







**NUEVOS RETOS DE LA MICROEXTACCIÓN EN FASE  
LÍQUIDA ACOPLADA A CROMATOGRFÍA LÍQUIDA PARA  
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS**

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



**Fdo.: JAVIER MARÍN GARCÍA**





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D. Natalia Campillo Seva, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "NUEVOS RETOS DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS", realizada por D. Javier Marín García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de abril de 2020





UNIVERSIDAD DE  
**MURCIA**

D<sup>a</sup>. Pilar Viñas López-Peigrín, Catedrática de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "NUEVOS RETOS DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA ACOPLADA A CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA PARA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS", realizada por D. Javier Marín García, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 30 de abril de 2020



## ***Agradecimientos***

A lo largo del tiempo que ha durado esta etapa, son muchas las personas a las que tengo que agradecer su implicación y apoyo, ya que, sin ellas no hubiera podido culminar este proyecto. Por ello, quiero agradecerles que, de una forma u otra, hayan contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

Como no podría ser de otra manera, quisiera agradecer a todos los miembros del Departamento de Química Analítica su recibimiento, porque desde el primer momento me han hecho sentir uno más.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a mis directoras de Tesis:

A D<sup>a</sup> Pilar Viñas López-Pelegrín, gracias por el apoyo y confianza que me has demostrado desde el primer momento.

A D<sup>a</sup> Natalia Campillo Seva, no tengo palabras para agradecerte todo el esfuerzo y tiempo que me has dedicado, aun en momentos difíciles, por toda la ayuda que me has ofrecido para la realización de esta Tesis, muchísimas gracias.

Juntas me habéis enseñado que con trabajo, ilusión y entrega, se puede conseguir cualquier proyecto por difícil que parezca. Me siento afortunado de haber podido trabajar con vosotras.

También quiero dar las gracias a los demás miembros del departamento comenzando por D. Manuel Hernández Córdoba y D. Ignacio López García, siempre serviciales y dispuestos a ayudarme en cualquier momento. A D<sup>a</sup> Carmen López Erroz que es todo amabilidad. A D<sup>a</sup> Natalia Arroyo que llego al laboratorio llena de energía y nuevas ideas. Y no me puedo olvidar de Miguel Ángel y Elena por su ayuda siempre que la he necesitado.

A mis compañeros de laboratorio, Marta y Ainhoa, con las que he descubierto que el trabajo desinteresado es la mejor vía para conseguir cualquier objetivo, gracias por estar siempre ahí ofreciéndome vuestro apoyo y ayuda; Juanjo, María José, María, gracias por los momentos compartidos. Ha sido un privilegio contar con vosotros todos

estos años, gracias por todo. No puedo olvidarme de Gema y Nacho, con los que comencé mi andadura en la investigación.

A mis padres por apoyarme en todo momento, por haberme brindado una vida llena de oportunidades, y a mis hermanos, aunque no nos veamos mucho sé que puedo contar con vuestra ayuda para lo que sea, os quiero muchísimo, aunque os lo diga en pocas ocasiones.

También debo mencionar a mis suegros, y a mis cuñados Mercedes, María José, José e Iggy, gracias por vuestro apoyo incondicional.

Debo mencionar a mis compañeros de la Policía Local de Santomera, porque más de uno ha sufrido un cambio de turno de última hora para que pudiera ir al laboratorio, gracias.

Por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, a mi esposa María por compartir tu vida conmigo y apoyarme en todos mis proyectos, y a mis hijos Daniela y Javi por alegrarme la vida cada día.

Dedico esta Tesis Doctoral a mis padres, por todo lo que han hecho por mí, y a mi esposa María y mis hijos Daniela y Javi, que son todo para mí.



