

Determinación de alquilfenoles en zumos de frutas y alimentos infantiles mediante técnicas cromatográficas y preconcentración mediante nanopartículas magnéticas de CoFe_2O_4 /ácido oleico

M. Pastor-Belda¹, P. Viñas¹, N. Campillo¹, M. Hernández-Córdoba¹

¹ Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, España. marta.pastor@um.es

1. Introducción

Los alquilfenoles (APs) forman un grupo de contaminantes orgánicos persistentes clasificados como disruptores endocrinos (EDCs). Se utilizan ampliamente en la producción de agentes tensioactivos y como estabilizadores de diferentes tipos de resinas, por lo que algunos alimentos pueden contenerlos debido a contaminación de las materias primas, a contaminación durante el proceso de elaboración [1] o por migración desde los envases que los contienen [2].

La complejidad de los alimentos y las bajas concentraciones de APs encontradas hacen necesaria una etapa de preparación de la muestra, de forma previa a la separación cromatográfica.

La aplicación de nanopartículas con propiedades magnéticas (MNPs) en el tratamiento de la muestra es, en la actualidad, una de las tendencias más interesantes en química analítica. La extracción en fase sólida magnética (MSPE) es un procedimiento de preconcentración relativamente nuevo [3-4], basado en la dispersión de las MNPs en la disolución de muestra para la adsorción de los analitos, siendo seguidamente separadas de la fase líquida usando un campo magnético externo. Finalmente, las MNPs enriquecidas con los analitos se someten a una etapa de desorción líquida, empleando el mínimo volumen de disolvente con objeto de alcanzar altos factores de enriquecimiento. La dispersión de las MNPs en la disolución de muestra produce una mejora en la eficiencia de extracción, dada la gran superficie de contacto entre la disolución y el adsorbente; obteniéndose altos factores de preconcentración y una reducción en las cantidades de muestra y de disolventes orgánicos tóxicos. En este sentido, se ha aplicado MSPE para la preconcentración de distintos analitos en diferentes tipos de muestras [5-6].

La ferrita de cobalto (CoFe_2O_4) es un material magnético con alta coercitividad, moderada magnetización y estabilidad física y química; resultando una interesante alternativa a las nanopartículas de ferrita (Fe_3O_4) [7, 9]. El recubrimiento de estas MNPs con bromuro de tetradecil trimetilamonio o con ácido oleico ha sido propuesto para protegerlas de la oxidación y evitar su aglomeración [7].

En la presente comunicación se presentan dos métodos analíticos para la determinación de seis APs (4-*tert*-butilfenol (TBP), 4-pentilfenol (PP), 4-hexilfenol (HP), 4-*tert*-octilfenol (TOP), octilfenol (OP) y 4-nonilfenol (NP)), usando MNPs de CoFe_2O_4 recubiertas de ácido oleico, mediante cromatografía líquida con detección dual por diodos y espectrometría de masas en tándem (LC-UV-ESI-IT-MS/MS) para el análisis de zumos de frutas y mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de alimentos infantiles.

2. Tratamiento de la muestra

2.1. MSPE-GC-MS

A 0.5 g de muestra (alimento infantil) se le añaden 15 mL (4% m/v) de ácido tricloroacético para precipitar las proteínas y se centrifuga la mezcla durante 10 min a 4000 rpm. Se recoge el sobrenadante, al que se añade 2-cloro-5-bromoanisol (CBA, estándar interno, EI) a 15 ng mL^{-1} de concentración, y se neutraliza por adición de NaOH, antes de proceder a filtrar la mezcla y diluir el filtrado hasta 25 mL con agua. Seguidamente se añaden 1.2 g de K_2HPO_4 y 500 μL de anhídrido acético (reactivos necesarios para la reacción de acetilación). A esta disolución se adicionan 100 mg de MNPs y la mezcla se somete durante 15 min a agitación orbital. Con la ayuda de un imán de neodimio se recogen las MNPs, desechando la fase líquida. Para la desorción de los analitos desde las MNPs, se ponen en contacto con 3 mL de etanol, aplicando energía de ultrasonidos durante 1.5 min mediante una sonda sumergida indirectamente en un baño de agua. Nuevamente, se procede a la separación de las fases utilizando un imán de Nd. La fase etanólica se filtra y se lleva a sequedad usando un rotavapor. El residuo seco se reconstituye en 50 μL de metanol, inyectando 1 μL en GC-MS.

