

UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Microextracción dispersiva con nanopartículas magnéticas y en fase líquida acoplada a técnicas cromatográficas

> Dña. Ainhoa Oller Ruiz 2020



Memoria presentada para optar al grado de

Doctora en Química

Fdo.: AINHOA OLLER RUIZ

Nunca pensé que la parte más difícil de escribir de mi Tesis Doctoral fueran los agradecimientos. Quizás, porque hay tanto que agradecer, y tantas personas que siento involucradas en este largo proceso que ha sido el doctorado. Proceso largo y sacrificado, pero muy enriquecedor que repetiría sin dudar, siempre que pueda volver a estar acompañada por los mismos profesionales, amigos y familiares. Todos, por un lado, o por otro formáis parte de todas estas páginas.

Las primeras personas que necesito nombrar son las mujeres más trabajadoras y perseverantes que me encontraré en mi carrera profesional, como son mis directoras de Tesis Natalia Campillo y Pilar Viñas. Gracias por tantas horas de trabajo, por dejarme espacio para poder escribir a mi tiempo, pero también por marcarme unos objetivos y guiarme constantemente, y todo ello siempre acompañado de tanto cariño y confianza. Desde mis clases de Grado que impartíais, he aprendido mucho de vosotras, de vuestra organización, de vuestro trabajo en equipo.

Gracias por dejarme formar parte de este gran Grupo de Investigación, encabezado por Manuel Hernández Córdoba quien siempre tiene tanto que enseñar; e Ignacio que tantos problemas nos soluciona diariamente. Gracias por todo.

Sin olvidar al resto de grupo, tantos que han pasado por ese laboratorio, otros que aún siguen. A Miguel Ángel y a Elena, gracias por vuestra eterna amabilidad. A Nacho, fue poco tiempo, pero me has enseñado mucho, gracias sobre todo por tu radio. A Javi, con quien he compartido tantas dispersivas y este último sprint que pensábamos no tendría fin. Juanjo, tú nos dejaste ver la luz al final del túnel y que tarde o temprano también lo conseguiríamos, gracias por amabilidad que te caracteriza. A María José y a María, últimas novedades del grupo, aprovechad estos maravillosos años, todos hemos formado un gran equipo. A Natalia Arroyo y a Rosa, gracias por trasmitirme vuestra experiencia, sois maravillosas.

A ti te debo un párrafo entero, a ti se podría decir que te debo la Tesis, Marta, ya lo sabes. Que alegría encontrarte en este camino, gracias, por tanto. Gracias por convertir los agobios en eternas risas, gracias porque cada buen resultado era una fiesta, gracias por cuidarme tanto. Ojalá no te pierda nunca, mi doctora favorita, con tanto tesón, tanto que aportar, de infinita humildad y eterna alegría.

Por supuesto, a mis cartageneros. Nuria, Carol, Gema (lo siento, entras en cartagenera), Dioni y Francisco. Gracias por tanto apoyo para mantenerme a flote entre tanta toxina y Tesis. Gracias por acogerme con tanto cariño en otro gran grupo.

También me gustaría nombrar a Fátima, amiga, compañera doctoranda y de vida en la distancia. Al final todo llega a su fin, o a su comienzo, y tú también lo conseguirás.

Por último, mis cuatro pilares. Mis padres, gracias por acompañarme en cada paso que doy, siempre estáis conmigo, aunque penséis que no. Aquí hay un trocito muy grande vuestro. Gracias por enseñarme vuestros valores y que en la vida todo funciona mejor en piña. Mi hermana, apoyo fundamental de mi vida, gracias por tus consejos, gracias por tus abrazos, gracias por hacerme Tatá de esa personita, pura alegría que es David. Por supuesto, gracias a ti también, Jaime.

A mi vida, incondicional Enrique. Tan lejos y tan cerca, gracias por apoyarme, por confiar en mí, por hacerme mejor persona y conseguir cada día nuevos retos junto a mí. Mis triunfos son tuyos y los tuyos, espero que también míos. Esto solo acaba de empezar, lo mejor está por llegar en esta nueva etapa, por fin juntos. Te quiero.

Gracias.

Es necesario creer que se está dotado para alguna cosa y que hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.

Marie Curie

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	5
Objetivos	9
Introducción	15

Capítulo I: Espectrometría de masas con triple cuadrupolo acoplada a cromatografía líquida y microextracción dispersiva líquido-líquido para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas _____61

 Capítulo II: Diferenciación de terpenos libres y glicosilados en uva mediante

 microextracción dispersiva líquido-líquido y cromatografía de gases acoplada a

 espectrometría de masas _______83

Capítulo III: Generación *in situ* de un líquido iónico en microextracción dispersiva en fase líquida para la determinación de clorobencenos en muestras medioambientales mediante desorción térmica-cromatografía de gases-espectrometría de masas____105

Capítulo IV: Monitorización de toxinas marinas lipofílicas mediante microextracción dispersiva líquido-líquido y cromatografía líquida-espectrometría de masas con triple cuadrupolo ______139

Capítulo V: Microextracción en fase sólida magnética para la determinación de inhibidores de la PDE-5 mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas con triple cuadrupolo______167

Capítulo VI: Comparación de microextraction dispersiva líquido-líquido y microextracción en fase sólida magnética para la determinación de herbicidas ácidos clorofenoxi en muestras medioambientales mediante LC-QqQ-MS²______**199**

Conclusiones	227
Abreviaturas	235

RESUMEN

Resumen

En los últimos años las técnicas miniaturizadas han centrado una parte muy importante de las investigaciones en el área de Química Analítica y, en particular, en la etapa de preparación de la muestra. Los métodos analíticos desarrollados en la presente Tesis Doctoral no son ajenos a esta tendencia, habiéndose desarrollado procedimientos basados en microextracción en fase líquida (LPME) y en fase sólida magnética (MSPE), que han permitido mejorar la sensibilidad de los procedimientos analíticos, ya que los compuestos de interés son aislados de la muestra y preconcentrados en un microvolumen de extractante que puede encontrarse en fase líquida o sólida. Además, de forma simultánea, se produce un efecto de limpieza en la muestra, que redunda en una mejora de la selectividad de los métodos. De entre las diferentes variantes de LPME, la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) ha demostrado marcadas ventajas sobre el resto, siendo la técnica LPME seleccionada en esta Tesis. Además de aplicar DLLME en su versión clásica usando disolventes extractantes más densos que el agua, algunas modificaciones han supuesto un paso más hacia la minimización del uso de disolventes orgánicos tóxicos: las fases extractantes más ligeras que el agua y compatibles con la fase móvil empleada en cromatografía líquida (LC) en fase reversa, la generación in situ de líquidos iónicos y la posibilidad de omitir el uso de dispersantes en determinadas muestras.

Aunque el análisis de los extractos obtenidos en la etapa de microextracción puede abordarse a través de distintos sistemas instrumentales, los métodos cromatográficos permiten separar compuestos estrechamente relacionados. La combinación de los procedimientos de microextracción con LC y cromatografía de gases (GC) ha permitido en esta Tesis el desarrollo de métodos selectivos, sensibles y precisos, que además, pueden ser englobados en el marco de la Química Analítica Verde, ya que el consumo de disolventes orgánicos tóxicos es nulo o muy bajo, así como el de muestra, generando por tanto cantidades muy pequeñas de residuos. Un inconveniente de la combinación de la microextracción con las técnicas cromatográficas reside en la posible incompatibilidad entre el extracto enriquecido con los analitos y el sistema de separación. La evaporación del disolvente extractante y la reconstitución del residuo seco en una fase compatible con la modalidad de LC seleccionada o el uso de sistemas de desorción térmica para análisis GC de líquidos iónicos conteniendo los analitos, han sido las soluciones aplicadas en esta Tesis Doctoral.

3

A. Oller Ruiz

La detección de los compuestos separados se ha llevado a cabo usando espectrometría de masas. Para GC, la ionización de los analitos se produce mediante una fuente de impacto electrónico y el analizador es un cuadrupolo simple, mientras que para LC, la fuente de electrospray posibilita el acoplamiento de dos sistemas incompatibles, siendo el analizador empleado un triple cuadrupolo, que permite identificaciones inequívocas siguiendo los patrones de fragmentación.

La selección de las condiciones óptimas en microextracción se ha llevado a cabo aplicando métodos estadísticos multivariantes, ya que existen variables directamente interrelacionadas. La aplicación de diseños Taguchi y de tipo central compuesto resultaron muy buenas herramientas para la selección de las condiciones experimentales que proporcionaban la mejor eficiencia de preconcentración.

En esta Tesis se presentan seis métodos analíticos que demuestran la aplicabilidad de la combinación de las técnicas de microextracción con las separaciones cromatográficas para la resolución de temas de interés en distintos ámbitos. Así, dentro del campo del análisis de alimentos se ha propuesto la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas y uva, diferenciando entre las formas libres y glicosiladas a través de hidrólisis enzimática (Capítulos I y II). Más concretamente en relación a seguridad alimentaria, la determinación de inhibidores de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) se ha abordado en bebidas energéticas y en suplementos dietéticos, pudiendo detectar fraudes por presencia de compuestos no declarados en la composición de los productos comerciales (Capítulo V). La determinación de inhibidores de PDE-5 en pelo humano puede resultar una aportación de interés en el ámbito forense. Procedimientos analíticos para control ambiental han sido propuestos en los Capítulos III, IV y VI para la determinación de clorobencenos, toxinas marinas lipofílicas y herbicidas tipo ácido clorofenoxi en suelos y aguas de distinta procedencia.

Todos los métodos desarrollados han sido validados, de acuerdo con las guías internacionales, a través de las características analíticas más relevantes (intervalos de linealidad, exactitud, precisión y sensibilidad) y aplicados al análisis de muestras reales de muy diferente naturaleza.

SUMMARY

Summary

In recent years, miniaturized techniques have focused on a very important part of research in the area of Analytical Chemistry, and, particularly, in the sample pretreatment step. The analytical methods developed in this Doctoral Thesis follow to this trend, and procedures based on liquid phase microextraction (LPME) and magnetic solid phase microextraction (MSPE) have been developed, leading to improved sensitivity of the analytical procedures, since the compounds of interest are isolated from the sample and preconcentrated in a microvolume of extractant that can be found in liquid or solid phase. Furthermore, a cleaning effect is simultaneously produced in the sample, which results in improved method selectivity. Among the different variants of LPME, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has shown marked advantages over others, and is the technique selected in this Thesis. In addition to the classical version using extraction solvents denser than water, some modifications have been applied to minimize the use of toxic organic solvents: extraction phases which are lighter than water and compatible with the mobile phase used in reversed phase-liquid chromatography (LC); the *in situ* generation of ionic liquids and the possibility of omitting the use of dispersants in certain samples.

Although the analysis of extracts obtained in the microextraction stage can be approached through various instrumental systems, chromatographic methods offer the possibility of separating closely related compounds. The combination of microextraction procedures with LC and gas chromatography (GC) enabled the development of selective, sensitive and accurate methods in this Thesis, and they can, in addition, be included in the framework of Green Analytical Chemistry, since the consumption of both toxic organic solvents and amount of sample is very low, thus generating little waste. One drawback of the combination of microextraction with chromatographic techniques is the possible incompatibility between the extract enriched with the analytes and the separation system. The evaporation of the extractant solvent and the reconstitution of the dry residue in a phase compatible with the selected LC mode or the use of thermal desorption systems for GC analysis of ionic liquids containing the analytes are the solutions applied in this PhD Thesis.

The detection of the separated compounds was performed with mass spectrometry. For GC, the ionization of the analytes was produced by an electronic impact source and the analyzer was a single quadrupole, while for LC, the electrospray source allowed the coupling of two incompatible systems, and the analyzer used was a

7

triple quadrupole, which enabled unambiguous identification following fragmentation patterns.

The selection of optimal microextraction conditions was carried out by applying multivariate statistical methods, since there are directly related variables. Taguchi and Central Compound designs proved to be very good tools for the selection of the experimental conditions that provided the best preconcentration efficiency.

Six analytical methods are presented in the Thesis, thus demonstrating the applicability of the combination of microextraction techniques with chromatographic separations for the resolution of interesting issues. Thus, within the field of food analysis, the determination of terpenes in alcoholic beverages and grapes, differentiating between free and glycosylated forms through enzymatic hydrolysis is proposed (Chapters I and II). Concerning food safety, the determination of PDE-5 enzyme inhibitors has been addressed in energy drinks and dietary supplements, with the ensuing detection of frauds due to the presence of undeclared compounds in the composition of commercial products (Chapter V). The determination of these inhibitors in human hair may be of interest in the forensic field. Analytical procedures for environmental control are proposed in Chapters III, IV and VI for the determination of chlorobenzenes, marine toxins and herbicides in soils and waters of different origins.

All the methods developed have been validated, according to international guidelines based on the most relevant analytical characteristics (linearity intervals, accuracy, precision and sensitivity) and applied to the analysis of real samples of very different nature.

OBJETIVOS

Objetivos

En esta Tesis Doctoral se ha aplicado el acoplamiento de la cromatografía, tanto líquida (LC) como de gases (GC), con técnicas de microextracción en fase líquida y en fase sólida, con el objetivo de obtener métodos de análisis respetuosos con el medio ambiente y, además, eficientes para la monitorización y cuantificación de compuestos orgánicos de diferentes familias químicas presentes en matrices de distinta naturaleza.

Uno de los objetivos principales en el desarrollo de los métodos se ha centrado en la etapa de preparación de la muestra, que bien es sabido que supone un verdadero cuello de botella en el proceso analítico global. Así, la optimización de esta etapa ha ocupado una parte importante de las investigaciones, en aras de conseguir, de forma previa a la medida instrumental, el aislamiento eficiente de los compuestos de interés que finalmente se traduce en extractos altamente enriquecidos con los analitos, a la vez que se simplifica enormemente la matriz de las muestras. De este modo, se consiguen métodos con elevada sensibilidad y selectividad.

La memoria se ha dividido en seis capítulos. Los cuatro primeros tienen como denominador común el empleo de la técnica microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), mientras que el quinto capítulo presenta la aplicación de la técnica microextracción en fase sólida magnética (MSPE). Una comparación de las posibilidades que presentan DLLME y MSPE para la determinación de herbicidas ácidos clorofenoxi se presenta en el último capítulo de la Tesis.

Uno de los objetivos generales fue comprobar las posibilidades de las técnicas de microextracción en el análisis de diferentes tipos de muestras. Así, la naturaleza de las muestras objeto de análisis en esta Tesis Doctoral abarca desde alimentos (frutas, bebidas alcohólicas y energéticas, suplementos dietéticos), muestras de carácter biológico (pelo) y muestras medioambientales (aguas y suelos). En consecuencia, puede afirmarse que la Tesis aporta avances en distintas áreas, como son el análisis alimentario, clínico y/o forense y medioambiental.

Los Capítulos I y II se centran en la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas y uva, respectivamente. Los dos métodos desarrollados se basan en la aplicación de la técnica DLLME, si bien los extractos obtenidos fueron sometidos a LC para el análisis de las bebidas y a GC para el de uva. La detección para la monitorización de las separaciones cromatográficas se llevó a cabo mediante espectrometría de masas (MS) y MS en tándem (MS²) para GC y LC, respectivamente. Merece la pena destacar que el contenido de etanol de las bebidas permitió omitir el uso de disolvente dispersante en la aplicación de DLLME, cumpliendo así el objetivo de minimizar el uso de disolventes orgánicos, para la propuesta de métodos encuadrados en la línea de la Química Analítica Verde. Para el análisis de uva, un mayor número de terpenos fue considerado, respecto de los analitos monitorizados en el Capítulo I. Además, en este caso se determinan tanto las formas libres como las glicosiladas, para lo que se incluye en el tratamiento de la muestra una etapa de hidrólisis enzimática combinada con la extracción de los terpenos desde la matriz sólida, antes de proceder a la preconcentración mediante DLLME. El objetivo de desarrollar métodos que permitan la especiación de las distintas formas químicas en las que los analitos se hallan en las muestras, queda así conseguido.

En el Capítulo III se aborda la determinación de clorobencenos en muestras medioambientales mediante GC-MS. Para ello, se aplica de nuevo la técnica DLLME, pero empleando un líquido iónico (IL) como disolvente extractante. Las características fisicoquímicas de los ILs, principalmente su estabilidad térmica, impiden que los extractos obtenidos mediante IL-DLLME puedan ser inyectados directamente en el sistema GC mediante un inyector del tipo con/sin división de flujo. Este problema se resolvió mediante el uso de una unidad de desorción térmica (TDU) donde se aplica un programa de temperatura que permite vaporizar solo los analitos y no el IL, de modo que éste no alcanza el sistema cromatográfico. La compatibilización de extractantes verdes con GC vuelve aquí a presentarse como un objetivo conseguido.

Los últimos sucesos acaecidos en el Mar Menor de Murcia nos impulsaron al desarrollo de un método sensible, rápido y fiable para la determinación de toxinas marinas producidas por fitoplancton. Así, el Capítulo IV presenta el acoplamiento de la técnica DLLME con LC-MS², que permitió el análisis de muestras de agua con un alto grado de selectividad y sensibilidad, gracias a los factores de preconcentración conseguidos para las toxinas en estudio, así como a las características del sistema de medida instrumental empleado.

La técnica MSPE es aplicada en los métodos de análisis presentados en los dos últimos Capítulos, para la determinación de fármacos inhibidores de la enzima fosfodiesterasa 5 (PDE-5) y herbicidas. El carácter magnético de la fase extractante dispersada en la muestra permite aplicar las etapas de adsorción y desorción de los analitos de forma sencilla. Se consigue así el objetivo de acortar los tiempos de análisis

Objetivos

respecto de la aplicación de técnicas clásicas, ya que la dispersión del extractante en la muestra consigue una rápida adsorción de los analitos, y el carácter magnético de dicha fase permite evitar la etapa de centrifugación. La capacidad de preconcentración de MSPE para muestras de muy diversa naturaleza (suelos, aguas, bebidas energéticas, suplementos dietéticos, geles lubricantes y pelo) fue objeto de estudio en los Capítulos IV y V, proporcionando muy buenos resultados. Teniendo en cuenta la versatilidad de las dos técnicas miniaturizadas aplicadas a lo largo de la Tesis, en el Capítulo VI se compara la capacidad de ambas para la determinación de herbicidas ácidos clorofenoxi en suelos agrícolas y aguas de diversa procedencia.

Con todo lo expuesto, queda también claro que otro objetivo general de la Tesis fue comprobar la aplicabilidad de las técnicas miniaturizadas de preconcentración para la determinación de compuestos químicos de diferente naturaleza. Los compuestos orgánicos estudiados en la presente Tesis Doctoral pueden clasificarse en tres grupos: aromas, fármacos y contaminantes. Todos los aromas estudiados (mirceno, limoneno, alcohol bencílico, linalool, óxidos de linalool I y II, óxidos de rosa I y II, 2-feniletanol, α terpineol, citronelol, nerol, geraniol, eugenol, carvacrol y citral) pertenecen al grupo de los terpenoides y todos los fármacos a la familia de los inhibidores de la enzima PDE-5 (sildenafilo, vardenafilo, tadalafilo y N-desmetilsildenafilo). Entre los contaminantes, pueden diferenciarse herbicidas ácidos clorofenoxi (dicamba y ácidos 2,4diclorofenoxiacético, 4-cloro-2-metilfenoxiacético, propiónico 2-(2,4-diclorofenoxi), propiónico 2-(4-cloro-2-metilfonoxi) y butírico 4-(2,4-diclorofenoxi)), clorobencenos (diclorobenceno, triclorobenceno, tetraclorobenceno, pentaclorobenceno У hexaclorobenceno) y toxinas marinas (espirólidas, dinofisitoxinas, ácido okadaico y azaspirácidos).

Los objetivos específicos propuestos para esta Tesis Doctoral son:

- Elección de un problema analítico, estudiando las propiedades fisicoquímicas de los analitos para aplicar la técnica de microextracción más apropiada, teniendo en cuenta el tipo de muestra que se va a analizar.
- ✓ Selección de la técnica de separación cromatográfica idónea, LC o GC.
- ✓ Estudio de las diferentes columnas cromatográficas que mejor resuelven los analitos en el menor tiempo posible. Así como, selección de la fase

móvil adecuada para su elución, teniendo en cuenta la naturaleza de los disolventes y rango óptimo de pH.

- ✓ Detección de los compuestos de interés mediante MS o MS², optimizando el modo de ionización en la fuente de ionización disponible, así como las condiciones de fragmentación que proporcionan los iones precursores y producto, en el caso de MS².
- ✓ Optimización de las distintas variables que afectan a la eficiencia de preconcentración de acuerdo con la técnica elegida, DLLME o MSPE. Se aplicarán métodos estadísticos multivariantes cuando las variables se hallen interrelacionadas.
- Validación de los procedimientos analíticos propuestos, obteniendo así las características analíticas relativas a intervalos de linealidad, sensibilidad a través de los límites de cuantificación y detección; precisión mediante reproducibilidad y repetitividad y exactitud a través de estudios de recuperación y/o análisis de materiales de referencia certificados.
- ✓ Análisis de las muestras de interés y evaluación de la presencia de efecto matriz mediante análisis estadístico.

INTRODUCCIÓN

Introducción

ÍNDICE

1.	Pr	oceso analítico	19
2.	Qı	uímica analítica verde	20
2	2.1.	Orígenes	20
2	2.2.	Principios	20
2	2.3.	Herramientas para su evaluación	22
2	2.4.	Logros de la QAV	26
З.	M	iniaturización	27
3	3.1.	Microextracción en fase líquida	28
	3.1	1. Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)	30
3	8.2.	Microextracción en fase sólida	34
	3.2	1. Microextracción en fase sólida magnética (MSPE)	35
	3.2	2. Síntesis y aplicaciones de las nanopartículas magnéticas (MNPs)	37
	3.2	3. Parámetros que afectan a la eficiencia de MSPE	39
4.	M	iniaturización y LC-MS	41
5.	M	iniaturización y GC-MS	45
6.	Aı	alizadores en MS	50
6	5.1.	Cuadrupolo simple (Q)	50
6	5.2.	Triple cuadrupolo (QqQ)	51
6	5.3.	Trampa de iones (IT)	52
6	5.4.	Tiempo de vuelo (TOF)	53
Re	fere	ncias	54

Introducción

1. Proceso analítico

Puede afirmarse que el Análisis Químico alcanza sus objetivos a través del proceso analítico, que puede definirse como la aplicación del método científico a través de una serie de etapas que aparecen reflejadas en la Figura 1 [1]. Las etapas del proceso analítico abarcan desde el planteamiento del problema analítico hasta la obtención de resultados que permitan emitir un informe y establecer conclusiones. En la mayoría de los casos se requiere el análisis de determinados compuestos en una muestra concreta. Los analitos podrán ser tanto inorgánicos como orgánicos, con unas propiedades fisicoquímicas propias (estructura molecular, peso molecular, pKa, log Kow, etc.), mientras que las muestras pueden encontrarse en los tres estados de la materia (sólido, líquido gaseoso) mostrar diferente procedencia У У (muestras medioambientales, cosméticas, alimentarias, biológicas, farmacéuticas, etc.), variando así la matriz en la que se hallan los analitos. De esta forma, el proceso analítico se verá condicionado tanto por la muestra como por los analitos en estudio.



Fig. 1: Etapas del proceso analítico

Resulta muy deseable que las etapas de preparación de la muestra y de medida instrumental reúnan una serie de características que proporcionen un proceso con alto grado de precisión, selectividad, sensibilidad, eficiencia y rapidez. Su aplicación debe implicar tiempos cortos y bajos costes económicos, además de resultar segura tanto para el operario como para el medio ambiente. En torno a esta última idea, el químico analítico ha trabajado concienzudamente en los últimos años desarrollando metodologías acordes con los principios de la Química Analítica Verde (QAV).

2. Química analítica verde

En la última década, la preocupación social respecto a los problemas medioambientales que está sufriendo nuestro planeta se ha extendido enormemente. Viviendo en una sociedad en continuo crecimiento y desarrollo hacia una mejora constante en calidad de vida, se hace necesaria la implementación de actividades con mínimo impacto ambiental. La idea de desarrollo sostenible alcanzó el campo de la química a finales del siglo XX con la primera definición de "Química Verde" [2], entendida como un enfoque de la síntesis y uso de compuestos químicos que reduzcan los riesgos para los seres humanos y el medio ambiente. Así, se promueve el uso de técnicas y metodologías químicas que reduzcan o eliminen la generación de residuos peligrosos.

2.1. Orígenes

El desarrollo de la Química Verde aportó y creó diferentes herramientas y metodologías para su avance, comenzándose a hablar en 1995 [3] de una química analítica medioambiental, que estudiaba los efectos de la química analítica en el medioambiente, siendo descritos los llamados métodos "limpios". Pero no fue hasta el año 2000 cuando apareció el término "Química Analítica Verde" (QAV, GAC, Green Analytical Chemistry) propiamente dicho [4], haciendo referencia al diseño de métodos de análisis con generación mínima o nula de sustancias perjudiciales.

2.2. Principios

Anastas y Warner [5] establecieron los <u>12 principios de la "Química Verde"</u> para proporcionar un marco de trabajo en el área de la química cada vez más respetuoso con el medioambiente (Figura 2).

Introducción

1. Prevención de la generación de residuos:	 preferible a tener que tratar un residuo generado. 	
2. Economía atómica:	 las síntesis deben incorporar al producto final todos los materiales usados durante el proceso. 	
3. Síntesis químicas menos peligrosas:	 utilizando y generando sustancias de mínima toxicidad. 	
4. Diseño de reactivos químicos más seguros:	 eficaces y, al mismo tiempo, menos tóxicos. 	
5. Empleo de disolventes y sustancias auxiliares más seguros:	• incluso intentar obviar su uso.	
6. Aumentar la eficiencia energética:	 minimización del uso de energía externa, trabajando a temperatura y presiones ambientales. 	
7. Uso de materias primas renovables	 en lugar de agotables, siempre que sea viable técnica y económicamente. 	
8. Reducir derivados:	 ya que requieren reactivos adicionales y pueden generar residuos. 	
9. Aplicar catálisis:	 los catalizadores son prioritarios respecto de reactivos estequiométricos. 	
10. Diseño de reactivos y productos degradables:	 que a final de su función se descomponen en productos inocuos y no persisten en el medioambiente. 	
11. Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación:	 permitiendo una monitorización continua del proceso. 	
12. Química intrínsecamente más segura para la prevención de accidentes:	 las sustancias utilizadas minimizarán el potencial de accidentes químicos. 	

Fig. 2: Principios de la Química Verde [5]

Sin embargo, estos doce principios no son completamente aplicables en QAV, sólo se podrían aplicar seis de ellos (1, 5, 6, 8, 11 y 12), considerando que existen conceptos básicos para un analista que deberían aparecer en los principios de la QAV. Por ello, Gałuzska y colaboradores propusieron en 2013 [6] los 12 principios específicos para la QAV, que aparecen en la Figura 3.

Desarrollo de técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de la muestra.
 Minimización de la cantidad de muestra, así como de las réplicas requeridas.
 Realización de mediciones *in situ*.
 Integración de procesos analíticos y operaciones para reducir el uso de reactivos.
 Selección de métodos automatizados y miniaturizados.
 Evitar la derivatización.
 Evitar la generación de grandes volúmenes de residuos y valorar la gestión de los que se produzcan.
 Empleo de métodos multianalíticos o multiparámetros.
 Minimización del consumo energético.
 Elección de reactivos obtenidos de fuentes renovables.
 Eliminar y sustituir los reactivos tóxicos.
 Aumentar la seguridad del operador.

2.3. Herramientas para su evaluación

Para evaluar si un método de análisis es verdaderamente "verde", es decir, respetuoso con el medioambiente, se han propuesto diferentes escalas [7], que se indican a continuación por orden cronológico de aparición:

✓ En 2002, el National Water Quality Monitoring Council (NWQMC) propuso la evaluación basada en los criterios del Índice de Métodos Ambientales Nacionales

Fig. 3: Principios de la QAV [6]

Introducción

(NEMI, National Environmental Methods Index) [8], que atienden a la naturaleza de los reactivos empleados, según su grado de persistencia, bioacumulación y toxicidad (PBT); la peligrosidad de los productos químicos que intervienen en el proceso, atendiendo a si aparecen en las listas D, F, P y U de la ley de conservación y recuperación de recursos (RCRA); el carácter corrosivo del método, si se usa pH menor que 2 o mayor que 12; y la generación de residuos, que no debe superar los 50 g. Estos cuatro criterios se recogen y evalúan en el símbolo de perfil verde de un método, donde un círculo se divide en cuatro partes (Fig. 4), correspondientes a los criterios citados y se marcan en verde si son superados por el método. En la página web de este índice se recogen datos y procedimientos de análisis de diferentes agencias y organizaciones, dando lugar a una gran base de datos de métodos de análisis que permite la selección de los métodos de análisis más adecuados para unos analitos específicos o un tipo de muestra. Actualmente, hay más de 1000 métodos disponibles en esta base de datos.



Fig. 4: Símbolo de perfil verde de NEMI

✓ El criterio de consumo energético fue añadido en 2009 por Raynie [9], modificando el concepto de NEMI con cuatro criterios. Además, dividió la parte de riesgo en tres, considerando los riesgos para la salud, seguridad y medioambiente. Así, el primer pictograma evolucionó al "green assessment profile" (perfil de evaluación verde o ecológico) que se muestra en la Figura 5. Se establece además un código de colores (verde, amarillo o rojo), lo que aporta diferentes niveles de evaluación para cada criterio.



Fig. 5: Perfil de evaluación verde

Los perfiles de riesgos para la salud y seguridad se evalúan según la etiqueta de la National Fire Protection Association (NFPA), con la que se evalúa la inflamabilidad de los productos químicos que intervienen en el método, su reactividad o inestabilidad, los riesgos para la salud y otros riesgos específicos. Por otra parte, el riesgo medioambiental se refiere a si contribuye a la destrucción de la capa de ozono, producción de lluvia ácida, toxicidad en medios acuáticos o fauna, persistencia o bioacumulación. El consumo de energía se evalúa según los kWh que pueden consumirse en el análisis de una muestra. Por último, la generación de residuos tendrá un código de color según la cantidad generada.

✓ En 2012, Gałuszka y colaboradores diseñaron [10] una ecoescala aplicada a la QAV a partir de criterios anteriormente establecidos. Así, asignaron una valoración de 100 puntos para el método analítico verde ideal, valor al que se irían restando puntos de penalización (PPs) de acuerdo con las características de cada método particular. De esta forma, se establecieron tres categorías: "análisis verde excelente" para aquellos métodos con puntuación mayor de 75, "análisis aceptable" para puntuaciones comprendidas entre 75 y 50, y "análisis inadecuado" para valoraciones inferiores a 50 puntos. Los PPs se aplican tanto a los reactivos como al consumo de energía por parte de la instrumentación, según los criterios mostrados en la Tabla 1.

✓ En 2016, se creó el "Certificado verde o ecológico" donde se consideraban los PPs, un código de color y una escala de letras para la clasificación (Figura 6), estableciendo una estratificación desde procesos analíticos con efectividad ecológica (grado A) hasta procesos no ecológicos (grado G).

24

Introducción

Reactivos		PPs subtotales	PPs totales
Cantidad	< 10 mL (g)	1	
	10-100 mL (g)	2	
	> 100 mL (g)	3	
Riesgos	Sin pictogramas	0	
	Peligro menos grave	1	
	Peligro más grave	2	
Instrumentación			
Consumo energético	< 0,1 kWh por muestra		0
	1,5 kWh por muestra		1
	> 1,5 kWh por muestra		2
Riesgos laborales	Procesos herméticos		0
	Emisión de vapores		3
Residuos	Ninguno		0
	< 1 mL (g)		1
	1-10 mL (g)		3
	> 10 mL (g)		5
	Reciclaje		0
	Degradación		1
	Pasivación		2
	Sin tratamiento		3

Tabla 1. Puntos de penalización para clasificación de métodos en la ecoescala [10]



Fig. 6: Certificado ecológico [11] para un proceso analítico

2.4. Logros de la QAV

La puesta en práctica de los principios de la QAV ha conseguido reducir el impacto medioambiental de los métodos de análisis desde tres frentes diferenciados [12]:

1) Reducción del volumen de disolventes necesario en el tratamiento de muestra. Este objetivo ha sido principalmente alcanzado gracias al desarrollo de nuevas metodologías aplicables a esta etapa del proceso analítico, de entre las que destacan:

- *Extracción asistida por microondas (MAE)*, donde se usa la energía de las microondas para calentar la mezcla muestra-disolvente de extracción en recipientes sellados o abiertos. Sólo puede aplicarse a analitos térmicamente estables, ya que la temperatura de la mezcla aumenta en el proceso, y, además, con disolventes extractantes capaces de absorber la energía de este tipo de ondas.

- *Extracción asistida por ultrasonidos (UAE)*, en la que las partículas sólidas sufren ruptura mecánica por acción de los ultrasonidos, mejorando la eficiencia de extracción a la vez que se acorta el tiempo de tratamiento.

- *Extracción con fluidos supercríticos (SFE)*, para muestras sólidas evitando el uso de disolventes orgánicos tóxicos y reduciendo considerablemente el tiempo de tratamiento de muestra frente a métodos convencionales como la extracción Soxhlet.

- Extracción líquida presurizada (PLE), permite obtener altas eficiencias de extracción para compuestos térmicamente lábiles o aquellos que requieren condiciones ácidas, usando el disolvente apropiado en las condiciones adecuadas de presión y temperatura. Cuando se emplean disolventes comunes mantenidos cerca de su zona crítica, se incrementa la solubilidad de los analitos y se consigue su extracción en tiempos muy cortos y con bajos volúmenes, ya que el disolvente se mantiene por debajo de su punto de ebullición. Con el desarrollo y validación comercial de esta técnica por Dionex en 1996 [13], se le pasó a conocer como extracción con disolventes acelerados (*ASE*). Cuando el disolvente es agua, la técnica se conoce como extracción en agua supercaliente (SHWE), recibiendo mucho interés con objeto de reducir el uso de disolventes orgánicos tóxicos.
- *Extracción en fase sólida (SPE),* ampliamente utilizada en los últimos años, pues se ha reconocido como técnica de extracción, limpieza y preconcentración, evitando el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, en comparación con las técnicas anteriores, y obteniendo buenos factores de enriquecimiento frente a la extracción líquido-líquido (LLE). Sin embargo, la selección de la fase adsorbente es compleja y puede tener problemas de reproducibilidad, ya que la eficiencia está relacionada con la uniformidad de su empaquetamiento. Por todo ello, las técnicas clásicas SPE y LLE han derivado en sus versiones miniaturizadas siguiendo las líneas de actuación de la QAV y, por su implicación en la presente Tesis Doctoral, dichas técnicas serán revisadas con más detalle en un apartado posterior.

 Reducción de la cantidad y toxicidad de los reactivos empleados en la etapa de medida, lo que ha sido conseguido a través de diferentes vías de acuerdo con el tipo de técnica analítica:

- *Automatización* con el análisis por inyección en flujo e inyección secuencial, reduciendo el consumo de disolventes y residuos. También se ha conseguido automatizar y combinar on-line la técnica SPE con LC.

- *Miniaturización* de la LC al reducir el tamaño de la columna y de las partículas de relleno, lo que permite disminuir el flujo de fase móvil y su volumen total. La combinación de las técnicas cromatográficas con la espectrometría de masas ha logrado disminuir los límites de detección incluso para matrices complejas, permitiendo que los tratamientos de muestra sean más sencillos.

3) Desarrollo de métodos de análisis directos que no necesiten el uso de reactivos, evitando así el pretratamiento de la muestra. Para ello, se utilizan las técnicas de espectrometría de infrarrojo o Raman, fluorescencia, ultravioleta-visible y resonancia magnética nuclear. Con ello se reduce el uso de disolventes y reactivos, así como el tiempo de análisis y, consecuentemente, hay reducción de costes.

3. Miniaturización

Una de las líneas de trabajo principales de la QAV es la simplificación de la etapa de tratamiento de la muestra. Si bien sería deseable su omisión en el proceso analítico, en la mayoría de los casos la matriz de la muestra resulta incompatible con la técnica

de análisis seleccionada, por lo que su tratamiento resulta necesario. Incluso en aquellos casos donde no existe el problema de incompatibilidad, es común aplicar algún proceso de preconcentración de la muestra cuando se requiere llevar a cabo determinaciones a nivel de trazas. Los métodos miniaturizados de extracción han ocupado una parte importante del desarrollo de la QAV, mejorando los límites de detección instrumentales con un consumo mínimo de energía, disolventes y tiempo.

La reducción de la cantidad de fase extractante al orden de los microlitros o microgramos, ha permitido el desarrollo de las llamadas técnicas de microextracción, que pueden dividirse en dos grupos, microextracción en fase líquida (LPME) y microextracción en fase sólida (SPME), según los analitos sean aislados en una fase líquida o sólida, respectivamente.

3.1. Microextracción en fase líquida

La técnica convencional LLE ha sido ampliamente utilizada para la preconcentración y limpieza de muestras acuosas. Sin embargo, los problemas asociados a LLE tales como su alto consumo de disolventes tóxicos, largos tiempos de extracción y la necesidad de incluir una etapa de evaporación del extractante para incrementar la sensibilidad de los procedimientos, han relegado a esta técnica a un segundo plano. La reducción del volumen de fase extractante al orden de los microlitros ha minimizado gran parte de los problemas asociados a LLE, evolucionando así la técnica hacia LPME, técnica introducida por primera vez por Jeannot y Cantwell [14] y que se basa, de igual forma que LLE, en el reparto del analito entre un disolvente orgánico y la muestra acuosa. Desde su introducción ha dado lugar a múltiples variantes:

✓ La microextracción en gota única (SDME) [15] fue desarrollada en 1996, y se basa en la exposición, con ayuda de una microjeringa, de una microgota de disolvente orgánico a la disolución de la muestra, que es mantenida en agitación. Si la fase extractante es expuesta a la atmósfera en contacto con la disolución de la muestra la técnica se conoce como SDME en espacio de cabeza (HS-SDME); sin embargo, cuando los analitos presentan baja volatilidad, la gota extractante ha de ponerse en contacto directo con la muestra (DI-SDME), limitándose enormemente su estabilidad, que se verá afectada por la presencia de concentraciones altas de partículas en suspensión o por el movimiento de la propia muestra en agitación. Cuando la fase extractante se

deposita sobre la superficie de la disolución de la muestra mantenida en agitación, hablamos de microextracción en gota directamente suspendida (DSDME). Estas modalidades de SDME se caracterizan por su bajo coste y por no requerir equipamiento sofisticado; sin embargo, considerando la limitada superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora, los tiempos de operación son largos y la estabilidad de la gota se ve comprometida por los factores anteriormente citados.

✓ La extracción de analitos ionizables puede ser llevada a cabo mediante procedimientos LPME de tres fases, conocidos como microextracción líquido-líquidolíquido (LLLME) [16]. El pH de la muestra se ajusta de forma que los analitos se encuentren en estado neutro, y así, pasen a un microvolumen de disolvente orgánico. Seguidamente, un reajuste de pH los ioniza, de modo que, se vuelven a extraer a otra fase acuosa. Bajo esta modalidad se han descrito hasta tres variables diferentes: la propia LLLME [17,18], microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) [19] y LPME asistida por membrana [20].

✓ La técnica HF-LPME [19,21] ha minimizado las limitaciones de la SDME con el uso de fibras poliméricas porosas para albergar la fase extractante. La fibra se puede encontrar en forma de varilla o en forma de "U". El desarrollo de nuevos materiales poliméricos ha incrementado la versatilidad de esta técnica, pudiendo ser cada vez más selectiva. Uno de sus inconvenientes es el desgaste sufrido por las fibras en contacto con las disoluciones de muestra. La Figura 7 muestra un esquema de algunas de las modalidades más usadas de LPME.

✓ De todas las técnicas LPME desarrolladas, por diferentes motivos quizá la más versátil es la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME). DLLME fue introducida en 2006 por Rezaee y colaboradores [22]. Dado que esta técnica ha sido aplicada en cinco capítulos de esta Memoria, tanto en su versión convencional como implicando alguna variante, se presenta a continuación con más detalle.

✓ Merece la pena destacar la extracción en punto de nube (CPE) introducida en el laboratorio analítico en 1978 [23]. Esta técnica se basa en el comportamiento de las disoluciones acuosas de surfactantes no iónicos al aumentar su temperatura, generándose turbidez debido a la separación del surfactante como consecuencia de la deshidratación de las porciones hidrofílicas de las micelas. Así pues, CPE ofrece una interesante alternativa para la eliminación del uso de disolventes orgánicos tóxicos.



Fig. 7: Representación esquemática de (a) SDME en espacio de cabeza; (b) directamente inmersa; (c) directamente suspendida. (d) LLLME; (e) LPME asistida mediante membrana; (f) HF-LPME mediante fibra en varilla y (g) en forma de U

3.1.1 Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)

En su versión clásica, DLLME se basa en un sistema ternario de disolventes: la muestra en fase acuosa, un disolvente orgánico inmiscible con el agua y más denso que ella y un disolvente dispersante, miscible tanto en la fase acuosa como en la orgánica y cuya función es la de disgregar en microgotas al disolvente extractante en el seno de la muestra acuosa. Dicha disgregación genera un incremento de la superficie de contacto entre la fase dadora (muestra) y aceptora (extractante), aumentando la eficiencia de extracción y reduciendo drásticamente el tiempo de extracción, ya que tiene lugar casi instantáneamente.

La Figura 8 muestra un esquema del procedimiento de aplicación de DLLME, caracterizado por su rapidez y por no requerir material específico y/o costoso. Con ayuda de una microjeringa, la mezcla de disolventes dispersante y extractante (a) se inyecta de forma vigorosa en la disolución de muestra (b), generándose una turbidez

(c) debida a la dispersión del extractante en millones de microgotas (d) por acción del dispersante. Tras la extracción, las fases son separadas por centrifugación (e) y el disolvente extractante se deposita en el fondo del tubo cónico (f). Cuando el extractante presenta menor densidad que el agua, tras la centrifugación aparece como una gota flotante. La gota enriquecida se recoge con una microjeringa y, si es compatible con el sistema instrumental, se somete directamente a análisis.



Fig. 8: Procedimiento de aplicación de DLLME [22]

Las principales variables que afectan a la eficiencia de extracción en DLLME son (Figura 9):

- Volumen y naturaleza del disolvente extractante. Debe ser inmiscible con la fase acuosa y compatible con el sistema de análisis empleado. En caso de no cumplirse esta condición de compatibilidad, puede considerarse la transferencia de los analitos a otro disolvente o su evaporación y reconstitución posterior del residuo seco. Aunque la

aplicación de DLLME en modo convencional utiliza generalmente disolventes de mayor densidad que el agua, tales como los organoclorados, el uso de disolventes más ligeros que el agua también puede proporcionar buenos resultados. Su volumen debe ser suficiente para conseguir la extracción de un alto porcentaje de analitos, pero no demasiado elevado para evitar un efecto de dilución.



Fig. 9: Sistema ternario de disolventes, variables que determinan la eficiencia

 Volumen y naturaleza del disolvente dispersante. Debiendo ser miscible tanto en la fase dadora como en la aceptora, los dispersantes más empleados son metanol, acetonitrilo, etanol y acetona. Generalmente se utilizan volúmenes comprendidos entre 0,5 y 2 mL.

- Volumen, pH y fuerza iónica son los principales factores de la fase acuosa que afectan a la eficiencia de extracción.