# Índice



<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	7
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1. LA MUESTRA EN EL PROCESO ANALÍTICO .....	21
1.1. Muestras biológicas .....	22
1.2. Muestras ambientales .....	26
1.3. Alimentos .....	30
2. LA QUÍMICA VERDE EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	32
2.1. Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) .....	37
2.1.1. Parámetros que afectan a DLLME .....	39
2.1.2. Modalidades de DLLME .....	41
2.1.3. Acoplamiento DLLME-Técnicas cromatográficas .....	42
2.2. Extracción en punto de nube (CPE) .....	43
2.2.1. Acoplamiento de CPE a sistemas cromatográficos .....	46
3. LA DERIVATIZACIÓN EN EL PROCESO ANALÍTICO .....	46
4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA .....	47
4.1. Espectrometría de masas acoplada a LC .....	48
4.2. Interfases para LC-MS .....	49
4.3. Analizadores de masas empleados en LC-MS .....	54
5. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS .....	59
6. BIBLIOGRAFÍA .....	62
<b>CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN DE GLIOXAL Y METILGLIOXAL EN ORINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR SURFACTANTE Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA</b> .....	69
RESUMEN .....	71
I.1. INTRODUCCIÓN .....	73
I.2. PARTE EXPERIMENTAL .....	76
I.2.1. Reactivos .....	76
I.2.2. Instrumentación .....	77
I.2.3. Preparación de los derivados $\alpha$ -dicarbonílicos .....	78
I.2.4. Muestras y procedimiento analítico .....	78
I.2.5. Estudios de recuperación .....	79

I.2.6. Análisis de creatinina en muestras de orina.....	80
I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
I.3.1. Optimización del sistema LC-FLD.....	80
I.3.2. Optimización de la etapa de derivatización.....	81
I.3.3. Optimización del procedimiento DLLME.....	83
I.3.4. Validación del método.....	88
I.3.5. Efecto matriz y estudios de recuperación.....	89
I.3.6. Análisis de las muestras.....	92
I.4. CONCLUSIÓN.....	94
I.5. BIBLIOGRAFÍA.....	95
<b>CAPÍTULO II. DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES SINTÉTICOS DE LA FOSFODIESTERASA-5 EN AGUA Y ORINA HUMANA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO.....</b>	<b>99</b>
RESUMEN.....	101
II.1. INTRODUCCIÓN.....	103
II.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	106
II.2.1. Reactivos.....	106
II.2.2. Instrumentación.....	107
II.2.3. Muestras y procedimiento analítico.....	108
II.2.4. Estudios de recuperación.....	110
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
II.3.1. Separación cromatográfica.....	111
II.3.2. Optimización de la etapa DLLME.....	112
II.3.3. Validación del método.....	116
II.3.4. Análisis de muestras y estudios de recuperación.....	120
II.4. CONCLUSIONES.....	123
II.5. BIBLIOGRAFÍA.....	124
<b>CAPÍTULO III. EXTRACCIÓN EN PUNTO DE NUBE ASISTIDA POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA K MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....</b>	<b>127</b>
RESUMEN.....	129
III.1. INTRODUCCIÓN.....	131
III.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	133
III.2.1. Reactivos.....	133

III.2.2. Instrumentación .....	134
III.2.3. Muestras y procedimiento analítico.....	137
III.2.4. Estudios de recuperación .....	139
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	139
III.3.1. Separación cromatográfica .....	139
III.3.2. Optimización de la etapa de extracción asistida por ultrasonidos .....	140
III.3.3. Optimización de la etapa de preconcentración .....	141
III.3.4. Validación del método .....	144
III.3.5. Análisis de las muestras .....	148
III.3.6. Estudios de recuperación .....	149
III.4. CONCLUSIONES .....	150
III.5. BIBLIOGRAFÍA.....	151
<b>CAPÍTULO IV. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO Y SU PRINCIPAL METABOLITO. DETERMINACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE .....</b>	<b>157</b>
RESUMEN.....	159
IV.1. INTRODUCCIÓN .....	161
IV.2. PARTE EXPERIMENTAL .....	163
IV.2.1. Reactivos.....	163
IV.2.2. Instrumentación .....	164
IV.2.3. Muestras y procedimiento analítico.....	165
IV.2.4. Estudios de recuperación .....	166
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	166
IV.3.1. Separación cromatográfica .....	166
IV.3.2. Condiciones de derivatización .....	167
IV.3.3. Optimización de la etapa de preconcentración .....	169
IV.3.4. Tratamiento de las muestras vegetales .....	171
IV.3.5. Validación del método .....	172
IV.3.6. Análisis de las muestras .....	176
IV.3.7. Estudios de recuperación .....	177
IV.4. CONCLUSIONES .....	177
IV.5. BIBLIOGRAFÍA.....	178