En el sistema GC-MS se utiliza helio como gas portador y una columna capilar altamente polar (VF-23ms, 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm de espesor), llevando a cabo la inyección en modo sin división de flujo a 240 $^\circ\text{C}$. El programa de temperatura comienza a 80 $^\circ\text{C}$ (0.5 min), aumentándose la temperatura linealmente hasta 180 $^\circ\text{C}$ a 20 $^\circ\text{C min}^{-1}$ (3 min) y, finalmente, hasta 240 $^\circ\text{C}$ a 40 $^\circ\text{C min}^{-1}$ (7 min). Los APs eluyeron entre 6.11 y 9.91 min, correspondiendo a TBP y NP, respectivamente. La detección en MS se realiza en modo de iones seleccionados (SIM), monitorizando dos o tres iones para cada uno de los compuestos.

2.2. MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS

El zumo de fruta se homogeneiza y se centrifuga durante 5 min a 3000 rpm. Se toman 10 mL del zumo y se diluyen hasta 25 mL en presencia de 80 ng mL^{-1} de benzokfluoranteno (BkF, EI), adicionando seguidamente 50 mg de MNPs. Esta mezcla se agita durante 10 min a máxima velocidad en un agitador orbital, produciéndose así la adsorción de los analitos sobre las MNPs. Con la ayuda de un imán de Nd se recuperan las MNPs enriquecidas. La recuperación de los analitos de la fase sólida a la líquida se produce añadiendo 3 mL de metanol y agitando la mezcla durante 5 min de forma orbital. Esta fase líquida se filtra y se lleva a sequedad. El residuo seco se reconstituye en 100 μL de acetonitrilo, inyectándose 30 μL en LC.

Para la separación de los APs por LC-ESI-IT-MS/MS se utiliza una columna analítica Eclipse XDB-C18 (5 cm \times 0.46 cm \times 5 μm) con una fase móvil mezcla de acetonitrilo:ácido fórmico al 0.1% (v/v) operando a una velocidad de flujo de 0.4 mL min^{-1} en modo gradiente partiendo de una proporción 55:45 (3.5 min), pasando hasta 70:30 en 0.5 min (1.5 min); y finalmente hasta 80:20 en 0.5 min (13 min). Los compuestos eluyen con tiempos de retención comprendidos entre 4.2 y 13 min para TBP y NP, respectivamente. Se utilizó una fuente de electrospray acoplada a una trampa de iones para la detección de masas en tándem (ESI-IT-MS/MS). TBP, PP y HP no son capaces de ionizarse con este sistema y, por tanto, fueron cuantificados a través de un detector de diodos (DAD). Por otro lado, OP, TOP y NP muestran mayor sensibilidad operando la ionización ESI en modo positivo. El detector opera en modo de monitorización de reacciones seleccionadas (SRM)

utilizando dos transiciones para cada compuesto para así obtener la máxima sensibilidad y selectividad

3. Optimización de los procedimientos de extracción

La optimización de los procedimientos de extracción desde las muestras de zumos y alimentos infantiles se llevó a cabo mediante métodos univariantes y utilizando en ambos casos muestras fortificadas: zumo de piña al nivel de concentración de 200 ng mL^{-1} para cada analito y leche infantil a 10 ng mL^{-1} .

Los principales parámetros que afectan al procedimiento de preconcentración basado en el uso de MNPs son: el tipo y la cantidad de nanopartículas, el tiempo de adsorción, la naturaleza y volumen de disolvente de desorción, así como el tiempo de desorción.