- Tiempo y velocidad de centrifugación para la separación de la fase enriquecida.

Aunque a día de hoy sigue empleándose ampliamente DLLME en modo convencional [24], han ido surgiendo diferentes variantes con el fin de minimizar el uso de disolventes orgánicos tóxicos. Con el objetivo de reducir el impacto ambiental que los disolventes orgánicos clásicos provocan, se han desarrollado procedimientos DLLME

empleando otros disolventes extractantes de menor toxicidad que los convencionales e incluso consiguiendo su dispersión en ausencia de disolventes dispersantes.

El principal problema que aparece con el uso de disolventes extractantes menos densos que el agua es su recuperación desde la superficie de la fase acuosa. La técnica DLLME con solidificación de gota orgánica flotante (SFOD-DLLME), desarrollada por Khalili y colaboradores [25], emplea extractantes con puntos de fusión ligeramente inferiores a la temperatura ambiente, de modo que resulta sencilla su recuperación con una espátula una vez que son solidificados. Tras su vuelta al estado líquido, la fase enriquecida se somete a análisis.

Otra alternativa de disolventes extractantes la representan los disolventes supramoleculares (SM-DLLME) [26], generalmente formados por micelas invertidas de ácido decanoico dispersas en tetrahidrofurano o hidróxido de tetrabutilamonio, que dan lugar a coacervados en la disolución de la muestra, alcanzando el equilibrio de extracción rápidamente.

Las especiales propiedades fisicoquímicas de los líquidos iónicos (ILs) [27] les han permitido ocupar un lugar privilegiado dentro de los métodos de LPME. Aunque el impacto ambiental de los ILs está estrechamente relacionado con sus estructuras, de forma general se consideran disolventes verdes, debido a su baja toxicidad, excelentes propiedades de solvatación y habilidad para disolver diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, además, presentan baja volatilidad y alta viscosidad y estabilidad térmica. La adición de los componentes aniónico y catiónico del IL por separado sobre la fase acuosa genera, a través de una reacción de metátesis, el IL ya disperso en finas microgotas, proporcionando altas eficiencias de extracción en tiempos muy cortos y evitando el uso de disolventes dispersantes implicados en IL-DLLME en modo convencional. Esta variante se conoce como *in situ* IL-DLLME [28,29].

Con el fin de mejorar la dispersión o incluso eliminar el disolvente dispersante, se puede aplicar energía externa, refiriéndonos a DLLME cuando el disolvente dispersante se halle presente y a microextracción dispersiva en fase líquida (DLPME) cuando la dispersión se consiga en ausencia de dicho disolvente [30]. En este sentido, destaca la aplicación de agitación magnética (MSA-DLPME) [31], agitación vórtex (VA-DLPME) [32], energía de microondas (MA-DLPME) [33] o ultrasonidos (UA-DLPME) [34]. En IL-DLLME destaca la modalidad de temperatura controlada (TC-IL-DPLME), basada en el aumento de la temperatura para conseguir la total dispersión o solubilización de la fase extractante en la muestra.

3.2. Microextracción en fase sólida

Las técnicas de preparación de muestra basadas en el uso de sorbentes sólidos se clasifican en dos grandes grupos, de acuerdo con el mecanismo de extracción: técnicas de extracción exhaustiva, como la extracción en fase sólida (SPE) y las basadas en equilibrios de extracción, como la microextracción en fase sólida (SPME). En SPE, el aislamiento de los analitos tiene lugar mediante percolación de la muestra líquida a través de un absorbente empaquetado en una columna. Durante este proceso, diversos componentes de la matriz de la muestra pueden también ser absorbidos, requiriéndose etapas de limpieza adicionales que pueden conducir a pérdidas de analito. En las técnicas basadas en equilibrio de extracción, un soporte físico albergando microcantidades de fase extractante se expone a la muestra mediante el modo de DI o de HS [35]. Aunque los tiempos de extracción en las modalidades miniaturizadas de SPE pueden ser largos, las pérdidas de analito son menos probables y el impacto ambiental de su aplicación les cataloga como procedimientos verdes para el tratamiento de la muestra. Aun así, SPE permanece como una de las técnicas más empleadas para el tratamiento de matrices acuosas, aplicándose bajo diferentes formatos, e incluso se ha conseguido automatizar siendo aplicada on-line con el sistema de medida [36].

La primera versión miniaturizada de SPE fue desarrollada en 1990 [37] y se conoce como SPME con fibra, donde la fase extractante se mantiene sobre una fibra de sílice fundida albergada en una microjeringa modificada. Su aplicación requiere una primera etapa de reparto de los analitos entre la muestra y el sorbente, y una segunda para su desorción térmica (TD) concentrándose en el inyector de un sistema GC o mediante desorción líquida en un pequeño volumen de disolvente. La modalidad de desorción líquida suele emplearse para análisis mediante LC. La hibridación SPME-TD-GC permite eliminar completamente el uso de disolventes.

Los pequeños volúmenes de fase extractante (0,03-0,612 µL) suponen una limitación en la sensibilidad de los métodos SPME en fibra. Por este motivo se han desarrollado numerosas técnicas de microextracción en fase sólida [38], tales como extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE), sobre pastilla agitadora (SCSE),

sobre disco rotativo (RDSE) o microextracción en sorbente empaquetado (MEPS). Pero no solo se ha considerado la inmovilización del extractante, su dispersión en el seno de la muestra ha dado lugar a la técnica de extracción en fase sólida dispersa (DSPE), que ha supuesto una importante implementación al uso de sorbentes inmovilizados.

En DSPE, el sorbente se dispersa en el seno de la muestra para la extracción de los analitos. Seguidamente, las dos fases son separadas físicamente mediante filtración, centrifugación o por acción de un campo magnético externo, si el extractante presenta propiedades magnéticas. Finalmente, usando un disolvente adecuado, se procede a la desorción de los analitos para su análisis. En DSPE se incrementa notablemente la superficie de contacto del extractante con la muestra con respecto al uso de sorbentes inmovilizados, lo que se traduce en una reducción del tiempo de extracción. Además, la agitación de la muestra puede facilitar aún más la cinética de transferencia de masa.

El tipo de sorbente empleado en DSPE es el factor más influyente en la eficiencia de extracción, pudiendo aplicarse una amplia gama de materiales que abarcan desde los más convencionales (la mayoría disponibles comercialmente), hasta otros más específicos, como los polímeros de impresión molecular (MIPs) y los materiales biopoliméricos [35]. Las partículas de sorbente generalmente usadas presentan dimensiones nanométricas (nanopartículas, NPs), ya que la elevada relación de área superficial a volumen que muestran se traduce en mayores capacidades de extracción que otros tipos de adsorbentes.

La aplicación de DSPE con sorbentes magnéticos se conoce como microextracción en fase sólida magnética (MSPE), extracción microdispersiva en fase sólida magnética (m-µdSPE) o extracción dispersiva en fase sólida magnética (MDSPE, m-DSPE). Esta técnica será revisada a continuación con más detenimiento, teniendo en cuenta su implicación en dos de los métodos de análisis presentados en esta Tesis.

3.2.1. Microextracción en fase sólida magnética (MSPE)

Los materiales magnéticos se emplearon por primera vez en 1973 con fines de separación, inmovilizando enzimas sobre partículas magnéticas de óxido de hierro [39]. Sin embargo, no fue hasta 1999, cuando Šafaříková y Šafařík [40] introdujeron el término de MSPE. Las NPs magnéticas (MNPs) son un material muy interesante debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, tales como dispersabilidad, gran área superficial relativa y relación área/volumen. Además, la simplicidad de los procesos de

generación de MNPs, así como la posibilidad de funcionalizar su superficie las hace muy versátiles [41].

El protocolo de aplicación de MSPE consiste en dispersar las MNPs en la disolución de muestra, produciéndose la adsorción de los analitos en su superficie. A continuación, se separan las MNPs de la disolución de muestra acercando un imán al recipiente que contiene la mezcla. Seguidamente, las MNPs enriquecidas se redispersan en un disolvente adecuado, donde los analitos son desorbidos, para proceder al análisis del extracto obtenido (Figura 10).



Fig. 10: Procedimiento MSPE

MSPE ha sido aplicada en diversas áreas de entre las que destacan el análisis de alimentos [42], matrices biológicas [43] y muestras ambientales [44,45], debido a sus múltiples ventajas, tales como:

-Bajos tiempos y costes de operación, frente a la tradicional SPE.

-Selectividad frente a determinados compuestos o grupos de compuestos, gracias a la posibilidad de funcionalización de las MNPs.

-Se suprime la etapa de centrifugación o filtración para la recogida del material extractante, considerando su carácter magnético.

-Altos factores de enriquecimiento, ya que MSPE puede aplicarse con volúmenes grandes de muestra, y minimizarse el volumen de disolvente desorbente, que a su vez puede ser evaporado, mejorando aún más la preconcentración.

3.2.2. Síntesis y aplicaciones de las MNPs

En los últimos años, las MNPs han sido aplicadas en diferentes campos, desde la medicina, biotecnología, ciencias ambientales, hasta en ciencias de los materiales [46]. Si bien, en el área de la Química Analítica, su principal aplicación se centra en la etapa de preparación de la muestra. Aunque resulta muy común la síntesis de MNPs en el laboratorio, existen ya disponibles comercialmente de diferentes materiales. Las MNPs se componen de un núcleo magnético y un recubrimiento que se deposita durante otras síntesis, aportando diferentes características fisicoquímicas.

 \checkmark El *núcleo* está formado por un metal magnetizable, como metales puros (Fe, Co, Ni, Ag, Au, ...), óxidos metálicos (Fe₃O₄ y γ -Fe₂O₃), ferritas (MeFe₂O₄, Me=Co, Cu, Zn, Mg Mn, Ni) y aleaciones metálicas (FePt, CoPt) [47]. La magnetita (Fe₃O₄) es uno de los núcleos más usados, su síntesis se lleva a cabo por coprecipitación de sales de hierro que se oxidan en medio básico. Los núcleos así formados muestran cierta inestabilidad, tienden a formar agregados, son fácilmente oxidables y presentan tamaños no homogéneos. Para evitar estos inconvenientes, se recomienda su funcionalización o su síntesis en presencia de otro elemento metálico, como el cobalto, dando lugar las ferritas. Las ferritas son compuestos químicos de fórmula Me_xFe₂O₄, donde el metal (Me) puede ser Mn, Mg, Zn, Cu, Ni o Co. En el Capítulo VI de esta Tesis Doctoral, el núcleo empleado ha sido de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄), aplicando el procedimiento de síntesis propuesto por Maaz y colaboradores [48], basado en coprecipitación química por la mezcla de disoluciones acuosas de acuosas de FeCl₃ y CoCl₂ en medio alcalino. Este núcleo magnético resulta una interesante alternativa a la magnetita por ser más estable a la oxidación, presentar mayor dureza y la posibilidad de controlar el tamaño de partícula, aunque su funcionalización con objeto de mejorar la extracción de los compuestos de interés es generalmente recomendada.

El recubrimiento del núcleo magnético es crucial con objeto de mejorar su estabilidad química. Generalmente se lleva a cabo rodeando al núcleo de una capa protectora, pero otra alternativa consiste en dispersar los núcleos en una matriz densa dando lugar a los llamados "composites" o "MNPs de matriz dispersa". Se puede llevar a cabo usando diferentes materiales, aportándole otras funcionalidades que incrementan la selectividad de la extracción. El recubrimiento puede aportar así diferentes grupos funcionales, tales como amino, ácido carboxílico, aldehído, tiol, epoxi, hidroxil, proteínas A y G, albúmina, biotina y anticuerpos. De este modo, los analitos se

fijan sobre las MNPs a través de diversos mecanismos (Figura 11): biocompatibilidad, reconocimiento de forma, señalización fluorescente, detección de antígenos o fisisorción.



Fig. 11: Mecanismos de adsorción de las MNPs [46]

Las estrategias de funcionalización más empleadas llevan a la formación de recubrimientos [47] (Figura 12):

✓ De carácter inorgánico, como el formado por sílice (MNP@SiO₂), que incrementa el área superficial del núcleo debido a su carácter mesoporoso y puede servir de soporte a otros agentes adicionales que producirían interacciones indeseadas si se uniesen directamente al núcleo. Otros recubrimientos inorgánicos de interés son alúmina, óxido de titanio o hidróxidos de doble capa.

✓ De entre los materiales de carácter orgánico [49] destacan los surfactantes, las estructuras metal-orgánicos (MOFs) [50], MIPs y polímeros conductores. La mayoría de los polímeros se unen químicamente a las MNPs, creando principalmente fuerzas estéricas de repulsión evitando su aglomeración al contrarrestar las fuerzas magnéticas y de Van der Waals.

✓ Mención aparte merecen los materiales basados en carbono, que han despertado gran interés por su alta estabilidad química y térmica, su elevada área superficial, porosidad y biocompatibilidad. Estos materiales presentan una gran capacidad de extracción de compuestos orgánicos en un amplio rango de pH y además poseen abundantes sitios de fácil modificación para ser funcionalizados. El

carbono existe en distintas formas alotrópicas como grafito, fullerenos, nanotubos de carbono (CNTs), CNTs de pared sencilla (SWCNTs) y multipared (MWCNTs), nanofibras de carbono, grafeno y óxido de grafeno (GO), entre otras [51].



Fig. 12: Recubrimientos de MNPs más empleados

3.2.3. Parámetros que afectan a la eficiencia de MSPE

La optimización de un procedimiento MSPE requiere el estudio de la influencia de diferentes variables sobre la eficiencia de extracción. Los parámetros a optimizar para la etapa de adsorción son [52]:

✓ Naturaleza del material adsorbente. Su selección resulta decisiva en el éxito de la extracción de los compuestos de interés. Se seleccionarán aquellos adsorbentes que presenten afinidad hacia los analitos, siendo las principales interacciones que la determinan fuerzas iónicas, de Van der Waals, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y puentes de hidrógeno.

✓ Masa de MNPs. Generalmente se usan masas comprendidas entre 5 y 250 mg, cumpliéndose siempre que, a mayor área superficial de las MNPs, menor será la masa requerida para alcanzar el equilibrio.

✓ Volumen de disolución de muestra. Este factor se halla directamente relacionado con la masa de MNPs y los valores generalmente usados oscilan entre 2 y 250 mL.

✓ Tiempo de extracción. Siendo MSPE una técnica basada en el equilibrio, existe una relación directa entre la masa de analito adsorbido y el tiempo de contacto entre la disolución de muestra y el adsorbente. Generalmente, el porcentaje de extracción aumenta con el tiempo hasta alcanzar el equilibrio. De nuevo, a mayor área superficial de las MNPs, menor será el tiempo requerido para la extracción. Así, la aplicación de agitación acorta la duración de esta etapa al evitar que las MNPs se depositen.

✓ pH de la fase dadora, que puede ser determinante en la extracción de analitos cuya estructura química se modifique con los cambios de pH.

✓ Efecto salino en la disolución de muestra: la adición de sal a la fase dadora puede afectar positiva o negativamente al porcentaje de extracción. En algunas aplicaciones se ha observado que al aumentar la viscosidad del medio con la presencia de sal se reduce la eficiencia de extracción. Sin embargo, en otros casos disminuye la solubilidad de analitos polares favoreciendo su extracción.

Los parámetros de la etapa de desorción que determinan la eficiencia de la técnica son:

✓ Naturaleza del disolvente desorbente. Debe seleccionarse aquel disolvente que consiga la desorción cuantitativa de los analitos. Los más utilizados son acetonitrilo, metanol y acetona, aunque para la desorción de compuestos con carácter ácido se han usado disolventes orgánicos en medio alcalino.

✓ Volumen de desorbente, que viene determinado por la masa de MNPs. Generalmente se requieren volúmenes relativamente grandes de disolvente de desorción para alcanzar la desorción cuantitativa de los compuestos de interés, por lo que es muy común aplicar una etapa de secado y su posterior reconstitución en un volumen menor, y si fuera necesario usando otro disolvente compatible con el sistema de medida.

✓ Tiempo de desorción. Se trata de un factor determinante de la reproducibilidad del método. Normalmente se selecciona el menor tiempo que permite alcanzar la eficiencia de desorción máxima. La aplicación de energía externa como agitación vórtex o ultrasonidos puede acelerar el proceso.

✓ El pH del medio de desorción puede afectar para analitos cuya estructura química varíe con dicho parámetro. El uso de medios fuertemente ácidos o alcalinos

puede degradar las MNPs dando lugar a turbidez en el extracto final que requerirá filtración, por lo que la modificación del pH solo se aplica cuando es estrictamente necesario.

Los cuatro parámetros que se ven influenciados entre sí son la masa de MNPs, el tiempo de adsorción y el volumen de muestra y de desorbente. Normalmente, a mayor volumen de fase dadora, con mayor cantidad de material adsorbente y tiempos de extracción más largos, se alcanzan buenos porcentajes de extracción. De igual modo, si la masa de MNPs necesaria es grande, el volumen de desorbente también deberá serlo para conseguir la desorción completa de los analitos.

4. Miniaturización y LC-MS

La identificación y cuantificación de los componentes que se hallan a nivel de trazas en muestras de matriz compleja ha hecho que el acoplamiento de las técnicas cromatográficas con MS como detector, se haya convertido en la técnica más usada, al combinar la gran capacidad de separación del sistema cromatográfico con la sensibilidad y la capacidad del sistema de detección para aportar información estructural. Si además se combina el uso de técnicas miniaturizadas con equipos de cromatografía y MS resulta una herramienta poderosa, generando aplicaciones muy interesantes en diferentes campos como el clínico, alimentario, cosmético, forense, etc.

El análisis de extractos de muestra obtenidos a través de procedimientos miniaturizados mediante LC puede requerir una etapa intermedia si no se cumple la condición de compatibilidad. Para LC en modo de fase reversa, los disolventes en los que se extraen los analitos deben ser compatibles con la fase móvil. Cuando se utilizan disolventes de baja polaridad como los organoclorados, el extracto enriquecido con los analitos debe ser evaporado para su posterior reconstitución en un disolvente compatible con la fase móvil o en esta misma. Cuando se usan ILs o disolventes menos densos que el agua tales como 1-octanol, el extracto final es simplemente diluido con un disolvente compatible con la fase móvil antes de su análisis. La termostatización de la columna cromatográfica suele recomendarse para disminuir la viscosidad del extracto inyectado, eluyendo así más fácilmente.

El acoplamiento LC-MS resulta complejo ya que LC trabaja en fase condensada y MS opera bajo vacío. Se requiere, por tanto, de una interfase que vaporice la fase móvil y, además, ionice los analitos. El uso de fuentes de ionización a presión atmosférica (API) ha convertido a LC-MS en un método de gran aplicabilidad por su especificidad, sensibilidad y eficiencia [53]. Las técnicas API más usadas para LC son:

✓ Ionización por electrospray (ESI): el flujo de fase móvil se hace pasar por un capilar de transferencia donde confluye con un gas (normalmente nitrógeno) a alta velocidad para generar un aerosol, al tiempo que aplica un potencial de 3-4 kV. El voltaje genera un cono de Taylor que, junto al flujo de gas, se rompe generando un aerosol de gotas muy finas de disolvente de fase móvil conteniendo las moléculas de los analitos. Como consecuencia del voltaje aplicado, estas gotas se encuentran cargadas en su superficie. El disolvente se va evaporando, produciendo inestabilidad electrostática que rompe las gotas en otras de menor dimensión, lo que se conoce como explosión de Coulomb. Por último, el potencial genera una atracción electrostática produciendo la ionización del analito. Los iones son dirigidos por el gas hasta el analizador de masas, en el camino van sufriendo pequeñas fragmentaciones por colisión, lo que hace que este tipo de ionización sea apta tanto para biomoléculas grandes como para moléculas frágiles térmicamente. Además, permite generar iones multicargados a partir de grandes moléculas, como péptidos o proteínas [41]. La Figura 13 representa un esquema de la cámara de la fuente ESI donde se produce la ionización y la Figura 14 muestra los procesos a los que se somete el analito y la fase móvil en ESI.



Fig. 13: Cámara de ionización ESI [54]



Fig. 14: Proceso que sufre el flujo de fase móvil conteniendo los analitos en ESI [54]

✓ *Ionización química a presión atmosférica (APCI):* en este caso, la fase móvil conteniendo los analitos también se transforma en aerosol, pero el secado se produce en un bloque calentado. A continuación, es transportada por un gas inerte (hasta un plasma generado por una corona de descarga. Los iones formados por el gas y los

vapores de fase móvil generan la ionización de los analitos, como se muestra en las Figuras 15 y 16.



Fig. 15: Cámara de ionización por APCI [54]



Fig. 16: Proceso que sufre el analito en APCI [54]

La elección de un tipo de fuente de ionización u otro depende de la naturaleza de los analitos bajo estudio. Estas dos fuentes presentan diferentes ventajas e inconvenientes. Ambas proporcionan espectros de masas de iones positivos y negativos y son fuentes suaves que generan pocos fragmentos y, por tanto, proporcionan poca información estructural. ESI produce iones multicarga, funciona bien tanto con ácidos como con bases, compuestos polares o heteroátomos. Al no utilizar temperaturas demasiado elevadas, es posible el análisis de moléculas lábiles. Sin embargo, se pueden formar aductos con los tampones de la fase móvil, dependiendo la velocidad del flujo y pH de la fase móvil.

En cambio, la fuente APCI no depende de la fase móvil. La reacción ion-molécula se da a presión atmosférica y es posible el análisis de moléculas de bajo peso molecular no volátiles, ya que ioniza más moléculas que ESI. Por otro lado, al trabajar en fase gaseosa y a altas temperaturas, las moléculas lábiles pueden descomponerse.

5. Miniaturización y GC-MS

Cuando el análisis de extractos de muestra obtenidos a través de procedimientos miniaturizados se realiza mediante GC, el disolvente del extracto debe ser volátil. Su volatilización se lleva a cabo en el portal de inyección del sistema GC, que es calentado a una temperatura, condicionada por la temperatura de volatilización del disolvente, para permitir su entrada al sistema. Usando una microjeringa se inyecta la muestra a través de un septum en el interior de un *liner* de vidrio albergado en la cámara de vaporización. El *liner* se calienta a una temperatura superior a la de ebullición de los compuestos de interés, lo que garantiza su vaporización previa a la entrada en la columna cromatográfica, que podrá llevarse a cabo de dos modos diferentes si se emplea un inyector *split/splitless* (Figura 17):

✓ En modo *split* se ajusta el parámetro denominado "*split ratio*" para que sólo pase a la columna una parte del volumen inyectado. Se suele emplear con muestras o extractos muy concentrados o provenientes de matrices complejas.

 ✓ En modo *splitless* entra el volumen completo vaporizado, aportando mayor sensibilidad al método. ✓ En ambos modos de inyección es posible aplicar un pulso de presión (pulsed *split/splitless*), aumentando el flujo del gas portador y, por tanto, incrementando la presión en los primeros minutos de la separación para que todo el volumen vaporizado se transfiera a la columna.



Fig. 17: Inyector split/splitless

Por otra parte, el inyector de desorción térmica (TD) es un sistema de introducción de la muestra para GC que asegura la transferencia de la muestra desde extractos preconcentrados en fases sólidas o incluso en fases líquidas incompatibles con GC, tales como los ILs. Se compone de dos unidades que, aunque pueden ser independientes, se unen para asegurar la correcta transferencia de los analitos hasta la columna de cromatografía, limitando a su vez posibles contaminaciones externas. Los componentes del sistema de desorción térmica son:

✓ Unidad de desorción térmica (TDU) (Figura 18). La muestra se sitúa en un tubo de transporte que a su vez actúa como *liner*. Una vez colocado en la TDU, el tubo se bloquea herméticamente, se presuriza el sistema por entrada de helio y se calienta de forma homogénea, precisa y rápida, a través de un sistema termoeléctrico, asegurando

la transferencia de todos los compuestos de interés a fase gas y al siguiente componente del inyector.



Fig. 18: Unidad de desorción térmica (TDU)

✓ Sistema de inyección en frío (CIS), también llamado inyector de temperatura programada (PTV) (Figura 19). Este componente también cuenta con un *liner*, de diámetro inferior al de la TDU y que puede estar relleno de distintos materiales para favorecer el atrapamiento de los compuestos procedentes de la TDU. El CIS dispone de un sistema de enfriamiento/calentamiento. Para alcanzar temperaturas inferiores a la ambiental, se usa una unidad Peltier con enfriamiento líquido o refrigeración criostática con N₂ líquido. La transferencia de muestra a la columna se consigue calentando el CIS para volver a volatilizar los compuestos de interés, siendo arrastrados por el gas portador al interior del GC. El CIS debe contar con una válvula tipo *split/splitless* para controlar las diferencias entre el flujo de gas que proviene de la TDU y el que finalmente llega a la columna.



Fig. 19: Sistema de inyección en frío (CIS)

El uso de sistemas de TD para GC en condiciones óptimas requiere el estudio de diferentes variables que condicionan la sensibilidad del método. En los dos componentes hay que elegir el flujo óptimo de gas, su presión y el modo de desorción. Cuando se aplica desorción en microvial en la TDU se optimizará la temperatura inicial a la que se somete el microvial y el programa de calentamiento completo para la liberación de los analitos hacia el CIS. En el caso del CIS, se seleccionará una temperatura de enfriamiento para la retención de los componentes de interés y una velocidad de calentamiento hasta la temperatura final para la entrada a la columna. Además, se optimiza el relleno del *liner* para asegurar que los analitos se retienen en el CIS mientras son liberados desde la TDU.

En el apartado anterior se comentaron las dificultades asociadas a la combinación LC-MS, no ocurre así con el acoplamiento GC-MS que resulta más sencillo, ya que las características que han de cumplir los compuestos para ser separados mediante GC, alta volatilidad y estabilidad térmica, son las mismas requeridas para producir un espectro de masas mediante las fuentes de ionización usadas con este acoplamiento. El único problema que plantea la combinación GC-MS es que la separación se produce a una presión ligeramente superior a la atmosférica, mientras que el detector trabaja a alto vacío. El uso de helio o hidrógeno como fase móvil a caudales bajos y bombas de vacío de elevado caudal para mantener el nivel de vacío requerido en el espectrómetro, soluciona el problema.

Existen dos métodos para producir la ionización de la muestra directamente desde el estado gaseoso: la ionización por impacto electrónico (EI) y la ionización química (CI).

En El las moléculas de la muestra se ionizan por acción de un haz de electrones de alta energía, emitidos por un filamento incandescente y que son acelerados por medio de una diferencia de potencial variable (5-10 eV) entre el filamento y la fuente de iones. Se utiliza un campo magnético dispuesto paralelamente a la dirección de los electrones para enfocarlos hacia una determinada trayectoria, de modo que describen una trayectoria helicoidal hasta su llegada al ánodo. La Figura 20 muestra una fuente de ionización El.



Fig. 20: Fuente de ionización por impacto electrónico [55]

En el contacto de los electrones acelerados con las moléculas de la muestra (ABC), éstas pueden sufrir diferentes procesos:

Pérdida de un electrón:	ABC + e	\rightarrow	ABC+ + 2 e ⁻
Pérdida de dos electrones:	ABC + e ⁻	\rightarrow	ABC ²⁺ + 3 e ⁻
Captura de un electrón:	ABC + e ⁻	\rightarrow	ABC⁻
Disociación:	ABC + e	\rightarrow	AB+ + C- + e

La pérdida de un electrón es el proceso más probable, entre 1000 y 10000 veces más probable que el resto, de forma que el ion molecular será principalmente ABC⁺. Una vez ionizada o fragmentada la muestra, la aplicación de un potencial eléctrico elevado (1-10 kV) consigue la expulsión de los iones desde la fuente hasta el analizador. Al trabajar a alto vacío, no se producen reacciones bimoleculares por lo que el ion de mayor masa posible será el ion molecular que corresponderá con el peso molecular de la sustancia.

En CI se utiliza un ion como agente ionizante, que transfiere su carga a la molécula de muestra a través de una reacción bimolecular. Se introduce metano a 1

mm de Hg en la fuente de iones y los electrones ionizan fundamentalmente las moléculas de metano produciendo ion metonio que, a su vez, reaccionará con las moléculas de la muestra:

$$CH_4^+ + CH_4 \rightarrow CH_5^+ + CH_3$$

 $CH_5^+ + ABC \rightarrow CH_4 + ABCH^+$

El ion generado presenta una unidad de masa más que el ion molecular, denominado ion cuasimolecular y no tiene apenas tendencia a descomponerse, por lo que es el ion mayoritario.

6. Analizadores en MS

La elección del tipo de analizador en el sistema MS dependerá tanto del objetivo final del análisis como de los compuestos de interés. Así, podemos encontrar una amplia gama de analizadores de masas hacia los que se dirigen los iones generados en la fuente de ionización, y donde serán separados según su relación *m/z* cuadrupolo simple o triple, trampa de iones, de tiempo de vuelo, de sectores magnéticos, basados en transformada de Fourier, tipo Orbitrap e incluso la combinación de dos de ellos en tándem (MS²). A continuación, se explican los de uso más extendido [1,56].

6.1. Cuadrupolo simple (Q)

Este analizador [1,56] está compuesto por cuatro barras metálicas de sección circular colocadas en posiciones paralelas formando una circunferencia, de modo que el haz de iones procedente de la fuente incida en el centro de esta configuración. Cada barra se conecta eléctricamente a su opuesta y entre los dos pares se aplica un voltaje de radiofrecuencia (RF) al que se le impone otro de corriente continua (DC). Los iones se transfieren por el cuadrupolo pero para una relación específica de los voltajes aplicados, solo los iones de un valor m/z determinado consiguen llegar al detector. El resto de iones seguirán trayectorias inestables, colisionando con las barras, por lo que, variando dichos voltajes se permite la selección de un ion específico o de un pequeño rango de m/z (Figura 21). Para mejorar la sensibilidad de este analizador se puede seleccionar el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM), que aplica voltajes constantes durante un tiempo determinado que van siendo modificados secuencialmente para monitorizar diferentes iones. Así, en el acoplamiento GC-MS se

pueden seleccionar los voltajes a lo largo de la separación según el analito que se espera que eluya de la columna. ESI ha sido uno de los analizadores más usados en el acoplamiento con GC por su bajo precio, robustez y sensibilidad en modo SIM. Sin embargo, debido a la ausencia de iones fragmentados no resulta muy efectivo para objetivos de confirmación.



Fig. 21: Espectrómetro de masas de tipo cuadrupolar [56]

6.2. Triple cuadrupolo (QqQ)

El analizador QqQ es probablemente el más ampliamente usado en los últimos años tanto para LC como para GC. Se compone de tres cuadrupolos dispuestos linealmente (Figura 22). En el primer Q tiene lugar la selección de los iones precursores por aplicación de dos voltajes. En el segundo Q, también llamado celda de colisión, se produce la fragmentación de los iones transmitidos por el primer Q, por colisión del ion seleccionado con un gas inerte, siendo focalizados con ayuda del gas de colisión hacia el tercer Q, donde tiene lugar la selección de los iones producto. Todo el sistema se encuentra sometido a alto vacío, evitando así fragmentaciones indeseadas.

A. Oller Ruiz



Fig. 22: Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

La detección se lleva a cabo midiendo los iones producto generados a partir de cada ion precursor, trabajando en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). La doble filtración de iones permite catalogar el analizador QqQ como un sistema MS en tándem (MS²), que aporta gran sensibilidad y selectividad por eliminación de iones interferentes, disminuyendo así la relación señal/ruido del equipo.

Sin embargo, con este analizador se requiere para cada analito la optimización de múltiples parámetros específicos y el ajuste periódico de las ventanas de tiempo. Además, se debe disponer de los patrones de cada compuesto a analizar.

6.3. Trampa de iones (IT)

La IT se caracteriza porque tanto la ionización como la separación y la detección de los iones tiene lugar en el mismo espacio físico. La trampa está formada por tres electrodos hiperbólicos: uno anular y dos por encima y por debajo de este (de entrada y de salida), como se muestra en la Figura 23. Este analizador puede combinarse directamente con GC, pues los compuestos son eluidos en estado gas. Los iones formados se retienen o expulsan de la trampa al detector según su relación *m/z* para unos voltajes RF y DC dados, al igual que ocurre en el anterior analizador descrito. La IT proporciona espectros de MS ricos en iones y con mucha información en modo de barrido para un rango *m/z* determinado, a diferencia del cuadrupolo, y la sensibilidad es muy elevada. Además, se pueden obtener espectros de iones producto, que resultan muy útiles para elucidación estructural [1,56].



Fig. 23: Analizador de masas tipo trampa de iones

6.4. Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador TOF (Figura 24) consta de un acelerador de iones, un tubo en forma de chimenea por el que ascienden los iones acelerados y un detector.



Fig. 24: Analizador de masas TOF

El potencial de aceleración aplicado a todos los iones es el mismo, por lo que el tiempo que tardan (tiempo de vuelo) en recorrer el tubo, es proporcional a su relación

m/z. Así, se puede conocer la masa de un compuesto sin identificar, sin necesidad del uso de patrones. Su resolución puede verse influenciada por la diferencia de tiempo que sufren los iones a la salida de la fuente y para evitarlo se pueden añadir reflectores para reenfocar los iones de la misma masa, o aumentar la altura de la chimenea y, por tanto, el recorrido que sufren los iones [1,56].

Referencias

[1] G.D. Christian, P.K. Dasgupta, K.A. Schug, Analytical Chemistry, Wiley, 7^a edición, EEUU, 2013.

[2] A. Kloskowski, Ł. Marcinkowski, J. Namieśnik, Green aspects of miniaturized sample preparation techniques. In Miniaturization Sample Preparation, Cap. 8 (416–446), 2014.

[3] 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.

[4] J. Namieśnik, Trends in environmental analytics and monitoring, Crit. Rev. Anal. Chem. 30 (2000) 221–269.

[5] P.T. Anastas, J. Warner, Green Chemistry: Theory and practice, Oxford University Press, EEUU, 1998.

[6] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices, TrAC -Trends Anal. Chem. 50 (2013) 78–84.

[7] S. Armenta, S. Garrigues, F.A. Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, Green extraction techniques in green analytical chemistry, TrAC - Trends Anal. Chem. 116 (2019) 248–253.

[8] National Environmental Methods Index (NEMI), https://www.nemi.gov/home/ (último acceso, 24 enero 2020).

[9] D. Raynie, J.L. Driver, Green assessment of chemical methods suitability of analytical method. In: 13th Green Chemistry and Engineering Conference, Washington, DC, 2009.

[10] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, TrAC - Trends Anal. Chem. 37 (2012) 61–72.

[11] S. Garrigues, S. Armenta, M. de la Guardia, Challenges in Green Analytical Chemistry, Encycl. Inorg. Bioinorg. Chem. (2016) 1–9.

[12] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green Analytical Chemistry, TrAC - Trends Anal. Chem. 27 (2008) 497–511.

[13] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, C. Pohl, Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, Anal. Chem. 68 (1996) 1033–1039.

[14] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, Anal. Chem. 68 (1996) 2236–2240.

[15] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, Anal. Chem. 68 (1996) 1817–1821.

[16] 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.

[17] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous backextraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction, Anal. Chem. 70 (1998) 3912–3919.

[18] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous backextraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop, Anal. Chem. 71 (1999) 388–393.

[19] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquidmicroextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, Anal. Chem. 71 (1999) 2650–2656.

[20] 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.

A. Oller Ruiz

[21] M. Asensio-Ramos, L.M. Ravelo-Pérez, M.Á. González-Curbelo, J. Hernández-Borges, Liquid phase microextraction applications in food analysis, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7415–7437.

[22] 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.

[23] H. Watanabe, H. Tanaka, A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid-liquid extraction of zinc(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, Talanta 25 (1978) 585–589.

[24] N. Campillo, P. Viñas, J. Šandrejová, V. Andruch, Ten years of dispersive liquid–liquid microextraction and derived techniques, Appl. Spectrosc. Rev. 52 (2017) 267–415.

[25] M.R. Khalili Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.Å. Jönsson, A new liquidphase microextraction method based on solidification of floating organic drop, Anal. Chim. Acta 585 (2007) 286–293.

[26] S. Jafarvand, F. Shemirani, Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: Determination of cadmium in water and vegetable samples, Anal. Methods 3 (2011) 1552–1559.

[27] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 885–891.

[28] C. Yao, J.L. Anderson, Dispersive liquid-liquid microextraction using an *in situ* metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1491–1502.

[29] M. Baghdadi, F. Shemirani, *In situ* solvent formation microextraction based on ionic liquids: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions, Anal. Chim. Acta 634 (2009) 186–191.

[30] J. Šandrejová, N. Campillo, P. Viñas, V. Andruch, Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction, Microchem. J. 127 (2016) 184–186.

[31] P. Biparva, M. Ehsani, M.R. Hadjmohammadi, Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples, J. Food Compos. Anal. 27 (2012) 87–94.

[32] E. Yiantzi, E. Psillakis, K. Tyrovola, N. Kalogerakis, Vortex-assisted liquidliquid microextraction of octylphenol, nonylphenol and bisphenol-A, Talanta 80 (2010) 2057–2062.

[33] Q. Zhong, P. Su, Y. Zhang, R. Wang, Y. Yang, *In situ* ionic liquid-based microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of triazine herbicides, Microchim. Acta. 178 (2012) 341–347.

[34] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, J. Chromatogr. A 1190 (2008) 27–38.

[35] C.F. Poole, Solid-phase extraction in bioanalytical applications. In: Handbooks in separation science, Cap. 25 (673-698), Elsevier, Netherlands, 2020.

[36] B. Buszewski, M. Szultka, Past, present, and future of solid phase extraction: a review, Crit. Rev. Anal. Chem. 42 (2012) 198–213.

[37] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, Anal. Chem. 62 (1990) 2145–2148.

[38] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, TrAC - Trends Anal. Chem. 71 (2015) 2–8.

[39] P.J. Robinson, P. Dunnill, M.D. Lilly, The properties of magnetic supports in relation to inmobilized enzyme reactors, Biotechnol. Bioeng. 15 (1973) 603–606.

[40] M. Šafaříková, I. Šafařík, Magnetic solid-phase extraction, J. Magn. Magn. Mater. 194 (1999) 108–112.

[41] L. Xie, R. Jiang, F. Zhu, H. Liu, G. Ouyang, Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 377–399.

[42] I.S. Ibarra, J.A. Rodriguez, C.A. Galán-Vidal, A. Cepeda, J.M. Miranda, Magnetic solid phase extraction applied to food analysis, J. Chem. 2015 (2015) 1–13.

[43] I. Vasconcelos, C. Fernandes, Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices, TrAC - Trends Anal. Chem. 89 (2017) 41–52.

[44] W.A. Wan Ibrahim, H.R. Nodeh, H.Y. Aboul-Enein, M.M. Sanagi, Magnetic solid-phase extraction based on modified ferum oxides for enrichment, preconcentration, and isolation of pesticides and selected pollutants, Crit. Rev. Anal. Chem. 45 (2015) 270–287.

[45] A. Speltini, M. Sturini, F. Maraschi, A. Profumo, Recent trends in the application of the newest carbonaceous materials for magnetic solid-phase extraction of environmental pollutants, Trends Environ. Anal. Chem. 10 (2016) 11–23.

[46] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodriguez, E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: a review, Anal. Chim. Acta 674 (2010) 157–165.

 [47] M. Hemmati, M. Rajabi, A. Asghari, Magnetic nanoparticle based solidphase extraction of heavy metal ions: a review on recent advances, Microchim. Acta 185
(3) (2018) 1-32.

[48] 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. Mater. 308 (2007) 289–295.

[49] D. Huang, C. Deng, X. Zhang, Functionalized magnetic nanomaterials as solid-phase extraction adsorbents for organic pollutants in environmental analysis, Anal. Methods 6 (2014) 7130–7141.

[50] F. Maya, C. Palomino Cabello, R.M. Frizzarin, J.M. Estela, G. Turnes Palomino, V. Cerdà, Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons, TrAC - Trends Anal. Chem. 90 (2017) 142–152.

[51] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis, TrAC - Trends Anal. Chem. 59 (2014) 26–41.

[52] X. Yu, Y. Sun, C. Jiang, X. Sun, Y. Gao, Y. Wang, H. Zhang, D. Song, Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis, Talanta 98 (2012) 257–264.

[53] C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography-mass spectrometry. In: Food toxicants analysis: techniques, strategies and developments, Cap. 14 (509-560), Elsevier, Netherlands, 2007.

[54] Á. Ríos Castro, M.C. Cruz Moreno Bondi, B. Simonet Suau, Técnicas espectroscópicas en química analítica. Volumen II: Espectometría atómica, de iones y electrones, Síntesis, Madrid, 2014.

[55] Museo Nacional de Ciencias Naturales, espectrometría de masas. https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrom etria_de_masas.pdf (último acceso, 22 enero 2020).

[56] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principios de análisis intrumental, 6th ed., Cengage Learning, Mexico, 2008.

CAPÍTULO I
Espectrometría de masas con triple cuadrupolo acoplada a cromatografía líquida y microextracción dispersiva líquido-líquido para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas



Resumen

Se ha llevado a cabo la preconcentración y determinación de cinco monoterpenos (linalool, geraniol, eugenol, carvacrol y timol) en bebidas alcohólicas sin necesidad de tratamiento previo de la muestra, usando microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME). Para ello, se inyectan 300 µL de CHCl₃ en 8 mL de bebida, no siendo necesaria la adición de disolvente dispersante, puesto que el propio etanol contenido en la bebida alcohólica actuó como tal. La fase orgánica enriquecida se evaporó y el residuo se reconstituyó en 50 µL de agua. Este extracto se analizó mediante cromatografía líquida en fase reversa, utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo (conteniendo 0,1% de ácido fórmico) y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,1% en proporción 25:75, acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Se evaluó el efecto matriz, proponiendo la cuantificación de las muestras mediante el método de adiciones estándar. Los límites de detección estuvieron en el intervalo de 0,003 a 1,5 ng mL-1, dependiendo del compuesto y la muestra. Se encontraron factores de enriquecimiento entre 12 y 88. El método se validó mediante estudios de recuperación, obteniendo valores en el intervalo 76-128%. La precisión, en términos de la desviación estándar relativa, fue inferior al 20%. Se analizaron ocho muestras, detectándose los monoterpenos estudiados a concentraciones entre 0,4 y 627 ng mL⁻¹.

1. Introducción

Los monoterpenos son compuestos altamente volátiles derivados del isopreno, que se pueden encontrar a elevadas concentraciones en aceites esenciales de diferentes tipos de plantas, tales como lavanda, citronela, rosa, menta, tomillo, orégano, canela, clavo y nuez moscada. Gracias a su carácter antimicrobiano, antifúngico, antinflamatorio, antibacteriano y anticancerígeno [1], los monoterpenos resultan muy beneficiosos para la salud. Debido a sus características fisicoquímicas y volatilidad, son frecuentemente usados en las industrias cosmética y alimentaria como componentes aromáticos. Aunque no se han descrito efectos tóxicos, excepto cuando se hallan a concentraciones extremadamente elevadas, su determinación resulta de gran importancia para evaluar las características organolépticas y de calidad en alimentos y bebidas. En este estudio, se analizaron diferentes tipos de bebidas alcohólicas, que son matrices complejas ya que, además de terpenos, contienen alcoholes, cetonas, ésteres, sulfuros, compuestos nitrogenados, etc. Para ello, se requieren procedimientos sensibles y específicos, puesto que los terpenos están presentes a bajas concentraciones comparadas con otros compuestos.