---

<b>CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, GLUFOSINATO Y AMPA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM .....</b>	<b>185</b>
RESUMEN.....	187
V.1. INTRODUCCIÓN .....	189
V.2. PARTE EXPERIMENTAL.....	190
V.2.1. Reactivos.....	190
V.2.2. Instrumentación .....	191
V.2.3. Muestras y procedimiento analítico.....	192
V.2.4. Estudios de recuperación.....	194
V.2.5. Estudio de disipación de glifosato .....	194
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	195
V.3.1. Separación cromatográfica, detección y condiciones de derivatización ...	195
V.3.2. Optimización de la etapa de preconcentración.....	198
V.3.3. Validación del método.....	200
V.3.4. Análisis de las muestras y estudios de recuperación .....	204
V.3.5. Estudio de disipación .....	206
V.4. CONCLUSIONES .....	207
V.5. BIBLIOGRAFÍA .....	208
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>213</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>221</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>225</b>

# Resumen



En el desarrollo de un método analítico, una de las etapas más complejas es la preparación de la muestra. Por ello, una parte importante de la investigación en Química Analítica se focaliza en el desarrollo de nuevos procedimientos para simplificar el tratamiento de la muestra. En este sentido, miniaturización y automatización son tendencias clave en la mejora de diferentes aspectos prácticos para la determinación de los compuestos de interés en la muestra utilizando métodos instrumentales. Así, las técnicas miniaturizadas de preparación de muestra, en relación con las técnicas clásicas, se caracterizan por conseguir una notable disminución en el consumo de muestra, reactivos y disolventes orgánicos tóxicos y, por tanto, generan volúmenes mínimos de residuos, por lo que cumplen con los principios de la Química Analítica Verde. Además, en la mayoría de estos procedimientos, se alcanzan altos grados de preconcentración para los compuestos de interés, lo que conduce a un aumento de la sensibilidad de la instrumentación usada en los laboratorios analíticos.

Las técnicas de microextracción se pueden dividir en dos grandes grupos, las que aíslan los analitos en una fase sólida, microextracción en fase sólida (SPME), y las que los extraen en una fase líquida, microextracción en fase líquida (LPME). Las investigaciones en esta Tesis Doctoral se han centrado en el desarrollo de procedimientos basados en LPME, concretamente microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), microextracción líquido-líquido (LLME) y extracción en punto de nube (CPE). Se presentan diferentes modificaciones en la aplicación básica de estas técnicas, entre las que destacan el uso de surfactantes para mejorar la eficiencia en DLLME, la extracción de los analitos en un disolvente orgánico que es empleado como dispersante en DLLME, la aplicación de energía de la radiación de microondas para acelerar la formación del punto de nube en CPE y el uso de reactivos formadores de pares iónicos para favorecer la extracción en LLME.

Las técnicas cromatográficas resultan muy adecuadas para el análisis de los extractos obtenidos a través de las técnicas miniaturizadas de tratamiento de muestra, ya que permiten la separación de compuestos de estructuras moleculares muy similares, que no podrían ser diferenciados de otra forma. Tanto la cromatografía líquida (LC) como la de gases (GC) han sido ampliamente aplicadas con este propósito, siendo seleccionada una u otra en función de la naturaleza y las propiedades físico-químicas de los analitos. En esta Tesis Doctoral, todos los métodos analíticos desarrollados implican separaciones mediante LC, por resultar la mejor opción para los compuestos orgánicos estudiados.

