con cantidades mínimas o incluso libres de disolventes tóxicos.
8. 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 y ha permitido alcanzar, bajo la modalidad de

DLLME, EFs altos con un mínimo consumo de tiempo. La técnica de microextracción en fase sólida, SBSE, ha proporcionado asimismo muy buenos resultados en cuanto a sensibilidad y selectividad para la cuantificación de fungicidas del grupo de las estrobilurinas en alimentos de origen vegetal, requiriendo tiempos de análisis algo más largos que para DLLME.

9. Se han llevado a cabo nuevos progresos en la integración de múltiples acoplamientos en línea y combinaciones de técnicas de preparación de muestra y analíticas, como SPE-DLLME y LC-DAD-APCI-IT-MS/MS para la determinación de cinco insecticidas neonicotinoides en miel.
10. 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 y en el método Plackett-Burman. De este modo, 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.
11. Para aquellos casos en los que las muestras presentaron efecto matriz, se abordó su posible eliminación, cambiando la composición de la fase móvil y/o aplicando una técnica de calibración apropiada que compensara dicho efecto. 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 LODs y LOQs, como resultado directo de la preparación de la muestra. Así, la compensación del efecto matriz se ha conseguido con el uso de un estándar interno para la cuantificación de los fungicidas estrobilurinas en frutas. Se comprobó la influencia de la matriz de la muestra empleando APCI para insecticidas neonicotinoides y ESI para ácidos fenólicos, HTs, flavonoides y citoquininas. El efecto matriz encontrado en la determinación de lactonas macrocíclicas en leche procedía de la etapa de preparación de la muestra pues se observó tanto en DAD como en MS, y la cuantificación se llevó a cabo por el método de adiciones estándar, al igual que para la cuantificación de nucleótidos y de melamina y productos derivados.

12. La siguiente tabla muestra un resumen de las variables cromatográficas y de detección optimizadas en esta Tesis Doctoral para la determinación de diferentes compuestos químicos en alimentos.

Analitos	LC	Columna	Fase móvil	DAD	MS Interfase	MS Analizador	Preconcentración	Alimento	Extracción
Nucleótidos: CMP, UMP, AMP, GMP e IMP	IPC	C ₁₈ Gemini®-NX	5:95 MeOH:Formiato 0,1 M pH 5,5 Isocrático	252, 260 y 271 nm	ESI-APCI (Negativo)	TOF	-	Alimentos infantiles y lácteos	Precipitación de proteínas con TCA
Melamina y productos derivados: MEL, AMN, AMD y CA	SCX	Spherisorb SCX	10:90 ACN:NH ₄ Ac 10 mM pH 6,5 Isocrático	200 y 220 nm	APCI (Positivo y Negativo)	IT	-	Alimentos infantiles, harinas, bebidas de soja y coco	ACN:agua: dietilamina
Ácidos fenólicos (GA, DHBA y EA) y HTs (PC, PGs y CG)	RP	Tracer Extrasil ODS2	ACN:HCOOH 0,5% Gradiente	260 nm	ESI (Negativo)	TOF	-	Granada y zumo	Dilución de los zumos. Muestras sólidas: MeOH
Fungicidas estrobilurinas	RP	Spherisorb ODS2	50:50 ACN:Agua Isocrático	200 nm	-	-	SBSE (PDMS, extracción 20 min a 45°C, desorción en ACN:agua 15 min)	Frutas	MeOH y ultrasonidos
Insecticidas neonicotinoides	RP	Spherisorb ODS2	ACN:HCOOH 0,1% Gradiente	245, 253 y 270 nm	APCI (Positivo)	IT	DLLME (100 µL CHCl ₃ + 1,5 mL ACN recogido de SPE)	Miel	Disolución en agua y SPE
Lactonas macrocíclicas	RP	Tracer Extrasil ODS2	75:25 ACN:Agua Isocrático	245 nm	APCI (Negativo)	IT	DLLME (200 µL CHCl ₃ + 2 mL ACN)	Leche	Precipitación de proteínas con TCA
Citoquinas	RP	Tracer Extrasil ODS2	40:60 ACN:Agua Isocrático	-	ESI (Positivo)	TOF	DLLME (250 µL 1,2-dicloroetano + 1,5 ACN)	Frutas y vegetales	Etanol
Flavonoides	RP	Discovery HS PEG	ACN:HCOOH 0,1% Gradiente	280 y 370 nm	ESI (Negativo)	TOF	DLLME (150 µL CHCl ₃ + 1,5 mL ACN)	Miel	Disolución en agua

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se han presentado en Congresos Nacionales e Internacionales.

- "Ion-pair high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to dual electrospray atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry for the determination of nucleotides in baby foods"
J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5197-5203
DOI: 10.1016/j.chroma.2010.06.014
Publicado en el número especial del Congreso Euroanalysis2009, Innsbruck, Austria. Septiembre, 2009
- "Stir bar sorptive extraction coupled to liquid chromatography for the analysis of strobilurin fungicides in fruit samples"
J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4529-4534
DOI: 10.1016/j.chroma.2010.05.006
Publicado en el número especial VI Congreso Ibérico, XXII Reunión Nacional. Oporto, Portugal. Septiembre, 2010
- "Determination of melamine and derivatives in foods by liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and diode array detection"
Anal. Lett. 45 (2012) 2508-2518
DOI: 10.1080/00032719.2012.694941
Publicado en el número especial de Euroanalysis2011, Belgrado, Serbia. Septiembre, 2011
- "Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry"
J. Chromatogr. A 1282 (2013) 20-26
DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.086
Publicado en el número especial del 29th International Symposium on Chromatography (ISC´2012), Toruń, Polonia. Septiembre, 2012

- "Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of three cytokinin compounds in fruits and vegetables by liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry"
Talanta 116 (2013) 376-381
 DOI: 10.1016/j.talanta.2013.05.063
 Publicado en el número especial del VII Congreso Ibérico de Espectroscopia-XXIII Reunión Nacional de Espectroscopia (XXIII RNE-VII CIE), Córdoba, España. Septiembre, 2012
- "Liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides in honey samples using dispersive liquid-liquid microextraction"
J. Agric. Food Chem. 61 (2013) 4799-4805
 DOI: 10.1021/jf400669b
 Publicado en el número especial de 13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, España. Noviembre, 2011.
- "Liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry for the determination of phenolic acids and hydrolyzable tannins in pomegranate fruit and beverages"
 Enviado a *Microchem. J.*
- "Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of flavonoid aglycone compounds in honey using liquid chromatography with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry"
 Enviado a *Talanta*.