Los monoterpenos son frecuentemente determinados mediante cromatografía de gases (GC) debido a su volatilidad [2–9]. Por otra parte, se han desarrollado para algunos de los analitos aquí estudiados, otros procedimientos basados en cromatografía líquida (LC) usando detección con diodos (DAD) [1,10–17], espectrometría de masas (MS) [15,18–25], fluorescencia [16,20,26] o detección electroquímica [27].

Los métodos convencionales de preparación de muestra basados en extracción en fase sólida (SPE) [5,10,14,20] para la determinación de terpenos consumen mucho tiempo y grandes cantidades de disolventes. Las ventajas de las técnicas miniaturizadas sobre las convencionales incluyen alta eficiencia de extracción y sensibilidad, tiempos de análisis más cortos, menor consumo de disolventes, costes más bajos, y, sobre todo, son respetuosos con el medio ambiente. Para estos analitos se han propuesto varias técnicas miniaturizadas, como son microextracción en fase sólida (SPME) [6–8], extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) [2], extracción por adsorción en espacio de cabeza (HSSE) [3] y microextracción en gota única (SDME) [13]. La técnica de preconcentración en fase líquida, microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) se ha aplicado para la determinación de monoterpenos en muestras alimentarias [28] y aceites esenciales [4,9]; sin embargo, no se ha encontrado ninguna aplicación para la determinación de estas especies en bebidas alcohólicas. La aplicación de DLLME en este tipo de muestras, hace innecesario el uso de disolvente dispersante, pues su propio contenido en etanol ya actúa dispersando el disolvente extractante.

En este estudio, se ha utilizado espectrometría de masas en tándem (MS²) con triple cuadrupolo (QqQ) en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) acoplada a LC y DLLME como técnica de preparación de muestra para la determinación de cinco monoterpenos en diferentes tipos de bebidas alcohólicas. Los analitos fueron linalool, geraniol, eugenol, carvacrol y timol, cuyas estructuras moleculares se muestran en la Figura I.1 El acoplamiento LC-MS² con el analizador QqQ es una poderosa metodología debido a su alta robustez, exactitud, sensibilidad y selectividad, proporcionando una identificación de los compuestos inequívoca. Los resultados se han validado mediante estudios de recuperación.



Fig. I.1: Estructuras moleculares de los monoterpenos estudiados

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Los disolventes acetonitrilo (AcN), metanol y cloroformo fueron de calidad HPLC y obtenidos de Sigma (St. Louis, MO, EEUU). El agua usada fue previamente purificada con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Los estándares analíticos linalool, eugenol, geraniol, timol y carvacrol se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Se prepararon disoluciones individuales de los terpenos (500 µg mL⁻¹) en metanol y se almacenaron en viales ámbar a -20 °C. Diariamente se preparaban 66

DLLME LC-QqQ-MS² para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas

disoluciones diluidas en agua y se almacenaban a 4 °C. El ácido fórmico (FA) al 98% de pureza se adquirió de Fluka (Buchs, Suiza).

2.2. Instrumentación

Se utilizó un sistema Agilent (Waldbronn, Alemania) 1200 HPLC provisto de una bomba binaria (G1312A) operando a temperatura ambiente. La columna cromatográfica empleada para la técnica en fase reversa fue una HS PEG-5 (15 cm × 0,46 cm, 5 µm) (Sigma-Aldrich). La fase móvil consistió en una mezcla de 25% AcN (conteniendo 0,1% FA) y 75% de agua (0,1% FA). La velocidad de flujo fue de 0,5 mL min⁻¹. Se utilizaron viales de 2 mL de capacidad provistos de microinsertos de 250 µL con pie polimérico para la inyección de alícuotas de 20 µL de las muestras mediante un automuestreador.

El espectrómetro de masas usado fue un triple cuadrupolo Agilent G6410A y el desarrollo del método y la adquisición de los datos se llevó a cabo usando el software "Agilent Mass Hunter Data Acquisition", tanto para análisis cualitativo como cuantitativo. La fuente de ionización por electrospray (ESI) operaba en modo positivo, con las siguientes condiciones: voltaje capilar, 4000 V; presión del nebulizador, 40 psi; temperatura del gas de secado (nitrógeno), 350 °C y flujo del gas de secado, 9 L min⁻¹. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de colisión. El espectro de masas se registró en el rango m/z 50-800 amu. Las transiciones MRM se optimizaron mediante infusión directa en la fuente de ionización de disoluciones individuales de los analitos de 10 µg mL⁻¹. Las condiciones seleccionadas para el voltaje del fragmentador y las energías de colisión (CE) se muestran en la Tabla I.1. La transición más sensible se utilizó para la cuantificación, mientras que el tiempo de retención y las tres transiciones MRM implicadas en la formación de los compuestos. Se utilizó ionización en modo positivo de la molécula protonada.

Se usó una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) aplicando la máxima velocidad que permitían los tubos cónicos de vidrio, 3000 rpm. Para evaporar los extractos, se utilizó el evaporador XcelVapTM (Horizon Technology, Salem, EEUU).

Communitation	t (maine)		Peso	Transiciones	Voltaje del	
Compuestos	t_{R} (min)	log K _{ow} u	molecular	MRM (<i>m/z</i>)	fragmentador (V)	CE (V)
Linalool	9,8	2,65	154,25	137 → 81 ^b	80	5
				137 → 95	60	10
				137 → 79	60	20
Geraniol	11,4	2,50	154,25	137 → 81 ^b	80	5
				137 → 95	60	10
				137 → 79	60	20
Eugenol	12,1	2,61	164,20	165 → 124 ^b	90	10
				165 → 109	90	20
				165 → 137	90	5
Carvacrol	22,1	3,43	150,27	151 → 109 ^b	90	5
				151 → 43	90	10
				151 → 91	90	20
Timol	22,9	3,43	150,27	151 → 109 ^b	90	5
				151 → 91	90	20
				151 → 43	90	10
ªCalculado a p⊦	17; ^b Transici	ones usadas	para cuantifica	ción		

Tabla I.1. Parámetros del sistema LC-QqQ-MS² para los monoterpenos estudiados

2.3. Muestras y procedimiento analítico

Se analizaron ocho muestras de bebidas comerciales: dos de whisky (40% alcohol), ron (40%), brandy (40%), licor de avellana (20%), ginebra (40%), vino tinto (13%) y vino mistela (13%). No fue necesario llevar a cabo ningún tratamiento previo a las muestras.

Para la preconcentración mediante DLLME, en un tubo cónico se depositaron 8 mL de bebida y 300 µL de cloroformo y se agitó la mezcla manualmente, obteniéndose una disolución turbia, debido al etanol que contenían las muestras. Esta disolución se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. El disolvente extractante sedimentó en el fondo del tubo, se recogió y se evaporó hasta sequedad en el evaporador con una corriente de argón. Se reconstituyó el residuo con 50 µL de agua y se inyectó un volumen de 20 µL en el sistema LC usando el automuestreador. La calibración con estándares acuosos de los terpenos se llevó a cabo usando una mezcla de 6 mL de agua conteniendo los terpenos y 2 mL de etanol (para simular la composición de las muestras), a la que se añadió el cloroformo.

DLLME LC-QqQ-MS² para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas

Para los estudios de recuperación, se fortificaron tres muestras de ron, brandy y mistela, por duplicado, a tres niveles de concentración (25, 100 y 500 ng mL⁻¹). Las muestras fortificadas se dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente para distribuir los analitos de forma adecuada y permitir que interactuasen con la matriz de la muestra antes del análisis.

3. Resultados y discusión

3.1. Separación cromatográfica y condiciones de detección

Para optimizar la separación en fase reversa (RP) de los monoterpenos, se utilizaron varias columnas con diferentes fases estacionarias, incluyendo XDB-C18, ODS2, polietilenglicol (PEG), así como fases tipo ciano y amino. La fase estacionaria PEG proporcionó la mejor separación cromatográfica entre los picos de los analitos, debido a su elevada polaridad.

Para la optimización de la fase móvil, se seleccionó AcN como disolvente orgánico, por su baja viscosidad, y mezclas con agua y FA en diferentes proporciones. La mejor separación se consiguió trabajando en condiciones isocráticas y usando una fase móvil constituida por una mezcla de 25% AcN (0,1% FA) y 75% agua (0,1% FA), a una velocidad de flujo de 0,5 mL min⁻¹. Usando esta fase móvil, los tiempos de retención estuvieron entre 9,8 y 22,9 minutos (Tabla I.1), sin solapamiento de picos.

El modo de ionización en la fuente de electrospray se optimizó usando un barrido completo (*full-scan*) de cada analito, y todos los terpenos mostraron la máxima sensibilidad en términos de área de pico, operando en el modo de ionización positivo, siendo el ion precursor dominante el ion molecular protonado [M+H]⁺. La Tabla I.1 muestra los parámetros MS elegidos cuando se trabajó en modo MRM monitorizando tres transiciones para cada analito. La Figura I.2 muestra el cromatograma de iones totales (TIC) obtenido a partir de una disolución estándar, así como los de iones extraídos (EIC) para los monoterpenos estudiados. Aunque algunos de los compuestos presentaban el mismo ion precursor y las mismas transiciones, esto no supuso ningún problema para la cuantificación puesto que eluían a tiempos de retención diferentes.



Fig. I.2: Cromatograma de iones totales (TIC) y de iones extraídos de los monoterpenos usando DLLME y LC-QqQ-MS² obtenidos para una disolución estándar de 100 ng mL⁻¹

3.2. Optimización del procedimiento DLLME

El primer parámetro estudiado para la etapa de microextracción fue la naturaleza del disolvente extractante, usando una mezcla de los estándares a la concentración de 100 ng mL⁻¹. Este disolvente debe tener un bajo punto de ebullición, puesto que la fase orgánica sedimentada será evaporada y después reconstituida con un disolvente compatible con RP-LC. Se ensayaron varios disolventes orgánicos menos densos que el agua de forma que, al centrifugar, se separa la fase orgánica quedando la gota sobre la 70

DLLME LC-QqQ-MS² para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas

fase acuosa: octano, isooctano, tolueno, 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2propanol, 2-octanona y 2-undecanona, usando 150 µL del disolvente orgánico, 10 mL de disolución acuosa conteniendo los terpenos y 1 mL de AcN como disolvente dispersante. Con isooctano y 2-propanol no se obtuvo fase orgánica discernible tras el proceso de centrifugación, mientras que tolueno, 2-octanona y 2-undecanona no resultaron eficientes en la extracción de los analitos. Aunque en términos de eficiencia de extracción, 1-dodecanol y 1-undecanol resultaron adecuados, los extractos generados eran turbios y su recolección resultó difícil. Por otra parte, se ensayaron también disolventes orgánicos más densos que el agua, incluyendo tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano y 1,1,2,2tetracloroeteno. Para todos ellos, al depositarse la fase orgánica en el fondo del tubo cónico, la recolección de la gota por medio de una microjeringa resultaba mucho más sencilla que con los anteriores extractantes. Se comparó la eficiencia de extracción de estos disolventes, que resultó más elevada para cloroformo y 1,2-dicloroetano. Sin embargo, este último disolvente tiene una elevada temperatura de vaporización, por lo que su evaporación completa era difícil, siendo cloroformo seleccionado como extractante.

El volumen del disolvente extractante se optimizó usando tanto una disolución estándar acuosa, como una muestra de bebida alcohólica. Cuando se usaron volúmenes menores de 300 µL, las gotas obtenidas eran muy pequeñas para las bebidas con un elevado contenido de etanol. La mayor eficiencia de extracción se consiguió con 300 µL de cloroformo, y disminuyó con volúmenes más elevados debido al efecto de dilución, por tanto, se seleccionó un volumen de 300 µL.

El disolvente dispersante, que debe ser miscible tanto con el disolvente extractante como con la fase acuosa, fue optimizado mediante la inyección rápida de 1 mL de cada disolvente ensayado (acetona, metanol (MeOH), etanol y AcN) conteniendo 300 µL de CHCl₃ en 10 mL de disolución acuosa de los estándares. Las eficiencias de extracción fueron más elevadas para la mayoría de los analitos cuando se usaron acetona y etanol como disolvente dispersante, como muestra la Figura I.3. Por tanto, considerando que las muestras a analizar presentaban un contenido elevado de etanol en su composición, se seleccionó este disolvente como dispersante.

71



Fig. 1.3: Efecto de la naturaleza del disolvente dispersante en la eficiencia de extracción de los monoterpenos mediante DLLME

Se estudió el volumen de etanol entre 1 y 3 mL (correspondiendo a 13-40% de etanol en el volumen final, simulando las muestras analizadas) y no se obtuvieron variaciones de la señal en este intervalo. Consecuentemente, ya que los valores correspondieron a los porcentajes de alcohol en las muestras, la adición de etanol a las bebidas alcohólicas se consideró innecesaria. Sin embargo, para preparar las disoluciones estándar acuosas, se añadieron 2 mL de etanol para simular la composición de las muestras.

El volumen de la muestra se estudió en el intervalo de 5 a 10 mL, usando tres muestras (whisky, ginebra y licor de avellana) fortificadas, a las cuales se añadieron 300 µL de cloroformo. Los resultados medios se muestran en la Figura I.4, donde se observa el aumento de las señales en todos los casos para el volumen de 8 mL de bebida.

Una de las principales ventajas de la DLLME es la rapidez con la que se alcanza el equilibrio tras unos pocos segundos de agitación manual, por lo que el tiempo de extracción no fue estudiado. Finalmente, la mezcla se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm.

72



Fig. I.4: Efecto del volumen de muestra en la eficiencia de extracción de los monoterpenos mediante DLLME

3.3. Validación del método y estudio del efecto matriz

El método se validó utilizando los parámetros de intervalo de linealidad, límites de detección y cuantificación, recuperación y precisión. Las gráficas de calibrado se obtuvieron por regresión lineal de los datos obtenidos mediante DLLME combinada con LC-QqQ-MS², representando área de pico frente a concentración de analito, usando cinco niveles de concentración. La linealidad del método se ensayó hasta 500 ng mL⁻¹ para todos los monoterpenos, obteniéndose un coeficiente de regresión R² mayor que 0,98 en todos los casos.

Para investigar la posible existencia de efecto matriz, se aplicó el método de adiciones estándar a las ocho bebidas alcohólicas. Las pendientes obtenidas fueron comparadas con las encontradas con estándares acuosos usando un *t*-test de medidas repetidas (Tabla I.2), confirmándose la presencia de efecto matriz, puesto que los valores de "p" fueron más bajos que 0,05 en la mayoría de los casos, al 95% de nivel de confianza. Por tanto, se recomienda el método de adiciones estándar para la cuantificación de las muestras.

Tabla I.2. Pendiente	es ^a de las gráficas de cali	brado acuoso y medi	ante adicione	s estándar a	a las muestr	as (mL ng ⁻¹)			
Compuesto	Calibración acuosa	Licor de avellana	Vino tinto	Whisky 1	Whisky 2	Brandy	Mistela	Ron	Ginebra
Linalool	699±97	346±31	437±84	79±3	60±5	520±23	1010±61	278±14	170±70
Geraniol	35274±1227	16779±1360	12214±134	1002±78	3162±334	9246±103	17036±633	10027±424	36046±5214
Eugenol	3917±163	2461 ±96	1709±25	236±15	666±63	1449±46	2585±115	1623±75	2838±68
Carvacrol	6932±196	4306±178	3563±78	246±18	803±51	2394±40	4652±266	2635±148	5576±250
Timol	3712±179	1993±103	1696±28	100±6	311±17	986±5	2056±107	1057±53	2089±117
ªValor medio ± desvia	ción estándar (n = 5)								

A. Oller Ruiz

DLLME LC-QqQ-MS² para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas

La sensibilidad del método se evaluó calculando los límites de detección (LDs) para una relación señal-ruido (S/N) de 3 y los límites de cuantificación (LQs) para una relación S/N de 10. Se encontraron valores de LDs entre 0,53 y 1,5 ng mL⁻¹ para linalool; 0,003-0,09 ng mL⁻¹ para geraniol; 0,03-0,38 ng mL⁻¹ para eugenol; 0,04-0,95 ng mL⁻¹ para carvacrol y 0,04-0,90 ng mL⁻¹ para timol, dependiendo de la muestra. Los valores de los LQs variaron entre 1,7 y 5,0 ng mL⁻¹ para linalool; 0,01-0,3 ng mL⁻¹ para geraniol; 0,13-3,1 ng mL⁻¹ para carvacrol y 0,13-3,0 ng mL⁻¹ para timol.

Se calculó el factor de enriquecimiento (FE) del procedimiento de microextracción comparando las pendientes de calibración obtenidas con estándares acuosos en presencia y en ausencia de la etapa DLLME. Así, los valores de FE fueron 12, 88, 75, 79 y 71 para linalool, geraniol, eugenol, carvacrol y timol, respectivamente.

Se calculó la repetitividad del método DLLME-LC-QqQ-MS² usando la desviación estándar relativa (RSD) de diez análisis repetidos de una bebida fortificada con los analitos al nivel de 100 ng mL⁻¹. Los valores de RSD estuvieron en el rango de 10 a 12%.

Puesto que no se disponía de materiales de referencia certificados para validar el método, la exactitud se calculó mediante estudios de recuperación aplicados a tres muestras diferentes (ron, brandy y mistela) fortificadas a tres niveles de concentración (25, 100 y 500 ng mL⁻¹). Las recuperaciones variaron entre 76 y 128% (Tabla I.3).

Compuesto	Nivel de fortificación	Pop	Brandy	Mistola
Compuesto	(ng mL ⁻¹)	KUII	branuy	IVIIStela
Linalool	25	120	119	83
	100	115	88	80
	500	99	102	98
Geraniol	25	117	79	119
	100	80	101	93
	500	101	99	102
Eugenol	25	121	76	120
	100	78	106	88
	500	101	98	102
Carvacrol	25	119	99	133
	100	76	99	93
	500	101	101	103
Timol	25	117	90	128
	100	76	100	92
	500	100	100	102

Tabla I.3. Estudios de recuperación (%) de los terpenos en bebidas alcohólicas fortificadas

3.4. Análisis de las muestras

El procedimiento propuesto se aplicó a la determinación del contenido de monoterpenos en ocho muestras de bebidas alcohólicas. No se encontraron picos de compuestos interferentes a los tiempos de retención de los analitos, que se identificaron mediante comparación de los tiempos de retención, sus transiciones y las relaciones entre las transiciones obtenidas en las muestras y las disoluciones estándar. La Tabla I.4 muestra los contenidos de monoterpenos encontrados. En la muestra de ginebra se encontró una concentración elevada de linalool, siendo los contenidos mucho más bajos en el resto de muestras. También se identificaron eugenol y geraniol en la mayoría de las muestras, aunque a bajos niveles. Carvacrol y timol se encontraron a muy bajas concentraciones en un pequeño número de muestras. Las concentraciones de terpenos encontradas fueron similares a las descritas en publicaciones previas en referencia a los niveles de geraniol y linalool en vinos [5,7] y eugenol en bebidas [16].

		1			
Muestra	Linalool	Geraniol	Eugenol	Carvacrol	Timol
Licor de avellana	ND	ND	ND	ND	ND
Vino tinto	ND	ND	54±6	0,43±0,03	1,0±0,2
Whisky 1	21±3	7,5±0,9	9,8±1,2	ND	ND
Whisky 2	39±5	2,5±0,3	6,5±0,8	ND	ND
Brandy	6,2±0,7	1,5±0,2	6,7±0,8	ND	ND
Mistela	ND	ND	6,4±0,8	2,0±0,2	ND
Ron	ND	0,53±0,07	2,3±0,3	ND	ND
Ginebra	627±75	85±11	ND	1,1±0,1	6,9±1,0
^a Valor medio ± desv	viación estándar (ı	n=3); ND significa	no detectado		

Tabla I.4. Contenidos^a de monoterpenos en bebidas alcohólicas (ng mL⁻¹)

En la Tabla I.5 se muestra una comparación del método desarrollado con otros previamente publicados para los analitos aquí estudiados. La sensibilidad más elevada se consigue con el método propuesto, con un bajo consumo de muestra. La preconcentración de la muestra mediante DLLME se caracteriza por el bajo consumo de tiempo y de disolventes orgánicos. Además, el uso de MS² proporciona una inequívoca identificación de los analitos.

	Tratamiento de	Cantidad de	т.;;т			LDs (ng mL ⁻¹)		
Muestra	muestra	muestra	lecnica	Linalool	Eugenol	Geraniol	Carvacrol	Timol	Keterencia
Vinos	HS-SPME	5 mL	GC-MS	2,06	·	0,5	·	·	[7]
			LC-UV	150	·	180	ı	80	
	Dilución con	0	GC-MS	130	ı	20	ı	50	Ĩ
Aceites esenciales	disolvente	0,2 g	GC-FID	1000	ı	1000	ı	006	[/ 1]
			LC-UV	I	62	ı	55	41	
	Dilución con		LC-Amperometría	I	6,7	ı	15	17	Ē
Aceites esenciales/ plantas	disolvente/UAE	~ 100 µL/0.1	LC-Colorimetría	ı	m	ı	3,1	1,4	[77]
Vinos	SPE	50 mL	GC-FID	0,43	ı	0,33	·	ı	[5]
Bebidas	QuEChERS	5 mL	LC-UV	ı	-	I	ı	·	[16]
Plantas	SLE	0,1 g	LC-UV	ı	50	I	ı	ı	[11]
Miel	DSPE	200 g	LC-DAD	ı	ı	I	18	38	[10]
Formulaciones de hierbas/frutas	UAE	0,2 g/0,5 g	LC-MS ²	I	1,1	ı	·	·	[23]
Bebidas alcohólicas	DLLME ^a	8 mL	LC-MS ²	0,52 ^a	0,02ª	0,11 ^a	0,24ª	0,22 ^a	Este método

78

A. Oller Ruiz

4. Conclusiones

El acoplamiento LC-QqQ-MS² se ha aplicado por primera vez para la determinación de cinco monoterpenos en bebidas alcohólicas, con un rápido tratamiento de preconcentración de la muestra mediante DLLME. La técnica de microextracción consigue altos factores de enriquecimiento usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos y de muestra. Los datos obtenidos en el modo MRM, junto con los tiempos de retención, permiten una precisa identificación de los analitos, siendo así el método aplicable al control de calidad de terpenos en bebidas alcohólicas.

Referencias

[1] D. Mirón, A. Lange, A.R. Zimmer, P. Mayorga, E.E.S. Schapoval, HPLC-DAD for the determination of three different classes of antifungals: method characterization, statistical approach, and application to a permeation study, Biomed. Chromatogr. 28 (2014) 1728–1737.

[2] M. Arbulu, M.C. Sampedro, A. Sanchez-Ortega, A. Gómez-Caballero, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Characterisation of the flavour profile from *Graciano Vitis vinifera* wine variety by a novel dual stir bar sorptive extraction methodology coupled to thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 777 (2013) 41–48.

[3] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography–mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1399 (2015) 18–24.

[4] M. Khajeh, Z.S. Moghaddam, M. Bohlooli, A. Khajeh, Modeling of dispersive liquid – liquid microextraction for determination of essential oil from *Borago officinalis L*. by using combination of artificial neural network and genetic algorithm method, J. Chromatogr. Sci. 53 (2015) 1801–1807.

[5] Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 209– 214. [6] R. Flamini, Some advances in the knowledge of grape, wine and distillates chemistry as achieved by mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 40 (2005) 705–13.

[7] E. Paula Barros, N. Moreira, G. Elias Pereira, S.G.F. Leite, C. Moraes Rezende, P. Guedes de Pinho, Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines, Talanta 101 (2012) 177–186.

[8] F. Rodrigues, M. Caldeira, J.S. Câmara, Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages, Anal. Chim. Acta 609 (2008) 82–104.

[9] H. Sereshti, Y. Izadmanesh, S. Samadi, Optimized ultrasonic assisted extraction–dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography for determination of essential oil of *Oliveria decumbens Vent*, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 4593–4598.

[10] A.Y. Badjah Hadj Ahmed, M.S. Obbed, S.M. Wabaidur, Z.A. Alothman, N.H. Al-Shaalan, High-performance liquid chromatography analysis of phenolic acid, flavonoid, and phenol contents in various natural yemeni honeys using multi-walled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent, J. Agric. Food Chem. 62 (2014) 5443–5450.

[11] V.V. Dighe, A.A. Gursale, G.A. Charegaonkar, Quantitation of eugenol, cinnamaldehyde and isoeugenol from *cinnamomum tamala* nees and eberm. leaf powder and *cinnamomum zeylanicum* breyn stem bark powder by LC, Chromatographia 70 (2009) 1759–1762.

[12] V. Ferreira, P. Hernández-Orte, A. Escudero, R. López, J. Cacho, Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages, J. Chromatogr. A 864 (1999) 77–88.

[13] A.A. Rincón, V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, Headspace-single drop microextraction (HS-SDME) in combination with high-performance liquid chromatography (HPLC) to evaluate the content of alkyl- and methoxy-phenolic compounds in biomass smoke, Talanta 85 (2011) 1265–1273.

80

DLLME LC-QqQ-MS² para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas

[14] P.G. Stevenson, G. Guiochon, Retention divergence of terpenes with porous graphitized carbon and C18 stationary phases, J. Chromatogr. A 1247 (2012) 57–62.

[15] C. Turek, F.C. Stintzing, Application of high-performance liquid chromatography diode array detection and mass spectrometry to the analysis of characteristic compounds in various essential oils, Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 3109–3123.

[16] I.M. Valente, C.M. Santos, M.M. Moreira, J.A. Rodrigues, New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography, J. Chromatogr. A 1271 (2013) 27–32.

[17] J. Ródenas-Montano, E.J. Carrasco-Correa, M. Beneito-Cambra, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Determination of alcohols in essential oils by liquid chromatography with ultraviolet detection after chromogenic derivatization, J. Chromatogr. A 1296 (2013) 157–163.

[18] F. Beaudry, S.A. Guénette, P. Vachon, Determination of eugenol in rat plasma by liquid chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity, Biomed. Chromatogr. 20 (2006) 1216–1222.

[19] G. Famiglini, V. Termopoli, P. Palma, F. Capriotti, A. Cappiello, Rapid LC-MS method for the detection of common fragrances in personal care products without sample preparation, Electrophoresis 35 (2014) 1339–1345.

[20] R.J.W. Meesters, M. Duisken, H. Jähnigen, J. Hollender, Sensitive determination of monoterpene alcohols in urine by HPLC-FLD combined with ESI-MS detection after online-solid phase extraction of the monoterpene-coumarincarbamate derivates, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 875 (2008) 444–450.

[21] D. Melles, T. Vielhaber, A. Baumann, R. Zazzeroni, U. Karst, In chemico evaluation of skin metabolism: Investigation of eugenol and isoeugenol by electrochemistry coupled to liquid chromatography and mass spectrometry, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 913–914 (2013) 106–112.

[22] B.C. Owen, L.J. Haupert, T.M. Jarrell, C.L. Marcum, T.H. Parsell, M.M. Abu-Omar, J.J. Bozell, S.K. Black, H.I. Kenttämaa, High-performance liquid chromatography/high-resolution multiple stage tandem mass spectrometry using negative-ion-mode hydroxide-doped electrospray ionization for the characterization of lignin degradation products, Anal. Chem. 84 (2012) 6000–6007.

[23] R. Pandey, B. Kumar, HPLC–QTOF–MS/MS-based rapid screening of phenolics and triterpenic acids in leaf extracts of *Ocimum* species and their interspecies variation, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 39 (2016) 225–238.

[24] R. Pandey, K.B. Rameshkumar, B. Kumar, Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of multiple bioactive constituents in fruit extracts of *Myristica fragrans* and its marketed polyherbal formulations using a polarity switching, J. Sep. Sci. 38 (2015) 1277–1285.

[25] C. Tian, M. Wang, C. Shen, C. Zhao, Accuracy mass screening and identification of phenolic compounds from the five parts of *Abutilon theophrasti* Medic. by reverse-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupoles-time of flight-mass spectrometry, J. Sep. Sci. 35 (2012) 763–772.

[26] P. Viñas, M.J. Soler-Romera, M. Hernández-Córdoba, Liquid chromatographic determination of phenol, thymol and carvacrol in honey using fluorimetric detection, Talanta 69 (2006) 1063–1067.

[27] A. Cantalapiedra, M.J. Gismera, M.T. Sevilla, J.R. Procopio, Sensitive and selective determination of phenolic compounds from aromatic plants using an electrochemical detection coupled with HPLC method, Phytochem. Anal. 25 (2014) 247–254.

[28] 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.

CAPÍTULO II

Diferenciación de terpenos libres y glicosilados en uva mediante microextracción dispersiva líquido-líquido y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas



Resumen

En este trabajo se analizaron 15 terpenos en sus formas libres y glicosiladas en diferentes variedades de uva, empleando la técnica microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) combinada con cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM). El tratamiento de la muestra de uva incluyó una etapa previa de extracción desde la matriz sólida, hidrólisis enzimática para la liberación de los terpenos enlazados y, por último, la preconcentración de los analitos mediante DLLME. La cuantificación de las muestras se realizó mediante calibración con estándares acuosos. Los límites de detección se encontraron entre 9 y 49 ng g⁻¹. Se realizaron ensayos de recuperación para validar el método, con resultados comprendidos entre 75 y 115%. La precisión, calculada en base a desviación estándar relativa de medidas repetidas, fue inferior a 12% en todos los casos. Se analizaron cuatro variedades de uva Moscatel, siendo cuantificados los terpenos aromáticos en el intervalo 52-470 ng g⁻¹ en las fracciones libre y enlazada.

1. Introducción

Las características organolépticas de la fruta en general, y de la uva en particular, están relacionadas con su contenido tanto en compuestos aromáticos volátiles libres, como con los no volátiles, por hallarse enlazados químicamente al azúcar de la fruta. Lógicamente, las formas químicas unidas a azúcares no influyen en las características olfativas de la fruta. Los compuestos glicosilados pueden ser hidrolizados mecánicamente durante el proceso de vinificación de la uva, o mediante diferentes tipos de hidrólisis. Los compuestos responsables del aroma en uva son, entre otros, monoterpenos, sesquiterpenos, norisoprenoides, derivados del ácido siquímico o del benceno, alcoholes alifáticos, compuestos de azufre, compuestos carbonílicos, ácidos, ésteres y lactonas [1].

El análisis del contenido total de terpenos permite conocer el origen de la uva, su estado de maduración, su variedad [2] e incluso si es más recomendable su consumo como uva de mesa o para la producción de vino. La bibliografía recoge diferentes métodos analíticos para la determinación de terpenos en uva, contemplando en todos los casos la cuantificación de sus formas libres [3–18], pero no siempre las formas glicosiladas. Para liberar los compuestos enlazados, se han desarrollado diferentes procedimientos de glicólisis [3], basados en hidrólisis enzimática [5,12–18] e hidrólisis ácida [6,7]. El uso de cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* ha proporcionado muy buenos resultados para la liberación de terpenos glicoconjugados [8].

Puesto que los terpenos suelen estar presentes a bajos niveles de concentración (ng g⁻¹) y las muestras de uva son matrices complejas, se requieren procedimientos de extracción que eliminen las posibles interferencias y sean, por tanto, selectivos y sensibles. Los procedimientos tradicionales de tratamiento de muestra, como la extracción en fase sólida (SPE) [5,7,8,13–21], consumen grandes volúmenes de disolvente orgánico, siendo largos y tediosos en su aplicación. En los últimos años, para la determinación de terpenos se han aplicado técnicas miniaturizadas, como la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) [4,9,11,12,19,22–25], extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) [10,26], extracción por adsorción en espacio de cabeza (HSSE) [27], extracción en fase sólida dispersa (DSPE) [28] y microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [29]. El análisis de los extractos obtenidos se lleva a cabo generalmente mediante cromatografía de gases (GC)

87

acoplada a detección mediante espectrometría de masas (MS) [4–19,21–28], teniendo en cuenta la alta volatilidad de los terpenos, aunque también se han separado mediante cromatografía líquida (LC) [20,29].

En este capítulo, se presenta la primera aplicación de la técnica de preconcentración DLLME acoplada a GC-MS para la determinación de quince terpenos, cuyas estructuras moleculares se muestran en la Figura II.1. El procedimiento desarrollado incluye una etapa de hidrólisis que permite la cuantificación de los analitos en sus formas libres y glicosiladas. El método DLLME-GC-MS se caracteriza por su fácil aplicación y rapidez, obteniéndose muy buenos parámetros de sensibilidad.



Fig. II.1: Estructuras moleculares de los terpenos estudiados

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Se utilizaron etanol, acetonitrilo (AcN) y cloroformo de alta calidad de Sigma (St. Louis, MO, EEUU) y un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU) para purificación del agua. Los estándares analíticos de óxido de linalool, óxido de rosa, α -terpineol, nerol, geraniol y eugenol se obtuvieron de Fluka (Buchs, Suiza), limoneno de Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU), y mirceno, alcohol bencílico, linalool, 2-feniletanol, citronelol y citral se obtuvieron de Acros Organics (Geel, Bélgica).

Los reactivos usados en el pretratamiento de la muestra fueron lactona del ácido D-glucónico, polivinilpolipirrolidona (PVPP), citrato trisódico dihidratado, dihidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio y ácido ortofosfórico (85%) de Sigma. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando un preparado comercial AR-2000 con actividad glucosidasa, obtenido de Gist Brocades (Seclin, Francia).

2.2. Instrumentación

Los compuestos aromáticos se separaron en un sistema GC Agilent (Waldbronn, Alemania) HP 6890 empleando una columna HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm), utilizando helio como gas portador a una presión constante de 7 psi, e inyectando 2 µL de muestra en modo *splitless*. La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C y la del detector a 280 °C. Se estableció un programa de horno incrementando la temperatura desde 60 hasta 140 °C a una velocidad de 3 °C min⁻¹, que daba lugar a un tiempo de análisis de 27 min [15], quedando resueltos los picos cromatográficos de todos los terpenos entre 6 y 22 minutos.

Se empleó un espectrómetro de masas (Agilent 5973 N) con ionización por impacto de electrones (EI) aplicando 70 eV como energía ionizante, y escaneando en el rango *m/z* de 40 a 600. El voltaje del multiplicador de electrones fue de 1300 V. Las temperaturas del cuadrupolo y de la fuente de iones se mantuvieron en 150 y 230 °C, respectivamente. Con objeto de mejorar la sensibilidad del método se trabajó en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) usando un ion principal y tres iones secundarios. La identificación de los analitos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de los iones principales y las relaciones de abundancias entre cada ion secundario y el principal para las disoluciones estándar, las muestras y las muestras

fortificadas. La Tabla II.1 muestra los tiempos de retención de los terpenos, los iones monitorizados y las relaciones de abundancia entre ellos.

Compuesto	t _R (min)	Т	Q1	Q2	Q3	Q1/T	Q2/T
Mirceno	6,51	41	93	69	91	95,2	77,0
Limoneno	7,79	68	67	93	79	75,5	73,4
Alcohol bencílico	8,31	79	108	107	77	92,0	60,4
Óxido de linalool II	9,34	59	94	93	68	45,9	37,2
Óxido de linalool I	9,91	59	94	93	68	44,9	34,8
Linalool	10,4	71	93	80	67	78,1	29,5
Óxido de rosa II	10,8	139	69	83	67	51,9	26,7
2-Feniletanol	10,9	91	92	122	65	53,1	24,5
Óxido de rosa I	11,4	139	69	83	67	53,2	24,8
α-Terpineol	14,0	59	93	121	136	68,8	52,7
Citronelol	15,6	69	67	82	68	45,8	29,3
Nerol	15,6	69	67	93	68	38,6	26,7
Geraniol	16,7	69	93	68	67	22,4	17,5
Citral	17,5	69	84	53	94	23,6	16,6
Eugenol	21,2	164	77	103	149	43,9	39,8
T: ion principal, Q: ione	s secundario	os, Q/T: rela	ción iones s	ecundario/p	principal		

Tabla II.1. Tiempos de retención y valores *m/z* de los iones monitorizados

Para triturar las muestras de uva se empleó un molino de bolas Dangoumau con nitrógeno líquido. Para centrifugar se utilizó una centrífuga Eppendorf modelo 5810R (Hamburgo, Alemania) y un agitador orbital (IKA, Staufen, Alemania).

2.3. Muestras y procedimiento analítico

Las muestras analizadas se cultivaron en el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA, Murcia, España) correspondiendo a la especie *Vitis vinifera* Moscatel de Hamburgo y fueron muestreadas durante la cosecha de 2017. Las variedades seleccionadas fueron de la sociedad murciana de Investigación y Tecnología de Uva de Mesa (ITUM) 2, 3, 13 y 15, cuyas características se recogen en la Tabla II.2. Las muestras de uva fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis.

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

Características	ITUM 2	ITUM 3	ITUM 13	ITUM 15
Color	Blanca	Blanca	Blanca	Roja
Sabor	Moscatel ligero	Neutro	Moscatel ligero	Moscatel
Textura (Newtons)	Crujiente:	Crujiente:	Crujiente:	Crujiente:
	22 – 24	21 – 24	21 – 24	20 – 23
Calibre (mm)	18 – 21	19 – 22	19 – 22	18 – 23
Índice de fertilidad	0,8 – 1,2	0,8 - 1,1	1,0 – 1,2	1,6 – 1,8
Peso de racimo (g)	450 - 600	500 – 650	500 – 650	350 – 500
Periodo de	Final junio –	Mitad junio –	Mitad agosto –	Final julio –
recolección	Mitad septiembre	Mitad octubre	Mitad octubre	Mitad agosto

Tabla II.2. Variedades de uva analizadas

Para eliminar interferencias de otros compuestos presentes en la matriz, se realizó una etapa de extracción y limpieza [15]. Las muestras recién sacadas del congelador y mantenidas en nitrógeno líquido se trituraron en un molino de bolas. Seguidamente, en un vaso de precipitados se pesaron 7,5 g del polvo obtenido de la trituración en frio, y se añadieron 30 mL de agua y 75 mg de lactona del ácido D-glucónico, que actuó como inhibidor de la actividad de la glucosidasa, evitando así la descomposición natural de los compuestos aromáticos glicosilados. La mezcla se agitó mediante un agitador orbital durante 15 min a 4 °C, y se centrifugó a 9000 rpm durante 20 min, manteniendo una temperatura constante de 4 °C. El sobrenadante se filtró por duplicado con lana de vidrio, añadiéndose al filtrado 150 mg de PVPP, para eliminar los altos niveles de compuestos fenólicos capaces de inhibir la actividad glucosidasa, que a continuación se agitó nuevamente durante 15 min y se centrifugó durante 10 min.

De este último extracto filtrado y limpio se tomaron dos alícuotas de 10 mL para distinguir entre el contenido de terpenos en sus formas libre y enlazada. Para la fracción libre, una de las alícuotas se colocó en un tubo de vidrio de fondo cónico en el que previamente se había pesado 0,5 g de NaCl. Seguidamente, por medio de una microjeringa se inyectó rápidamente una mezcla conteniendo 1,5 mL de AcN y 250 µL de cloroformo. Se observó la turbidez producida por la dispersión del disolvente extractante, siendo las microgotas del mismo, ya enriquecidas con los terpenos, agregadas de nuevo tras la centrifugación a 3000 rpm durante 3 min y manteniendo la mezcla refrigerada a 4 °C. La fase sedimentada de cloroformo se recogió usando una microjeringa y 2 µL fueron inyectados directamente en el sistema GC-MS.

Para la determinación del contenido total de terpenos, la otra alícuota del filtrado (10 mL) se sometió a un tratamiento previo de hidrólisis enzimática [13–15], que consistió en la adición de 200 mg de la enzima comercial AR-2000, 0,5882 g de citrato trisódico dihidratado y 0,2722 g de dihidrógeno fosfato de potasio, siendo el pH ajustado a 5 con ácido ortofosfórico. La mezcla se mantuvo durante 24 h a 40 °C para permitir el transcurso de la reacción de hidrólisis. Finalmente, se aplicó el procedimiento DLLME previamente descrito. Los resultados obtenidos del análisis de este extracto, junto con los encontrados para los terpenos en su forma libre, permitieron conocer el contenido de los compuestos en su forma glicosilada en las muestras. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

Debido a que no se disponía de material de referencia certificado para la validación del método, se realizaron estudios de recuperación mediante adiciones estándar a la uva ITUM 2 a dos niveles de concentración, 150 y 250 ng g⁻¹. Para ello, la muestra se fortificó después de su molienda y se dejó reposar durante 1 h a 4 °C, antes de proceder al análisis siguiendo el protocolo previamente descrito.

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización del procedimiento DLLME

Se llevaron a cabo experimentos preliminares con objeto de aplicar el procedimiento DLLME optimizado en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral para la determinación de terpenos en bebidas alcohólicas [29], aunque empleando etanol como dispersante, cuya adición pudo ser omitida para las bebidas alcohólicas por su contenido natural en alcohol. Sin embargo, cuando se aplicó el procedimiento DLLME al extracto de uva sometido a hidrólisis enzimática, aparecía un precipitado blanco que enturbiaba la fase de cloroformo, impidiendo su inyección en el sistema GC-MS. Se realizaron diferentes ensayos con objeto de evitar la aparición del residuo sólido en la fase extractante. Para ello se probaron otros disolventes extractantes (diclorometano y tetracloruro de carbono), así como otros disolventes dispersantes (AcN, metanol y acetona). Se comprobó que el etanol era el responsable de la turbidez y que de las distintas combinaciones extractante/dispersante, los mejores resultados los proporcionaba la mezcla cloroformo/AcN, que fue por tanto seleccionada.

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

Manteniendo un volumen de muestra de 10 mL, se aplicó un diseño ortogonal Taguchi para estudiar la influencia sobre la eficiencia de extracción mediante DLLME de tres factores (cada uno de ellos a tres niveles): volúmenes de los disolventes extractante y dispersante y fuerza iónica de la fase acuosa. Para ello, se usó una disolución de muestra fortificada con los analitos a 50 ng mL⁻¹. Los niveles estudiados para cada factor fueron: volumen de cloroformo (250, 300 y 350 µL), volumen de AcN (0,5, 1,5 y 2,5 mL), y concentración de cloruro sódico (0, 0,5 y 1% (m/v)). Los efectos de los tres factores estudiados sobre la eficiencia media de extracción de los terpenos se muestran en la Figura II.2, donde puede comprobarse que la señal analítica disminuye cuando aumenta el volumen de extractante, debido al efecto de dilución. Los niveles centrales ensayados para las otras dos variables proporcionaron la mayor sensibilidad para todos los compuestos.



Fig. II.2: Efecto de tres factores en la eficiencia de extracción mediante DLLME de los terpenos.

Las condiciones seleccionadas corresponden a 250 μ L de cloroformo, 1,5 mL de AcN y 0,5% (m/v) de NaCl en extracto acuoso de muestra.

3.2. Hidrólisis enzimática

Como ya se ha indicado anteriormente, los compuestos aromáticos se encuentran en la uva en proporciones importantes enlazados a los azúcares propios de la fruta, es decir, glicosilados. Para su determinación y también para mejorar el carácter organoléptico de la uva usada para vinificación, es necesaria la glicolisis de los compuestos enlazados. Diferentes procedimientos de hidrólisis han sido propuestos con este objetivo: hidrólisis enzimática con pectinol [16–18], con la enzima comercial AR2000 [5,12–15], o con glicosidasas de origen vegetal o microbiano, como las levaduras [8], además de una hidrólisis ácida [6,7].