Por otra parte, las técnicas seleccionadas para la monitorización de los compuestos separados por LC han sido la detección fluorimétrica (FLD) y espectrometría de masas (MS), teniendo en cuenta las elevadas sensibilidad y selectividad proporcionadas por estos sistemas de detección. La implicación de reacciones químicas de derivatización para la obtención de productos fluorescentes incrementa no solo la sensibilidad, sino también la selectividad de los métodos propuestos, respecto de su detección mediante espectrometría de absorción molecular. La fuente de ionización por electrospray (ESI) ha sido la interfase empleada para el acoplamiento de LC y MS. Se trata de dos técnicas de partida incompatibles por su modo de operación, ya que LC trabaja en fase líquida y MS en condiciones de vacío. En esta Tesis se ha empleado MS en tándem (MS/MS), mediante el uso de un triple cuadrupolo (QqQ) como analizador de masas, que ha permitido la identificación de los analitos sin posibilidad de duda, gracias a los patrones de fragmentación característicos bajo las condiciones seleccionadas.

La presente Tesis Doctoral se centra en el análisis de muestras de muy diferente naturaleza implicando problemas que en una u otra medida preocupan a la sociedad, ya que se aborda la detección de compuestos de interés en las industrias alimentaria y farmacéutica, de contaminantes medioambientales y de biomarcadores en fluidos biológicos. Así, las muestras objeto de análisis han sido alimentos vegetales, aguas y suelos de distinta procedencia, así como orina humana. Los compuestos determinados han sido tres formas de la vitamina K (filoquinona, menaquinona y menadiona), herbicidas (glifosato, glufosinato y ácido aminometilfosfónico (AMPA)), inhibidores de la enzima fosfodiesterasa-5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil y N-desmetilsildenafil) y biomarcadores (glioxal y metilglioxal).

La presentación del trabajo desarrollado se ha estructurado en cinco capítulos:

Capítulo I. Determinación de los biomarcadores glioxal y metilglioxal, previamente derivatizados por reacción con 2,3-diaminonaftaleno para formar las correspondientes  $\alpha$ -quinoxalinas, que son preconcentradas en 1-undecanol mediante DLLME asistida por el surfactante Tritón X-114. El análisis de los extractos obtenidos a partir de orina se lleva a cabo mediante LC-FLD.

Capítulo II. Determinación de cuatro inhibidores de la fosfodiesterasa-5 en aguas y orina humana. Los analitos son preconcentrados mediante DLLME y el extracto enriquecido se analiza mediante LC-ESI-QqQ-MS/MS.

Capítulo III. Aplicación de CPE asistida por microondas, usando Tritón X-114, para la preconcentración de tres formas de la vitamina K, previamente extraídos de las

muestras vegetales mediante extracción asistida por ultrasonidos. Se empleó la combinación LC-ESI-QqQ-MS/MS para la medida instrumental.

Capítulo IV. Determinación de glifosato y su metabolito AMPA en aguas y vegetales mediante LC-FLD. Los herbicidas fueron derivatizados con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo y preconcentrados en metil isobutil cetona en forma de pares iónicos mediante LLME.

Capítulo V. Determinación de glifosato, glufosinato y AMPA en aguas, vegetales y suelos, empleando la metodología de derivatización y preconcentración desarrollada en el capítulo IV y llevando a cabo el análisis mediante LC-ESI-QqQ-MS/MS.

Los cinco métodos de análisis presentados en esta Memoria han sido validados siguiendo las Guías Internacionales de validación de métodos analíticos.



# Summary



One of the more difficult stages in the development of an analytical method is the sample preparation. For this reason, an important part of the Analytical Chemistry research is focused towards the simplification of this step. In this sense, miniaturization and automation are key trends in the improvement of different practical aspects of the suitability of analytes for their instrumental measurement. Thus, miniaturized techniques of sample preparation, in relation to classical techniques, are characterized by achieving a significant reduction in the consumption of sample, reagents and toxic organic solvents, and, consequently, generating minimum volumes of waste, therefore comply with the principles of Green Analytical Chemistry. Furthermore, most of these procedures achieve high degrees of preconcentration for the compounds of interest, which leads to an increase in the sensitivity of the instrumentation used in analytical laboratories.