Se comparó la eficiencia de extracción obtenida usando MNPs de CoFe_2O_4 sin recubrir y recubiertas de ácido oleico y C_{18} , obteniéndose para los dos tipos de muestras los mejores resultados con el recubrimiento de ácido oleico, siendo por tanto seleccionadas.

Para la separación mediante GC, los compuestos han de someterse a una etapa de derivatización para incrementar su volatilidad, realizándose una acetilación in-situ. Por ello el proceso de preconcentración se optimizó de forma separada para GC y LC.

La masa de MNPs, que proporcionó los mejores resultados, fue de 50 mg para LC y 100 mg para GC. El tiempo de adsorción se estudió en el rango de 5 a 30 min, con agitación orbital en ambos casos. Los APs mostraron máxima sensibilidad con 10 min, manteniéndose constante o incluso disminuyendo la señal para tiempos más largos. Sin embargo, el tiempo de equilibrio para los APs acetilados se alcanzó a los 15 min.

Para la desorción de los analitos se probaron diferentes disolventes (metanol, etanol, acetonitrilo y acetona), con puntos de ebullición bajos para conseguir su posterior evaporación en tiempos cortos. La desorción de los APs se produjo con mayor eficiencia en metanol mientras que la de los compuestos acetilados en etanol. El volumen óptimo de disolvente de desorción en ambos casos fue 3 mL. Se estudiaron diferentes condiciones de desorción de los analitos; 5 min en agitación orbital, 5 min con agitación con vortex, 5 min en baño de ultrasonidos y 1.5 min aplicando ultrasonidos a través de una sonda sumergida en un baño de agua. Se seleccionó la agitación orbital para la desorción de los APs y aplicación de ultrasonidos para los APs acetilados.

El disolvente se lleva a sequedad usando un rotavapor y se reconstituye en 50 μL de metanol para la determinación de APs acetilados y en 100 μL de acetonitrilo para la determinación de APs.

Tabla 1: Comparación de las variables en MSPE

	LC-MS	GC-MS
	$\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{ácido oleico}$	$\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{ácido oleico}$
Tipo de nanopartículas		
Masa de MNPs, mg	50	100
Tiempo de adsorción, min	10	15
Disolvente de desorción	Metanol	Etanol
Volumen de desorción, mL	3	3
Energía aplicada en la desorción	Orbital	Ultrasonidos con sonda
Tiempo de desorción, min	5	1.5
Volumen de reconstitución, μL	100	50

4. Validación de los métodos

Se han validado los métodos obteniendo intervalos de linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), selectividad, recuperación, exactitud, precisión y robustez.

Las gráficas de calibrado de los APs se obtuvieron por el procedimiento del EI aplicando, tanto para MSPE-GC-MS como para MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS, un análisis de regresión lineal representando la relación de área de pico del analito entre la del correspondiente EI frente a la concentración de analito, a seis niveles de concentración comprendidos entre 0.1 y 20 ng mL⁻¹ para GC y en el intervalo de 5 a 200 ng mL⁻¹ para LC. Los valores de los coeficientes de regresión R² obtenidos demostraron una linealidad excelente para todo el intervalo estudiado.

La sensibilidad de ambos métodos se evaluó calculando LOD y LOQ, para cada uno de los compuestos y en los diferentes tipos de muestra. Se utilizó el criterio de tres veces la relación señal/ruido (S/N) para obtener los LODs, y el criterio S/N igual a 10 para los LOQs (Tabla 2).

En ambos métodos se llevó a cabo un estudio de precisión en base a la repetitividad, calculada como la desviación estándar relativa (RSD) para una serie de diez análisis consecutivos usando muestras fortificadas. Los valores de RSD variaron entre 7.5 y 9.3% para MSPE-GC-MS y entre 8.1% y 12.7% para MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS, como muestra la Tabla 2.