Estudios previos han demostrado que la enzima comercial AR2000 proporciona una hidrólisis más específica de los monoterpenos, y con mayor rendimiento que otras enzimas, como, por ejemplo, las de origen microbiano [12]. Por otro lado, Schneider y colaboradores observaron que la hidrólisis ácida de terpenos produce un reordenamiento de la disposición de los anillos aromáticos, dando lugar a compuestos diferentes [13].

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos por otros autores, se optó por llevar a cabo la hidrólisis de los terpenos usando la enzima comercial AR2000. Aunque la separación de las formas libre y enlazada ha sido propuesta mediante SPE, para llevar a cabo la hidrólisis directamente en el extracto de fase enlazada [12,13], en el procedimiento aquí desarrollado se preconcentra mediante DLLME el extracto de la fruta sin y con hidrólisis previa, de modo que la fracción de fase enlazada se obtiene por diferencia.

3.3. Validación del método y estudio del efecto matriz

Para estudiar la posible presencia de efecto de la matriz, se aplicó el método de adiciones estándar a dos muestras de uva (ITUM 2 y 15), a cinco niveles de concentración comprendidos entre 20 y 400 ng g⁻¹. Las gráficas de calibración se obtuvieron representando el área de pico *versus* concentración, y las pendientes obtenidas se compararon con las encontradas mediante calibración con estándares acuosos (Tabla II.3). La aplicación de un test ANOVA proporcionó valores de "p" superiores a 0,05, concluyendo que no existían diferencias significativas entre las pendientes de adiciones estándar a las muestras y calibración acuosa. Por tanto, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo frente a estándares acuosos, evitando así el uso del laborioso método de adiciones estándar.

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

Compuesto	Calibración acuosa	Uva ITUM 2	Uva ITUM 15
Mirceno	216176±19224	263135±9167	183247±18305
Limoneno	239778±12263	204249±8586	221534±8005
Alcohol bencílico	79969±6816	110232±16937	81230±8162
Óxido de linalool II	84483±3408	79874±7727	84005±3605
Óxido de linalool I	83892±3864	80050±6601	84513±3441
Linalool	209426±12877	223325±16687	182879±17588
Óxido de rosa II	125798±2583	192632±3279	165839±8781
2-Feniletanol	211978±5781	249999±27380	182808±12762
Óxido de rosa I	99315±5742	198311±11008	100412±10735
α-Terpineol	151975±6081	135605±10212	154271±5698
Citronelol	109455±4526	75267±2142	84739±4071
Nerol	78523±862	65167±4056	55870±3262
Geraniol	212543±15391	246275±29116	223603±18732
Citral	173396±10321	177951±5843	201887±7709
Eugenol	167885±9599	177846±13343	186647±9853
^a Valor medio ± desviación e	estándar (n=6)		

Tabla II.3. Pendientes^a de calibración acuosa y de adiciones estándar a dos muestras (g ng⁻¹)

Los límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs) se calcularon para una relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente. Los valores de LDs se encontraron entre 9 y 49 ng g⁻¹ que correspondieron a alcohol bencílico y mirceno, respectivamente (Tabla II.4).

El análisis consecutivo de diez alícuotas de una muestra de uva enriquecida con todos los analitos a 200 ng g⁻¹ permitió estimar la repetitividad del método DLLME-GC-MS. Los valores de desviación estándar relativa (RSD) se hallaron entre 1,7 y 12%, lo que denota una buena precisión del método.

A. Oller Ruiz

Compuesto	Rango de linealidad (ng g ⁻¹)	LD ^a (ng g ⁻¹)	LQ ^b (ng g ⁻¹)	RSD ^c (%)
Mirceno	150-400	49	164	8,4
Limoneno	70-400	24	79	8,3
Alcohol bencílico	25-400	9	31	12
Óxido de linalool II	50-400	15	51	3,5
Óxido de linalool I	50-400	20	65	4,9
Linalool	50-400	18	60	2,9
Óxido de rosa II	50-400	19	62	3,0
2-Feniletanol	25-400	12	41	8,1
Óxido de rosa I	50-400	18	60	4,0
α-Terpineol	70-400	27	90	3,2
Citronelol	100-400	30	100	3,7
Nerol	70-400	27	90	1,7
Geraniol	100-400	36	119	4,3
Citral	50-400	20	67	6,5
Eugenol	50-400	18	60	4,4
^a Calculado para S/N=3; ^b	Calculado para S/N=10; ^c n=10			

Tabla II.4. Características analíticas del método DLLME-GC-MS

Se llevaron a cabo estudios de recuperación para verificar la exactitud del método, fortificando las muestras de ITUM 2 y 15 a los niveles de concentración de 150 y 250 ng g⁻¹. Los porcentajes de recuperación variaron entre 75 y 115% (Tabla II.5).

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

Compuesto	Nivel de fortificación (ng g ⁻¹)	ITUM 2	ITUM 15
Mirceno	150	75	96
	250	97	98
Limoneno	150	84	84
	250	114	100
Alcohol bencílico	150	114	83
	250	115	101
Óxido de linalool II	150	92	87
	250	107	105
Óxido de linalool I	150	84	93
	250	104	108
Linalool	150	114	77
	250	102	99
Óxido de rosa II	150	89	88
	250	105	104
2-Feniletanol	150	110	115
	250	115	112
Óxido de rosa I	150	85	93
	250	102	103
α-Terpineol	150	81	92
	250	105	103
Citronelol	150	94	90
	250	104	99
Nerol	150	95	86
	250	104	101
Geraniol	150	113	80
	250	109	99
Citral	150	97	90
	250	111	101
Eugenol	150	91	83
	250	106	99

Tabla II.5. Porcentajes de recuperación para dos muestras de uva

3.4. Análisis de las muestras

El método optimizado se aplicó al análisis de cuatro muestras de uvas tipo Moscatel, diferenciando entre las fracciones libres y enlazadas de los terpenos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.6.

Solo se detectaron seis de los compuestos estudiados: alcohol bencílico, 2feniletanol, geraniol, linalool y óxido de linalool I y II. Salvo geraniol y linalool, el resto de monoterpenos detectados mostraron concentraciones mucho más altas para las formas glicosiladas, como previamente ha sido descrito [3,14].

Los contenidos más altos correspondieron a linalool en forma libre (359-470 ng g^{-1}) en todas las muestras [3]. En medio ácido, como ocurre en la hidrólisis enzimática aplicada en este método, el linalool se transforma a α -terpineol por ciclación, a hidroxilinalool por hidratación en la séptima posición y a geraniol y nerol por una transición nucleófila 1,3-alilo [3]. Estos resultados estuvieron en concordancia con la bibliografía, que identifica a linalool como el principal aroma de la uva Moscatel [12,21,25], puesto que tiene un típico aroma floral.

Los contenidos totales de monoterpenos en la fase libre fueron de 359, 370, 441 y 470 ng g⁻¹ para las muestras ITUM 2, 3, 13 y 15, respectivamente. Mientras las concentraciones totales para los terpenos glicosilados fueron 439, 662 y 223 ng g⁻¹ para ITUM 2, 3 y 13, respectivamente; mientras que en ITUM 15 no se encontraron niveles cuantificables de terpenos enlazados.

Compuestos	Fracción	ITUM 2	ITUM 3	ITUM 13	ITUM 15
Alcohol bencílico	Libre	ND	ND	ND	NQ
	Enlazada	155 ± 14	198 ± 15	223 ± 13	NQ
Óxido de linalool II	Libre	NQ	ND	ND	ND
	Enlazada	52 ± 1	ND	ND	ND
Óxido de linalool I	Libre	ND	NQ	NQ	NQ
	Enlazada	127 ± 4	464 ± 18	ND	ND
Linalool	Libre	359 ± 1	370 ± 3	441 ± 9	470 ± 4
	Enlazada	ND	ND	ND	ND
2-Feniletanol	Libre	ND	ND	ND	ND
	Enlazada	105 ± 7	NQ	NQ	NQ
^a Valor medio ± desviac	ión estándar (n=3	3). ND, no detecta	do. NQ, no cuant	ificado	

Tabla II.6. Contenidos^a (ng g⁻¹) de terpenos en uvas analizadas por DLLME-GC-MS

En la Figura II.3 se representa un cromatograma de iones totales (TIC) obtenido de una muestra de uva fortificada con los analitos a 200 ng g⁻¹.


Fig. II.3: Cromatograma de iones totales obtenido para la muestra ITUM 2 fortificada a 200 ng g⁻¹. Los picos corresponden a: 1, mirceno; 2, limoneno; 3, alcohol bencílico; 4, óxido de linalool II; 5, óxido de linalool I; 6, linalool; 7, óxido de rosa II; 8, 2-feniletanol; 9, óxido de rosa I; 10, α-terpineol; 11, citronelol; 12, nerol; 13, geraniol; 14, citral; 15, eugenol

La identificación de los analitos se llevó a comparando los tiempos de retención del ion principal y las relaciones de abundancia entre los iones cualificadores y el principal en las disoluciones estándar, en las muestras y en las muestras fortificadas.

4. Conclusiones

La técnica DLLME ha demostrado su capacidad para la preconcentración de quince terpenos relacionados con las características organolépticas de la uva, de forma sencilla, rápida y con un mínimo consumo de disolventes orgánicos. La combinación de DLLME con GC-MS ha proporcionado análisis con un alto grado de sensibilidad y selectividad. La hidrólisis enzimática de las muestras aplicada de forma previa a la preconcentración posibilita la diferenciación de las fracciones de los terpenos en forma libre y glicosilada. El tratamiento de la uva simplifica la matriz, pudiendo cuantificar las muestras frente a estándares acuosos.

Referencias

[1] P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Handbook of enology, 2nd ed., John Wiley, EEUU, 2006.

[2] D.I. Jackson, P.B. Lombard, Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality, Am. J. Enol. Vitic. 44 (1993) 409–430.

[3] S. Maicas, J.J. Mateo, Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: A review, Appl. Microbiol. Biotechnol. 67 (2005) 322–335.

[4] V. Canuti, M. Conversano, M.L. Calzi, H. Heymann, M.A. Matthews, S.E. Ebeler, Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for profiling free volatile compounds in Cabernet Sauvignon grapes and wines, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3012–3022.

[5] J.M. Oliveira, I.M. Araújo, Ó.M. Pereira, J.S. Maia, A.J. Amaral, M.O. Maia, Characterization and differentiation of five "*Vinhos Verdes*" grape varieties on the basis of monoterpenic compounds, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 269–275.

[6] J.J. Mateo, N. Gentilini, T. Huerta, M. Jiménez, R. Di Stefano, Fractionation of glycoside precursors of aroma in grapes and wine, J. Chromatogr. A 778 (1997) 219–224.

[7] M.J. Ibarz, V. Ferreira, P. Hernández-Orte, N. Loscos, J. Cacho, Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavor precursors extracted from grapes, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 217–229.

 [8] M. Fernández-González, R. Di Stefano, Fractionation of glycoside aroma precursors in neutral grapes. Hydrolysis and conversion by *Saccharomyces cerevisiae*, LWT - Food Sci. Technol. 37 (2004) 467–473.

[9] E. Sánchez-Palomo, M.C. Díaz-Maroto, M.S. Pérez-Coello, Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS, Talanta 66 (2005) 1152–1157.

100

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

[10] M.R. Salinas, A. Zalacain, F. Pardo, G.L. Alonso, Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 4821–4827.

[11] E. Coelho, S.M. Rocha, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, Headspace-SPME applied to varietal volatile components evolution during *Vitis vinifera* L. cv. 'Baga' ripening, Anal. Chim. Acta 563 (2006) 204–214.

[12] W. Kang, Y. Xu, L. Qin, Y. Wang, Effects of different β-D-glycosidases on bound aroma compounds in muscat grape determined by HS-SPME and GC-MS, J. Inst. Brew. 116 (2012) 70–77.

[13] R. Schneider, A. Razungles, C. Augier, R. Baumes, Monoterpenic and norisoprenoidic glycoconjugates of *Vitis vinifera* L. cv. Melon B. as precursors of odorants in Muscadet wines, J. Chromatogr. A 936 (2001) 145–157.

[14] P. Canosa, J.M. Oliveira, A. Masa, M. Vilanova, Study of the volatile and glycosidically bound compounds of minority *Vitis vinifera* red cultivars from NW Spain, J. Inst. Brew. 117 (2011) 462–471.

[15] J. Fenoll, A. Manso, P. Hellín, L. Ruiz, P. Flores, Changes in the aromatic composition of the *Vitis vinifera* grape Muscat Hamburg during ripening, Food Chem. 114 (2009) 420–428.

[16] Y.Z. Gunata, C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Cordonnier, The aroma of grapes I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components, J. Chromatogr. A 331 (1985) 83–90.

[17] A. Nasi, P. Ferranti, S. Amato, L. Chianese, Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques, Food Chem. 110 (2008) 762–768.

[18] M. Fernández-González, R. Di Stefano, A. Briones, Hydrolysis and transformation of terpene glycosides from muscat must by different yeast species, Food Microbiol. 20 (2003) 35–41.

[19] M. Dziadas, H.H. Jeleń, Analysis of terpenes in white wines using SPE-SPME-GC/MS approach, Anal. Chim. Acta 677 (2010) 43–9.

A. Oller Ruiz

[20] R.J.W. Meesters, M. Duisken, H. Jähnigen, J. Hollender, Sensitive determination of monoterpene alcohols in urine by HPLC-FLD combined with ESI-MS detection after online-solid phase extraction of the monoterpene-coumarincarbamate derivates, J. Chromatogr. B 875 (2008) 444–450.

[21] Z. Piñeiro, M. Palma, C.G. Barroso, Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 209– 214.

[22] J.E. Welke, V. Manfroi, M. Zanus, M. Lazzarotto, C. Alcaraz Zini, Differentiation of wines according to grape variety using multivariate analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection data, Food Chem. 141 (2013) 3897–905.

[23] M. Zhang, Q. Pan, G. Yan, C. Duan, Using headspace solid phase microextraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine, Food Chem. 125 (2011) 743–749.

[24] E. Paula Barros, N. Moreira, G. Elias Pereira, S.G.F. Leite, C. Moraes Rezende, P. Guedes de Pinho, Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines, Talanta 101 (2012) 177–186.

[25] F. Rodrigues, M. Caldeira, J.S. Câmara, Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC-qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages, Anal. Chim. Acta 609 (2008) 82–104.

[26] M. Arbulu, M.C. Sampedro, A. Sanchez-Ortega, A. Gómez-Caballero, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Characterisation of the flavour profile from *Graciano Vitis vinifera* wine variety by a novel dual stir bar sorptive extraction methodology coupled to thermal desorption and gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 777 (2013) 41–48.

[27] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1399 (2015) 18–24.

DLLME-GC-MS para la determinación de terpenos en uvas

[28] M. Celeiro, E. Guerra, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 1–14.

[29] A. Oller-Ruiz, P. Viñas, N. Campillo, J. Fenoll, M. Hernández-Córdoba, Triple quadrupole mass spectrometry with liquid chromatography and dispersive liquidliquid microextraction for the determination of monoterpenes in alcoholic drinks, Food Anal. Methods 10 (2017) 3615–3622.

CAPÍTULO III

Generación *in situ* de un líquido iónico en microextracción dispersiva en fase líquida para la determinación de clorobencenos en muestras medioambientales mediante desorción térmica-cromatografía de gases-espectrometría de masas



Resumen

Se propone un procedimiento de microextracción dispersiva en fase líquida (DLPME) con generación *in situ* del líquido iónico (IL) extractante para la preconcentración de diez clorobencenos. El análisis del IL enriquecido se lleva a cabo de forma directa mediante cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) usando desorción térmica (TD) en microviales.

El método desarrollado se aplicó al análisis de muestras medioambientales de aguas y suelos. Los clorobencenos fueron aislados de la matriz sólida del suelo en disolución reguladora alcalina aplicando extracción asistida por ultrasonidos. Se optimizaron todos los factores que afectaban tanto a la eficiencia de la etapa IL-DLPME, como a la desorción térmica. La cuantificación de las muestras de agua se realizó mediante calibración con estándares acuosos, mientras que se aplicó el método de adiciones estándar para la cuantificación de clorobencenos en suelos, al detectarse efecto matriz en las muestras. Los límites de detección estuvieron en los intervalos 0,5-7,2 ng L⁻¹ y 8,4-252 ng kg⁻¹, para aguas y suelos, respectivamente.

1. Introducción

Los clorobencenos (CBs) son compuestos químicos ampliamente utilizados como repelentes, disolventes, intermedios de reacción, componentes de fluidos dieléctricos y en la fabricación de desodorantes y fluidos de transferencia de calor en colectores de energía solar. Todas estas fuentes y emisiones provocan que una gran cantidad de los CBs alcancen diferentes compartimentos medioambientales, siendo adsorbidos por las partículas sedimentadas, contaminando aguas, suelos y, debido a su volatilidad, también la atmósfera. Los tratamientos generales de aguas de depuradora no consiguen eliminar estos compuestos completamente. Por ello, animales y humanos pueden estar expuestos a los CBs por inhalación e ingestión, con la consiguiente acumulación en el tejido adiposo, favorecida por sus altos valores de log K_{ow} (entre 3,18 y 5,6, según el compuesto) [1,2].

A los múltiples efectos tóxicos que se han atribuido a estos compuestos, se suman su carácter persistente, bioacumulativo, migratorio y, en consecuencia, de difícil eliminación del medioambiente [1,2]. Su nivel de toxicidad aumenta con el número de átomos de cloro contenidos en el anillo bencénico; así, hexaclorobenceno (HCB) presenta la mayor toxicidad y representa el mayor peligro medioambiental, siendo clasificado como carcinogénico por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) [3]. Incluso se ha regulado para este tóxico el contenido máximo permisible en aguas a través de la Directiva Europea 2008/105/EC [4] en 0,05 ng mL⁻¹. Los CBs han sido encontrados en diferentes muestras medioambientales como en atmósfera [1,2,5], en aguas de distinta procedencia [6–27], lodos de depuradora, sedimentos y suelos [24,26,28–36].

Los análisis para control medioambiental de CBs han sido realizados mayoritariamente mediante cromatografía de gases (GC) acoplada a diferentes sistemas de detección, tales como detección por ionización en llama (FID) [6,7,14,29], detector de captura de electrones (ECD) [17,19,20,22,30–32] y espectrometría de masas (MS) [5,8–13,18,21,23–28,34–37]. Sin embargo, también se ha utilizado la cromatografía líquida (LC) [15,16] para la separación de los compuestos.

La mayoría de las determinaciones de CBs en muestras sólidas, como los suelos, requieren una etapa previa de extracción. Las técnicas más empleadas para este

propósito han sido extracción acelerada con disolventes (ASE) [30], extracción con agua subcrítica presurizada (PSWE) [35] y extracción asistida por ultrasonidos (UAE) [32–34].

Con el propósito de limpiar y/o preconcentrar la muestra, se han utilizado procedimientos clásicos de preparación de muestra, tales como extracción en fase sólida (SPE) [5,21], extracción líquido-líquido (LLE) [18] y extracción Soxhlet [5], para la cuantificación de CBs. Sin embargo, estos procedimientos han ido siendo sustituidos por técnicas de microextracción, por ser más sencillas, limpias y con un bajo consumo de disolventes tóxicos. La bibliografía recoge aplicaciones de los procedimientos miniaturizados, microextracción en fase sólida (SPME) [22–28], microextracción en fase sólida magnética (MSPE) [19,33], extracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) [11,34,35], extracción por adsorción en espacio de cabeza (HSSE) [13] y otras basadas en microextracción en fase líquida (LPME) [6,14,31], como microextracción en gota única (SDME) [7–10,15,29], emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) [12], dispersiva en fase líquida (DLPME) [16] y dispersiva líquido-líquido (DLLME) [20].

Los líquidos iónicos (ILs) han sido empleados como disolventes extractantes en la preconcentración de CBs mediante SDME [7-9,15,29] y DLPME empleando calor para dispersar la fase extractante [16], ofreciendo diversas ventajas frente a los disolventes orgánicos clorados comúnmente utilizados. En este Capítulo se presenta un nuevo y rápido procedimiento basado en la generación in situ del IL extractante. Las dos propiedades más importantes que caracterizan a los ILs, les confieren simultáneamente ventajas e inconvenientes. Así, debido a su alta estabilidad térmica, resultan incompatibles con los sistemas GC empleando inyectores convencionales, por lo que se hace necesario el uso de otros sistemas de inyección. Por otro lado, por su baja volatilidad, pueden ser sometidos a altas temperaturas, permitiendo la evaporación de los analitos y su entrada en la columna GC, mientras que el IL no es inyectado en la columna. El análisis de compuestos preconcentrados en ILs mediante GC se ha llevado a cabo empleando sistemas de inyección diseñados y construidos en el laboratorio (home-made) [7,38] o sistemas comerciales, de entre los que destacan el sistema de desorción térmica (TD) [8,9]. Para la inyección por TD en microvial, el IL se introduce en un microvial (que puede tener un volumen de hasta 150 µL) y este, a su vez, dentro de un tubo de desorción térmica, y todo el conjunto se somete a un programa de temperatura en la unidad de desorción térmica (TDU), donde los analitos se evaporan y un gas portador los impulsa al inyector de temperatura programada (PTV) [13,39],

donde se concentran antes de entrar en la columna. Debido a su elevado punto de ebullición, el IL permanece en el microvial tras la etapa de calentamiento, por lo que se puede utilizar un volumen grande de IL sin que esto incremente los LDs del método. Además, se evitarán picos cromatográficos propios de los disolventes extractantes inyectados.

En este Capítulo, se han determinado tres diclorobencenos (1,4-diclorobenceno (1,4-DCB), 1,3-diclorobenceno (1,3-DCB) y 1,2-diclorobenceno (1,2-DCB)), tres triclorobencenos (1,3,5-triclorobenceno (1,3,5-TCB), 1,2,4-triclorobenceno (1,2,4-TCB) y 1,2,3-triclorobenceno (1,2,3-TCB)), dos tetraclorobencenos (1,2,4,5-tetraclorobenceno (1,2,4,5-TeCB), y 1,2,3,5-tetraclorobenceno (1,2,3,5-TeCB)), pentaclorobenceno (PCB) y HCB en aguas y suelos mediante IL-DLPME combinada con TD-GC-MS. El tratamiento de los suelos incluyó una etapa de UAE previa a la de preconcentración. Las estructuras moleculares de los diez CBs estudiados se representan en la Figura III.1.



Fig. III.1: Estructuras moleculares de los CBs estudiados

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Los CBs 1,4-DCB (\geq 99%), 1,3-DCB (98%), 1,2-DCB (99%), 1,3,5-TCB (99%), 1,2,4-TCB (\geq 99%), 1,2,3-TCB (99%), 1,2,4,5-TeCB (\geq 99%), 1,2,3,5-TeCB (98%), PCB (98%) y HCB (98%) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Se utilizó 2,3,6-tricloroanisol (99%, 2,4,6-TCA) como estándar interno (IS). Se prepararon disoluciones separadas de cada analito en acetonitrilo (Lab-Scan, Dublín, Irlanda) a concentraciones comprendidas entre 1000 y 2000 mg L⁻¹ y se almacenaron a 4 °C. La disolución de concentración intermedia (100 mg L⁻¹), conteniendo todos los analitos, se preparó en agua purificada, que se obtuvo usando un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

Los reactivos catiónicos y aniónicos para generar *in situ* el IL extractante fueron cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio ($[C_6MIm]Cl$), cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ($[C_8MIm]Cl$), cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio ($[C_10MIm]Cl$), cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio ($[C_{12}MIm]Cl$) y bis(trifluorometil) sulfonilimida de litio (Li $[NTf_2]$), servidos por loLiTec (Heilbronn, Alemania). Se prepararon disoluciones 1 M de cada uno de los reactivos en agua purificada. Las combinaciones de Li $[NTf_2]$ con los citados cloruros de imidazolio generaron los ILs ensayados como extractantes, cuyas estructuras aparecen en la Fig. III.2.



Fig. III.2: Líquidos iónicos ensayados

112

Se utilizó acetato amónico de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido) y ácido acético de Fluka Chemie (Buchs, Suiza). El helio usado como gas portador en GC (99,9999% de pureza) fue de Air Liquide (Madrid, España).

2.2. Instrumentación

El sistema de introducción de muestra en el cromatógrafo de gases estaba compuesto de una unidad de desorción térmica (TDU-2) equipada con un automuestreador (MPS-2), un inyector de temperatura programada (PTV o CIS-4) de Gerstel (Mulheim an der Ruhr, Alemania). La separación cromatográfica se llevó a cabo en un GC Agilent 6890N (Agilent, Waldbronn, Alemania) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Agilent 5973, con fuente de ionización inerte. Las condiciones experimentales para la introducción de muestra y la separación de los analitos en el sistema GC-MS aparecen en la Tabla III.1. La elución de los CBs tiene lugar entre los tiempos de retención 4,74 y 7,98 min, correspondiendo a 1,4-DCB y HCB, respectivamente (Tabla III.2).

TD	U	
	Modo	Splitless
	Programa de Temperatura	50-280 °C a 250 °C min ⁻¹ , mantenido 7,6 min
	Flujo del gas de desorción	Helio, 35 mL min ⁻¹
CIS	5	
	Modo	Venteo de disolvente ("solvent vent")
	Liner	Empaquetado con Tenax, 2 mm d.i.
	Programa de Temperatura	15-313 °C a 530 °C min ⁻¹ , mantenido 3,8 min
GC	-MS	
	Columna capilar	HP-5MS, 5% difenil-95% dimetilpolisiloxano
		(30 m x 0,25 mm, 0,25 μm)
	Gas portador	Helio, 1 mL min ⁻¹
	Programa de horno	40 °C, mantenido 1 min
		40-125 °C a 30 °C min ⁻¹ , mantenido 1,5 min
		125-255 °C a 100 °C min ⁻¹ , mantenido 3 min
	Modo de adquisición	SIM
	Temperatura de la línea de	300 °C
	transferencia	
	Temperatura del cuadrupolo	150 °C
	Temperatura de la fuente de	230 °C
	ionización	
	Modo de ionización	Modo de impacto de electrones (70 eV)

Tabla III.1. Condiciones experimentales del sistema TD-GC-MS

Los compuestos se cuantificaron en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) para mejorar los LDs, los iones utilizados se recogen en la Tabla III.2. La identificación de los compuestos se confirmó inyectando estándares acuosos, muestras y muestras fortificadas, y comparando sus tiempos de retención y las relaciones de abundancia de los iones secundarios respecto del ion principal para cada compuesto.

Compuesto	t _R (min)	log K _{ow}	Peso	lones monitorizados			
			molecular	(<i>m/z</i>)			
1,4-DCB	4,74	3,18	147,00	111 (45), <i>146</i> , 148 (72)			
1,3-DCB	4,79	3,18	147,00	111 (45), <i>146</i> , 148 (75)			
1,2-DCB	4,98	3,18	147,00	111 (37), <i>146</i> , 148 (66)			
1,3,5-TCB	5,77	3,79	181,44	<i>180</i> , 182 (99)			
1,2,4-TCB	6,05	3,79	181,44	<i>180</i> , 182 (99)			
1,2,3-TCB	6,25	3,79	181,44	<i>180</i> , 182 (99)			
1,2,4,5-TeCB	6,78	4,39	215,88	214 (80), <i>216</i>			
2,4,6-TCA (IS)	6,95	3,20	211,47	181 (20), 195 (56), <i>210</i>			
1,2,3,5-TeCB	6,98	4,39	215,88	214 (76), <i>216</i>			
РСВ	7,44	4,99	250,32	248 (63), <i>250</i> , 252 (66)			
НСВ	7,98	5,60	284,77	249 (24), 284 (80), 286			
Los números en cursiva corresponden al ion principal. Los valores entre paréntesis representan el							

Tabla III.2. Calacteristicas de los Ce	Tabla	I.2. Ca	racterísticas	de	los	CBs	
--	-------	---------	---------------	----	-----	-----	--

Se utilizó una centrífuga Unicen 21 (Alresa, Madrid, España) con capacidad para 4 tubos de 100 mL, para el tratamiento de los suelos, y una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) de 8 tubos de 15 mL de capacidad, para la ruptura de la emulsión generada en la etapa IL-DLPME. Para el tratamiento UAE del suelo se requirió un procesador ultrasónico UP 200H (Dr. Hielscher, Teltow, Alemania), equipado con una sonda de titanio (7 mm d.i.) a 200 W de potencia.

2.3. Muestras y procedimiento analítico

porcentaje de abundancia de los iones secundarios respecto del ion principal.

- *Muestras de agua:* se utilizaron 4 muestras de agua (de río, nieve y otras dos de uso agrícola), todas procedentes del sureste de España. Se recogieron volúmenes de alrededor de 200 mL en recipientes ámbar, a su llegada al laboratorio se filtraron a vacío a través de filtros de membrana de nylon 0,45 µm y se almacenaron a 4 °C hasta

su análisis. Para ello, se colocaron 10 mL de muestra en un tubo de vidrio de fondo cónico, añadiéndose el estándar interno (2,4,6-TCA) a la concentración de 50 ng mL⁻¹. Seguidamente, se añadieron de forma separada 275 μ L de una disolución de [C₆MIm]Cl 1 M y 310 μ L de Li[NTf₂] 1 M. La formación del líquido iónico en el seno de la disolución acuosa generó una emulsión formada por finas gotas de IL, permitiendo la rápida transferencia de los CBs. Esta dispersión se rompió por centrifugación durante 2 min a 3000 rpm, depositándose una microgota, de aproximadamente 40 μ L, de IL enriquecida con los CBs, la cual se recogió usando una microjeringa. Se depositaron 40 μ L del extracto de IL en un microvial, que se colocó en un tubo de desorción para ser transferido a la TDU, donde se aplicó el programa de calentamiento optimizado (Tabla III.1) que permitió el análisis GC-MS.

- *Muestras de suelo:* Se analizaron cuatro suelos agrícolas del sureste de España (A, B, C y D). Estos suelos se caracterizaron, recogiéndose sus propiedades en la Tabla III.3. La toma de muestra se realizó en los 20 cm más superficiales de suelo, se secaron al aire durante toda la noche a temperatura ambiente, se trituraron manualmente y se tamizaron usando un tamiz de 2 mm. Por último, se almacenaron en un lugar fresco y seco hasta su análisis.

Parámetros	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
Arcilla (%)	31,7	29,5	46,7	32,9
Limo (%)	23,0	24,7	33,5	30,2
Arena (%)	45,3	45,8	19,8	36,9
Nitrógeno total (%)	0,17	0,13	0,08	0,51
Carbono orgánico total (%)	1,81	1,09	0,72	1,80
pHª	7,77	7,85	7,95	7,30
Conductividad ^a (µS cm ⁻¹)	6430	3870	1320	7300
^a Valores medidos para extractos	acuosos (1:1) a 25	5 °C		

Tabla III.3. Características de los suelos analizados

Para la etapa UAE, se pesaron 2,5 g de muestra en un tubo Falcon de 40 mL, y se añadieron 15 µL de 2,4,6-TCA de 50 µg mL⁻¹ y 15 mL de una disolución reguladora de acetato amónico 0,5 M de pH 4, ajustado con ácido acético. Seguidamente, se sumergió la sonda de ultrasonidos directamente en la mezcla durante 50 s y operando con pulsos de 0,5 s y 105 µm de amplitud. A continuación, la suspensión se centrifugó

durante 4 min a 4000 rpm, y se tomaron 10 mL de la disolución sobrenadante, para proceder a la etapa de preconcentración IL-DLPME previamente descrita para muestras de aguas.

Con fines de validación, se usó como material de referencia certificado CRM143 (BNAs – Sandy Loam 1) obtenido de Sigma-Aldrich. Se analizó dicho material por triplicado aplicando el método UAE-IL-DLPME combinado con TD-GC-MS para comprobar la exactitud del método. Los extractos UAE fueron diluidos adecuadamente teniendo en cuenta los contenidos certificados en CBs (5410±578 y 1460±181 µg kg⁻¹ para 1,2-DCB y 1,4-DCB, respectivamente).

3. Resultados y discusión

3.1. Optimización del procedimiento de extracción de suelos

En la bibliografía se encuentran diferentes formas de extracción de CBs desde matrices de suelo usando tanto disolventes orgánicos [30,32,35] como disoluciones acuosas tamponadas y conteniendo sales en altas concentraciones [29,34,36]. Para optimizar el tratamiento de suelos, se utilizaron 50 mg del material de referencia certificado, y dado que solo contenía dos de los CBs de interés, se fortificó con el resto de los analitos a 80 ng g⁻¹. Con el objetivo de preconcentrar el extracto obtenido mediante IL-DLPME, se ensayaron las siguientes disoluciones acuosas: HCl 0,2 M (pH 2) conteniendo 1,5 y 30% m/v de KCl y NaCl, respectivamente [29], KCl 20% m/v (pH 7) [36] y reguladora de acetato amónico 0,5 M de pH 4 ajustado con ácido acético.

En todos los casos se añadieron 10 mL de fase extractante, la mezcla se sometió a agitación vórtex durante 10 min y la disolución sobrenadante se recuperó tras la centrifugación a 6000 rpm durante 3 min. Cada extracto así obtenido, se sometió a preconcentración mediante IL-DLPME, que había sido previamente optimizada. Como muestra la Figura III.3, la disolución reguladora de acetato amónico proporcionó las recuperaciones más altas.



Fig. III.3: Estudio de diferentes disoluciones extractantes

Seguidamente, se estudió el efecto del pH de la disolución reguladora de acetato amónico desde 2 hasta 9, empleando ácido acético o amoniaco según correspondiese. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.4 y, como puede comprobarse, la eficiencia de extracción aumentó hasta pH 4, disminuyendo para valores de pH superiores, por lo que se seleccionó un pH de 4.



Fig. III.4: Efecto del pH en la eficiencia de extracción

Por otra parte, se estudió la influencia de la aplicación de energía externa durante la etapa de extracción mediante energía de microondas (usando un horno doméstico durante 20 s a 800 W o un digestor a través de un programa que incrementaba la potencia desde 0 hasta 200 W en un minuto, que era mantenida durante 15 min), energía de ultrasonidos (a través de una sonda directamente sumergida en la mezcla muestra:disolución extractante durante 30 s y operando con pulsos de 0,5 s y 105 µm de amplitud), calentando en un baño de agua a 60 °C durante 5 min, aplicando agitación vórtex durante 10 min y, finalmente, la combinación de agitación vórtex y ultrasonidos. La aplicación de energía de ultrasonidos proporcionó los mejores resultados de eficiencia de extracción, por lo que se seleccionó este tipo de energía. Además, se estudió el efecto del tiempo de aplicación en el intervalo de 10 a 90 s (Figura III.5). En términos de sensibilidad, el tiempo de 50 s proporcionó los mejores resultados para la mayoría de los CBs.



Fig. III.5: Estudio del tiempo de extracción mediante UAE

El efecto de la masa de suelo fue estudiado entre 50 mg y 3 g, empleando el CRM fortificado con los CBs no certificados en el material a 80 ng g⁻¹. Las áreas de pico para todos los analitos se vieron incrementadas al aumentar la masa hasta 2,5 g, manteniéndose prácticamente constantes para valores de masa superiores, por lo que se eligió la masa de 2,5 g.

3.2. Optimización del procedimiento IL-DLPME

Para obtener la máxima sensibilidad, se evaluó el efecto de las diferentes variables que afectan a la técnica IL-DLPME.

La bibliografía muestra aplicaciones de ILs como disolventes extractantes en SDME, requiriéndose largos tiempos de extracción debido a la limitada área de contacto entre las fases dadora y aceptora. Por otro lado, la disgregación del IL en el seno de la disolución acuosa aplicando calor ha acortado el tiempo de análisis [16]. Se propone en este Capítulo la generación *in situ* del IL en el seno de la disolución de la muestra a través de una reacción de metátesis. El IL se forma ya disgregado, de modo que la preconcentración se acelera sin necesidad de usar disolvente dispersante, como en DLLME convencional, o aplicar energía externa.

Se han generado *in situ* diferentes ILs, utilizando en todos los casos NTf₂ como componente aniónico por adición de 200 μ L de una disolución 1 M de Li[NTf₂], seguidamente añadiendo 200 μ L de las disoluciones 1 M de [C₆MIm]Cl, [C₈MIm]Cl, [C₁₀MIm]Cl o [C₁₂MIm]Cl, sobre 10 mL de una disolución acuosa de los estándares a 50 ng mL⁻¹. La extracción tuvo lugar de forma instantánea, por lo que, tras unos pocos segundos de agitación manual, se procedió a la centrifugación de la mezcla durante 2 min a 3000 rpm. Se recuperaron volúmenes de IL sedimentado en el rango 20-50 μ L, dependiendo del IL formado; lo que se podría atribuir a que la longitud de la cadena alquílica del IL influye en su solubilidad en agua. Las eficiencias de extracción más altas se obtuvieron, como muestra la Figura III.6, con el IL [C₆MIm][NTf₂] formado, y, considerando su relativa baja polaridad, fue seleccionado como disolvente extractante.



Fig. III.6: Efecto de la naturaleza del IL en la extracción de los CBs

Una vez seleccionado el IL, se llevó a cabo un estudio multivariante mediante un diseño Taguchi para estudiar el efecto de tres factores (cada uno de ellos a tres niveles) sobre la eficiencia de preconcentración: volumen de fase acuosa (6, 8 y 10 mL) volumen de IL (300, 500 y 700 µL), y concentración de NaCl en la fase acuosa (0, 2 y 3% m/v). El diseño dio lugar a nueve experimentos. La fase acuosa empleada fue una disolución conteniendo los analitos a 50 ng mL⁻¹. Los volúmenes de IL ensayados corresponden al volumen total proporcionado por mezclas 1:1 de sus componentes iónicos.

Los resultados obtenidos aparecen en la Figura III.7, permitiendo concluir que la mejor sensibilidad en términos de área de pico se consiguió con el mayor volumen ensayado de fasea acuosa (10 mL) y con 500 µL de IL. Sin embargo, se observa un descenso de la señal al añadir cloruro sódico en todo el intervalo estudiado, por lo que se descartó la adición de sal.



Fig. III.7: Efecto del volumen de muestra, volumen de IL y concentración de NaCl en la eficiencia de IL-DLPME.

El tiempo de extracción no se incluyó en el estudio, puesto que el equilibrio se alcanzó prácticamente de forma instantánea. La centrifugación se estableció a 3000 rpm durante 2 min, condiciones que proporcionaron una separación eficiente de la fase enriquecida.

La formación y el volumen recuperado de IL se puede ver afectado por la relación estequiométrica entre sus componentes iónicos. En consecuencia, se estudió la proporción apropiada usando un diseño central compuesto (CCD; $\alpha = 1,5$; 4 puntos cúbicos; 4 puntos axiales y 4 puntos centrales). Se estudió el rango de 125 a 275 µL de

la parte catiónica $[C_6MIm]^+$, frente a la relación $[NTf_2]^-/[C_6MIm]^+$ entre 0,75-1,65. Este estudio generó 16 experimentos, recogidos en la Tabla III.4, donde se muestran los volúmenes añadidos de ambos componentes del IL, la relación entre ellos y el volumen final de IL. Se puede observar que, mayoritariamente, los valores centrales probados del IL total formado estuvieron en el rango de 400 y 500 µL.

Encovo	Volumen de	Relación	Volumen de	Volumen de
ElisdyO	[C ₆ MIm] ⁺ (μL)	$([NTf_2]/[C_6MIm]^+)$	[NTf ₂] ⁻ (μL)	$[C_6MIm][NTf_2]$ (µL)
1	150	1,5	225	375
2	200	1,2	240	440
3	150	0,9	135	285
4	250	0,9	225	475
5	250	1,5	375	625
6	200	1,2	240	440
7	200	1,2	240	440
8	200	1,2	240	440
9	200	0,75	150	350
10	125	1,2	150	275
11	200	1,2	240	440
12	200	1,2	240	440
13	275	1,2	330	605
14	200	1,65	330	530
15	200	1,2	240	440
16	200	1,2	240	440

 Tabla III.4. Diseño CCD para el estudio de la relación entre los componentes iónicos del

 IL formado

Como se muestra en la Figura III.8, las respuestas máximas fueron obtenidas con un volumen de 275 μ L del catión [C₆MIm]⁺ y la relación 1,12, lo que corresponde a 310 μ L de la parte aniónica [NTf₂]⁻. Estas condiciones permitieron la recuperación de un volumen de gota enriquecida de 40 μ L.



Fig. III.8: Diseño CCD para el estudio de la proporción entre las partes iónicas del IL

3.3. Condiciones de desorción térmica

Con objeto de introducir en el sistema GC-MS los CBs preconcentrados mediante IL-DLPME, usando una microjeringa se colocaron 40 μ L de IL sedimentado en un microvial y se sometió a desorción térmica. La fase de IL enriquecida se obtuvo mediante preconcentración IL-DLPME de 10 mL de una disolución acuosa de los CBs a 50 ng mL⁻¹ bajo las condiciones experimentales optimizadas. Para estudiar el efecto de los parámetros más influyentes en esta etapa, se aplicó un diseño CCD ($\alpha = 1,5; 4$ puntos cúbicos; 4 puntos axiales y 4 puntos centrales). Las tres variables consideradas y los intervalos en los que fueron estudiadas fueron tiempo de desorción (0,5-9,5 min), temperatura de desorción (205-280 °C) y velocidad de flujo del gas de desorción (35-110 mL min⁻¹).

Como era de esperar, la sensibilidad más alta se consiguió a la máxima temperatura ensayada (Fig. III.9), ya que las temperaturas altas favorecen el proceso de vaporización. No se probaron temperaturas superiores por la posible descomposición térmica del extractante, que podría originar ruido de fondo en el cromatograma. La vaporización no es instantánea, debido al relativo gran volumen del extractante, por lo que la temperatura se debe mantener durante un tiempo en la TDU. El tiempo de desorción se estudió entre 0,5 y 9,5 min, y se obtuvo la máxima señal con 7,6 min (Fig. III.9). Durante la etapa de desorción, se aplica un flujo de gas portador que promueve

la vaporización de los analitos y los arrastra hacia la zona de refrigeración en el CIS. La variación del flujo de helio en el intervalo 35-110 mL min⁻¹, mostró que el valor más bajo ensayado (35 mL min⁻¹) proporcionó la máxima sensibilidad. Por tanto, bajo las condiciones seleccionadas la fase IL fue sometida en el microvial a una temperatura de 280 °C, mantenida durante 7,6 min y aplicando un flujo de helio de 35 mL min⁻¹.



Fig. III.9: Resultados de la optimización, mediante diseño CCD, de la temperatura, tiempo de calentamiento y flujo de gas aplicado en TDU

Antes de entrar en la columna, los CBs vaporizados son retenidos en el PTV. La capacidad de retención de diferentes materiales de relleno del *liner* del PTV fue estudiada para este propósito. Los materiales ensayados fueron Tenax, lana de vidrio de sílice, lana de vidrio de cuarzo y polidimetilsiloxano (PDMS). Como se puede observar en la Figura III.10, Tenax proporcionó la mejor retención para los analitos más volátiles, mientras que los más pesados eran más eficientemente retenidos con PDMS. Teniendo en cuenta el promedio de todos los compuestos, Tenax fue finalmente seleccionado.

Además, si el PTV se mantiene a baja temperatura mientras los analitos son desorbidos en la TDU, se mejora su retención, reduciendo las posibles pérdidas de los compuestos más volátiles. Para ello se usó una unidad Peltier, que permite enfriar a temperaturas ligeramente inferiores que la temperatura ambiente, siendo en este caso termostatado el PTV a 15 °C.