Microextraction techniques can be divided into two large groups, those that isolate analytes into a solid phase, solid-phase microextraction (SPME), and those that extract them into a liquid phase, liquid-phase microextraction (LPME). Research in this PhD Thesis has focused on the development of procedures based on LPME, specifically dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), liquid-liquid microextraction (LLME) and cloud point extraction (CPE). Different modifications are presented in the basic application of these techniques, among which the use of surfactants to improve efficiency in DLLME, the extraction of the analytes in an organic solvent that is used as a dispersant in DLLME, the application of energy from microwave radiation to accelerate the formation of the cloud point in CPE and the use of ion-pair forming reagents to favour extraction in LLME stand out.

Chromatographic techniques are very suitable for the analysis of extracts obtained through miniaturized sample treatment techniques, since they allow the separation of compounds with very similar molecular structures, which could not be differentiated in any other way. Both liquid chromatography (LC) and gas chromatography (GC) have been widely applied for this purpose, one or the other being selected according to the nature and physical-chemical properties of the analytes. In this Doctoral Thesis, all the analytical methods developed involve LC separations, as they are the best option for the organic compounds studied.

On the other hand, fluorimetric detection (FLD) and mass spectrometry (MS) have been the techniques selected for the monitoring of compounds separated by LC, taking into account the high sensitivity and selectivity provided by these detection systems. The implication of chemical derivatisation reactions to obtain fluorescent products increases

not only the sensitivity but also the selectivity of the proposed methods, with respect to their detection by molecular absorption spectrometry. The electrospray ionization source (ESI) has been the interface used for LC and MS coupling. These techniques are incompatible due to their mode of operation, since LC works in liquid phase and MS in vacuum conditions. In this Thesis, MS in tandem (MS/MS) has been used, by means of the use of a triple quadrupole (QqQ) as mass analyzer, which has allowed the identification of the analytes without possibility of doubt, thanks to the characteristic fragmentation patterns under the selected conditions.

Research presented focuses on the analysis of samples of very different nature involving problems that in one way or another concern society, since it deals with the detection of compounds of interest in the food and pharmaceutical industries, contaminants in different environmental compartments and biomarkers in biological fluids. Thus, plants, water and soil from different sources, as well as human urine have been the matrices under analysis. The compounds determined have been three forms of vitamin K (phylloquinone, menaquinone and menadione), herbicides (glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid (AMPA)), inhibitors of the enzyme phosphodiesterase-5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil and N-desmethylsildenafil) and biomarkers (glyoxal and methylglyoxal).

The presentation of the developed work has been structured in five chapters:

Chapter I. Determination of the glyoxal and methylglyoxal biomarkers, previously derivatized by reaction with 2,3-diaminonaphthalene to form the corresponding  $\alpha$ -quinoxalines, which are preconcentrated in 1-undecanol by DLLME assisted by the surfactant Triton X-114. The analysis of the extracts obtained from urine is carried out by LC-FLD.

Chapter II. Determination of four phosphodiesterase-5 inhibitors in waters and human urines. The analytes are preconcentrated by DLLME and the enriched extract is analysed by LC-ESI-QqQ-MS/MS.

Chapter III. Microwave-assisted CPE application, using Triton X-114, for the preconcentration of three forms of vitamin K, previously extracted from plant samples by ultrasound assisted extraction. The LC-ESI-QqQ-MS/MS combination was used for instrumental measurement.

Chapter IV. Determination of glyphosate and its metabolite AMPA in waters and plants using LC-FLD. The herbicides were derivatized with 9-fluorenylmethyl

chloroformate and pre-concentrated in methyl isobutyl ketone in the form of ionic pairs by means of LLME.