Tabla 2: Comparación de las variables en MSPE

Compuesto	MSPE-GC-MS			MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS		
	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	RSD (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	RSD (%)
TBP	1.7	5.7	7.5	38	125	10.1
PP	0.6	1.9	8.1	17	56	9.3
TOP	0.4	2.7	8.2	1.7	5.6	12.7
HP	0.8	2.7	7.6	11	36	8.9
OP	0.6	2.2	9.2	6.8	22	11.9
NP	1.3	4.4	9.3	4.4	14	8.1

Los valores entre paréntesis corresponden a ng g⁻¹

5. Efecto matriz y estudios de recuperación

La respuesta del sistema de detección a los analitos puede verse afectada por la presencia de sustancias coextraídas de la muestra. El efecto matriz se evaluó comparando las pendientes de las gráficas de calibrado obtenidas con estándares acuosos y mediante adiciones estándar para las diferentes muestras de zumos de frutas y alimentos infantiles.

En ambos métodos se llevó a cabo un estudio estadístico para comparar los valores de las pendientes obtenidas y el test ANOVA demostró la existencia de interferencias en la detección, dando lugar a un efecto matriz ya que los valores “p” obtenidos fueron inferiores a 0.05 para todos los analitos en ambos métodos. En consecuencia, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo mediante el método de adiciones estándar a las muestras

Con el fin de comprobar la exactitud de los métodos desarrollados, se llevaron a cabo estudios de recuperación fortificando diferentes muestras a dos niveles de concentración.

Las recuperaciones de los APs variaron entre 87 y 105% con el método MSPE-GC-MS, mientras que las recuperaciones mediante el método MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS estuvieron comprendidas entre 91 y 119%.

6. Análisis de muestras reales

El método MSPE-GC-MS se ha aplicado al análisis de diferentes alimentos infantiles como leches y papillas de cereales y frutas de diferentes características. La mayoría de las muestras analizadas no contienen ninguno de los APs estudiados en concentraciones superiores a los correspondientes LODs; mientras que en algunas muestras, se encontraron concentraciones comprendidas entre 3 ng g⁻¹ para HP y 122 ng g⁻¹ para TOP.

El método MSPE-LC-ESI-IT-MS/MS se aplica al análisis de diferentes zumos de frutas (piña, melocotón, manzana, naranja y pomelo), encontrándose TOP y NP en concentraciones comprendidas entre 9 y 106 ng mL⁻¹.

7. Conclusiones

El uso de la separación magnética usando nanopartículas de CoFe₂O₄ recubiertas de ácido oleico como adsorbente es un método simple y eficiente para extraer selectivamente los alquifenoles desde diferentes matrices alimentarias, como zumos y alimentos infantiles. El uso de LC frente a GC permite el análisis de los compuestos sin necesidad de una etapa de derivatización. Sin embargo, con la determinación de los compuestos en su forma acetilada por GC se alcanzan LODs mucho más bajos.

Referencias

- [1] M. Mezcuá, M.A. Martínez-Uroz, M.M. Gómez-Ramos, M.J. Gómez, J.M. Navas, A.R. Fernández-Alba, Analysis of synthetic endocrine-disrupting chemicals in food: A review, *Talanta* 100, 90-106 (2012)
- [2] J.E. Loyo-Rosales, G.C. Rosales-Rivera, A.M. Lynch, C.P. Rice, A. Torrents, Migration of nonylphenol from plastic containers to water and milk surrogate, *J. Agric. Food Chem.* 52, 2016-2020 (2004)
- [3] M. Safariková, I. Safárik, Magnetic solid-phase extraction, *J. Magn. Magn. Mat.* 194 108–112 (1999).
- [4] B. Hu, M. He, B. Chen, Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 2685–2710 (2015).
- [5] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodríguez, E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: A review, *Anal. Chim. Acta* 674, 157-165 (2010).
- [6] A. Ríos, M. Zougagh, M. Bouri, Magnetic (nano) materials as a useful tool for sample preparation in analytical methods, A review, *Anal. Meth.* 5, 4558-4573 (2013).
- [7] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Magn. Mater.* 308 289-295 (2007).
- [8] I.P. Román, A. Chisvert, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography–mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 2467-2475 (2014).
- [9] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokasb, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 25–33 (2014).