Fig. III.10: Efecto del material de relleno del liner en el PTV

Después de la etapa de desorción, el PTV se calienta durante un tiempo seleccionado para transferir los compuestos retenidos en el *liner* hacia la columna cromatográfica. El efecto de la temperatura (150-350 °C) y el tiempo de calentamiento (1,5-5 min), se estudió mediante un CCD (α = 1,5; 4 puntos cúbicos; 4 puntos axiales y 4 puntos centrales). La Figura III.11 muestra los resultados obtenidos en forma de superficie de respuesta. Teniendo en cuenta la media obtenida para las respuestas de los diez CBs, se adoptó finalmente un programa de calentamiento desde 15 hasta 313 °C a una velocidad de 530 °C min⁻¹, temperatura mantenida durante 3,8 min.



Fig.III.11: Gráfico de superficie de respuesta para la optimización de los parámetros aplicados en el PTV

3.4. Validación del método y efecto matriz

Se seleccionó 2,4,6-TCA como estándar interno, ya que tiene un comportamiento cromatográfico y una estructura molecular similar a los analitos, y además se comprobó que no estaba presente en las muestras a analizar. Su adición a las muestras de agua a una concentración de 50 ng mL⁻¹, permitió mejorar la repetitividad del método, que fue evaluada por medio de diez análisis consecutivos de una muestra de agua fortificada con los CBs (50 ng mL⁻¹). Los valores de RSD estuvieron entre 3 y 5%, según el compuesto, demostrando una excelente precisión.

Se obtuvieron gráficas de calibrado representando el cociente entre las áreas de pico de cada analito y la del IS frente a la concentración de analito. Se comprobó que existía relación lineal en el intervalo estudiado entre 0,05 y 100 ng mL⁻¹, con valores de coeficiente de regresión apropiados (R²>0,99) en todos los casos. Las pendientes para las rectas de calibrado obtenidas mediante el método de adiciones estándar a cuatro muestras de agua, se evaluaron mediante un test ANOVA (Tabla III.5). La comparación de los valores de "p" mostraron la ausencia de diferencias estadísticas significativas entre las muestras y las disoluciones de los estándares acuosos, validando la cuantificación de las mismas frente a estándares acuosos.

Compuesto	Estándares		Niovo	Agua de	Agua de		
Compuesto	acuosos	Agua de no	Meve	riego 1	riego 2		
1,4-DCB	0,078±0,004	0,083±0,002	0,090±0,007	0,095±0,003	0,102±0,006		
1,3-DCB	0,081±0,005	0,080±0,002	0,087±0,006	0,092±0,003	0,099±0,005		
1,2-DCB	0,076±0,004	0,081±0,002	0,089±0,006	0,092±0,003	0,100±0,005		
1,3,5-TCB	0,073±0,003	0,078±0,002	0,083±0,005	0,086±0,002	0,092±0,005		
1,2,4-TCB	0,058±0,002	0,062±0,001	0,065±0,003	0,066±0,002	0,070±0,003		
1,2,3-TCB	0,047±0,001	0,050±0,001	0,052±0,002	0,052±0,001	0,055±0,002		
1,2,4,5-TeCB	0,029±0,001	0,030±0,001	0,030±0,001	0,030±0,001	0,029±0,001		
1,2,3,5-TeCB	0,023±0,001	0,023±0,001	0,023±0,001	0,023±0,001	0,022±0,001		
РСВ	0,010±0,001	0,011±0,001	0,011±0,001	0,011±0,001	0,011±0,001		
НСВ	0,0026±0,001	0,0028±0,0005	0,0031±0,001	0,0032±0,0005	0,0034±0,0005		
^a Valor medio ± desviación estándar (n=6)							

Tabla III.5. Pendientes^a (mL ng⁻¹) de las rectas de calibrado para muestras de agua

Sin embargo, la comparación de las pendientes mediante el test ANOVA para las cuatro muestras de suelo (Tabla III.6), sí mostró la existencia de diferencias significativas

con respecto a la calibración frente a estándares acuosos y, por tanto, la presencia de efecto matriz, por lo que se propone el método de adiciones estándar para su cuantificación.

Compuesto	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D			
1,4-DCB	3,3±0,1	6,3±0,1	4,5±0,2	11,6±0,6			
1,3-DCB	3,2±0,1	6,3±0,1	4,4±0,2	12,7±0,6			
1,2-DCB	3,3±0,3	8,3±0,2	5,6±0,3	14,9±1,3			
1,3,5-TCB	0,90±0,03	3,0±0,1	1,8±0,1	7,4±0,3			
1,2,4-TCB	0,64±0,03	3,0±0,1	1,7±0,1	6,9±0,3			
1,2,3-TCB	0,48±0,02	2,7±0,1	1,4±0,1	5,6±0,1			
1,2,4,5-TeCB	0,03±0,01	0,60±0,03	0,35±0,06	1,70±0,04			
1,2,3,5-TeCB	0,003±1,2e-4	0,50±0,03	0,11±0,02	1,5±0,10			
РСВ	0,03±0,002	0,07±0,01	0,008±0,003	0,43±0,02			
НСВ	0,002±1,50e-4	0,001±2,53e-4	0,001±1,08e-4	0,069±0,008			
^a Valor medio + desviación estándar (n=6): Pendientes expresadas en $\alpha \mu \alpha^{-1}$							

Tabla III.6. Pendientes^a de las rectas de calibrado para muestras de suelo

Los límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs) se calcularon usando el criterio de relación señal/ruido igual a 3 y 10, respectivamente. Como se resume en la Tabla III.7, los LDs estuvieron entre 0,52 y 7,2 ng L⁻¹ y los LQs entre 1,5 y 22 ng L⁻¹ para muestras de agua. Para las muestras de suelo, los LDs estuvieron en el rango 8,4-252 ng kg⁻¹ y los LQs en el intervalo 28-840 ng kg⁻¹, dependiendo del analito y la muestra. Los valores de LD y LQ para suelos mostrados en la Tabla III.7 fueron obtenidos considerando el promedio de las pendientes de las diferentes muestras de suelo. En cualquier caso, los valores más bajos y más altos corresponden a 1,2,4,5-TeCB y HCB, respectivamente.

Compuestos	LQ ^a	LD ^b	RSD ^c	LQª	LD ^b			
Compuestos	(ng L ⁻¹)	(ng L ⁻¹)	(%)	(ng kg⁻¹)	(ng kg⁻¹)			
1,4-DCB	4,03	1,34	5,0	38	11			
1,3-DCB	3,92	1,30	5,1	32	9,6			
1,2-DCB	4,23	1,41	5,0	28	8,4			
1,3,5-TCB	1,72	0,57	5,3	57	17			
1,2,4-TCB	2,67	0,89	5,2	60	18			
1,2,3-TCB	3,12	1,04	4,9	63	19			
1,2,4,5-TeCB	1,55	0,52	4,5	150	45			
1,2,3,5-TeCB	1,86	0,62	4,7	158	247			
PCB	6,64	2,12	4,6	360	108			
НСВ	21,5	7,16	5,0	840	252			
^a Calculado para S/N	^a Calculado para S/N=10. ^b Calculado para S/N=3. ^c n=10							

 Tabla III.7.
 Características analíticas del método

En las Tablas III.8 y III.9 se muestra una comparación del método propuesto con otros publicados previamente para la cuantificación de CBs en aguas y suelos, respectivamente. Se puede comprobar que la sensibilidad proporcionada por el método aquí presentado se encuentra entre las más altas, como consecuencia del modo de inyección aquí empleado, pues se consigue analizar el extracto entero de líquido iónico obtenido. Esto también lo hicieron otros investigadores [8,9], sin embargo, ellos lo aplicaron a la técnica SDME la cual consume tiempos de extracción más largos puesto que tienen un área superficial limitada entre las fases dadora y aceptora. Se puede observar que hay tiempos de extracción más cortos [12,20], en cambio, sus métodos implican el uso de disolvente halogenados, mientras que los líquidos iónicos son disolventes "verdes".

En otros casos donde la sensibilidad alcanzada es muy baja, es debido al alto consumo de volumen utilizado (0,5 L) pues se trata del procedimiento convencional LLE [18] o el basado en la microextracción en fase sólida mediante en un imán [25] cuyas desventajas podrían ser un mayor tiempo de extracción y la necesidad de sintetizar la fase extractante. Además, el consumo nulo de disolventes orgánicos, el bajo tiempo requerido y el alto número de CB determinados simultáneamente pueden señalarse como ventajas del método desarrollado.

Este trabajo Ξ [16] Ref. 21] [19] [18] [10] [14] 17 25] [27] [13] [15] [12] [20] [6] 8 0,018 НCВ 4,7 0,5 7,2 45 و \sim 0,015 0,149 PCB 0,5 28 2,1 2,1 و 4 magnético 1,4-DCB 1,3-DCB 1,2-DCB 1,3,5-TCB 1,2,4-TCB 1,2,3-TCB 1,2,4,5-TeCB 1,2,3,5-TeCB 0,301 0,011 0,6 102 28 ω \sim ī و 4 ī \sim = fibra hueca; MIL 0,134 0,008 110 102 2,6 0,5 20 7 m ω \sim \sim LDs (ng L⁻¹) 0,153 0,005 AE = acetato de etilo; Mag-HSAE = extracción por adsorción magnética en espacio de cabeza; TC = temperatura controlada; HF 3,4 100 100 13 102 7 4 Ь \sim . 0,006 0,131 122 100 6'0 ۲ 4 50 12 10 31 9 4 ω \sim \sim Tabla III.8. Comparación de las características analíticas de los procedimientos propuestos para muestras de agua 0,193 0,005 2,4 100 0,6 122 19 و 4 4 \sim ı 0,006 0,173 102 1,4 4 L 9 12 9 42 50 7 و 20 80 \sim و 0,125 0,008 1,3 2,9 152 10 10 9 20 69 20 50 و 80 ω ı 0,093 0,008 203 1,34 500 100 2,7 20 74 50 50 و ი \sim ഹ 4 ı -D-GC-MS **FD-GC-MS** TD-GC-MS Detección LC-DAD GC-ECD GC-ECD GC-ECD LC-DAD GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-MS GC-FID GC-MS GC-MS Volumen de muestra (mL) 500 200 15 10 20 20 15 10 10 10 40 15 10 ഹ ω ഹ ഹ Tiempo (min) Tratamiento de la muestra 99 45 10 30 10 50 30 49 4 09 37 4 ഹ 9 ı. \sim \sim 15 µL bromooctano 9 μL isooctano 11 mL AE + 4 mL MeOH 50 mL hexano 20 µL acetona 15 μL tolueno 20 µL tolueno Consumo de disolvente 300 µL CS2 9,5 µL CB 585 µL IL 1 µL MIL 75 µL IL 5 µL IL 5 µL IL 0 0 0 TC-HS-LPME IL-HS-SDME HS-IL-SDME TC-IL-LPME Mag-HSAE Mag-HSAE HS-SDME IL-DLPME HS-SPME USAEME HF-LPME DLLME Técnica MSPE HSSE SBSE SPE Щ

128

A. Oller Ruiz

	Tratamianto da la mi	actra													
		פווכם							LDs	(ng g ⁻¹)					
Técnica	Consumo de disolvente	Tiempo (min) m	Masa de uestra (g)	Deteccion	1,4-DCB	1,3-DCB	1,2-DCB	1,3,5-TCB	1,2,4-TCB ⁻	1,2,3-TCB 1	,2,4,5-TeCB	1,2,3,5-TeCB	PCB	HCB	Ket.
PSWE-SBME	17 mL agua:AcN	210	10	GC-MS	I	ı	ı	ı	ı	I	0,003	ı	0,002	0,004	[35]
UAWE-SBSE	4 µL 1-octanol	80	-	GC-MS	I	ı	ı	ı	ı	1,3	I	0,7	ı	27,3	[34]
SPME	0	26	0,1	GC-MS	ı			0,055	0,046	0,03	0,05	0,04	0,1	ı	[28]
UAE-SPE	2 mL acetona + 23 mL hexano	ı	10	GC-ECD	2	. 	-	,	0,1	ı	I	ı	ı	I	[32]
HS-IL-SDME	16 µL IL	120	L2	TD-GC-FID	2	2	. 	ı	ı	I	I	ı	ı	ı	[29]
SHS	0	30	2	GC-MS	2,7	2,7	2,9	ı	m	m	ı	ı	ı	ı.	[36]
UAE-MSPE	20 mL MeOH+ 3 mL acetona:DCM	31	ъ	GC-MS		600'0		0,013		0,016	ı	0,024	0,0026	0,031	[33]
UAE-IL-DLPMI	Ξ 585 μL IL	ω	2,5	TD-GC-MS	0,011	0,010	0,008	0,017	0,018	0,019	0,045	0,047	0,108	0,252 _t	Este rabajo
UAWE = extra	cción en agua asistida	por ultras	onidos; SH	S = espacio	de cabez	a estático									

Tabla III.9. Comparación de las características analíticas de los procedimientos propuestos para muestras de suelo

IL-DLPME-GC-MS para la determinación de CBs en muestras medioambientales

La exactitud del método UAE-IL-DLPME con TD-GC-MS aplicado a suelos se estudió analizando por triplicado el material de referencia certificado "CRM 143 BNAs – Sandy Loam 1", con contenidos certificados para 1,2-DCB (5410±578 ng g⁻¹) y 1,4-DCB (1460±181 ng g⁻¹), empleando 2,5 g. La dilución de 0,5 mL del extracto UAE hasta 10 mL fue necesaria de forma previa a la preconcentración, considerando las elevadas concentraciones certificadas. Los contenidos encontrados fueron 5794±422 ng g⁻¹ para 1,2-DCB y 1398±355 ng g⁻¹ para 1,4-DCB, expresados como valor medio±desviación estándar (n=6). Mediante comparación de los contenidos certificados y los obtenidos aplicando el procedimiento propuesto a través de un *t*-test (95% de nivel de confianza), se obtuvieron valores de "p" de 0,405 y 0,801 para 1,2-DCB y 1,4-DCB, respectivamente. Por tanto, no se encontraron diferencias significativas entre los contenidos certificados y los experimentales.

Por otro lado, también se estudió la exactitud del método mediante estudios de recuperación sobre dos muestras de suelo fortificadas con los 10 CBs a dos niveles de concentración (25 y 75 ng g⁻¹). Cada muestra de suelo fue analizada por duplicado. Las recuperaciones obtenidas se encontraron entre 81-135 y 83-106% para el nivel de fortificación más bajo y el más alto, respectivamente.

Para las muestras de agua, puesto que no se disponía de material de referencia certificado, se llevaron a cabo estudios de recuperación en dos muestras (de río y nieve) fortificadas a 15 y 50 ng mL⁻¹ para 1,2,4,5-TeCB, 1,2,3,5-TeCB, PCB y HCB, y para el resto de CBs a 5 y 20 ng mL⁻¹. Las recuperaciones estuvieron en los rangos 95-126 y 88-107% para los niveles más bajos (5 y 15 ng mL⁻¹) y los más altos (20 y 50 ng mL⁻¹), respectivamente.

3.5. Análisis de las muestras

El procedimiento optimizado IL-DLPME con TD-GC-MS se aplicó al análisis de cuatro muestras de agua y cuatro suelos agrícolas previamente sometidos a UAE. Las muestras de agua de río y nieve se mostraron libres de estos contaminantes, por encima de los correspondientes LDs. En las aguas de riego se encontraron alguno de los CBs estudiados, como muestra la Tabla III.10, donde también aparecen los resultados de los análisis de los suelos agrícolas. Se encontraron CBs en el rango 2,7-256 ng L⁻¹ para aguas y entre 1,5 y 50 ng g⁻¹ para suelos. Los compuestos 1,3,5-TCB,

1,2,4,5-TeCB, PCB y HCB no se detectaron en ninguna de las muestras analizadas, siendo además los más tóxicos por su alto contenido de átomos de cloro. Puesto que estos contaminantes son empleados en la agricultura o pueden llegar al medioambiente fácilmente desde distintas fuentes, no es sorprendente que se hayan encontrado en suelos y aguas de procedencia agrícola.

Compuesto	Agua de riego 1	Agua de riego 2	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D			
	ilege i	nege 1							
1,4-DCB	41±6,1	ND	9,2±1,6	1,9±0,07	2,7±0,2	1,5±0,2			
1,3-DCB	34±5,0	ND	13±1,3	3,6±0,5	4,5±0,3	2,2±0,3			
1,2-DCB	256±15	ND	50±1	10±0,2	ND	15±1,2			
1,2,4-TCB	31±2,8	ND	11±0,7	ND	ND	2,8±0,52			
1,2,3-TCB	ND	ND	3,2±0,4	ND	ND	ND			
1,2,3,5-TeCB	ND	2,7±0,1	ND	ND	ND	ND			
Madia da las val	ana i dan iasi	án antán dan (n. 2)							

Tabla III.10. Contenidos encontrados de CBs en las muestras medioambientales

Media de los valores \pm desviación estándar (n=3), expresados en ng L⁻¹ para aguas y ng g⁻¹ para suelos. ND significa no detectado

La Figura III.12 muestra el cromatograma obtenido mediante el procedimiento optimizado para la muestra de suelo D, fortificado con los CBs a 100 ng g⁻¹ (A) y sin fortificar (B). Puede apreciarse que no aparecen picos interferentes a los tiempos de retención de los analitos, pudiendo así ser identificados inequívocamente comparando sus tiempos de retención y sus espectros de masas con los obtenidos de disoluciones de los estándares y las muestras fortificadas.



Fig. III.12: Cromatograma obtenido mediante el método desarrollado para la muestra de suelo D (A) fortificada a 100 ng g⁻¹ y (B) no fortificada

4. Conclusiones

La generación *in situ* del IL empleado como extractante en la preconcentración DLPME conduce a la dispersión directa del extractante, evitando el uso de disolventes dispersantes o aplicación de energía externa. De esta forma, se consigue incrementar la superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora que lleva a una extracción eficiente e instantánea.

Además, el uso de TD desde el microvial ha demostrado ser una forma de introducción de muestra adecuada y eficiente para análisis mediante GC, aprovechando la estabilidad térmica que caracteriza a los ILs. Además, la posibilidad de análisis de relativamente elevados volúmenes de fase extractante incrementa la sensibilidad del método de forma notable.

Finalmente, se concluye que el procedimiento desarrollado IL-DLPME con TD-GC-MS presenta muy buenas características analíticas, en términos de selectividad, precisión, sensibilidad y exactitud, para análisis de aguas y suelos.

Referencias

[1] J.L. Barber, A.J. Sweetman, D. Van Wijk, K.C. Jones, Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes, Sci. Total Environ. 349 (2005) 1–44.

[2] R.E. Bailey, D. van Wijk, P.C. Thomas, Sources and prevalence of pentachlorobenzene in the environment, Chemosphere 75 (2009) 555–564.

[3] International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, 2001.

 [4] Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, Off. J. Eur. Union 348 (2008) 84–97.

[5] I. Navarro, A. de la Torre, P. Sanz, M.A. Arjol, J. Fernández, M.A. Martínez, Organochlorine pesticides air monitoring near a historical lindane production site in Spain, Sci. Total Environ. 670 (2019) 1001–1007.

[6] F. Khalilian, M. Rezaee, Development of a sensitive methodology for the analysis of chlorobenzenes in water samples by combination of homogeneous liquid-liquid microextraction via flotation assistance and gas chromatography-flame ionization detection, J. Chin. Chem. Soc. 61 (2014) 1351–1356.

[7] F. Zhao, S. Lu, W. Du, B. Zeng, Ionic liquid-based headspace single-drop microextraction coupled to gas chromatography for the determination of chlorobenzene derivatives, Microchim. Acta 165 (2009) 29–33.

[8] A. Chisvert, I.P. Román, L. Vidal, A. Canals, Simple and commercial readily-available approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography. Determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1290–1295.

[9] E. Fernández, L. Vidal, A. Canals, Hydrophilic magnetic ionic liquid for magnetic headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. (2017) 1–9.

[10] X. Ma, J. Ma, Determination of trace amounts of chlorobenzenes in water using membrane-supported headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry, J. Anal. Chem. 72 (2017) 890–896.

[11] Z.Y. Luo, H.Y. Liu, Z.G. Shi, Novel mode of liquid-phase microextraction: A magnetic stirrer as the extractant phase holder, J. Sep. Sci. 39 (2016) 399–404.

[12] M.I. Leong, S.D. Huang, Determination of volatile organic compounds in water using ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography, J. Sep. Sci. 35 (2012) 688–694.

[13] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, A simple device for headspace sorptive extraction prior to gas chromatography–mass spectrometry analysis, Talanta 195 (2019) 796–799.

[14] S. Chen, H. Peng, D. Wu, Y. Guan, Temperature-controlled headspace liquid-phase microextraction device using volatile solvents, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 5883–5889.

[15] L. Vidal, E. Psillakis, C.E. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples, Anal. Chim. Acta 584 (2007) 189–195.

[16] F. Kamarei, H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, Optimization of temperaturecontrolled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for analysis of chlorobenzenes in water samples, Talanta 83 (2010) 36–41.

[17] A. Esrafili, Y. Yamini, M. Ghambarian, S. Seidi, M. Moradi, Analysis of trace amounts of chlorobenzenes in water samples: An approach towards the automation of dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction, Microchim. Acta 176 (2012) 367–374.

[18] A.A. Meharg, J. Wright, D. Osborn, Chlorobenzenes in rivers draining industrial catchments, Sci. Total Environ. 251–252 (2000) 243–253.

[19] M. Saraji, N. Khaje, Phenyl-functionalized silica-coated magnetic nanoparticles for the extraction of chlorobenzenes, and their determination by GCelectron capture detection, J. Sep. Sci. 36 (2013) 1090–1096.

[20] R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.R.M. Hosseini, M.R. Jamali, Partper-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection, Talanta 72 (2007) 387–393.
IL-DLPME-GC-MS para la determinación de CBs en muestras medioambientales

[21] Y. Wang, H. Kee Lee, Determination of chlorobenzenes in water by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 803 (1998) 219–225.

[22] X.J. Li, C.W. Ye, X.L. Huo, Z. Zeng, Solid-phase microextraction using a diglycidyloxycalix[4]arene coated fiber combined with gas chromatography: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of chlorobenzenes in water, Microchim. Acta 168 (2010) 161–167.

[23] H. Cheng, F. Wang, Y. Bian, R. Ji, Y. Song, X. Jiang, Co- and selfactivated synthesis of tailored multimodal porous carbons for solid-phase microextraction of chlorobenzenes and polychlorinated biphenyls, J. Chromatogr. A 1585 (2019) 1–9.

[24] H. Bagheri, F. Karimi Zandian, H. Javanmardi, A. Abbasi, T. Golzari Aqda, Nanostructured molybdenum oxide in a 3D metal organic framework and in a 2D polyoxometalate network for extraction of chlorinated benzenes prior to their quantification by GC–MS, Microchim. Acta 185 (2018) 536–546.

[25] L. Vidal, M. Ahmadi, E. Fernández, T. Madrakian, A. Canals, Magnetic headspace adsorptive extraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Chim. Acta 971 (2017) 40–47.

[26] E. Ghasemi, M. Sillanpää, Optimization of headspace solid phase microextraction based on nano-structured ZnO combined with gas chromatographymass spectrometry for preconcentration and determination of ultra-traces of chlorobenzenes in environmental samples, Talanta 130 (2014) 322–327.

[27] Y. He, Y. Wang, H.K. Lee, Trace analysis of ten chlorinated benzenes in water by headspace solid-phase microextraction, J. Chromatogr. A 874 (2000) 149–154.

[28] M. Sarrión, F. Santos, M. Galceran, Strategies for the analysis of chlorobenzenes in soils using solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-ion trap mass spectrometry, J. Chromatogr. A 819 (1998) 197–209.

[29] S.Y. Dong, Z. Yang, T.L. Huang, Ionic liquid-based headspace liquidphase micro-cxtraction for the determination of dichlorobenzene isomers in soils, Chromatographia 72 (2010) 1137–1141.

[30] Y. Song, F. Wang, Y. Bian, Y. Zhang, X. Jiang, Chlorobenzenes and organochlorinated pesticides in vegetable soils from an industrial site, China, J. Environ. Sci. 24 (2012) 362–368.

[31] G. Shen, H.K. Lee, Headspace liquid-phase microextraction of chlorobenzenes in soil with gas chromatography-electron capture detection headspace liquid-phase microextraction of chlorobenzenes in soil with gas chromatography-electron capture detection, Anal. Chem. 75 (2003) 98–103.

[32] J. Zhang, W. Zhao, J. Pan, L. Qiu, Y. Zhu, Tissue-dependent distribution and accumulation of chlorobenzenes by vegetables in urban area, Environ. Int. 31 (2005) 855–860.

[33] J. Zhang, N. Gan, S. Chen, M. Pan, D. Wu, Y. Cao, β-Cyclodextrin functionalized meso-/macroporous magnetic titanium dioxide ddsorbent as extraction material combined with gas chromatography-mass spectrometry for the detection of chlorobenzenes in soil samples, J. Chromatogr. A 1401 (2015) 24–32.

[34] L. Wang, L. Wang, J. Chen, W. Du, G. Fan, X. Lu, Ultrasonic-assisted water extraction and solvent bar microextraction followed by gas chromatography-ion trap mass spectrometry for determination of chlorobenzenes in soil samples, J. Chromatogr. A 1256 (2012) 9–14.

[35] R. Rodil, P. Popp, Development of pressurized subcritical water extraction combined with stir bar sorptive extraction for the analysis of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in soils, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 82–90.

[36] A. Serrano, M. Gallego, Sorption study of 25 volatile organic compounds in several Mediterranean soils using headspace-gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1118 (2006) 261–270.

[37] H. Hu, T. Li, X. Sun, X.X. Zhang, X.X. Zhang, Z. Zhong, Y. Guo, Determination of benzene series compounds and chlorobenzenes in water sample by static headspace gas chromatography with flame ionization detection, J. Sep. Sci. 38 (2015) 1916–1923.

[38] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Direct coupling of ionic liquid based single-drop microextraction and GC/MS, Anal. Chem. 80 (2008) 793–800.

IL-DLPME-GC-MS para la determinación de CBs en muestras medioambientales

[39] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, In situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphorus pesticides, J. Chromatogr. A 1559 (2018) 95–101.

CAPÍTULO IV

Monitorización de toxinas marinas lipofílicas mediante microextracción dispersiva líquido-líquido y cromatografía líquidaespectrometría de masas con triple cuadrupolo



Resumen

Se propone por primera vez el empleo de una extracción miniaturizada, microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), para la preconcentración de trece toxinas marinas lipofílicas en muestras de agua de mar. Para ello, a 12 mL de muestra se añadieron 0,5 mL de metanol y 440 µL de cloroformo. La fase orgánica enriquecida fue evaporada y reconstituida en metanol, y analizada mediante cromatografía líquida en fase reversa con espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (RP-LC-QqQ-MS²). Se usó un método multivariante de diseño central compuesto (CCD) para la optimización de los parámetros interrelacionados que afectan a la eficiencia de la etapa DLLME. Debido a la ausencia de efecto matriz en las muestras, se propone su cuantificación frente a estándares acuosos. El método DLLME-LC-QqQ-MS² optimizado se validó mediante estudios de recuperación, obteniéndose valores en el rango 89-121%. Los límites de detección variaron entre 0,2 y 5,7 ng L⁻¹, dependiendo del analito, y la precisión del procedimiento se evaluó en términos de desviación estándar relativa (RSD), encontrando valores en el intervalo 0,1-7,5%. No se detectó ninguna de las toxinas estudiadas en las muestras del Mar Menor analizadas.

1. Introducción

La importancia del papel que los microorganismos fotosintéticos juegan en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos es indiscutible; sin embargo, su capacidad para producir toxinas les convierte en foco de atención para el control de dichos ecosistemas, preservando en último término la salud animal y humana [1]. Las toxinas acuáticas pueden aparecer tanto en cuerpos de agua dulce como salada. En ambientes marinos, el fitoplancton es el principal productor de toxinas, de ahí que se conozcan como ficotoxinas. Las toxinas que han generado mayor preocupación para la salud pública en agua dulce son las cianotoxinas. Sin embargo, no siempre es posible delimitar totalmente entre fico- y cianotoxinas [2].

Las toxinas marinas son metabolitos secundarios generados por diversas especies de fitoplancton cuando se someten a condiciones climáticas y ambientales adversas. Dado que el fitoplancton sirve de alimento a muchos organismos acuáticos, pueden producirse fenómenos de biomagnificación, al entrar en la cadena trófica y ocasionar graves problemas de salud en humanos. Los organismos filtradores, capaces de filtrar grandes volúmenes de agua a lo largo de su vida, y el marisco son las especies en las que mayor bioacumulación de toxinas marinas se ha detectado.

Los episodios de proliferación de fitoplancton suelen ser eventuales y sólo en puntos localizados de ciertos cuerpos de agua con altos niveles de contaminación. Sin embargo, cuando ocurren, bien en zonas de cultivo de marisco o de pesca para consumo humano, o incluso en aguas de mar de zonas de baño, conllevan la aparición de problemas económicos, sanitarios y ambientales. En los últimos años, se han producido varios casos de proliferación de fitoplancton en las costas europeas [3], y en España, concretamente en las costas de Andalucía [4], Galicia [5], la Comunidad Valenciana [6] y en el Mar Menor de la Región de Murcia [7]. El aumento de la temperatura del agua, cambios de salinidad, la entrada de nutrientes procedentes de actividad agrícola o descargas de residuos urbanos, son algunos de los factores que favorecen la proliferación del fitoplancton y el consiguiente aumento de la concentración de toxinas en los medios acuáticos. Estas variables han sido decisivas en los problemas detectados en los últimos años en las aguas del Mar Menor de Murcia (sureste de España), especialmente en el verano de 2016. A raíz de la eutrofización detectada en el Mar Menor, se activaron protocolos de vigilancia. En esta línea se encuentra la monitorización de la presencia de toxinas en el agua de este ecosistema.

Atendiendo a su estructura química las toxinas marinas suelen clasificarse en ocho grupos: azaspirácidos (AZAs), brevetoxinas, iminas cíclicas, ácido domoico, ácido okadaico (OA), pectenotoxinas (PTXs), saxitoxinas y yesotoxinas. Las dinofisitoxinas (DTXs) se hallan incluidas en el grupo del OA [8].

De acuerdo con su carácter polar, las toxinas marinas pueden clasificarse en hidrofílicas, lipofílicas y anfifílicas [9]. Las principales familias incluidas en el grupo de las lipofílicas son: OA y DTXs, PTXs, yesotoxinas, AZAs y CIs (que a su vez incluye espirolidas (SPXs), pinatoxinas, pteriatoxinas y gimnodiminas (GYMs)).

Según los órganos diana y los síntomas observados en estudios con animales o en intoxicaciones humanas, las toxinas acuáticas pueden clasificarse en toxinas que causan: intoxicación paralítica por mariscos (PSP), intoxicación amnésica por mariscos (ASP), intoxicación diarreica por mariscos (DSP), intoxicación neurotóxica por mariscos (NSP) e intoxicación por peces ciguatera (CFP), habiendo dado lugar este último efecto a la clasificación de las llamadas ciguatoxinas. Aunque suelen aparecer síndromes adicionales, cada tipo de envenenamiento está asociado con un grupo específico de biotoxinas [2]. Así, por ejemplo, OA, DTXs, PTXs, yesotoxinas, AZAs, SPXs y GYMs provocan síntomas que las categorizan principalmente como causantes de DSP [9].

La Tabla IV.1 muestra una clasificación de ficotoxinas de acuerdo con su estructura molecular y su efecto tóxico, incluyendo además las especies de fitoplancton que pueden producirlas.

La elevada toxicidad de las toxinas marinas ha impulsado a la Unión Europea a la regulación de los niveles de determinados tipos de toxinas en moluscos destinados a consumo humano, a través de la Regulación número 853/2004 [10], implementada en 2005. Además, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha ido actualizando los límites que se establecen en dicha regulación, para ampliarlos a otros grupos de toxinas no contempladas en la Regulación de la EU de 2004, teniendo en cuenta el consumo medio de los distintos alimentos [11].

Grupo estructural	Efecto tóxico	Fitoplancton	Toxinas	
		productor		
Iminas cíclicas [12]	Toxinas de acción	Alexandrium	SPXs	
	rápida. Toxicidad en	Prorocentrum		
	humanos desconocida	Karenia	GYMs	
		No se ha identificado	Pinatoxinas	
			Pteriatoxinas	
AZAs [13]	Problemas estomacales	Azadinium	Existen 20, los más	
			importantes: AZA1,	
			AZA2 y AZA3	
OA [14]	DSP	Dinophysis	OA y DTXs	
PTXs [15]	No especificado en	Dinophysis	Se han descrito 11,	
	humanos, relacionado		la más importante:	
	con DSP		PTX2	
Ácido domoico [16]	Intoxicación amnésica	Pseudo-Nitzschia	Ácido domoico y	
	por marisco (ASP)		sus análogos	
Yesotoxinas [17]	No se ha descrito en	Protoceratium	Yesotoxina,	
	humanos	Gonyaulax spinifera	homo- yesotoxina	
Saxitoxinas [18]	PSP	Alexandrium	Saxitoxinas,	
		Gymnodinium	neosaxitoxinas,	
			gonyautoxinas	
Brevetoxinas [19]	PSP	Karenia brevis	1 y 2	
Ciguatoxinas [20]	Cardiovasculares,	Gambierdiscus	Hay más de 20	
	gastrointestinales y	toxicus	análogos	
	neurológicos (CFP)			
Palitoxinas [21]	Mialgia, fiebre,	Ostreopsis	Existen 8, las más	
	vómitos		importantes:	
			palitoxina y	
			ostreocina-D	

Tabla IV.1. Clasificación de las toxinas marinas producidas por fitoplancton

Los métodos analíticos de referencia establecidos en la Regulación de 2005 (nº 2074/2005) [22] son los bioensayos con ratones (MBA) para toxinas PSP y lipofílicas, cromatografía líquida (LC) para las ASP y también como método alternativo para las lipofílicas. Los bioensayos presentan elevada variabilidad en los resultados, así como sensibilidad y selectividad limitadas, además de despertar inquietudes éticas relacionadas con el uso de animales vivos. Por ello, la Comisión Europea [22] ya admite el uso de otros métodos, siempre que hayan sido validados a través de las guías

internacionales y que sean, al menos, tan efectivos como los bioensayos. Así, la bibliografía describe diferentes metodologías para la separación, identificación y cuantificación de toxinas marinas, siendo LC la más ampliamente usada, en combinación con detector de fluorescencia (FLD) [23,24], de diodos (DAD) [25], o espectrometría de masas (MS) [24–46]. Generalmente, estos métodos son aplicados al análisis de marisco y pescado [23–38] para comprobar que se cumplen los niveles máximos permitidos. La bibliografía también muestra aplicaciones para el análisis de sedimentos [39,40] y aguas [40–46].

Mientras que estas toxinas se podrían llegar a encontrar a niveles elevados en moluscos, debido a su filtración continua de agua, en el de agua de mar cabe esperarlas a nivel de trazas, por lo que resulta necesario el uso de una etapa de preconcentración. La técnica convencional de extracción en fase sólida (SPE) es la más comúnmente empleada para la preconcentración de las toxinas, al mismo tiempo que consigue limpiar la muestra, reduciendo el nivel de interferencias, habiéndose aplicado tanto en el análisis de aguas [40,43-45], como de alimentos de origen marino previamente sometidos a una etapa de extracción sólido-líquido [25,30,37]. SPE proporciona altos niveles de robustez y fiabilidad; sin embargo, conlleva largos tiempos de análisis, así como consumo elevado tanto de disolventes orgánicos, como de muestra. A pesar de las demostradas ventajas de los métodos miniaturizados, solo se ha encontrado una aplicación para la determinación de toxinas marinas lipofílicas, basada en el uso de extracción en fase microsólida dispersa (DMSPE) [41].

En este Capítulo, se ha desarrollado un método basado en microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) para la determinación de trece toxinas lipofílicas en agua de mar. Los extractos preconcentrados son analizados mediante LC-MS² con triple cuadrupolo (QqQ) como analizador de masas. Las estructuras químicas de las toxinas estudiadas aparecen en la Figura IV.1.







Fig. IV.1: Estructuras moleculares de las toxinas marinas estudiadas

A. Oller Ruiz

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

13,19-Didesmetil espirolida C (13,19didesM, 7,06±0,24 μg mL⁻¹), 13-desmetil espirolida C (13desM, 7,23±0,10 μg mL⁻¹), 20-metil espirolida G (SPX20G, 7,01±0,61 μg mL⁻¹), ácido okadaico (OA, 16±0,8 μg mL⁻¹), dinofisitoxina 1 (DTX1, 6,40±0,33 μg mL⁻¹), dinofisitoxina 2 (DTX2, 2,01±0,11 μg mL⁻¹), azaspirácido 1 (AZA1, 1,08±0,06 μg mL⁻¹), azaspirácido 2 (AZA2, 1,05±0,08 μg mL⁻¹), azaspirácido 3 (AZA3, 1,03±0,07 μg mL⁻¹), azaspirácido 4 (AZA4, 1,01±0,03 μg mL⁻¹) y azaspirácido 5 (AZA5, 1,09±0,03 μg mL⁻¹) fueron adquiridas de Cifga, S.A. (Lugo, España) en ampollas individuales conteniendo 0,5 mL de disolución metanólica de las concentraciones especificadas. Gimnodimina (GYM, 2,50±0,13 μg mL⁻¹) y pectenotoxina 2 (PTX2, 4,40±0,13 μg mL⁻¹) fueron suministradas por el "National Research Council, Institute for Marine Biosciences" (NRC CNRC, Halifax, Canadá). Las disoluciones patrón individuales se almacenaron a -18 °C.

Se emplearon disolventes de alta pureza, metanol (MeOH), acetonitrilo (AcN), acetona y etanol de Chem-Lab NV (Zedelgem, Bélgica), cloroformo, tetracloruro de carbono, diclorometano, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroeteno, metil isobutil cetona (MIBK), 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-octanona y 2-undecanona de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Ácido fórmico (FA, 98%) y acetato amónico se adquirieron en Panreac (Barcelona, España). El agua purificada se obtuvo mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

2.2. Instrumentación

El equipo utilizado fue un sistema 1200 UHPLC de Agilent (Waldbronn, Alemania) equipado con bomba cuaternaria (G1312A) y una columna de fase reversa Zorbax SB-C18 (Agilent, 75 x 2,1 mm, 3,5 µm) termostatada a 30 °C. La inyección en el sistema LC (15 µL) se llevó a cabo usando un muestreador automático, colocándose las muestras en viales ámbar de 2 mL, conteniendo microinsertos de 250 µL. Se trabajó en modo gradiente con una fase móvil compuesta por una disolución acuosa de acetato amónico 2 mM y FA 0,1% (disolvente A) y una disolución metanólica de acetato amónico 2 mM y FA 0,1% (disolvente B). En la Tabla IV.2 se recoge el programa de gradiente aplicado.

La detección se realizó en un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo (Agilent, G6410A), provisto de una fuente de ionización por impacto electrónico (ESI) operando en modo positivo, aplicando los siguientes parámetros: presión de nitrógeno como gas nebulizador, 40 psi; voltaje del capilar, 4500 V y temperatura y flujo del gas de secado, 350 °C y 8 L min⁻¹, respectivamente. Los espectros de masa se analizaron en el rango *m/z* 80-1000 amu. El análisis de los datos se llevó a cabo usando el programa *Agilent Mass Hunter Data Acquisition*. Se trabajó en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM).

Tiempo (min)	Disolvente B (%)	Velocidad de flujo (mL min ⁻¹)
0	25	0,3
3	60	0,3
8	60	0,3
8,5	75	0,3
15	75	0,3
15,5	75	0,4
20	85	0,4
20,5	95	0,5
23	95	0,5
26	95	0,5
31	25	0,5

Tabla IV.2. Programa de gradiente de fase móvil

Para optimizar las condiciones de la detección y las transiciones MRM de cada compuesto, se inyectaron en el sistema disoluciones individuales de los analitos (1 µg mL⁻¹). En la Tabla IV.3. se recogen las condiciones LC-QqQ-MS² finalmente seleccionadas.

Otro equipamiento empleado fue una centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) y un evaporador XcelVapTM (Horizon technology, Salem, EEUU).

			Voltaje del			
Compuesto	t _R (min)	Transiciones MRM (<i>m/z</i>)	fragmentador (V)	CE (V)		
GYM	6,93	508,3 →490,6ª	200	40		
13,19didesM	7,32	678 → 430ª	200	50		
		678 → 164 (194)	200	40		
13desM	7,72	692 → 164ª	200	50		
		692 → 444 (44)	200	20		
SPX20G	8,12	706 → 688ª	190	30		
		706 → 670 (33)	190	35		
OA	13,8	827 → 723ª	190	55		
		827 → 809 (47)	190	45		
DTX2	14,7	827 → 723ª	190	55		
		827 → 809 (20)	190	45		
PTX2	14,8	881,5 → 539,3ª	230	60		
		881,5 → 837,5 (119)	230			
AZA4	15,0	844 → 826 ^a	190	30		
		844 → 808 (12)	190	45		
DTX1	17,5	841 → 737ª	190	45		
		841 → 823 (50)	190	55		
AZA3	18,6	828 → 810ª	190	30		
		828 → 792 (13)	190	45		
AZA5	19,0	844 → 826 ^a	180	30		
		844 → 808 (37)	180	40		
AZA1	19,4	842 → 824ª	190	30		
		842 → 806 (17)	190	45		
AZA2	20,0	856 → 838ª	190	30		
		856 → 820 (17)	190	45		
^a Transición usada para cuantificar. Los valores entre paréntesis indican la abundancia relativa de la						

Tabla IV.3. Parámetros del sistema LC-OqO-MS² para las toxinas monitorizadas

transición secundaria frente a la principal cuantificadora.

Muestras y procedimiento analítico 2.3.

Se analizaron diez muestras de agua de mar, tomadas en el Mar Menor (Murcia, sureste de España) durante el mes de agosto de 2019. Los muestreos se pueden diferenciar en dos tipos, los tomados en zonas del interior del Mar Menor desde una embarcación o en playas a las que el muestreador entra a pie. Las muestras de interior fueron tomadas desde barco con una columna de 5 m de longitud, permitiendo el análisis de una muestra integrada de agua a diferentes profundidades. En cambio, en las de playa se toma a una profundidad de 40 cm desde la superficie. Las muestras se

almacenan en botes cuadrados de polietileno de un litro de capacidad a 4 °C hasta su análisis.

Antes de llevar a cabo la preconcentración de las muestras, se procedió a su filtración a vacío a través de filtros de membrana de nylon 0,45 µm. Seguidamente, en un tubo Falcon de 15 mL con fondo cónico, se colocaron 12 mL de muestra filtrada, siendo la mezcla formada por 0,5 mL de MeOH y 440 µL de cloroformo, inyectada de forma rápida en el seno de la muestra. Se observó la turbidez formada por la dispersión de las microgotas de cloroformo. Se agitó la mezcla ternaria manualmente durante unos pocos segundos y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min, depositándose la fase extractante enriquecida. Con ayuda de una microjeringa se recogió la fase sedimentada, evaporando el disolvente por aplicación de 440 bares de presión y 40 °C de temperatura. El residuo seco se reconstituyó en 100 µL de MeOH, inyectando 15 µL en el sistema LC. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Los estudios de recuperación se realizaron sobre dos muestras diferentes, a dos niveles diferentes de fortificación: 10 y 50 ng L⁻¹ para todas las toxinas, a excepción de DTX (50 y 100 ng L⁻¹). Se analizaron tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración.

3. Resultados y Discusión

3.1. Separación cromatográfica y condiciones MS

Teniendo en cuenta el carácter lipofílico de las toxinas estudiadas, se aplicó LC en modo de fase reversa (RP) usando una fase estacionaria C₁₈. El modo de elución isocrático no fue compatible con la separación de los trece compuestos en un tiempo razonable, por lo que se ensayaron distintos gradientes. Bajo las condiciones finalmente seleccionadas se comenzaba con 25% del disolvente B con una velocidad de flujo de 0,3 mL min⁻¹, siendo incrementado hasta el 60% en 3 min y mantenido durante 5 min, permitiendo así la elución de GYM y las dos SPXs. Seguidamente, se aumentó el porcentaje del disolvente B hasta 75% en 0,5 min y fue mantenido durante 6,5 min para eluir SPX20G, OA, DTX2, PTX2 y AZA4. En la siguiente etapa del gradiente se aumentó la velocidad de flujo hasta 0,4 mL min⁻¹ en 0,5 min y, seguidamente, se programó otro incremento de la proporción del disolvente B hasta el 85% en 4,5 min, lo que permitió la elución de DTX1 y las cuatro toxinas AZAs todavía retenidas.

Por último, como etapa de limpieza se programa un 95% de disolvente B y se reestablecen las condiciones iniciales a 0,5 mL min⁻¹, como muestra la Tabla IV.2. Para altas proporciones de MeOH en la fase móvil, la presión en la columna disminuye, lo que se aprovecha para aumentar la velocidad de flujo de fase móvil, con el objetivo de acortar el tiempo de análisis.

Los parámetros del detector se optimizaron en varias etapas, trabajando primero en modo *full-scan* desde 800 hasta 1000 amu (m/z) para localizar el ion precursor de cada compuesto. Todas las toxinas mostraron una mayor sensibilidad trabajando en modo de ionización positivo en la fuente ESI. Seguidamente, se aplicaron diferentes voltajes de fragmentación y energías de colisión, generando diferentes iones producto y seleccionando las dos transiciones MRM más sensibles para cada uno. Obsérvese en la Tabla IV.3 que para GYM solo se consiguió localizar una fragmentación. La identificación de las toxinas se basó en sus tiempos de retención y las distintas transiciones MRM implicando la formación de iones producto con los valores de m/z más elevados. Para la cuantificación se empleó la transición de mayor sensibilidad.

Por último, se optimizaron las condiciones de temperatura (200-350 °C) y flujo del gas (4-12 L min⁻¹), presión en el nebulizador (20-50 psi) y voltaje en el capilar (2000-5000 V) en la fuente ESI, siendo las condiciones adoptadas: 350 °C de temperatura de nitrógeno a un flujo de 8 L min⁻¹ y una presión de nebulizador de 40 psi, siendo el voltaje en el capilar de 4500 V. Aunque los pares OA/DTX2 y AZA4/AZA5 tienen los mismos iones precursores e incluso las mismas transiciones MRM, esto no supuso un problema en la cuantificación puesto que los tiempos de retención eran diferentes.

3.2. Optimización del procedimiento DLLME

Los primeros experimentos se dirigieron a la selección del disolvente extractante, siendo ensayados once diferentes, tanto más densos (CCl₄, CHCl₃, CH₂Cl₂, 1,2dicloroetano y 1,1,2,2-tetracloroeteno), como menos densos que el agua (MIBK, 2octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-octanona y 2-undecanona). Para ello, se utilizó una disolución acuosa conteniendo un analito de cada una de las cuatro familias estudiadas: 13,19didesM, OA, AZA1 y PTX2, a 1 ng mL⁻¹. Se inyectó con ayuda de una microjeringa una mezcla conteniendo 1,5 mL de MeOH y 500 µL de extractante, sobre

8 mL de la disolución estándar, se agitó la mezcla durante unos pocos segundos y se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm. Para los extractantes de menor densidad que el agua, se inyectaron 15 µL directamente en el sistema LC; en el caso de los más densos que el agua, la fase enriquecida se evaporó y se reconstituyó en 150 µL de MeOH de forma previa a su análisis.

La Figura IV.2 muestra los resultados obtenidos, donde se comprueba que, salvo MIBK, los disolventes más ligeros que el agua no preconcentraron los analitos. Cloroformo proporcionó la mayor eficiencia para 13,19-didesM y OA, no se encontraron diferencias significativas entre CHCl₃ y 1,2-dicloroetano para PTX2, y aunque MIBK resultó ser más eficiente para AZA1, teniendo en cuenta su incompatibilidad con cloroformo y que este último también proporcionaba buenos resultados para esta toxina, se eligió el cloroformo como extractante.



Fig. IV.2: Influencia de la naturaleza de la fase extractante en la preconcentración

Cuando se ensayaron otros disolventes dispersantes (AcN, acetona y etanol), aunque no se encontraron grandes diferencias de sensibilidad para OA y PTX2, MeOH proporcionó mejores resultados para 13,19didesM y AZA1 (Figura IV.3), por lo que fue seleccionado.



Fig. IV.3: Influencia de la naturaleza del dispersante en la microextracción

Los volúmenes de las tres fases participantes en DLLME fueron estudiados simultáneamente, puesto que son variables interrelacionadas. Para ello se utilizó un diseño central compuesto (CCD; $\alpha = 0.5$; 8 puntos cúbicos; 6 puntos axiales y 4 puntos centrales). El volumen de fase acuosa se estudió en el rango de 6 a 12 mL, el volumen de dispersante de 0,5 a 2 mL y el de extractante desde 200 hasta 700 µL. Las condiciones de los 20 experimentos llevados a cabo se recogen en la Tabla IV.4. Los resultados del análisis de los datos obtenidos aparecen en la Figura IV.4, donde se puede observar que la evolución de las respuestas sigue el mismo patrón para volumen de muestra y de dispersante, la respuesta es máxima en los valores extremos de los rangos estudiados, y mínima en el centro. Para el disolvente extractante, en cambio, aumentó la sensibilidad al ser incrementado su volumen hasta 440 µL, disminuyendo para valores mayores, probablemente debido a un efecto de dilución. Se seleccionaron las condiciones que proporcionaron mayor sensibilidad: 12 mL de fase acuosa, 0,5 mL de MeOH y 440 µL de CHCl₃.

Cuando se varió el pH de la fase acuosa entre 4 y 9, por adición de FA y amoniaco, el pH bajo favoreció a las toxinas de carácter ácido (PTX, DTXs y OA), mientras que aquellas con carácter básico como AZAs, SPXs y GYM mostraron eficiencias de extracción mayores en medios alcalinos. Consecuentemente se adoptó una situación de compromiso sin modificar el pH de la muestra, el cual rondaba cerca de la neutralidad.

Encovo	Muestra	MeOH	CHCl ₃		Muestra	MeOH	$CHCI_3$
Elisayo	(mL)	(mL)	(μL)	Elisayo	(mL)	(mL)	(µL)
1	6	2	200	11	9	1,25	450
2	12	0,5	700	12	12	2	700
3	12	2	200	13	9	1,25	575
4	9	1,25	450	14	9	1,25	325
5	12	0,5	200	15	9	1,25	450
6	6	0,5	200	16	9	1,625	450
7	9	1,25	450	17	10,5	1,25	450
8	6	2	700	18	7,5	1,25	450
9	9	1,25	450	19	9	0,875	450
10	6	0,5	700	20	9	1,25	450

Tabla IV.4. Diseño CCD para el estudio de la relación entre los volúmenes de las tres fases involucradas en la técnica DLLME



Fig. IV.4: Optimización CCD de los volúmenes de las fases involucradas en DLLME

3.3. Validación del método y efecto matriz

El método desarrollado fue validado en términos de precisión, límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs), rango de linealidad y exactitud. Se obtuvieron gráficas de calibrado mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, representando el área de pico cromatográfico frente a la concentración de cada compuesto a siete niveles de fortificación. En todos los casos los coeficientes de regresión (R²) fueron superiores a 0,998, para los intervalos recogidos en la Tabla IV.5.

	•				
Compuesto	Rango de linealidad (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	LQ (ng L ⁻¹)	RSD (%)	
GYM	2 - 1000	0,7	2,3	0,1	
13,19didesM	1 - 1000	0,3	1,0	3,1	
13desM	1 - 1000	0,2	0,7	1,7	
SPX20G	3 - 1000	1,0	3,3	0,9	
OA	5 - 1500	1,4	4,7	0,8	
PTX2	4 - 1000	1,1	3,7	2,3	
AZA4	4 - 1000	1,3	4,3	5,1	
DTX2	4 - 1000	1,1	3,7	1,9	
AZA5	1 - 1000	0,2	0,7	1,8	
DTX1	20 - 5000	5,7	19	7,5	
AZA3	3 - 1000	0,9	3	2,1	
AZA1	1 - 1000	0,3	1,0	1,0	
AZA2	2 - 1000	0,6	2	3,6	

Tabla IV.5. Parámetros analíticos del procedimiento DLLME- LC-QqQ-MS²

Para la evaluación de la posible existencia de efecto matriz, se aplicó el método de adiciones estándar a cinco muestras de agua de mar. La comparación, mediante un *t*-test, de las pendientes de las gráficas de adiciones estándar a cada muestra con las obtenidas usando estándares acuosos no mostró diferencias significativas. Por tanto, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo frente a estándares acuosos.

Se calcularon los valores de LD y LQ, considerando aquellas concentraciones de analito que proporcionaban señales analíticas 3 y 10 veces superiores a las del ruido, respectivamente. Los LDs estuvieron entre 0,2 y 5,7 ng L⁻¹ y los LQs en el rango 0,7-19 ng L⁻¹ (Tabla IV.5). La precisión del método desarrollado se estudió a través de diez análisis consecutivos de una muestra de agua de mar fortificada a 50 ng L⁻¹. Los

valores de desviación estándar relativa (RSD) se encontraron entre 0,1 y 7,5%, demostrando muy buena repetitividad para el método desarrollado.

3.4. Análisis de las muestras

El método DLLME-LC-QqQ-MS² propuesto se aplicó para el análisis de diez muestras diferentes de agua de mar. No se detectó ninguna de las toxinas estudiadas, por consiguiente, podemos afirmar que de encontrarse en dichas muestras sería a niveles de concentración inferiores a sus LDs.

La Figura IV.6 recoge los cromatogramas de iones extraídos (EICs) obtenidos del análisis de una muestra de agua fortificada a 10 ng L⁻¹, excepto para DTX1 que se fortificó a 50 ng L⁻¹. Para cada toxina se han especificado las transiciones seleccionadas. No se observaron picos interferentes a los tiempos de retención de las toxinas, que fueron identificadas utilizando sus tiempos de retención, las transiciones proporcionadas por los espectros de masas y comparando el porcentaje de cada transición obtenida en las disoluciones patrón, las muestras sin fortificar y fortificadas.

La exactitud del método se estudió mediante ensayos de recuperación. Se fortificaron dos muestras de agua a dos niveles de concentración, 10 y 50 ng L⁻¹ para todos los compuestos salvo para DTX1 (50 y 100 ng L⁻¹). Las recuperaciones obtenidas se muestran en la Tabla IV.6, encontrándose todos los valores en el rango 82-123% para el nivel de fortificación más bajo y entre 90-121% para el más alto.



Fig. IV.5: ElCs obtenidos usando el método DLLME-LC-QqQ-MS² para una muestra fortificada

Compuesto	Nivel de fortificación (ng L-1)	Muestra 1	Muestra 2
GYM	10	100	112
	50	98	102
13desM	10	95	98
	50	96	97
13,19didesM	10	89	90
	50	92	94
SPX20G	10	82	114
	50	119	121
OA	10	111	109
	50	99	96
PTX2	10	96	112
	50	102	112
AZA4	10	121	104
	50	114	120
DTX2	10	90	118
	50	105	90
AZA5	10	104	104
	50	101	104
DTX1	50	90	123
	100	106	93
AZA3	10	101	113
	50	106	106
AZA1	10	105	107
	50	95	112
AZA2	10	101	115
	50	99	102
^a Valor medio (n=3)			

Tabla IV.6. Porcentajesª de recuperación en aguas de mar

La Tabla IV.7 muestra una comparación entre el método desarrollado y otros previamente publicados para la determinación de toxinas en agua de mar empleando LC-MS. Obsérvese que, aunque se alcanzan LDs inferiores con algunos de los métodos SPE propuestos, éstos implican volúmenes de muestra mucho mayores (entre 200 y 500 mL) y, por tanto, tiempos de tratamiento de muestra de hasta 9 h. Por el contrario, con el procedimiento DLLME presentado en este Capítulo se requieren únicamente 12 mL de muestra y apenas se invierten 5 min en su tratamiento. El volumen de disolventes orgánicos usado en DLLME es considerablemente menor, teniendo en cuenta su carácter miniaturizado. Finalmente, resaltar el número de toxinas aquí determinadas, que es superior al considerado en métodos previos.

Tabla IV.7 Comparación del método desarrollado con otros previamente publicados para determinación de toxinas en agua de mar

	Ref	[43]	[44]	[45]	[41]	Este trabajo
	AZA5		ı	0,003		0,2
	AZA4	ı	I	0,003	ı	1,3
	AZA3	ı	0,03	0,002	ı	6'0
	AZA2	,	0,03	0,002	600'0	0,6
	AZA1		0,03	0,002	0,082	0,3
	PTX2	13	I	0,5	0,061	1,1
L ⁻¹)	DTX2	ı	0,2	I	ı	1,1
.Ds (ng	DTX1	ı	0,2	0,3	0,129	5,7
	OA	68	0,2	0,3	0,034	1,4
	SPX20G	ı	I	I	ı	1,0
	13,19didesM	ı	ı	ı	ı	0,3
	13desM	I	0,03	I	0,024	0,2
	GYM	I	0,03	I	0,030	0,7
	Tiempo (min)	238	I	520	338	5
estra	Técnica	SPE	DMSPE	SPE	SPE	DLLME
Tratamiento de la mu	e Consumo disolvente	9 mL MeOH	1,5 mL NH₄OH/AcN + 1,5 mL FA/AcN	10 mL MeOH	6 mL MeOH + 9 mL NH₄OH/MeOH	0,5 mL MeOH + 0,44 mL CHCl ₃
	Volumen d muestra (ml	200	50	500	300	12

A. Oller Ruiz

4. Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo, por primera vez, la optimización de una técnica miniaturizada basada en microextracción en fase líquida para la preconcentración de trece toxinas marinas lipofílicas, pertenecientes a cuatro familias químicas diferentes. La combinación de DLLME con LC-QqQ-MS² permite alcanzar muy buena sensibilidad y un alto grado de selectividad (a niveles de ppt) para el análisis de agua de mar. La ausencia de efecto matriz permitió la cuantificación de las muestras frente a estándares acuosos. En ninguna de las muestras de agua del Mar Menor de Murcia estudiadas se detectaron las toxinas.

Referencias

[1] J.F. Humbert, Advances in the detection of phycotoxins and cyanotoxins, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1653–1654.

[2] V. Fessard, L. Le Hégarat, A strategy to study genotoxicity: Application to aquatic toxins, limits and solutions, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1715–1722.

[3] S.E. McNamee, L.K. Medlin, J. Kegel, G.R. McCoy, R. Raine, L. Barra, M.V. Ruggiero, W.H.C.F. Kooistra, M. Montresor, J. Hagstrom, E.P. Blanco, E. Graneli, F. Rodríguez, L. Escalera, B. Reguera, S. Dittami, B. Edvardsen, J. Taylor, J.M. Lewis, Y. Pazos, C.T. Elliott, K. Campbell, Distribution, occurrence and biotoxin composition of the main shellfish toxin producing microalgae within european waters: A comparison of methods of analysis, Harmful Algae 55 (2016) 112–120.

[4] R. Fernández, L. Mamán, D. Jaén, L.F. Fuentes, M.A. Ocaña, M.M. Gordillo, Dinophysis species and diarrhetic shellfish toxins: 20 years of monitoring program in Andalusia, south of Spain, Toxins 11 (2019) 1–28.

[5] J.M.T. Palenzuela, L.G. Vilas, F.M. Bellas, E. Garet, Á. González-Fernández,
E. Spyrakos, Pseudo-nitzschia blooms in a coastal upwelling system: Remote sensing detection, toxicity and environmental variables, Water 11 (2019) 1954–1978.

[6] M. Paches, D. Aguado, R. Martínez-Guijarro, I. Romero, Long-term study of seasonal changes in phytoplankton community structure in the western Mediterranean (Valencian Community), Environ. Sci. Pollut. Res. 26 (2019) 14266–14276. [7] A. Alcolea, S. Contreras, J.E. Hunink, J.L. García-Aróstegui, J. Jiménez-Martínez, Hydrogeological modelling for the watershed management of the Mar Menor coastal lagoon (Spain), Sci. Total Environ. 663 (2019) 901–914.

[8] F.F. Id, L.P. Rodr, J.M. Vieites, A. Garc, Phycotoxins in marine shellfish: origin, occurrence and effects on humans, Mar. Drugs 16 (2018) 188–214.

[9] J. Alarcan, R. Biré, L. Le Hégarat, V. Fessard, Mixtures of lipophilic phycotoxins: exposure data and toxicological assessment, Mar. Drugs 16 (2018) 1–26.

[10] Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin foodstuffs, Off. J. Eur. Union 139 (2004) 55–64.

[11] J. Alexander, D. Benford, A. Boobis, S. Ceccatelli, J. Cravedi, A. Di, D. Doerge, E. Dogliotti, L. Edler, P. Farmer, M. Filipi, J. Fink-, P. Fürst, T. Guerin, H.K. Knutsen, M. Machala, A. Mutti, Marine biotoxins in shellfish: Summary on regulated marine biotoxins, EFSA J. 1306 (2009) 1–23.

[12] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish - Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins), EFSA J. 8 (2010) 1628–1667.

[13] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish – Azaspiracid group, EFSA J. 6 (2008) 1–52.

[14] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish – okadaic acid and analogues, EFSA J. 589 (2008) 1–62.

[15] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish – Pectenotoxin group, EFSA J. 1109 (2009) 1–47.

[16] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, Marine biotoxins in shellfish – Domoic acid, EFSA J. 1181 (2009) 1–61.

[17] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish – Yessotoxin group, EFSA J. 907 (2008) 1–62.

[18] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish – Saxitoxin group, EFSA J. 1019 (2009) 1–76.

[19] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish - Brevetoxin group, EFSA J. 8 (2010) 1677–1706.

[20] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish - Emerging toxins: Ciguatoxin group, EFSA J. 8 (2010) 1627–1665.

[21] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Marine biotoxins in shellfish - Palytoxin group, EFSA J. 7 (2009) 1393–1431.

[22] Regulation (EC) No 2074/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products, Off. J. Eur. Union 337 (2005) 27–60.

[23] L. Puech, S. Dragacci, E. Gleizes, J.M. Fremy, Use of immunoaffinity columns for clean-up of diarrhetic toxins (okadaic acid and dinophysistoxins) extracts from shellfish prior to their analysis by HPLC/fluorimetry, Food Addit. Contam. 16 (1999) 239–251.

[24] M.A. Quilliam, Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection, J. AOAC Int. 78 (1995) 555–570.

[25] J. Regueiro, A.E. Rossignoli, G. Álvarez, J. Blanco, Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish, Food Chem. 129 (2011) 533–540.

[26] A. Gerssen, M.A. McElhinney, P.P.J. Mulder, R. Bire, P. Hess, J. De Boer, Solid phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1213–1226.

[27] I. Rodríguez, A. Alfonso, J.M. González-Jartín, M.R. Vieytes, L.M. Botana, A single run UPLC-MS/MS method for detection of all EU-regulated marine toxins, Talanta 189 (2018) 622–628.

[28] A. Domènech, N. Cortés-Francisco, O. Palacios, J.M. Franco, P. Riobó, J.J. Llerena, S. Vichi, J. Caixach, Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1328 (2014) 16–25.

[29] A. Li, G. Sun, J. Qiu, L. Fan, Lipophilic shellfish toxins in Dinophysis caudata picked cells and in shellfish from the East China Sea, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 3116–3126.

[30] G. Orellana, L. Van Meulebroek, S. Van Vooren, M. De Rijcke, M. Vandegehuchte, C.R. Janssen, L. Vanhaecke, Quantification and profiling of lipophilic marine toxins in microalgae by UHPLC coupled to high-resolution orbitrap mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 6345–6356.

[31] B. Krock, U. Tillmann, U. John, A. Cembella, LC-MS-MS aboard ship: Tandem mass spectrometry in the search for phycotoxins and novel toxigenic plankton from the North Sea, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 797–803.

[32] P. McCarron, E. Wright, M.A. Quilliam, Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra, J. AOAC Int. 97 (2014) 316–324.

[33] Q. Shen, L. Gong, J.T. Baibado, W. Dong, Y. Wang, Z. Dai, H.Y. Cheung, Graphene based pipette tip solid phase extraction of marine toxins in shellfish muscle followed by UPLC-MS/MS analysis, Talanta 116 (2013) 770–775.

[34] A. These, J. Scholz, A. Preiss-Weigert, Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4529–4538.

[35] L. Wang, X. Shi, Q. Zhao, A. Sun, D. Li, J. Zhao, Determination of lipophilic marine toxins in fresh and processed shellfish using modified QuEChERS and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Food Chem. 272 (2019) 427–433.

[36] E. Fux, D. McMillan, R. Bire, P. Hess, Development of an ultraperformance liquid chromatography-mass spectrometry method for the detection of lipophilic marine toxins, J. Chromatogr. A 1157 (2007) 273–280.

[37] H. Wu, J. Yao, M. Guo, Z. Tan, D. Zhou, Y. Zhai, Distribution of marine lipophilic toxins in shellfish products collected from the chinese market, Mar. Drugs 13 (2015) 4281–4295.

[38] C. Moroney, M. Lehane, A. Braña-Magdalena, A. Furey, K.J. James, Comparison of solid-phase extraction methods for the determination of azaspiracids in shellfish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, J. Chromatogr. A 963 (2002) 353–361.

[39] Y. Wang, J. Chen, Z. Li, S. Wang, Q. Shi, W. Cao, X. Zheng, C. Sun, X. Wang, L. Zheng, Determination of typical lipophilic marine toxins in marine sediments from three coastal bays of China using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after accelerated solvent extraction, Mar. Pollut. Bull. 101 (2015) 954–960.

[40] J. Chen, X. Li, S. Wang, F. Chen, W. Cao, C. Sun, L. Zheng, X. Wang, Screening of lipophilic marine toxins in marine aquaculture environment using liquid chromatography-mass spectrometry, Chemosphere 168 (2017) 32–40.

[41] Y. Zhang, D. Chen, Z. Hong, S. Zhou, Y. Zhao, Polymeric ion exchange material based dispersive micro solid-phase extraction of lipophilic marine toxins in seawater followed by the Q Exactive mass spectrometer analysis using a scheduled high resolution parallel reaction monitoring, Microchem. J. 138 (2018) 526–532.

[42] Y. Liu, R.C. Yu, F.-Z. Kong, C. Li, L. Dai, Z.-F. Chen, M.-J. Zhou, Lipophilic marine toxins discovered in the Bohai Sea using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, Chemosphere 183 (2017) 380–388.

[43] J. Chen, T. Han, X. Li, X. He, Y. Wang, F. Chen, X. Song, D. Zhou, X. Wang, Occurrence and distribution of marine natural organic pollutants: Lipophilic marine algal toxins in the Yellow Sea and the Bohai Sea, China, Sci. Total Environ. 612 (2018) 931–939.

[44] X. Li, Z. Li, J. Chen, Q. Shi, R. Zhang, S. Wang, X. Wang, Detection, occurrence and monthly variations of typical lipophilic marine toxins associated with diarrhetic shellfish poisoning in the coastal seawater of Qingdao City, China, Chemosphere 111 (2014) 560–567.

[45] C. Bosch-Orea, J. Sanchís, M. Farré, D. Barceló, Analysis of lipophilic marine biotoxins by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry in seawater from the Catalan Coast, Anal. Bioanal. Chem. 409 (2017) 5451–5462.

[46] Z. Zendong, M. Kadiri, C. Herrenknecht, E. Nézan, A. Mazzeo, P. Hess, Algal toxin profiles in Nigerian coastal waters (Gulf of Guinea) using passive sampling and liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Toxicon 114 (2016) 16–2.

CAPÍTULO V

Microextracción en fase sólida magnética para la determinación de inhibidores de la PDE-5 mediante cromatografía líquidaespectrometría de masas con triple cuadrupolo



Resumen

En este estudio se propone el empleo de la técnica de microextracción en fase sólida magnética (MSPE) para la preconcentración de los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa-5 (PDE-5), sidenafilo, tadalafilo y vardenafilo, y del metabolito activo Ndesmetilsildenafilo en pelo y matrices susceptibles de adulteración por adición de dichos compuestos (bebidas energéticas, geles lubricantes y suplementos dietéticos). Los analitos se extraen desde las muestras sólidas mediante extracción sólido-líquido (SLE) en medio alcalino, mientras que las muestras líquidas no requieren tratamiento previo a MSPE. El nanomaterial magnético empleado consiste en nanopartículas de ferrita dispersas en una matriz de nanotubos de carbono multipared funcionalizadas con polipirrol (MWCNTs/Fe₃O₄@PPy). Se han optimizado todos los parámetros que afectan a las etapas de adsorción (naturaleza y masa del material magnético, tiempo de extracción y fuerza iónica de la disolución de muestra) y desorción (naturaleza y volumen del disolvente de desorción, y tiempo de desorción) en MSPE, analizando el extracto obtenido mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS²). La cuantificación de las muestras se llevó a cabo usando una matriz modelo. Las recuperaciones estuvieron entre 81 y 123%, dependiendo del analito y la muestra.
1. Introducción

En los últimos años, la tendencia de la sociedad hacia estilos de vida saludables ha aumentado el consumo de suplementos alimenticios, formulaciones naturales y otros productos comúnmente adquiridos en herbolarios. Sin embargo, muchos de estos productos, supuestamente fabricados a base de hierbas, han sido retirados del mercado al detectar la presencia de fármacos no declarados en su composición, siendo los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5) adulterantes detectados con bastante frecuencia. Estos fármacos se administran principalmente para el tratamiento de la disfunción eréctil, aunque también han demostrado su eficiencia en la regulación de la hipertensión pulmonar. Sin embargo, diferentes efectos secundarios, tales como dolor de cabeza, enrojecimiento facial, congestión nasal, dolor de espalda o trastornos visuales, han sido descritos con su consumo [1]. En consecuencia, su presencia no declarada en productos comerciales podría significar un grave peligro para la salud, no solamente por su ingestión sino también por posibles interacciones con otros fármacos administrados simultáneamente. Así, se han descrito casos de diversos efectos adversos e incluso de muerte por consumo de suplementos dietéticos adulterados [1], dando lugar a la retirada del mercado de distintos productos [2]. Por todo ello, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos rápidos, de alta sensibilidad, precisión y exactitud para la detección de estos compuestos a bajos niveles de concentración.

Los primeros inhibidores sintéticos de PDE-5 aprobados fueron citrato de sildenafilo (SIL), tadalafilo (TAD) e hidrocloruro de vardenafilo (VAR) siendo comercializados como Viagra® (Pfizer), Cialis® (Elli Lilly) y Levitra® (Bayer), respectivamente. Aunque otros inhibidores de PDE-5 han sido aprobados después (udenafilo, hidrocloruro de mirodenafilo o carbonato de lodenafilo), SIL, TAD y VAR siguen siendo los más empleados y, serán objeto de análisis en este Capítulo, junto con N-desmetilsildenafilo (DSIL), que es el principal producto de la metabolización de SIL. Aunque de menor intensidad que su precursor, DSIL también presenta actividad farmacológica [1]. La Figura V.1 presenta las estructuras químicas de los compuestos objeto de estudio.

A. Oller Ruiz



Fig. V.1: Estructuras moleculares de los inhibidores de PDE-5 estudiados

La determinación de estos fármacos ha sido abordada en diferentes matrices de muestra, tales como suplementos dietéticos [3–17], bebidas energéticas y alcohólicas [9,18], pelo humano [19–23], orina y otros fluidos biológicos [23–31]. A pesar de que sangre y orina son matrices muy empleadas en toxicología forense, el pelo ha ganado mucho terreno en los últimos años, ya que gran parte de los problemas asociados al análisis de esta matriz han sido solucionados. Además, el pelo, aparte de la facilidad de obtención, presenta la capacidad de proporcionar análisis del consumo retrospectivo de fármacos y drogas [32].

Aunque se ha aplicado la cromatografía de gases (GC) [3,19] para análisis de inhibidores de PDE-5, las características de estos compuestos asociadas a su baja volatilidad implican el uso de reacciones de derivatización previas a la separación GC. Por ello, la cromatografía líquida (LC) aparece como una alternativa más adecuada, habiendo sido acoplada a diversos detectores, tales como de fluorescencia (FLD) [4], ultravioleta (UV) [4,10–13,28–30], espectrometría de masas (MS) y MS en tándem (MS²) [6,7,18,20–27], UV-MS [5,8,14–17] y amperometría [31].

Para el aislamiento de los analitos desde las muestras sólidas se ha aplicado extracción sólido-líquido (SLE) [11,22] y extracción asistida por ultrasonidos (UAE) [3– 8,10,14–17,19], empleando disolventes orgánicos, disoluciones acuosas a distintos

valores de pH y mezclas de ambos. Con objeto de mejorar la sensibilidad y selectividad de los métodos propuestos para los extractos obtenidos, así como para las muestras líquidas, se han aplicado técnicas convencionales de limpieza y/o preconcentración, tales como extracción en fase sólida (SPE) [19,21,24,25,30] y extracción líquido-líquido (LLE) [20,26,31]. Los inconvenientes inherentes a estas metodologías clásicas se han pretendido obviar con el uso de técnicas miniaturizadas. Así, se ha utilizado la microextraction dispersiva líquido-líquido (DLLME) para preconcentrar inhibidores de PDE-5 de fluidos biológicos [26,28]. La microextracción en fase sólida magnética (MSPE) también ha sido aplicada usando diferentes materiales magnéticos [12,13,27,29]. Los materiales magnéticos fueron empleados con fines analíticos por primera vez en 1999 [33] y desde entonces el desarrollo de cada vez más novedosos materiales ha ampliado enormemente sus posibilidades de aplicación, dando lugar a métodos de análisis de elevada sensibilidad y selectividad.

En este capítulo se han sintetizado diferentes nanomateriales magnéticos para la preconcentración de SIL, TAD, VAR y el metabolito DSIL mediante MSPE y su determinación en bebidas energéticas, geles lubricantes, suplementos dietéticos y pelo humano usando LC-MS² con analizador QqQ.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

N-desmetilsildenafilo (DSIL, 1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1Hpirazol[4,3-d]pirimidin-5-il)fenilsulfonil] piperazina) fue obtenido de LoGiCal Standards (Luckenwalde, Alemania), mientras que sildenafilo (SIL, 1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol[4,3-d]pirimidin-5-il)fenylsulfonil]-4-metilpiperazina), dihidrocloruro de vardenafilo (VAR, (4-[2-etoxi-5-(4-etil-piperazin-1-il)sulfonil-fenil]-9-metil-7propil-3,5,6,8-tetrazabiciclo[4.3.0]nona-3,7,9-trien-2-ona dihidrocloruro) y tadalafilo (TAD, (6R-*trans*)-6-(1,3-benzodioxol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-hexahidro-2-metil-pirazino [1',2':1,6] pirido[3,4-*b*]indol-1,4-diona) de Sigma (St. Louis, MO, EEUU). Todos los estándares se adquirieron disueltos en metanol (MeOH) a 1 mg mL⁻¹ de concentración. Se preparó una disolución en MeOH (Sigma) conteniendo los cuatro estándares (100 mg L⁻¹) que se almacenó a -18 °C y a partir de ésta se prepararon diariamente las disoluciones de trabajo en agua, manteniéndolas a 4 °C. Los reactivos necesarios para la síntesis del nanomaterial magnético finalmente seleccionado fueron: nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs) obtenidos de Shenzhen Nanotech Port Co., Ltd. (Shenzhen, China) con 40-60 nm de diámetro, longitud mayor de 5 μ m y área superficial de 40-70 m² g⁻¹. Sulfato de hierro (II) y amonio hexahidratado ((NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O), perclorato de sodio y amoníaco (25%, v/v) se obtuvieron de Panreac (Barcelona, España), cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) de Scharlau Chemie (Sentmenat, España) y pirrol monomérico de Sigma.

En la síntesis de otros materiales magnéticos ensayados se utilizó: cloruro de cobalto (II) hexahidratado, peroxodisulfato de potasio e hidróxido de sodio de Panreac, β -ciclodextrina (β -CD) de Tianjin Chemicals Corporation (Tianjin, China), tetraetoxisilano (TEOS) y 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano (GTMS) de Fluka (Buchs, Suiza). N,N-Dimetilformamida (DMF), chitosán, cloruro de hierro (II) tetrahidratado (FeCl₂·4H₂O), acetato de sodio, ácido metacrílico, persulfato de amonio (NH₄)₂S₂O₈, anilina, estireno e hidrocloruro de dopamina fueron adquiridos en Sigma.

Para la fase móvil en LC, se utilizó acetonitrilo (AcN) de calidad UHPLC de Panreac, ácido acético (Riedel-de-Häen, Seelze, Alemania) y acetato amónico (Fisher Scientific, Leics, Reino Unido). El agua se purificó en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

2.2. Instrumentación

El cromatógrafo líquido fue 1200 UHPLC (Agilent, Waldbronn, Alemania) equipado con bomba binaria (G1312A). La separación se llevó a cabo en fase reversa usando una columna Zorbax Eclipse UHPLC XDB-C18 (50 x 4,6 mm, 1,8 µm) de Agilent. El programa de elución de la fase móvil consistió en una primera etapa isocrática compuesta por 40:60 AcN:disolución reguladora de acetato amónico (0,05 M, pH 6,9) aplicada durante 6 min, que permitió la elución de los cuatro analitos, seguida de un aumento lineal de la proporción de AcN hasta el 90% en 1 min, siendo mantenida durante 2 min, como etapa de limpieza. Finalmente, se reestablecen las condiciones iniciales en 5 min. La velocidad de flujo de la fase móvil fue 0,6 mL min⁻¹. Volúmenes de inyección de 20 µL eran sometidos a análisis LC, utilizando un automuestreador y manteniendo las disoluciones en viales de 2 mL provistos de microinsertos de 250 µL de capacidad.

174

La detección se realizó en un espectrómetro de masas con triple cuadrupolo como analizador (Agilent, G6410A) y una fuente de ionización de electrospray (ESI) operando en modo negativo. Las condiciones aplicadas en la fuente fueron: presión del gas nebulizador (nitrógeno), 60 psi; voltaje del capilar, 4000 V; temperatura del gas de secado, 350 °C y su flujo, 11 L min⁻¹. Los espectros de masas se obtuvieron en el intervalo *m/z* de 50 a 700 amu. Para analizar los datos obtenidos se utilizó el programa *Agilent Mass Hunter Data Acquisition*.

Las condiciones experimentales del detector MS se optimizaron mediante inyección directa de disoluciones individuales de los analitos (5 µg mL⁻¹), eligiendo en primer lugar las transiciones en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), de las que, la de mayor sensibilidad se empleó con fines de cuantificación y el resto con fines de confirmación, junto con el tiempo de retención característico de cada compuesto. Seguidamente, se seleccionó el voltaje del fragmentador y las energías de colisión (CE) óptimas para cada transición previamente elegida (Tabla V.1).

			-	-		
Analito	t _R (min)	$\logK_{ow}{}^a$	Peso	Transiciones	Voltaje del	CE (V)
			molecular	MRM (<i>m/z</i>)	fragmentador (V)	
DSIL	2,06	0,87	460,55	461 → 85 ^b	220	40
				461 → 283 (90)	220	40
TAD	3,16	1,64	389,41	390 → 268 ^b	140	5
				390 → 169 (33)	120	40
VAR	4,61	1,43	488,61	489 → 151 ^b	245	50
				489 → 312 (27)	245	40
SIL	4,82	1,23	474,58	475 → 100 ^b	220	30
				475 → 283 (35)	220	40

Tabla V.1. Parámetros del sistema LC-QqQ-MS² para los fármacos estudiados

^aCalculado a pH 7; ^bTransición usada para cuantificar. Los valores entre paréntesis indican la abundancia relativa de la transición secundaria frente a la cuantificadora.

Para la optimización del tratamiento de las muestras se empleó un agitador vórtex (Heathrow Scientific, EEUU), un agitador magnético RH-KTC (IKA, Staufen, Alemania), un evaporador XcelVapTM (Horizon technology, Salem, EEUU), un agitador orbital (IKA) y una centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania). El imán utilizado fue un bloque compuesto de Nd-Fe-B, de dimensiones 50x15x15 mm, 86 g de peso y una resistencia de 33 kg, suministrado por Supermagnete (Gottmadingen, Alemania). Para la síntesis de nanopartículas fue necesario un baño de ultrasonidos de 9 litros de capacidad (Selecta, Barcelona, España).

2.3. Síntesis de nanopartículas

El nanomaterial finalmente seleccionado para MSPE fue MWCNTs/Fe₃O₄@PPy, sintetizado en el laboratorio de acuerdo con el procedimiento previamente descrito por Asgharinezhad y Ebrahimzadeh [34], incluyendo algunas modificaciones. Se disolvieron 0,85 g de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O y 0,422 g de FeCl₃·6H₂O en 250 mL de agua, añadiendo sobre esta disolución 0,5 g de MWCNTs y sometiendo la mezcla a ultrasonidos durante 20 min a 50 °C. A continuación, se agregaron gota a gota 20 mL de una disolución 8 M de NH₄OH para provocar, con ese medio básico, la precipitación de las nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ sobre las paredes de los MWCNTs. Para completar el crecimiento del nanomaterial, la reacción se mantuvo en un baño de agua a 50 °C durante 30 min. El precipitado de MWCNTs/Fe₃O₄ se separó de la disolución acuosa con ayuda de un imán, desechando la fase acuosa. El nanomaterial se lavó tres veces con agua pura y etanol, y se secó a 70 °C durante toda la noche en un horno.

Para conseguir mayor selectividad, MWCNTs/Fe₃O₄ se funcionalizó recubriéndolo de polipirrol (PPy), mediante una reacción de polimerización oxidativa en presencia de FeCl₃ como oxidante. A 0,6 g de MWCNTs/Fe₃O₄ se añadieron 250 mL de agua pura, ajustando el pH a 9 con amoníaco, y se agitó durante 5 min. Se añadieron entonces 0,4 mL de pirrol, manteniendo la agitación otros 10 min, y seguidamente 0,8 g de perclorato de sodio, y se mantuvo agitando durante otros 5 min. Por último, se añadieron gota a gota, con agitación constante, 50 mL de una disolución acuosa conteniendo 0,56 g de FeCl₃. La reacción se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, el nanomaterial MWCNTs/Fe₃O₄@PPy se lavó varias veces con agua purificada y etanol hasta que el líquido de lavado era incoloro, y se secó a 70 °C durante toda la noche.

Además de este material magnético, se sintetizaron otros diferentes para estudiar su eficiencia de preconcentración para los inhibidores de PDE-5:

✓ El recubrimiento de las MNPs de ferrita con chitosán (Fe₃O₄@chitosan) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Tong y Chen [35]: 0,4 g de chitosán y 0,2 mL de ácido acético se añadieron a 40 mL de acetato sódico 0,1 M, manteniéndose la mezcla en baño de ultrasonidos durante 10 min a temperatura ambiente. Por otro

lado, se añadieron 1,27 g de FeCl₂·4H₂O y 2,70 g de FeCl₃·6H₂O sobre 100 mL de acetato sódico 0,1 M. Finalmente, sobre la mezcla de ambas disoluciones, se añadieron gota a gota 40 mL de NaOH 6 M, agitando durante una hora a 55 °C. El producto formado se lavó con agua y etanol varias veces y se secó en un horno a 60 °C. Las MNPs generadas tienen carácter hidrofílico y son muy reactivas hacia grupos amino y carboxílico.

✓ La síntesis de CoFe₂O₄ [36], como alternativa a los núcleos de ferrita, se llevó a cabo mezclando 25 mL de una disolución acuosa de FeCl₃·6H₂O 0,4 M y 25 mL de CoCl₂·6H₂O 0,2 M. Sobre la mezcla se agregaron gota a gota, 25 mL de NaOH 3 M, manteniendo la disolución a 80 °C y en agitación durante 1 h. Una vez enfriada la mezcla, se retiró el material magnético con ayuda de un imán, se lavó con agua y etanol y se secó a 100 °C durante toda la noche. La funcionalización de las MNPs de CoFe₂O₄ se abordó con distintos materiales:

✓ Para el recubrimiento con polidopamina (PDA), generando CoFe₂O₄@PDA, se añadieron 320 mg de MNPs de CoFe₂O₄ dispersadas en 160 mL de una disolución Tris-HCl a pH 8,5, sonicando en un baño durante 10 min, seguidamente se añadieron 320 mg de hidrocloruro de dopamina. Esta disolución se mantuvo en agitación orbital durante 10 h. Las nanopartículas ya recubiertas, se separaron usando un imán, se lavaron con agua y etanol y se secaron a 60 °C [37].

✓ La funcionalización con poliestireno (PS), para generar CoFe₂O₄@PS [38], implicó la adición de 6 mL de estireno y 0,6 mL de ácido metacrílico a 200 mg de núcleos magnéticos de ferrita de cobalto dispersados en 100 mL de agua. La mezcla se mantuvo en agitación a 70 °C y en ausencia de oxígeno. Para iniciar la polimerización, se añadieron 0,1 g de peroxodisulfato de potasio. Las NPs de CoFe₂O₄@PS formadas se lavaron con agua y etanol y se mantuvieron a 60 °C durante 24 h. Este recubrimiento polimérico aporta una alta proporción de estructuras π-conjugadas.

✓ El recubrimiento con polianilina (PANI), dando lugar a CoFe₂O₄@PANI [39], se llevó a cabo añadiendo 0,2 mL de anilina monomérica y 0,25 g de MNPs de CoFe₂O₄ a 10 mL de HCI 3 mM, manteniendo la mezcla en agitación durante 16 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron gota a gota 5 mL de (NH₄)₂S₂O₈ 2,2 mM, y se mantuvo la agitación toda la noche. Finalmente, el producto CoFe₂O₄@PANI se separó, se lavó con agua y etanol varias veces y se secó a 100 °C durante 12 h. Estas nanopartículas son hidrofílicas, estables y buenas extractantes de compuestos polares y aromáticos por la interacción π - π con su anillo bencílico.

✓ La funcionalización con polipirrol (PPy), para la generación de CoFe₂O₄@PPy [34], se obtuvo por adición de 1 g de CoFe₂O₄ y 0,5 mL de pirrol monomérico a 400 mL de una disolución acuosa ajustada a pH 9 con amoníaco (25%, v/v), agitando durante 10 min. A continuación, se añadió 1 g de perclorato de sodio, manteniendo la agitación otros 10 min, y seguidamente, 50 mL de una disolución conteniendo 0,9 g de FeCl₃·6H₂O gota a gota y en agitación. La reacción de polimerización se dejó proceder durante 15 h a temperatura ambiente. Finalmente, el material magnético se lavó varias veces con agua y etanol y se mantuvo a 100 °C durante toda la noche. Estas nanopartículas se caracterizan por su elevada estabilidad y su afinidad hacia compuestos polares.

✓ Para el recubrimiento de las MNPs de CoFe₂O₄ con sílice y β-ciclodextrinas (CoFe₂O₄@SiO₂/β-CD) se siguió el procedimiento de Liu y colaboradores [40]: a 100 mL de etanol mantenido a 50 °C se añadieron 1 g de las MNPs, 20 mL de amoníaco (25%, v/v), 20 mL de agua y 3 mL de TEOS. La mezcla se sometió a agitación orbital durante 3 h. Las MNPs de CoFe₂O₄@SiO₂ generadas se separaron de la disolución usando un imán, siendo lavadas con etanol y HCl 0,1 M antes de su secado a 80 °C. Seguidamente, se añadieron 2,5 g de β-CDs disueltas en 50 mL de DMF conteniendo 0,5 g de hidruro de sodio, al material magnético recogido en la etapa anterior. La disolución se sometió a agitación orbital durante 15 min y se filtró en papel. Después, se añadieron 4 mL de GTMS al filtrado, agitando durante 5 h a 90 °C. Una vez enfriada la disolución, se añadieron 50 mL de DMF y 1,5 mL de amoníaco (25%, v/v) a 1 g de las MNPs, dejando la reacción proceder 12 h más en agitación orbital. El material magnético final se lavó con etanol y agua y se secó a 100 °C.

2.4. Muestras y procedimiento analítico

Se analizaron diferentes tipos de muestras adquiridas en tiendas y farmacias locales:

- Muestras líquidas o solubles en agua:

✓ Bebidas energéticas. Se analizaron cuatro muestras (B1-B4) comercializadas en envases de aluminio cuya composición declarada era 0,032% (m/v) de cafeína para todas las muestras, 11% (m/v) de glucosa para B1 y B3, y 0% de glucosa para B2 y B4.

Las muestras fueron filtradas a vacío a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm, tomándose una alícuota de 30 mL para proceder a la etapa MSPE detallada más adelante.

✓ Geles lubricantes (G1-G4). Se analizaron cuatro muestras de geles lubricantes de diferentes marcas y tipos: estimulante, de masaje y lubricación, con aroma y sabor y uno deportivo con efecto calor. Se tomaron masas de 5 g de muestra a las que se añadieron volúmenes de 25 mL de agua, dando lugar a volúmenes finales de 30 mL, agitándose manualmente la mezcla durante unos segundos antes de su preconcentración mediante MSPE.

- Muestras sólidas:

✓ Suplementos dietéticos en formato de cápsulas (S1 y S2) y comprimidos (S3-S5) con diferentes composiciones y finalidades. La muestra S1 se comercializa como complemento alimenticio para mantener los niveles normales de testosterona conteniendo ginseng, maca, guaraná, L-arginina, canela, vitaminas y cinc. Mientras que la muestra S2 se compone únicamente de ginkgo, el cual se asocia a una mejora del rendimiento cerebral y de la circulación sanguínea. La tercera muestra (S3) contiene cinc, vitamina C, extracto de ferula assafoétida (planta afrodisíaca con acción vasodilatadora) y de ginkgo biloba. La muestra S4 es un complejo vitamínico y de minerales indicado para hombres mayores de 50 años. También lo era la muestra S5, para adultos de 50 años en general, pero etiquetado como "natural" por ser una combinación de plantas tales como amla, acerola, albahaca, árbol del curry, limón, guayaba, uva, liquen y tagete. Para el análisis, se utilizó el polvo contenido en las cápsulas para las muestras S1 y S2, mientras que las muestras S3, S4 y S5 (comprimidos) se trituraron previamente en un mortero.

✓ Pelo de cuero cabelludo (P1-P3): se obtuvo de tres varones voluntarios de edades comprendidas entre 35 y 65 años. Estas muestras se lavaron previamente dos veces con metanol y dos veces con agua destilada antes de su tratamiento SLE.

Las muestras sólidas fueron sometidas previamente a una etapa SLE en medio alcalino. Para ello se tomaron 60 mg de pelo o suplemento dietético a los que se añadieron 30 mL de NaOH 5 mM, manteniendo la mezcla en agitación orbital durante 12 h. Seguidamente, la fase líquida era separada por filtración a vacío usando un filtro de membrana de nylon de 0,45 µm, y neutralizada por adición de 20 µL de HCl 7 M.

179

Procedimiento MSPE. Para la etapa de adsorción, se añadieron 20 mg de MWCNTs/Fe₃O₄@PPy a 30 mL de muestra, tratada según las condiciones anteriormente especificadas, y se sometió la mezcla a agitación vórtex durante 10 min. Las MNPs enriquecidas con los analitos fueron recuperadas con ayuda de un imán, procediéndose a la etapa de desorción por adición de 1 mL de MeOH y agitación orbital durante 1 min. El extracto así obtenido se evaporó hasta sequedad y se reconstituyó en 100 μL de AcN, de los que 20 μL fueron inyectados en el sistema LC-QqQ-MS².

3. Resultados y discusión

3.1. Separación cromatográfica y condiciones MS

La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna UHPLC XDB-C18 (50 x 4,6 mm, 1,8 µm) para conseguir una mejor resolución de los picos en un corto periodo de tiempo.

Aplicando elución isocrática, se optimizó la composición de la fase móvil usando una mezcla AcN:acetato amónico (0,05 M, pH=6,9) en distintas proporciones comprendidas entre 35:65 y 45:55, y diferentes velocidades de flujo en el intervalo 0,3-0,6 mL min⁻¹. Los mejores resultados, en relación a tiempo de análisis, resolución y forma de los picos cromatográficos, se obtuvieron con un 40% de AcN en la fase móvil y 0,6 mL min⁻¹. Dado que estas condiciones no proporcionaron separación entre SIL y VAR, la influencia del pH del componente acuoso de la fase móvil fue también estudiada sin éxito. Sin embargo, dado que estos dos compuestos eran monitorizados a través de distintas transiciones, se seleccionó la proporción 40:60 AcN:acetato amónico a 0,6 mL min⁻¹, eluyendo todos los analitos entre 2 y 4,8 min. Se incorporó una etapa de limpieza con un 90% de AcN para eluir especies más fuertemente retenidas y evitar el deterioro de la fase estacionaria.

3.2. Optimización del procedimiento MSPE

La optimización del procedimiento de preconcentración se realizó usando un detector de diodos en serie acoplado a LC. Ya que SIL y VAR eluían con tiempos de retención muy cercanos, estos estudios se llevaron a cabo utilizando una disolución acuosa conteniendo DSIL, TAD y VAR a 50 ng mL⁻¹. Dado que la estructura molecular

de SIL es muy similar a la de VAR (Fig. V.1), se espera que el comportamiento de ambos fármacos en la etapa MSPE sea muy parecido.

Se estudió la influencia de las variables que afectan en MSPE tanto a la etapa de adsorción como de desorción: naturaleza y masa de MNPs, volumen de fase dadora, tiempo de adsorción, naturaleza y volumen del disolvente de desorción y tiempo de desorción.

El parámetro más importante que afecta a la eficiencia de extracción en MSPE es la naturaleza del material magnético adsorbente. Se evaluaron diferentes tipos de recubrimientos poliméricos para los núcleos de CoFe₂O₄, incluyendo PDA, PS, PANI y PPy, así como β-CD. Para los núcleos de ferrita se estudió la eficiencia de los recubrimientos de chitosán y MWCNTs funcionalizados con PPy. Un recubrimiento se considera eficiente cuando adsorbe un alto porcentaje de analitos desde la fase dadora y, además, después se consigue una desorción efectiva en un disolvente adecuado. La eficiencia de los materiales magnéticos ensayados fue estudiada por análisis mediante LC tanto de la disolución acuosa de los estándares transcurrida la etapa de adsorción, como del disolvente empleado para la desorción de los analitos desde las MNPs.

La Figura V.2 muestra los valores medios de área de pico (n=2), obtenidos por inyección directa en el sistema LC de una disolución estándar acuosa (50 ng mL⁻¹), con las de esa misma disolución (25 mL) sometida a la etapa de adsorción MSPE, usando 25 mg de MNPs mantenidas en agitación vórtex con la fase dadora durante 10 min.



Fig. V.2: Influencia de la naturaleza de la fase extractante sobre la eficiencia de preconcentración.

Se observa en la Figura V.2 que las MNPs con recubrimiento de chitosán y β -CD no adsorbieron los compuestos de forma significativa, ya que las señales de la fase dadora prácticamente no variaban antes y después de someterla a la etapa de adsorción. Por el contrario, los materiales que mejor adsorbieron los inhibidores de PDE-5 fueron PPy, PS y MWCNTs/PPy, en el orden citado. El resto de los materiales magnéticos mostraron eficiencias de extracción intermedias.

A continuación, se procedió a estudiar la etapa de desorción para aquellas MNPs que habían adsorbido los analitos con media y alta eficiencia. Para ello, los 25 mg de material magnético enriquecido se pusieron en contacto con 1 mL de disolvente de desorción y la mezcla se mantuvo en agitación vórtex durante 5 min. El extracto obtenido se evaporó y se reconstituyó en 100 µL de MeOH para su análisis. Se ensayaron MeOH y AcN como disolventes de desorción. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.2, donde se puede apreciar, como era de esperar, que los mejores resultados se obtuvieron con PPy, PS y MWCNTs/PPy. Sin embargo, aunque PPy adsorbió los analitos en un alto porcentaje, no fueron desorbidos en gran extensión con ninguno de los disolventes empleados. Por otro lado, MeOH proporcionó mejores señales que AcN para la desorción desde PS y MWCNTs/PPy, pero dado que este último material parecía funcionar mejor para TAD y SIL y el recubrimiento de PS para DSIL y VAR, se optó por seguir optimizando todos los parámetros MSPE con ambos tipos de MNPs.

Tipo de MNPs	MeOH			AcN		
_	TAD	DSIL	VAR	TAD	DSIL	VAR
PDA	148	164	227	109	126	215
PANI	93	408	172	84	390	150
PS	546	835	677	431	345	501
РРу	40	213	108	32	198	94
MWCNTs/PPy	1167	328	500	1100	384	425
^a Valor medio (n=2)						

Tabla V.2. Áreas^a de pico obtenidas del análisis del extracto de desorción desde diferentes tipos de MNPs.

Seguidamente, se aplicó un estudio multivariante basado en un diseño Taguchi para optimizar cuatro parámetros interrelacionados a cuatro niveles diferentes cada uno de ellos: volumen de muestra (10, 20, 30 y 40 mL), masa de MNPs (20, 40, 60 y 80 mg), tiempo de extracción (5, 10, 20 y 30 min) y volumen de MeOH (1, 2, 3 y 4 mL). El diseño Taguchi así planteado dio lugar a 16 pruebas a realizar (Tabla V.3).

Encovo	Volumen de	Masa de	Tiempo de extracción	Volumen de	
LIISayO	muestra (mL)	MNPs (mg)	(min)	MeOH (mL)	
1	10	20	5	1	
2	10	40	10	2	
3	10	50	20	3	
4	10	70	30	4	
5	20	20	10	3	
6	20	40	5	4	
7	20	50	30	1	
8	20	70	20	2	
9	30	20	20	4	
10	30	40	30	3	
11	30	50	5	2	
12	30	70	10	1	
13	40	20	30	2	
14	40	40	20	1	
15	40	50	10	4	
16	40	70	5	3	

Tabla V.3. Diseño Taguchi para la optimización del procedimiento MSPE

Las áreas de pico obtenidas en cada uno de estos experimentos para cada analito con los recubrimientos de PS y MWCNTs/PPy se muestran en la Figura V.3. Si bien no se observaron grandes diferencias de sensibilidad para TAD y SIL con las dos fases extractantes, la extracción de VAR fue claramente más eficiente con MWCNTs/PPy, por lo que MWCNTs/Fe₃O₄@PPy fue el nanomaterial magnético seleccionado.



Fig. V.3: Área de pico obtenida en los experimentos del diseño Taguchi usando dos MNPs diferentes

del estudio Los resultados multivariante Taguchi realizado con MWCNTs/Fe₃O₄@PPy se muestran en la Figura V.4, en la que se observa que las señales incrementaron con el volumen de muestra hasta 30 mL, siendo el aumento de sensibilidad menos notable para 40 mL. Con respecto al tiempo de extracción, la señal aumentó hasta 10 min, manteniéndose prácticamente constante para tiempos más largos. La masa de MNPs se varió entre 20 y 70 mg, encontrándose la máxima sensibilidad para la menor masa ensayada. Las señales disminuyeron al aumentar el volumen del disolvente de desorción en todo el intervalo estudiado, probablemente debido un efecto de dilución. Finalmente, se estudió el efecto del pH de la fase acuosa en el intervalo 2-9, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los casos. Por tanto, las condiciones seleccionadas como óptimas fueron: 30 mL de volumen de fase acuosa, 10 min de extracción, 20 mg de MNPs y 1 mL de MeOH como disolvente de desorción.



Fig. V.4: Diseño de Taguchi para el estudio de (A) volumen de fase acuosa, (B) tiempo de extracción, (C) masa de MNPs y (D) volumen de MeOH

Para estudiar el tiempo de desorción, en 1 mL de MeOH se comprobó el efecto de la aplicación de energía externa (agitación vórtex, agitación orbital o ultrasonidos),

con objeto de acortar esta etapa. Este estudio se realizó en el equipo LC-MS², por lo que ya se podía diferenciar entre SIL y DSIL, incluyéndose ambos compuestos para esta optimización. En la Figura V.5 se observa que, para el promedio de los analitos, se consiguió mayor eficiencia de desorción aplicando 1 min de agitación orbital. Cuando se ensayaron tiempos de desorción más largos, la sensibilidad no aumentó, por lo que finalmente se optó por agitación orbital durante 1 min.





3.3. Pretratamiento de las muestras

- *Muestras líquidas*. Se ensayaron diferentes volúmenes (5, 10, 20 y 30 mL) de las bebidas energéticas fortificadas a 10 ng mL⁻¹ con los cuatro analitos, diluyéndolas con agua hasta 30 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.6, observándose un aumento de la señal con el volumen de muestra fortificada. Por tanto, se seleccionó un volumen de 30 mL de bebida para el procedimiento MSPE, sin necesidad de ningún tratamiento previo para este tipo de muestra, excepto una filtración a vacío a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm.



Fig. V.6: Efecto del volumen de bebida en la eficiencia de MSPE

Para las muestras de gel, se estudió su masa entre 1 y 5 g, fortificando la muestra a 300 ng g⁻¹ y disolviendo el gel en agua hasta 30 mL. La Figura V.7 muestra un aumento de la señal con la masa de muestra, siendo 5 g la cantidad de muestra analizada.



Fig. V.7: Efecto de la masa de gel en el procedimiento MSPE

- *Muestras sólidas*. Los inhibidores PDE-5 se suelen extraer de los suplementos dietéticos en disolventes orgánicos [3–5,10,12–14] o mezclas de estos disolventes con agua [6,7,11,15–17]. Para las muestras de pelo, se propone la modificación del pH en ausencia y presencia de disolventes orgánicos [19–21]. En este trabajo, al emplear MNPs funcionalizadas con diferentes recubrimientos, que podrían deteriorarse al emplear disolventes orgánicos, se optó por evitar su uso en la etapa SLE.

La optimización del procedimiento de extracción para pelo y suplementos dietéticos se llevó a cabo con 30 mg de muestra, a la que se añadieron distintos medios de extracción (30 mL): NaOH 50 y 5 mM y HCl 50 y 5 mM. Se mantuvieron las mezclas en agitación durante 12 h y el extracto fue filtrado con un filtro de nylon de 0,45 µm y neutralizado antes de proceder a su preconcentración mediante MSPE. La Figura V.8 muestra los resultados obtenidos para una muestra de suplemento dietético, proporcionando los mejores resultados la disolución básica más diluida. El mismo comportamiento fue observado para las muestras de pelo, seleccionándose, por tanto, el medio 5 mM en NaOH para la etapa SLE.



Fig. V.8: Influencia del medio extractante en SLE de suplementos dietéticos

Además, se estudió la masa de muestra sólida en el rango de 30 a 60 mg (Figura V.9), fortificando la muestra a 10 ng g⁻¹. Las áreas de pico aumentaron al incrementar la masa de muestra, por lo que se seleccionan 60 mg.



Fig. V.9: Efecto de la masa de muestra en SLE

3.4. Validación del método y efecto matriz

El procedimiento propuesto fue validado en términos de precisión, límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs), rango de linealidad y exactitud. Para ello, se obtuvieron gráficas de calibrado mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados representando la concentración de analito frente al área de pico. Se obtuvo linealidad en el intervalo de 0,025 a 25 ng mL⁻¹, con coeficientes de regresión (R²) superiores a 0,998.

Se utilizó el método de adiciones estándar a la muestra para estudiar la posible presencia de efecto matriz. Mediante el *t*-test se compararon las pendientes de las gráficas de adiciones estándar de cada uno de los distintos tipos de muestras con las obtenidas con estándares acuosos. Aunque se confirmó la presencia de efecto matriz, puesto que los valores de "p" fueron inferiores a 0,05, al nivel de confianza del 95%, no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes obtenidas para las distintas muestras de un mismo tipo, por lo que se recomendó la cuantificación con una matriz modelo.

La sensibilidad del método se evaluó mediante los LDs, calculados para una relación señal/ruido (S/N) de 3, y los LQs, obtenidos para una relación S/N de 10. Los valores obtenidos para cada tipo de muestra, se recogen en la Tabla V.4. La repetitividad se estudió en términos de desviación estándar relativa (RSD) para diez análisis repetidos de una muestra de cada tipo, fortificadas a 20 ng mL⁻¹. Los valores obtenidos se situaron en el rango 4,3-7%.

Muestres	DSIL		TAD		VAR		SIL	
Muestras	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD
Bebidaª	0,67	0,22	0,30	0,10	0,04	0,01	0,28	0,09
Gel ^b	17	5,8	11	3,7	2,6	0,87	17	5,5
Pelo ^b	215	71	256	85	12	3,9	99	33
Suplemento dietético ^b	1530	510	329	110	24	8,1	251	84
^a Expresados en no ml ⁻¹ ^b Expresados en no σ^{-1}								

Tabla V.4. Parámetros de sensibilidad obtenidos para el método MSPE-LC-MS²

3.5. Análisis de las muestras y estudios de recuperación

El método propuesto se aplicó para la determinación del contenido de inhibidores de PDE-5 en varias muestras de diferente procedencia, cuatro bebidas energéticas, cuatro geles lubricantes, cuatro suplementos dietéticos y pelo capilar de tres hombres. Los analitos se identificaron comparando sus tiempos de retención, sus transiciones y las abundancias relativas entre las disoluciones estándar, las muestras y las muestras fortificadas. Ninguno de los compuestos estudiados fue detectado en las muestras a niveles de concentración superiores a sus correspondientes LDs.

La Figura V.10 corresponde a un cromatograma de iones totales (TIC), así como los de iones extraídos (EICs) obtenidos de una muestra de bebida energética fortificada a 10 ng mL⁻¹.



Fig. V.10: Cromatogramas TIC y EIC obtenidos para una bebida energética fortificada a 10 ng mL⁻¹ *con los estándares y analizada mediante MSPE-LC-MS*²

Para estudiar la exactitud del método desarrollado, se llevaron a cabo ensayos de recuperación. Una muestra de bebida energética y otra de un suplemento

alimenticio se fortificaron a dos niveles de concentración, 5 y 10 ng mL⁻¹, una vez fortificadas se mantuvieron en reposo de 2 horas hasta su análisis. Las recuperaciones estuvieron en el rango 81-123% (Tabla V.5).

	5			
Compuesto	Nivel de fortificación	Bebida	Suplemento	
Compuesto	(ng mL ⁻¹)	energética	dietético	
DSIL	5	103	86	
	10	105	123	
TAD	5	105	81	
	10	118	112	
VAR	5	111	75	
	10	97	115	
SIL	5	113	82	
	10	97	112	

Tabla V.5. Porcentajes de recuperación (%) encontrados para los inhibidores de la PDE-5

4. Conclusiones

Se ha propuesto por primera vez la técnica MSPE para la preconcentración de cuatro inhibidores de la PDE-5 mediante LC-QqQ-MS². Para la extracción se utiliza un nanomaterial magnético compuesto de MWCNTs/Fe₂O₃ y funcionalizado con PPy que permite alcanzar bajos límites de detección en el análisis de muestras de muy distinta naturaleza. Las características del método desarrollado le convierten en una herramienta útil para seguridad humana, a través de la detección de productos adulterados, así como para estudios forenses.

Referencias

[1] D.N. Patel, L. Li, C.L. Kee, X. Ge, M.Y. Low, H.L. Koh, Screening of synthetic PDE-5 inhibitors and their analogues as adulterants: analytical techniques and challenges, J. Pharm. Biomed. Anal. 87 (2014) 176–190.

[2] Periódico "El Mundo", https://www.elmundo.es/ciencia-y-salud/salud/2019/06/11/5cff7eb3fc6c83f6588b457d.html, (último acceso, enero 2020).

[3] S.U. Mokhtar, S.T. Chin, C.L. Kee, M.Y. Low, O.H. Drummer, P.J. Marriott, Rapid determination of sildenafil and its analogues in dietary supplements using gas 192

chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, J. Pharm. Biomed. Anal. 121 (2016) 188–196.

[4] K. Wang, H. Zeng, Y. Zhang, X. Xie, Z. Yue, W. Zhang, C. Fu, L. Luo, H. Fan, A hierarchical screening method for detection of illegal adulterants in Fur seal ginseng pills by profiling analysis of HPLC multi-dimensional fingerprints, J. Sep. Sci. 42 (2019) 1509–1519.

[5] A.A. Savaliya, R.P. Shah, B. Prasad, S. Singh, Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil using LC/PDA and extracted ion LC-MS/TOF, J. Pharm. Biomed. Anal. 52 (2010) 406–409.

[6] S. Roh, Y. Kang, S. Park, Y. Huh, Determination of tadalafil and Ndesmethylsibutramine in health and dietary supplements using ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF MS), Food Addit. Contam. Part A 28 (2011) 1475–1482.

[7] F. Shi, C. Guo, L. Gong, J. Li, P. Dong, J. Zhang, P. Cui, S. Jiang, Y. Zhao, S. Zeng, Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements, J. Chromatogr. A 1344 (2014) 91–98.

[8] N.M. Reeuwijk, B.J. Venhuis, D. de Kaste, L.A.P. Hoogenboom, I.M.C.M. Rietjens, M.J. Martena, Sildenafil and analogous phosphodiesterase type 5 (PDE-5) inhibitors in herbal food supplements sampled on the Dutch market, Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 30 (2013) 2027–2034.

[9] S. Xiao, Y. He, Analysis of sildenafil in liquor and health wine using surface enhanced Raman spectroscopy, Int. J. Mol. Sci. 20 (2019) 1–13.

[10] I. Fejos, G. Neumajer, S. Béni, P. Jankovics, Qualitative and quantitative analysis of PDE-5 inhibitors in counterfeit medicines and dietary supplements by HPLC-UV using sildenafil as a sole reference, J. Pharm. Biomed. Anal. 98 (2014) 327–333.

[11] E.A. Nickum, C.L. Flurer, Determination of phosphodiesterase-5 inhibitors and analogs using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, J. Chromatogr. Sci. 53 (2015) 38–46.

[12] F.F. Chen, X.Y. Xie, Y.P. Shi, Magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of sildenafil, vardenafil and their analogs from herbal medicines, Talanta 115 (2013) 482–489.

[13] E. Yilmaz, H.i. Ulusoy, Ö. Demir, M. Soylak, A new magnetic nanodiamond/graphene oxide hybrid ($Fe_3O_4@ND@GO$) material for pre-concentration and sensitive determination of sildenafil in alleged herbal aphrodisiacs by HPLC-DAD system, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 1084 (2018) 113–121.

[14] P. Zou, S.S.Y. Oh, P. Hou, M.Y. Low, H.L. Koh, Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-elect, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 113–122.

[15] M. Poplawska, A. Blazewicz, P. Zolek, Z. Fijalek, Determination of flibanserin and tadalafil in supplements for women sexual desire enhancement using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometer, diode array detector and charged aerosol detector, J. Pharm. Biomed. Anal. 94 (2014) 45–53.

[16] C. Bortolini, A. Pivato, S. Bogialli, P. Pastore, "One-shot" analysis of PDE 5 inhibitors and analogues in counterfeit herbal natural products using an LC-DAD QTOF system, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 6207–6216.

[17] S.R. Gratz, C.L. Flurer, K.A. Wolnik, Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 525–533.

[18] E.Ö. Er, B. Özbek, S. Bakırdere, A sensitive and selective analytical method for the simultaneous determination of sildenafil and tadalafil in water, energy drinks and sewage sludge matrices by LC-QTOF-MS/MS, J. Int. Meas. Confed. 124 (2018) 64–71.

[19] K. Saisho, K.S. Scott, S. Morimoto, Y. Nakahara, Hair analysis for pharmaceutical drugs. II. Effective extraction and determination of sildenafil (viagra) and Its N-desmethyl metabolite in rat and human hair by GC-MS, Biol. Pharm. Bull. 24 (2001) 1384–1388.

194

[20] M. Duez, M. Etter, N. Klinger, V. Cirimele, Synthetic phosphodiesterase-5-inhibitors use/abuse and interest of hair testing: reporting of a rape case, Drug Test. Anal. 6 (2014) 17–21.

[21] S. Lee, B. Choi, J. Kim, S. In, S. Baeck, S.M. Oh, K.H. Chung, An LC-MS/MS method for the determination of five erectile dysfunction drugs and their selected metabolites in hair, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 978–979 (2015) 1–10.

[22] P. Kintz, J. Evans, M. Villain, C. Chatterton, V. Cirimele, Hair analysis to demonstrate administration of sildenafil to a woman in a case of drug-facilitated sexual assault, J. Anal. Toxicol. 33 (2009) 553–556.

[23] V. Dumestre-Toulet, V. Cirimele, S. Gromb, T. Belooussoff, D. Lavault, B. Ludes, P. Kintz, Last performance with VIAGRA®: Post-mortem identification of sildenafil and its metabolites in biological specimens including hair sample, Forensic Sci. Int. 126 (2002) 71–76.

[24] S. Lee, S. Kang, D. Ji, S. Baeck, S. Lee, S.M. Oh, K.H. Chung, Quantitative LC–MS/MS method in urine for the detection of drugs used to reverse the effects of chemical castration, Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 3185–3194.

[25] P. Proença, B.D. Forensic, C. Mustra, M.S. Forensic, Validated UPLC-MS/MS assay for the determination of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors in postmortem blood samples, J. Forensic Leg. Med. 20 (2013) 655–658.

[26] N. Campillo, J. Marín, J. Fenoll, I. Garrido, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, P. Viñas, Determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors by LC-MS² in waters and human urine submitted to dispersive liquid-liquid microextraction, Talanta 174 (2017) 638–644.

[27] E.Ö. Er, E. Akkaya, B. Özbek, S. Bakırdere, Development of an analytical method based on citric acid coated magnetite nanoparticles assisted dispersive magnetic solid-phase extraction for the enrichment and extraction of sildenafil, tadalafil, vardenafil and avanafil in human plasma and urine prior, Microchem. J. 147 (2019) 269–276.

[28] C. Xiao, M. Tang, J. Li, C. ru Yin, G. Xiang, L. Xu, Determination of sildenafil, vardenafil and sildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid

A. Oller Ruiz

microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection, J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 931 (2013) 111–116.

[29] M. Tang, Q. Wang, M. Jiang, L. Xu, Z.-G. Shi, T. Zhang, Y. Liu, Magnetic solid-phase extraction based on methylcellulose coated-Fe₃O₄-SiO₂-phenyl for HPLC-DAD analysis of sildenafil and its metabolite in biological samples, Talanta 130 (2014) 427–32.

[30] H.E. Dahshan, M.A. Helal, S.M. Mostafa, M.S. Elgawish, Development and validation of an HPLC-UV method for simultaneous determination of sildenafil and tramadol in biological fluids: Application to drug-drug interaction study, J. Pharm. Biomed. Anal. 168 (2019) 201–208.

[31] Z. Bartošová, D. Jirovský, A. Horna, High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7996–8001.

[32] C. Ferreira, C. Paulino, A. Quintas, Extraction procedures for hair forensic toxicological aanalysis: a mini-review, Chem. Res. Toxicol. 32 (2019) 2367–2381.

[33] M. Šafaříková, I. Šafařík, Magnetic solid-phase extraction, J. Magn. Magn. Mater. 194 (1999) 108–112.

[34] A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, Coextraction of acidic, basic and amphiprotic pollutants using multiwalled carbon nanotubes/magnetite nanoparticles@polypyrrole composite., J. Chromatogr. A 1412 (2015) 1–11.

[35] J. Tong, L. Chen, Determination of pyrethroids in environmental waters using magnetic chitosan extraction coupled with high performance liquid chromatography detection, Anal. Lett. 46 (2013) 1183–1197.

[36] 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. Mater. 308 (2007) 289–295.

[37] Z. Huang, H.K. Lee, Study and comparison of polydopamine and its derived carbon decorated nanoparticles in the magnetic solid-phase extraction of estrogens, J. Chromatogr. A 1414 (2015) 41–50.

196

[38] X. Yu, Y. Sun, C. Jiang, X. Sun, Y. Gao, Y. Wang, H. Zhang, D. Song, Magnetic solid-phase extraction of five pyrethroids from environmental water samples followed by ultrafast liquid chromatography analysis, Talanta 98 (2012) 257–264.

[39] A. Mehdinia, F. Roohi, A. Jabbari, Rapid magnetic solid phase extraction with in situ derivatization of methylmercury in seawater by Fe₃O₄/polyaniline nanoparticle, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 4269–4274.

[40] Y. Ji, X. Liu, M. Guan, C. Zhao, H. Huang, H. Zhang, C. Wang, Preparation of functionalized magnetic nanoparticulate sorbents for rapid extraction of biphenolic pollutants from environmental samples, J. Sep. Sci. 32 (2009) 2139–2145.

CAPÍTULO VI

Comparación de microextracción dispersiva líquido-líquido y microextracción en fase sólida magnética para la determinación de herbicidas ácidos clorofenoxi en muestras medioambientales mediante LC-QqQ-MS²



Resumen

En este Capítulo se comparan dos procedimientos de preconcentración, microextracción en fase sólida magnética (MSPE) y microextracción dispersiva líquidolíquido (DLLME), para la determinación de herbicidas ácidos clorofenoxi. Los análisis se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo (LC-QqQ-MS²), permitiendo la cuantificación de seis herbicidas en aguas y suelos. El aislamiento de los analitos desde las matrices de suelos se realizó mediante extracción sólido-líquido en condiciones alcalinas. Para MSPE, se añadió una masa de 40 mg de nanopartículas magnéticas CoFe₂O₄@polipirrol a 30 mL de muestra, o extracto de suelo, manteniendo agitación vórtex durante 10 min. La desorción se consiguió con 0,1 mL de metanol acidificado. Para DLLME, se preconcentraron 10 mL de muestra en 50 µL de 1-octanol, usando metanol como dispersante. Los procedimientos se validaron mediante estudios de recuperación, obteniéndose valores entre 80-117 y 80-112% para MSPE y DLLME, respectivamente.

1. Introducción

Los herbicidas ácidos clorofenoxi (CPAHs) son compuestos fitotóxicos empleados para el control del crecimiento de malas hierbas en diferentes tipos de plantaciones agrícolas. Dos de los herbicidas más comúnmente usados en Europa son el ácido 4cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) [1]. Debido a la baja volatilidad y alta polaridad y persistencia de los CPAHs, su dispersión en el medio ambiente ocurre fácilmente, originando problemas de contaminación. Su persistencia en el suelo depende de las propiedades de este, tales como el contenido en materia orgánica, ácidos húmicos, oxígeno y acidez [2].

Aunque los CPAHs son muy potentes, incluso siendo aplicados a bajas concentraciones, su potencial carácter carcinogénico y teratogénico les convierte en objeto de interés en materia de salud ambiental. En consecuencia, algunos de ellos se hallan incluidos en la lista europea de contaminantes prioritarios, tales como MCPA, 2,4-D y ácido propiónico 2-(2,4-diclorofenoxi) (2,4-DP) [3]. La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental (US EPA), así como otras organizaciones gubernamentales, establecen un nivel máximo de CPAHs en aguas potables entre 10 y 70 µg L⁻¹ [1]. De esta forma, resulta necesario el desarrollo de métodos analíticos para dichos compuestos, que sean fiables y sensibles, para conseguir su monitorización a nivel de trazas en muestras medioambientales.

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para este propósito, siendo la cromatografía líquida (LC) preferentemente elegida por la baja volatilidad de estos contaminantes, puesto que para trabajar en cromatografía de gases [4–8] es necesaria una etapa de derivatización. LC se ha combinado con detección ultravioleta (UV) [1– 3,9–21] y espectrometría de masas (MS) [22–25], siendo esta última la más sensible y la que aporta una identificación inequívoca, por lo que fue la empleada en este trabajo.

Además, las muestras medioambientales suelen ser matrices complejas, por lo que se deben incluir etapas de limpieza y preconcentración en el procedimiento analítico. En este sentido, el aislamiento de CPAHs desde muestras de suelo, ha sido llevado a cabo generalmente mediante extracción sólido-líquido (SLE) usando medios acuosos a pH básicos [18,22,25], extracción Soxhlet [21] y además con aportación de energías externas, tales como extracción asistida por microondas (MAE) [19] o por ultrasonidos (UAE) [2,20]. Para la limpieza y/o preconcentración de los extractos así obtenidos se ha empleado la metodología en fase dispersa con QuEChERS [25], así como extracción en fase sólida (SPE) [18]. Para las muestras de agua, la preconcentración también ha sido abordada mediante técnicas convencionales como extracción líquido-líquido (LLE) [4] y SPE [18,23].

Sin embargo, para conseguir un bajo consumo de disolventes, costes y tiempo, diversas técnicas miniaturizadas han proporcionado muy buenos resultados, tanto de microextracción en fase sólida (SPME) [6,9,24], como en fase líquida (LPME) [11], entre las que destacan LPME en fibra hueca (HF-LPME) [12], microextracción en gota única (SDME) [5], microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) en su versión clásica [7,13], con demulsificación por disolvente-DLLME [1] y mediada con micelas inversas [14], microextracción en gota directamente suspendida [3], microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME) [8] y microextracción por adsorción sobre barra agitadora (SBSE) [10].

La microextracción en fase sólida magnética (MSPE) con nanopartículas magnéticas (MNPs) [26] está suscitando un gran interés en el área de la Química Analítica. En esta técnica, las MNPs se dispersan en la disolución de los analitos, donde los adsorben, siendo recuperadas estas nanopartículas enriquecidas usando un campo magnético externo, aplicado al acercar un imán. Por último, los analitos son desorbidos de las MNPs en un disolvente adecuado. Comparada con la SPE convencional, MSPE simplifica el tratamiento de la muestra, puesto que no es necesario empaquetar el adsorbente dentro de una columna y, además, la fase dadora y aceptora se separan rápidamente por la acción del imán. La bibliografía muestra aplicaciones de MSPE para la determinación de CPAHs en análisis de aguas [16,17], arroz [27] y brotes de soja [15], utilizando materiales magnéticos de distinta composición.

Este trabajo presenta la optimización de dos procedimientos miniaturizados, DLLME y MSPE, para la determinación de seis herbicidas CPAHs, cuyas estructuras moleculares se representan en la Figura VI.1: dicamba (ácido 3,6-dicloro-2metoxibenzoico), 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico (MCPP) y ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico (2,4-DB), en aguas y suelos. La determinación se lleva a cabo mediante LC y espectrometría de masas en tándem (MS²), con triple-cuadrupolo (QqQ) como analizador de masa. Hay que destacar que no se han publicado trabajos previos para la determinación simultánea de estos seis analitos, y, además, se presentan aquí nuevas conclusiones en cuanto a la comparación de los dos métodos de preconcentración estudiados y su selección en función del tipo de muestra a analizar.



Fig. VI.1: Estructuras moleculares de los CPAHs estudiados

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Los disolventes utilizados, acetonitrilo (AcN) y metanol (MeOH), fueron de calidad LC-MS de Panreac (Barcelona, España). El agua se purificó con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU). Los estándares analíticos de los CPAHs estudiados se obtuvieron de Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se prepararon disoluciones individuales de cada analito a 1000 µg mL⁻¹ en MeOH y se almacenaron en viales ámbar a -20 °C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente en agua y se almacenaron a 4 °C. Otros reactivos necesarios fueron acetato amónico (Sigma-Aldrich), ácido acético (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania), ácido sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemania) y 1-octanol (Acros Organics, Geel, Bélgica).

Para la síntesis de las MNPs de ferrita de cobalto (CoFe₂O₄) con recubrimiento de polipirrol (CoFe₂O₄@PPy) se utilizó cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) (Scharlab, Sentmenat, España), cloruro de cobalto (II) hexahidratado (CoCl₂·6H₂O) (Acros Organics, NJ, EEUU), pirrol monomérico (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (Riedel-de-Haën, Seelze, Alemania), perclorato de sodio y ácido clorhídrico (Panreac). El núcleo de CoFe₂O₄ se sintetizó por coprecipitación de las correspondientes sales. Seguidamente, se recubrió mediante polimerización oxidativa, según el procedimiento descrito por Asgharinezhad y Ebrahimzadeh [28].

2.2. Instrumentación

El análisis se realizó en un sistema Agilent (Waldbronn, Alemania) 1200 HPLC equipado con una bomba cuaternaria (G1312A). Se trabajó en fase reversa con una columna cromatográfica C₁₈ (15 cm × 2,1 mm, 5 μ m) (Sigma-Aldrich). La fase móvil estaba compuesta por el disolvente A (disolución tampón de acetato amónico 5,3 mM, pH 4) y el disolvente B (AcN), trabajando con el siguiente gradiente: una primera etapa isocrática con la mezcla 87:13 A:B durante 2 min, seguidamente un gradiente lineal hasta 73:27 A:B en 0,5 min, manteniéndose esta composición durante 7,5 min. Finalmente, otro incremento lineal hasta el 55% de B en 5,5 min. La velocidad de flujo fue 0,5 mL min⁻¹. El volumen de inyección era de 15 μ L, se utilizó un automuestreador, siendo las muestras mantenidas en viales de vidrio de 2 mL provistos de microinsertos con pie polimérico.

La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas provisto de fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador de triple cuadrupolo (Agilent, G6410A). La fuente ESI operó en modo negativo, aplicando los siguientes parámetros: voltaje del capilar, 4000 V; presión del gas nebulizador, 60 psi y temperatura y flujo del gas de secado, 350 °C y 11 L min⁻¹, respectivamente. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y de colisión. El espectro de masas se registró en el rango *m/z* 50-1000 amu. Para el desarrollo del método y la adquisición de datos cualitativos y cuantitativos se empleó el software "Agilent Mass Hunter Data Acquisition".
Se llevó a cabo un estudio preliminar de las transiciones para cada compuesto en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), mediante infusión directa en la fuente de ionización de disoluciones individuales de 10 µg mL⁻¹ de los CPAHs. Las condiciones seleccionadas para la fragmentación de las moléculas en el triple cuadrupolo se resumen en la Tabla VI.1. El procedimiento de identificación para los residuos de herbicidas en las muestras se basó en el tiempo de retención y en las transiciones MRM, lo que incluye la formación de los iones producto con los valores m/z más altos. Aunque dicamba y 2,4-D mostraron el mismo ion precursor, no fue un problema para su cuantificación, puesto que eluyeron con diferentes tiempos de retención.

Apolito	t (min)	Transiciones	Voltaje del	Energía de colisión
Ananto	t_{R} (IIIII)	MRM (<i>m/z</i>)	fragmentador (V)	(V)
Dicamba	4,1	219 → 175ª	60	0
		219 -> 145 (7)	60	0
2,4-D	7,9	219 → 161ª	80	5
		219 → 125 (9)	80	30
MCPA	9,3	199 → 141ª	100	10
		199 → 125 (1)	100	10
		199 → 105 (2)	100	30
2,4-DP	11,1	233 → 161ª	80	5
		233 → 125 (9)	80	30
MCPP	13,7	213 → 141ª	90	10
		213 → 105 (2)	90	30
2,4-DB	14,8	247 → 165 (4)	80	5
		247 → 161ª	80	2
		247 → 125 (11)	80	20
^a Transiciones usa	das para cua	ntificar. Los valores entre	paréntesis indican la abun	dancia relativa de la

Tabla VI.1. Parámetros del sistema LC-QqQ-MS² para los CPAHs estudiados

^aTransiciones usadas para cuantificar. Los valores entre paréntesis indican la abundancia relativa de la transición secundaria frente a la cuantificadora.

Para la técnica MSPE se utilizaron imanes consistentes en bloques (50 x 15 x 15 mm y 86 g de peso) compuestos de Nd-Fe-B y con una fuerza de 33 kg, suministrados por Supermagnete (Gottmadingen, Alemania). También se emplearon un agitador vórtex de Heathrow Scientific (IL, EEUU), un agitador magnético RH-KTC (IKA, Staufen, Alemania), una centrífuga Unicen 21 (Alresa, Madrid, España) con capacidad para 4

tubos de 100 mL, usada en el tratamiento de los suelos, y otra EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) para 8 tubos de 15 mL, usada en DLLME.

2.3. Síntesis de las nanopartículas magnéticas

Para la síntesis del material magnético seleccionado para el método propuesto (CoFe₂O₄@PPy), se comenzó por generar los núcleos de ferrita de cobalto siguiendo el procedimiento desarrollado por Maaz et al. [29]. Para ello se mezclaron 25 mL de una disolución acuosa de FeCl₃·6H₂O 0,4 M y 25 mL de CoCl₂·6H₂O 0,2 M. Seguidamente, se añadieron gota a gota 25 mL de NaOH 3 M, manteniendo la disolución a 80 °C y en agitación durante una hora. Una vez que la mezcla se encuentra a temperatura ambiente, se separan las MNPs con ayuda de un imán, se lavan con agua y etanol y se secan en una estufa a 100 °C durante toda la noche.

Mediante polimerización de los monómeros de pirrol, vía oxidativa en presencia de cloruro de hierro en disolución, actuando como oxidante, se procedió a funcionalizar los núcleos de CoFe₂O₄, siguiendo el procedimiento previamente descrito [28]. Para ello, a 2 g de MNPs se añadieron 800 mL de una disolución acuosa ajustada a pH 9 con amoníaco (25%, v/v) conteniendo 1 mL de pirrol, manteniendo agitación durante 10 min. Seguidamente, se añadieron 2 g de perclorato de sodio, se agitó la mezcla otros 10 min y, finalmente, se agregaron gota a gota 100 mL de FeCl₃·6H₂O a la concentración de 18 mg mL⁻¹, con agitación constante. La mezcla se mantuvo durante 15 h a temperatura ambiente para obtener la polimerización. El precipitado final se lavó varias veces con agua y etanol, secando después a 100 °C durante 12 h.

Otros recubrimientos distintos de PPy, como ácido oleico, polidopamina (PDA) y nanotubos de carbono multipared (MWCNTs), fueron también ensayados como extractantes. A continuación, se explica la síntesis de aquellos que no fueron contemplados en el capítulo V de esta Memoria.

Para sintetizar las MNPs recubiertas de ácido oleico se utilizó de nuevo el método de Maaz [29], cuando se terminó de añadir la disolución de NaOH se adicionó a la mezcla 0,5 mL de ácido oleico, manteniendo en agitación una hora a 80 °C. El material magnético se recogió, lavó y secó de la misma forma que se ha indicado anteriormente.

2.4. Muestras y procedimiento analítico

- Muestras de agua:

Se analizaron tres muestras de agua de diferente procedencia (río, grifo y puerto) obtenidas en el sureste de España. Se filtraron a vacío a través de filtros de membrana de 0,45 µm de nylon para eliminar posibles sólidos en suspensión.

Para la preconcentración mediante MSPE, se pesaron 40 mg de MNPs de $CoFe_2O_4@PPy$ en un tubo Falcon de 50 mL y se añadieron 30 mL de la muestra de agua, ambas fases se mezclaron mediante agitación vórtex durante 10 min. Las MNPs enriquecidas se recogieron con ayuda de un imán externo. Las MNPs son atraídas hacia la pared del tubo, pudiendo así decantar la muestra. La desorción de los analitos se hizo añadiendo 100 µL de MeOH acidificado con HCl 0,5 M y agitando manualmente 1 min. De nuevo se aplicó el campo magnético externo para recoger las MNPs y el sobrenadante enriquecido se filtró con filtros tipo Mini-UniPrep de 0,2 µm de PTFE (Agilent), y de este extracto se inyectaron 15 µL en el sistema LC-QqQ-MS².

Para DLLME, se colocaron 10 mL de muestra en un tubo de vidrio de fondo cónico y se acidificaron a pH 2 con H_2SO_4 y se añadieron 0,5 g de NaCl. Seguidamente, se inyectó rápidamente con ayuda de una microjeringa la mezcla de 2 mL de MeOH, como disolvente dispersante, y 50 µL de 1-octanol, como disolvente extractante, generándose así una turbidez en la disolución que favorece la extracción de los analitos. Para romper la emulsión, se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min, quedando la fase de 1-octanol en la parte superior de la disolución. La microgota enriquecida se recogió y se inyectaron 15 µL en el sistema LC-QqQ-MS².

- Muestras de suelo:

Se analizaron tres suelos agrícolas obtenidos de diferentes puntos del sureste de España (A, B y C). Estos suelos se caracterizaron con contenidos, respectivamente, de 29,5, 46,7, y 32,9% de arcilla; 24,7, 33,5 y 30,2% de limo; 45,8, 19,8 y 36,9% de arena; 0,13, 0,08 y 0,51% de nitrógeno total; 1,09, 0,72 y 1,8% de carbón orgánico total; 7,85, 7,95 y 7,3 de pH medido en extractos acuosos (1:1) y 3870, 1320 y 7300 μ S cm⁻¹ de conductividad eléctrica para extractos medidos a 25 °C.

Para aislar los analitos desde la matriz sólida de los suelos, se aplicó extracción sólido-líquido (SLE) en condiciones alcalinas, mediante el método de Schaner y

colaboradores adaptado [22]: se pesaron 6 g de suelo a los que se añadieron 35 mL de una disolución de KOH 0,1 M. La mezcla se calentó en un baño de agua a 70 °C durante 10 min, después se agitó en vórtex 5 min y, por último, se centrifugó 10 min a 3000 rpm. Se desechó el residuo sólido y se recogieron 30 mL de la disolución sobrenadante, que se neutralizó con ácido sulfúrico, antes de aplicar el procedimiento MSPE previamente descrito para las muestras de agua.

Para MSPE y DLLME, se tomaron 30 y 10 mL, respectivamente, del extracto obtenido mediante SLE y se sometieron a preconcentración de igual modo que los procedimientos descritos anteriormente para las muestras de agua. Se introdujo la modificación de utilizar mayor volumen de 1-octanol (200 µL), puesto que la gota de extractante obtenida para estas muestras era demasiado pequeña y difícil de recuperar.

2.5. Estudios de recuperación

Para validar ambos métodos, se fortificaron dos muestras de agua (de río y de puerto) y dos suelos (A y B) a dos niveles de concentración (5 y 20 ng mL⁻¹ para aguas y 30 y 120 ng g⁻¹ para suelos). Para dicamba los niveles de fortificación fueron cinco veces superiores a los del resto de herbicidas. Las experiencias se realizaron por duplicado. Los suelos fortificados se homogeneizaron en vórtex durante 5 min y se mantuvieron toda la noche a temperatura ambiente para distribuir los herbicidas y permitir su interacción con la matriz, procediendo posteriormente con su análisis. Las muestras de agua fortificadas se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente de forma previa al análisis.

3. Resultados y discusión

3.1. Separación cromatográfica y condiciones de detección

La retención de los CPAHs depende fuertemente del pH de la fase móvil, por lo que se estudió su comportamiento empleando como fase móvil diversas mezclas 15:85 de AcN:acetato amónico a diferentes valores de pH en el intervalo 4-8, en condiciones isocráticas. Los tiempos de retención disminuyeron al disminuir el pH y, aunque a pH 4 se obtenía una buena resolución de los primeros picos, los herbicidas más ácidos eran eluídos a tiempos muy largos. Por consiguiente, se seleccionó pH 4, pero se procedió a optimizar un gradiente de elución. Los mejores resultados se obtuvieron iniciando el

programa con una etapa isocrática 13:87 AcN:acetato amónico (pH 4) durante 2 min, aumentando entonces el porcentaje de AcN hasta el 27% en 0,5 min. Este porcentaje se mantuvo durante 7,5 min, permitiendo la elución de los tres primeros compuestos con cadena carboxílica más corta: dicamba, 2,4-D y MCPA. Después se incrementó linealmente el porcentaje de AcN hasta el 55% en 5,5 min, eluyendo el resto de los herbicidas. La Tabla VI.1 muestra los tiempos de retención para los analitos, donde se observa que aquellos con carácter más ácido, son más fuertemente retenidos.

La ionización óptima en la fuente de electrospray se estudió para cada analito usando el modo *full-scan*, y la máxima sensibilidad se obtuvo en todos los casos en modo negativo, siendo el ion precursor la molécula desprotonada [M-H]⁻. El voltaje del fragmentador, así como las energías de colisión, también se sometieron a estudio para asegurar la mayor sensibilidad de las transiciones MRM. Se seleccionaron, al menos, dos para cada compuesto, una para cuantificar y otra para confirmación de la identidad del compuesto. Los valores seleccionados se recogen en la Tabla VI.1. Como se puede apreciar, dicamba y 2,4-D tienen el mismo ion precursor, pero esto no resultó ningún problema puesto que ambos picos cromatográficos están totalmente resueltos y aparecen a diferentes tiempos de retención.

3.2. Tratamiento de las muestras de suelo

De acuerdo con la bibliografía, la extracción de los CPAHs desde suelos es posible con disolventes orgánicos acidificados, tales como diclorometano [20] y AcN [2], o disoluciones acuosas alcalinas [18,22]. Dado que el extracto obtenido en la etapa SLE del suelo iba a ser seguidamente preconcentrado mediante MSPE o DLLME, era preferible disponer de un extracto acuoso. Por ello, se estudiaron mediante un diseño Taguchi, las variables influyentes en la eficiencia de extracción en fase acuosa alcalina, usando para ello una disolución de KOH. Los tres parámetros optimizados a cuatro niveles fueron la concentración de KOH (0,05, 0,1, 0,5 y 1 M), la temperatura del baño (50, 70, 80 y 90 °C) y el tiempo de agitación en vórtex (5, 10, 15 y 20 min), tras la aplicación de calor a la mezcla durante 10 min. Los mejores resultados se obtuvieron para una concentración de KOH 0,1 M, manteniendo la mezcla a 70 °C y finalmente agitando en vórtex durante 5 min, siendo éstas las condiciones adoptadas para la etapa SLE.

Por último, se estudió la cantidad de suelo a analizar, entre 2 y 10 g. Como se aprecia en la Figura VI.2, la sensibilidad aumentó hasta una masa de 6 g y disminuyó para masas mayores probablemente debido al efecto matriz. Se seleccionó la masa de 6 g de suelo.



Fig. VI.2: Influencia de la masa de suelo en la eficiencia de la etapa SLE

3.3. Optimización del procedimiento MSPE

Los parámetros con mayor influencia en el rendimiento de esta etapa de preconcentración son la naturaleza y masa de MNPs, tiempo de extracción y naturaleza y volumen del disolvente de desorción.

Los estudios preliminares para elegir el tipo de MNPs, se llevaron a cabo usando 30 mL de muestra de agua fortificada con los analitos a 100 ng mL⁻¹, a los cuales se añadieron 4 mg de MNPs y la mezcla se agitó en vórtex durante 10 min. Para la etapa de desorción, se añadieron 3 mL de MeOH y se aplicó agitación vórtex durante 10 min. Se utilizaron en todos los casos núcleos de ferrita de cobalto funcionalizados con distintos recubrimientos: ácido oleico, PDA, PPy y MWCNTs. En una primera etapa, se analizó la fase acuosa, una vez finalizada la etapa de adsorción. Dado que las señales analíticas no disminuyeron con el uso de CoFe₂O₄@ácido oleico, este material magnético fue descartado para experimentos posteriores. Seguidamente, se analizó la naturaleza del disolvente de desorción, para ponerlo en contacto con las MNPs funcionalizadas con PPy, PDA y MWCNTs, previamente enriquecidas. La desorción de

los CPAHs solamente fue posible con MeOH desde las MNPs recubiertas de PPy. Para desorber los analitos desde PDA y MWCNTs, fue necesario un medio alcalino fuerte, que presentó problemas de compatibilidad en el sistema LC y provocaba deterioro en el recubrimiento de PDA. Por tanto, finalmente se seleccionaron las MNPs funcionalizadas con PPy teniendo en cuenta su capacidad de extracción y la facilidad de desorción de los analitos, evitando el medio alcalino.

El volumen de muestra se investigó en el intervalo 20-40 mL. Las señales aumentaron hasta los 30 mL y disminuyeron ligeramente para volúmenes mayores (Figura VI.3), probablemente debido a que, con volúmenes mayores, la difusión de los analitos hacia el material adsorbente resulta más lenta y difícil. En consecuencia, se seleccionó un volumen de 30 mL de muestra, que corresponde también al volumen de sobrenadante que se recoge después del tratamiento de los suelos.



Fig. VI.3: Efecto del volumen de muestra en MSPE

El tiempo de adsorción se estudió entre 5 y 15 min, y los resultados obtenidos sugieren que se alcanza el equilibro a los 10 min, por lo que se seleccionó este tiempo (Figura VI.4).



Fig. VI.4: Efecto del tiempo de adsorción en MSPE

Como disolvente de desorción se ensayaron MeOH, etanol y AcN, proporcionando MeOH la mayor eficiencia de desorción. Además, se estudió el efecto de la acidificación del disolvente orgánico. Para ello se realizaron experiencias a diferentes concentraciones de ácido clorhídrico en metanol en el intervalo 0,01-1 M. Se observó un aumento de las señales analíticas hasta la concentración 0,5 M, como se aprecia en la Figura VI.5, manteniéndose prácticamente constantes para concentraciones mayores. Por ello, se escogió la concentración 0,5 M.



Fig. VI.5: Influencia de la concentración de HCl en el disolvente de desorción

La cantidad de MNPs usadas y el volumen del disolvente de desorción son variables interrelacionadas, por lo que, para optimizarlas, se utilizó un diseño de Taguchi. Se estudiaron los dos factores a 4 niveles, resultando un diseño de 16 experimentos. La masa de CoFe₂O₄@PPy se estudió entre 4 y 40 mg y el volumen de metanol acidificado entre 100 y 400 µL. Como muestra la Figura VI.6, los mejores resultados para todos los compuestos se obtuvieron con el volumen mínimo ensayado, como era de esperar, debido al efecto de dilución que se origina con volúmenes mayores. Masas de MNPs inferiores a 40 mg probablemente resultaron insuficientes para adsorber los herbicidas. No se estudiaron cantidades mayores para evitar su agregación en agua, lo que origina una superficie de carga inefectiva y, además, la necesidad de usar volúmenes de desorción más altos. Por tanto, los mejores resultados se obtuvieron con 40 mg de MNPs y el mínimo volumen de disolvente de desorción ensayado, 100 µL.



Fig. VI.6: Resultados del diseño de Taguchi para el estudio de (A) volumen de disolvente de desorción y (B) masa de MNPs

Por último, se estudió el modo de agitación en la etapa de desorción, usando agitación manual o aplicando ultrasonidos, por medio de un baño o a través de una sonda. Sin embargo, el uso de ultrasonidos provocó el deterioro de las MNPs, por lo que se mantuvo la agitación manual durante un minuto, que era suficiente para una completa desorción.

3.4. Optimización del procedimiento DLLME

Los primeros experimentos para la optimización de la DLLME se realizaron usando 10 mL de una muestra de agua acidificada a pH 2 y fortificada con 100 ng mL⁻¹ de los analitos.

Se estudió en primer lugar el efecto de diferentes disolventes extractantes, incluyendo de menor (1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, tolueno, clorobenceno, 2-octanona y 2-undecanona) y mayor densidad que el agua (tetracloruro de carbono, cloroformo, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano y tetracloroetileno). En todos los casos, se usó un volumen de 100 µL de extractante y 1 mL de metanol como disolvente dispersante. No se consiguió la extracción de los analitos cuando se utilizaron tetracloruro de carbono, tetracloroetileno, 2-octanona y 2-undecanona. Como muestra la Figura VI.7, la eficiencia de extracción más alta para casi todos los CPAHs se consiguió con 1-octanol, que fue el disolvente seleccionado.



Fig. VI.7: Estudio de la naturaleza del disolvente extractante

Como disolventes dispersantes se estudiaron acetona, MeOH, etanol y AcN. En todos los casos inyectando en la fase acuosa la mezcla formada por 1 mL de dispersante y 100 μ L de 1-octanol. Los mejores resultados se obtuvieron con MeOH para todos los analitos (Figura VI.8), siendo por tanto seleccionado.



Fig. VI.8: Estudio de la naturaleza del disolvente dispersante

Seguidamente, se optimizaron de manera conjunta los volúmenes de las tres fases implicadas en la técnica DLLME (volumen de 1-octanol, 50-200 µL; volumen de metanol, 0,5-2 mL y volumen de muestra, 4-10 mL), además de la fuerza iónica de la muestra acuosa, para ayudar a la separación de las fases (concentración de NaCl, 0-15% m/v). Se establecieron cuatro niveles para cada variable y se realizaron 16 experimentos mediante un diseño Taguchi. Los resultados obtenidos se representan en la Figura VI.9. Como era de esperar, se obtuvo mayor sensibilidad con el volumen de muestra más elevado y menor volumen de disolvente extractante. El volumen de disolvente dispersante elegido fue 2 mL y la concentración de cloruro sódico, 5% m/v.

Finalmente, el pH de la fase acuosa se estudió en el rango de 2 a 10. Las áreas de los picos disminuyeron al aumentar el pH, de modo que se seleccionó el valor de pH más ácido (pH 2).



Fig. VI.9: Diseño de Taguchi para el estudio de (A) volumen de muestra; (B) volumen de 1-octanol; (C) volumen de MeOH y (D) concentración de NaCl

Cuando las condiciones seleccionadas en la etapa DLLME se aplicaron a los extractos obtenidos de la SLE de suelos, la recuperación de la fase extractante fue muy dificultosa, probablemente debido a la matriz de esta muestra. La modificación del volumen de 1-octanol hasta 200 µL permitió recuperar la fase extractante enriquecida, por lo que este volumen fue aplicado en DLLME para suelos.

3.5. Validación del método y estudio del efecto matriz

Los métodos LC-QqQ-MS² combinados con MSPE o DLLME se validaron a través de los datos obtenidos de intervalo de linealidad, límites de detección (LDs) y cuantificación (LQs), recuperación y precisión. Mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, se obtuvieron las gráficas de calibrado representando área de pico frente a concentración de analito a cinco niveles diferentes. La linealidad se estableció desde 0,1 hasta 200 ng mL⁻¹ para MSPE, y desde 0,01 hasta 200 ng mL⁻¹ para DLLME, con valores de R² mayores que 0,98 en todos los casos.

La presencia de efecto matriz en las muestras se estudió usando un *t*-test, por comparación de las pendientes obtenidas usando disoluciones estándar acuosas y aplicando el método de adiciones estándar a tres muestras de agua y tres suelos.

Para las muestras de agua preconcentradas mediante DLLME, las pendientes obtenidas mediante adiciones estándar a las muestras fueron similares a aquellas obtenidas con estándares acuosos (p>0,05 en todos los casos), confirmando así la ausencia de efecto matriz y proponiéndose la cuantificación de las muestras mediante calibración acuosa. Por otra parte, para las muestras de suelo, sí se confirmó la existencia de efecto matriz (p<0,05). Sin embargo, dado que no existían diferencias significativas entre las pendientes de adiciones estándar a los suelos estudiados, se propuso su cuantificación usando una matriz de suelo modelo (*matrix-matched*).

Los resultados obtenidos en la comparación de las pendientes de calibración acuosa y adiciones estándar a muestras aplicando el procedimiento MSPE, condujeron a proponer la cuantificación usando matrices modelo para suelos y para aguas.

La sensibilidad de los métodos se evaluó calculando los LDs, usando el criterio de relación señal/ruido (S/N) igual a 3, y los LQs para relaciones S/N de 10. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla VI.2 para ambos métodos. Al comparar la aplicación de las dos técnicas de preconcentración, se observa que DLLME proporcionó mayor sensibilidad que MSPE.

Muestra	Dicamba	2,4-D	MCPA	2,4-DP	MCPP	2,4-DB
DLLME-LC-QqQ	-MS ²					
Aguas	1,1	0,01	0,02	0,01	0,01	0,18
Suelos	30	0,24	0,43	0,28	0,35	6,3
MSPE-LC-QqQ-I	MS ²					
Aguas	3,3	0,03	0,60	0,24	0,37	1,5
Suelos	90	0,75	1,50	0,80	0,92	4,1
ang mL ⁻¹ para agu	as y ng g ⁻¹ para	suelos.				

Tabla VI.2. LDs^a para los procedimientos DLLME

Los factores de enriquecimiento (FEs), calculados como el cociente entre las pendientes de las rectas de calibración acuosa obtenidas en presencia de preconcentración y en ausencia de dicha etapa, estuvieron entre 42 y 132, según el compuesto, para MSPE y entre 76 y 185 para DLLME (Tabla VI.3).

A. Oller Ruiz

Compuesto	Dicamba	2,4-D	МСРА	2,4-DP	MCPP	2,4-DB
DLLME-LC-QqQ-	-MS ²					
FEs	76	94	106	137	131	185
RSD (%) ^a	8,1	5,5	6,5	7,6	8,7	12
MSPE-LC-QqQ-N	∕IS ²					
FEs	43	45	42	81	54	132
RSD (%) ^a	9,1	9,4	6,3	12	7,1	12
^a n=10						

Tabla VI.3. Factores de enriquecimiento y precisión para DLLME y MSPE

La precisión (Tabla VI.3), en términos de desviación estándar relativa (RSD), se calculó a partir de 10 análisis consecutivos de una disolución estándar de los CPAHs a 70 ng mL⁻¹. Para MSPE, la RSD estuvo entre 6,3 y 12% para MCPA y 2,4-DB, respectivamente. Mientras que, para DLLME, se mantuvo en el rango de 5,5 y 12%, para 2,4-D y 2,4-DB, respectivamente.

3.6. Análisis de las muestras y estudios de recuperación

Los procedimientos propuestos se aplicaron a la determinación del contenido de los CPAHs en tres muestras de agua de distinta procedencia y tres suelos agrícolas. No se detectó ninguno de los herbicidas por encima de sus correspondientes LDs.

La Figura VI.10 muestra los cromatogramas de iones totales (TIC) y las transiciones MRM de cada uno de los analitos, para el suelo B fortificado a 120 ng g⁻¹, excepto para dicamba que fue a 480 ng g⁻¹, y analizado mediante SLE-MSPE combinado con LC-QqQ-MS².



*Fig. VI.10: Cromatograma de iones totales y EICs obtenidos para un suelo fortificado y analizados mediante SLE-MSPE y LC-QqQ-MS*²

Puesto que no se disponía de materiales de referencia certificados para validar la exactitud del método, se realizaron estudios de recuperación, fortificando a dos niveles de concentración. Las muestras fortificadas fueron una muestra de agua de río y otra de puerto, a 5 y 20 ng mL⁻¹ y dos suelos (A y B) a 30 y 120 ng g⁻¹. Los niveles de fortificación para dicamba fueron cinco veces más altos. Las muestras de suelo se fortificaron, se homogeneizaron en un agitador durante 5 minutos y se mantuvieron a temperatura ambiente durante toda la noche. Los valores para las recuperaciones obtenidas se recogen en la Tabla VI.4. Los valores medios de recuperación fueron 102±10 y 92±9 para aguas y suelos, respectivamente, cuando se aplicó la preconcentración MSPE. Las recuperaciones obtenidas mediante DLLME-LC-QqQ-MS2 variaron entre 91 y 116% para aguas y entre 80 y 112% para suelos.

Compuesto	Nivel de fortificación ^a	Agua de	Agua de	Suelo A	Suelo P
Compuesto	(ng mL ⁻¹)	río	puerto	Suelo A	SUEIO D
Dicamba	25	106 (100)	111 (100)	112 (84)	83 (100)
	100	96 (103)	103 (102)	104 (100)	100 (103)
2,4-D	5	105 (105)	108 (80)	87 (93)	80 (88)
	20	94 (117)	91 (110)	109 (99)	100 (92)
MCPA	5	106 (112)	108 (86)	87 (93)	82 (96)
	20	92 (97)	95 (109)	104 (95)	100 (91)
2,4-DP	5	104 (108)	100 (96)	105 (94)	85 (84)
	20	97 (98)	95 (107)	95 (99)	100 (90)
MCPP	5	104 (113)	101 (90)	90 (80)	80 (94)
	20	99 (103)	104 (111)	108 (97)	100 (91)
2,4-DB	5	112 (98)	93 (82)	84 (83)	86 (87)
	20	106 (112)	116 (104)	109 (112)	101 (91)

Tabla VI.4. Recuperaciones (%) obtenidas mediantes DLLME y MSPE combinados con LC-OqO-MS²

^aLos niveles de fortificación para suelos fueron 30 y 120 ng g⁻¹, excepto 150 y 480 ng g⁻¹ para dicamba. Los valores entre paréntesis corresponden a los porcentajes de recuperación obtenidos mediante MSPE-LC-QqQ-MS²

4. Conclusiones

El uso de LC-QqQ-MS² en combinación con las técnicas miniaturizadas de preconcentración MSPE y DLLME, permite la determinación de bajas concentraciones de CPAHs en aguas y suelos, caracterizándose las metodologías propuestas para el

tratamiento de las muestras por ser respetuosas con el medio ambiente. Aunque no se han encontrado herbicidas en las muestras analizadas, los resultados obtenidos a través de estudios de recuperación confirman la exactitud de los métodos desarrollados. El sistema LC, acoplado a MS² trabajando en modo MRM, ha permitido una identificación precisa e inequívoca de los seis analitos. Además, las ventajas asociadas a los procedimientos de preconcentración aplicados, englobados en la química verde, incrementan el valor analítico de los métodos optimizados.

Tras la validación de ambos métodos y a la vista de los resultados obtenidos, se concluye que la técnica con menores tiempos de aplicación, más sensible, con FEs más eficientes y una cuantificación más sencilla ha sido DLLME.

Referencias

[1] M. Behbahani, F. Najafi, S. Bagheri, M.K. Bojdi, P.G. Hassanlou, A. Bagheri, Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid, Environ. Monit. Assess. 186 (2014) 2609–2618.

[2] N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Di ez, Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient, Anal. Chim. Acta 470 (2002) 147–154.

[3] J. Hassan, M. Shamsipur, A. Es'haghi, S. Fazili, Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water samples by suspended liquid-phase microextraction–liquid chromatography, Chromatographia 73 (2011) 999–1003.

[4] M.I. Catalina, J. Dallüge, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, Determination of chlorophenoxy acid herbicides in water by in situ esterification followed by in-vial liquid–liquid extraction combined with large-volume on-column injection and gas chromatography–mass spectrometry, J. Chromatogr. A 877 (2000) 153–166.

[5] M. Saraji, B. Farajmand, Application of single-drop microextraction combined with in-microvial derivatization for determination of acidic herbicides in

A. Oller Ruiz

water samples by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 17–23.

[6] I. Rodríguez, E. Rubí, R. González, J.B. Quintana, R. Cela, On-fibre silylation following solid-phase microextraction for the determination of acidic herbicides in water samples by gas chromatography, Anal. Chim. Acta 537 (2005) 259–266.

[7] R. Ebrahimi, A. Feizbakhsh, A. Es'haghi, Extraction and derivatization of chlorophenoxy acid pesticides: performing two DLLME with one extracting phase, Chromatographia 79 (2016) 515–520.

[8] Y. Yamini, A. Saleh, Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with injection-port derivatization for the determination of some chlorophenoxyacetic acids in water samples, J. Sep. Sci. 36 (2013) 2330–2338.

[9] X. Liu, Q. Zhu, H. Chen, L. Zhou, X. Dang, J. Huang, Preparation of 2,4dichlorophenoxyacetic acid imprinted organic-inorganic hybrid monolithic column and application to selective solid-phase microextraction, J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 951–952 (2014) 32–37.

[10] M.B. Melwanki, S. Da Huang, Three-phase system in solvent bar microextraction: An approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography, Anal. Chim. Acta. 555 (2006) 139–145.

[11] C.C. Chen, M.B. Melwanki, S. Da Huang, Liquid-liquid-liquid microextraction with automated movement of the acceptor and the donor phase for the extraction of phenoxyacetic acids prior to liquid chromatography detection, J. Chromatogr. A 1104 (2006) 33–39.

[12] A. Esrafili, Y. Yamini, M. Ghambarian, M. Moradi, S. Seidi, A novel approach to automation of dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction, J. Sep. Sci. 34 (2011) 957–964.

[13] W.C. Tsai, S. Da Huang, Dispersive liquid-liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography for the determination of chlorophenoxy acid herbicides in aqueous samples, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 7846–7850.

[14] M. Tayyebi, Y. Yamini, M. Moradi, Reverse micelle-mediated dispersive liquid-liquid microextraction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, J. Sep. Sci. 35 (2012) 2491–2498.

[15] S. Ji, L. Qi, N. Li, M. Wang, Preparation of amino acid-based polymer functionalized magnetic nanoparticles as adsorbents for analysis of plant growth regulators in bean sprouts, Talanta 158 (2016) 229–234.

[16] S. Zhong, C. Zhou, X. Zhang, H. Zhou, H. Li, X. Zhu, Y. Wang, A novel molecularly imprinted material based on magnetic halloysite nanotubes for rapid enrichment of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water, J. Hazard. Mater. 276 (2014) 58–65.

[17] L. Sheng, Y. Jin, Y. He, Y. Huang, L. Yan, R. Zhao, Well-defined magnetic surface imprinted nanoparticles for selective enrichement of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in real samples, Talanta 174 (2017) 725–732.

[18] S. Moret, M. Hidalgo, J.M. Sánchez, Development of an ion-pairing liquid chromatography method for the determination of phenoxyacetic herbicides and their main metabolites: application to the analysis of soil samples, Chromatographia 63 (2006) 109–115.

[19] J.L. Luque-García, S. Morales-Muñoz, M.D. Luque de Castro, Microwaveassisted water extraction of acid herbicides from soils coupled to continuous filtration, pre-concentration, chromatographic separation and UV detection, Chromatographia 55 (2002) 117–122.

[20] O.P. de Amarante, N.M. Brito, T.C.R. Dos Santos, G.S. Nunes, M.L. Ribeiro, Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis, Talanta 60 (2003) 115–21.

[21] S.M. Kashyap, G.H. Pandya, V.K. Kondawar, S.S. Gabhane, Rapid analysis of 2,4-D in soil samples by modified soxhlet apparatus using HPLC with UV detection, J. Chromatogr. Sci. 43 (2005) 81–86.

[22] A. Schaner, J. Konecny, L. Luckey, H. Hickes, Determination of chlorinated acid herbicides in vegetation and soil by liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry, J. AOAC Int. 9 (2007) 1402–1410.

225

[23] E.S. Majzik, F. Tóth, L. Benke, Z. Kiss, SPE-LC-MS-MS determination of phenoxy acid herbicides in surface and ground water, Chromatographia 63 (2006) S105–S109.

[24] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, Automated on-line in-tube solidphase microextraction followed by liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for the determination of chlorinated phenoxy acid herbicides in environmental waters, Analyst 126 (2001) 602–608.

[25] P. Kaczyński, B. Łozowicka, M. Jankowska, I. Hrynko, Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction, Talanta 152 (2016) 127–136.

[26] M. Šafaříková, I. Šafařík, Magnetic solid-phase extraction, J. Magn. Magn. Mater. 194 (1999) 108–112.

[27] N. Li, J. Chen, Y.P. Shi, Magnetic polyethyleneimine functionalized reduced graphene oxide as a novel magnetic solid-phase extraction adsorbent for the determination of polar acidic herbicides in rice, Anal. Chim. Acta 949 (2017) 23–34.

[28] A.A. Asgharinezhad, H. Ebrahimzadeh, Coextraction of acidic, basic and amphiprotic pollutants using multiwalled carbon nanotubes/magnetite nanoparticles@polypyrrole composite, J. Chromatogr. A 1412 (2015) 1–11.

[29] 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 (2007) 289–295.

CONCLUSIONES

Conclusiones

La conclusión global que se puede obtener de esta Memoria es que el acoplamiento de técnicas de microextracción, tanto en fase líquida como en fase sólida magnética con cromatografía y espectrometría de masas, permite al químico analítico disponer de una muy buena herramienta para la determinación de compuestos orgánicos de muy diferente naturaleza, contaminantes o no, contenidos en diversos tipos de matrices y a muy bajos niveles de concentración.

Las conclusiones específicas derivadas de las investigaciones presentadas son las siguientes:

1. La aplicación de las técnicas miniaturizadas empleadas requiere para las muestras en estado sólido (fruta, suelos, suplementos dietéticos o pelo humano) una etapa previa de extracción sólido-líquido (SLE), con objeto de liberar los analitos desde la matriz sólida hacia una fase líquida, susceptible de ser sometida a preconcentración. Para la etapa SLE, el uso de disoluciones reguladoras, ácidos o bases en concentraciones moderadamente bajas ha permitido la extracción efectiva de los compuestos de interés. La aplicación de energía externa, como ultrasonidos o calor, acelera en ocasiones el proceso de liberación de los analitos, acortando así los tiempos de análisis.

2. Las técnicas de microextracción han permitido cumplir el objetivo de desarrollar métodos sensibles y selectivos, ya que se ha conseguido preconcentrar los analitos presentes en las muestras líquidas o en las fases líquidas obtenidas a partir de las muestras sólidas mediante SLE, logrando así alcanzar límites de detección mucho más bajos que los obtenidos por aplicación directa de los sistemas instrumentales empleados. Además, no solo son preconcentrados los analitos sino que también son aislados de posibles interferentes con baja afinidad hacia la fase extractante empleada, mejorando la selectividad de los métodos.

3. La aplicación de la técnica DLLME permite una extracción rápida, sencilla, sin requerimiento de material de laboratorio costoso, con baja generación de residuos y uso de disolventes al nivel de los microlitros. Aunque DLLME ha sido ampliamente usada hasta la fecha, su versatilidad queda demostrada con las nuevas aplicaciones aquí presentadas, tanto en modo convencional como bajo otras modalidades:

- Así, se puede aprovechar el contenido en etanol de las bebidas alcohólicas con objeto de obviar el uso de disolvente dispersante en su tratamiento mediante DLLME, lo que es un ejemplo del cumplimiento de los principios de la Química Analítica Verde. - La sustitución de los disolventes orgánicos clásicos habitualmente empleados como extractantes en DLLME por líquidos iónicos (ILs), hace que el procedimiento sea respetuoso medioambientalmente. Además, si el IL es generado *in situ*, la reacción de metátesis conduce a la dispersión de la fase extractante en el seno de la fase dadora, evitando de nuevo el uso del disolvente dispersante.

4. Se ha demostrado la capacidad de la técnica MSPE para preconcentrar analitos de muy diferente carácter como son los ácidos clorofenoxi y los inhibidores de PDE-5. La funcionalización de las MNPs es la clave para dirigir la selectividad de las fases extractantes. En esta Tesis Doctoral el polímero polipirrol ha formado parte del material magnético empleado en los dos procedimientos MSPE propuestos.

5. Por otro lado, destacar que el carácter magnético de la fase extractante permite eliminar la etapa de centrifugación, siendo aisladas las MNPs por aplicación de un campo magnético externo. Para la desorción de los analitos, es preferible emplear el mínimo volumen posible de disolvente que permita la desorción total. La evaporación del disolvente de desorción aparece como una alternativa para incrementar la sensibilidad de los procedimientos MSPE, cuando se requiere usar un volumen relativamente alto de disolvente de desorción.

6. La hibridación de los procedimientos DLLME y MSPE con las técnicas cromatográficas ha permitido la separación de compuestos muy estrechamente relacionados. GC ha proporcionado muy buenas separaciones para compuestos volátiles, como terpenos y clorobencenos, sin necesidad de incluir etapas de derivatización, seleccionando LC para los analitos de baja volatilidad.

7. No todos los procedimientos de microextracción desarrollados han sido directamente compatibles con los sistemas cromatográficos seleccionados. Tal es el caso del análisis mediante GC de compuestos preconcentrados en ILs. Este inconveniente se resolvió sustituyendo el sistema de inyección con/sin división de flujo por una unidad de desorción térmica acoplada a un vaporizador de temperatura programada (TDU/PTV) que, aprovechando la alta estabilidad térmica de los ILs, evita su entrada en la columna cromatográfica.

8. El uso de los métodos multivariantes como herramientas para la selección de las condiciones experimentales óptimas de aplicación de las técnicas de microextracción ha permitido considerar la interdependencia de ciertas variables que afectan a la

Conclusiones

eficiencia de la técnica. Además, el número de experimentos necesarios se reduce considerablemente respecto del uso de métodos univariantes. Para establecer las condiciones óptimas de aplicación de las técnicas miniaturizadas en esta Tesis Doctoral, se han empleado diseños experimentales de matriz ortogonal basados en el método Taguchi donde se estudian factores específicos entre sí a diferentes niveles establecidos, mientras que con un diseño central compuesto (CCD) se estudia la relación entre los factores a optimizar dentro de un rango de valores establecidos.

9. El uso de columnas de LC con diámetro interno más pequeño, consigue mejor resolución de los picos cromatográficos, siendo más estrechos y eluyendo más compuestos en un menor tiempo, resultando así métodos más rápidos y con menor consumo de disolvente.

10. La espectrometría de masas se muestra como el sistema de detección ideal para las separaciones cromatográficas. La optimización previa de las condiciones de trabajo del detector, en sus distintas modalidades, permite la identificación y cuantificación a muy bajos niveles de concentración. La fragmentación molecular proporcionada por los espectrómetros de masas en tándem incrementa notablemente la fiabilidad en la identificación de los compuestos.

11. Para la selección del método de cuantificación, se ha trabajado con estándares acuosos, utilizando una matriz modelo o por el método de adiciones estándar a las muestras, cuando existía un efecto matriz.

12. La precisión de los métodos propuestos ha sido comprobada a través de estudios de repetitividad y reproducibilidad, encontrándose en todos los casos valores de desviación estándar relativa inferiores al 12%, lo que permite concluir que el uso de técnicas de microextracción en la etapa de preparación de muestra, resulta adecuado.

13. La exactitud de los métodos se ha comprobado usando materiales de referencia certificados cuando se ha dispuesto de ellos o, en caso contrario, mediante estudios de recuperación. Los valores de recuperación obtenidos confirman la exactitud de los métodos desarrollados.

14. Seguidamente, se presenta un resumen con las principales características analíticas de los procedimientos desarrollados en esta Tesis Doctoral.

Resun	ien de las caractei	rísticas analíticas de los proce	edimientos optimizado:	s en esta ⁻	Fesis Doctoral		
Cap.	Analitos	Muestra	Extracción	ME	Análisis	Rango de linealidad (ng mL ⁻¹ ; ng g ⁻¹)	LDs (ng mL ⁻¹ ; ng g ⁻¹)
—	5 Terpenos	Bebidas alcohólicas (8 mL)		DLLME	LC-QqQ-MS ²	10 - 500	0,003 - 1,5
=	13 Terpenos libres y enlazados	Uva (7,5 g)	SLE (30 mL agua + agitación orbital)	DLLME	GC-MS	20 - 400	9 - 49
Ξ		Aguas (10 mL)	·				0,0005 - 0,0072
≡	IU CBS	Suelos (2,5 g)	UAE (15 mL tampón pH 4)	IL-ULYME	1D-9C-1MS	001 - cu'u	0,008 - 0,252
≥	13 Toxinas marinas	Aguas de mar (12 mL)		DLLME	LC-QqQ-MS ²	0,002 - 1,0	0,0002 – 0,0057
		Bebidas energéticas (30 mL)	ı				0,01 - 0,22
>	3 Inhibidores de la PDE-5 y	Geles lubricantes (5 g)	ı	MSPE	LC-QqQ-MS ²	0,025 - 25	0,87 - 5,8
		Pelo y suplementos dietéticos (60 mg)	SLE (30 mL NaOH 5 mM + agit. orbital)				8,1 – 510 3,9 - 85
		Aguas (30 mL)	ı				0,03 - 3,3
5	7 CPAHs	Suelos (6 g)	SLE (35 mL KOH 0,1 M + calor)	M 2 F F	LC-OdO-MS ²	0,1 - 200	0,75 - 90
		Aguas (10 mL)	·) 		0,01 - 1,1
		Suelos (2 g)	SLE (15 mL KOH 0,1 M + calor)	ULLIME		0,01 - 200	0,24 - 30

ecta Tecic Doctoral 2 ontimized or codiminator analíticae do loc ot original ŝ

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- AA: ácido acético
- AcN: acetonitrilo
- ANOVA: análisis de varianza
- APCI: ionización química a presión atmosférica
- API: ionización a presión atmosférica
- ASE: extracción acelerada con disolventes
- AZA: azaspirácido
- CB: clorobenceno
- CCD: diseño central compuesto
- CD: ciclodextrina
- CE: energía de colisión
- CI: ionización química
- CIS: sistema de inyección en frío
- CNT: nanotubo de carbono
- CPAH: herbicida ácido clorofenoxi
- CPE: extracción en punto de nube
- CRM: material de referencia certificado
- DAD: detector de diodos en serie
- DBC: diclorobenceno
- DC: corriente continua
- DCM: diclorometano
- desM: desmetil espirólida C
- didesM: didesmetil espirólida C
- DI: inmersión directa
- DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido

- DLPME: microextracción dispersiva en fase líquida
- DMF: N,N-dimetilformamida
- DSDME: microextracción en gota directamente suspendida
- DSIL: N-desmetilsildenafilo
- DSPE: extracción en fase sólida dispersa
- DTX: dinofisitoxina
- EC: Comisión Europea
- ECD: detector de captura de electrones
- El: ionización por impacto electrónico
- EIC: cromatograma de iones extraídos
- ESI: ionización por electrospray
- EtOH: etanol
- FA: ácido fórmico
- FE: factor de enriquecimiento
- FID: detector de ionización en llama
- FLD: detector de fluorescencia
- GAC: green analytical chemistry
- GC: cromatografía de gases
- GO: óxido de grafeno
- GTMS: 3-glicidiloxipropiltrimetoxisilano
- GYM: gimnodimina
- HCB: hexaclorobenceno
- HF: fibra hueca
- HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
- HS: espacio de cabeza
- HSSE: extracción por absorción en espacio de cabeza

238

Abreviaturas

- IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
- IL: líquido iónico
- IMIDA: Instituto murciano de investigación y desarrollo agrario y alimentario
- IP: isopropanol
- IS: estándar interno
- IT: trampa de iones
- ITUM: investigación y tecnología de uva de mesa
- LC: cromatografía líquida
- LD: límite de detección
- LDH: hidróxidos de doble capa
- LLE: extracción líquido-líquido
- LLLME: microextracción líquido-líquido
- LPME: microextracción en fase líquida
- LQ: límite de cuantificación
- m-µdSPE: extracción microdispersiva en fase sólida magnética
- m-DSPE: extracción dispersiva en fase sólida magnética
- MA: asistido por microondas
- MAE: extracción asistida por microondas
- Mag-HSAE: extracción por adsorción magnética en espacio de cabeza
- MCPA: ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético
- MCPP: ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico
- MDSPE: extracción dispersiva en fase sólida magnética
- MeOH: metanol
- MEPS: microextracción en sorbente empaquetado
- MIBK: metil isobutil cetona
- MIL: líquido iónico magnético

- MIP: polímero de impresión molecular
- MNP: nanopartícula magnética
- MOF: estructura metal-orgánica
- MRM: monitorización de reacciones múltiples
- MS: espectrometría de masas
- MS²: espectrometría de masas en tándem
- MSA: asistido por agitación magnética
- MSPE: microextracción en fase sólida magnética
- MWCNTs: nanotubos de carbono multipared
- ND: no detectado
- NQ: no cuantificado
- NP: nanopartícula
- OA: ácido okadaico
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PANI: polianilina
- PBT: persistencia, bioacumulación y toxicidad
- PCB: pentaclorobenceno
- PDA: polidopamina
- PDE-5: fosfodiesterasa tipo 5
- PDMS: polidimetilsiloxano
- PE: polietileno
- PEG: polietilenglicol
- PFE: extracción con fluidos presurizados
- PLE: extracción líquida presurizada
- PPs: puntos de penalización
- PPy: polipirrol

240

Abreviaturas

- PS: poliestireno
- PSWE: extracción con agua subcrítica presurizada
- PTV: vaporizador con temperatura programada
- PTX: pectenotoxina
- PVPP: polivinilpolipirrolidona
- Q: cuadrupolo simple
- QAV: química analítica verde
- QqQ: triple cuadrupolo
- QuEChERS: "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe"
- RDSE: extracción por adsorción sobre disco rotativo
- RF: radiofrecuencia
- RP: fase reversa
- RSD: desviación estándar relativa
- S/N: relación señal-ruido
- SBSE: extracción por absorción sobre barra agitadora
- SCSE: extracción por absorción sobre pastilla agitadora
- SDME: microextracción en gota única
- SFE: extracción con fluidos supercríticos
- SFOD: solidificación de gota orgánica flotante
- SHS: espacio de cabeza estático
- SHWE: extracción en agua supercaliente
- SIL: sildenafilo
- SIM: monitorización de iones seleccionados
- SLE: extracción sólido-líquido
- SM: supramolecular
- SPE: extracción en fase sólida

- SPME: microextracción en fase sólida
- SPXs: espirólidas
- SPX20G: 20 metil espirólida G
- SWCNTs: nanotubos de carbono de pared sencilla
- TAD: tadalafilo
- TC: temperatura controlada
- TCA: tricloroanisol
- TCB: triclorobenceno
- TD: desorción térmica
- TDU: unidad de desorción térmica
- TeCB: tetraclorobenceno
- TEOS: tetraetoxisilano
- TIC: cromatograma de iones totales
- TOF: tiempo de vuelo
- UA: asistido por ultrasonidos
- UAE: extracción asistida por ultrasonidos
- UAWE: extracción en agua asistida por ultrasonidos
- UHPLC: cromatografía líquida de ultraalta resolución
- US EPA: Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental
- US: ultrasonidos
- USAEME: microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos
- UV: ultravioleta
- VA: agitación con vortex
- VAR: vardenafilo