Chapter V. Determination of glyphosate, glufosinate and AMPA in waters, plants and soils, applying the derivatization and preconcentration methodology developed in chapter IV and carrying out the analysis by LC-ESI-QqQ-MS/MS.

The five methods of analysis presented have been validated following the International Guidelines for the validation of analytical methods.



# Objetivos



El trabajo desarrollado en esta Tesis Doctoral representa una nueva aportación a una de las líneas de trabajo más importantes que el grupo de investigación “Métodos Instrumentales Aplicados” viene desarrollando durante los últimos años en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Murcia.

Los estudios realizados por este grupo de investigación van encaminados al desarrollo y perfeccionamiento de métodos analíticos para el análisis de trazas en una amplia gama de muestras. Considerando que la etapa de preparación de la muestra es generalmente el cuello de botella del proceso analítico global, las investigaciones van principalmente dirigidas a mejorar los aspectos prácticos de esta etapa, centrándose en el estudio de las posibilidades de la implementación de su simplificación, miniaturización y automatización.

Los procedimientos analíticos presentados siguen los principios de la Química Analítica Verde, en cuanto a la minimización del consumo de disolventes orgánicos, de muestra y, en consecuencia, de la generación de residuos. En definitiva, el objetivo último es el desarrollo de métodos de análisis que, siendo respetuosos con el medio ambiente, permitan una identificación precisa de los compuestos de interés, así como una cuantificación con alto grado de sensibilidad, con el empleo de instrumentación científica relativamente accesible en los laboratorios de análisis

En análisis de trazas se precisa de una etapa de preconcentración previa debido a que los analitos se encuentran en la muestra a concentraciones muy bajas. Los nuevos avances en los procedimientos miniaturizados han dado lugar a las técnicas de microextracción, permitiendo aislar los compuestos de interés presentes en la matriz de la muestra en una pequeña cantidad de fase extractante, consiguiendo de esta manera, la preconcentración de los analitos antes de su determinación, que en muchas ocasiones, implica una separación cromatográfica.

De acuerdo con las propiedades o características físico-químicas (peso molecular, carga, solubilidad, polaridad y volatilidad) de los compuestos objeto de estudio se pueden realizar extracciones selectivas hacia una fase sólida o líquida. Cuando la fase extractante se halla en estado líquido hablamos de microextracción en fase líquida (LPME), caracterizada por los pequeños volúmenes de disolventes extractantes empleados. La microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) es la técnica LPME más ampliamente usada, ya que presenta características óptimas para ser considerada una técnica verde, siendo además de muy simple y rápida aplicación e implicando un

muy bajo consumo de disolventes orgánicos. Por otra parte, existen otras alternativas de LPME que están en continuo desarrollo y perfeccionamiento, proporcionando altos grados de preconcentración de forma rápida y sencilla.

Las técnicas de microextracción permiten la determinación de concentraciones de sustancias mucho más bajas que cuando se realizan los ensayos mediante métodos de extracción convencionales. Debido a la gran variedad de soluciones que aportan estos métodos a los problemas analíticos, su uso se ha visto incrementado en diversos sectores como la industria, agencias gubernamentales, investigación, etc.

La presente Tesis Doctoral se ha enfocado al análisis de tres tipos de muestras, cuyo control resulta de gran interés para la sociedad: alimentos, muestras ambientales y de carácter biológico. Con respecto a los alimentos, el sector agroalimentario ha sido objeto de estudio, tanto para la determinación de componentes naturales como contaminantes de estas matrices alimentarias. Los consumidores demandan, cada vez más, calidad y seguridad alimentaria, demanda que solo puede ser asegurada mediante la aplicación de metodologías de análisis sensibles y exactas. Por otra parte, el control de la salud humana está directamente relacionado con la monitorización de biomarcadores, así como de fármacos y sus metabolitos en el cuerpo humano. En este sentido los fluidos biológicos resultan ser una matriz de acceso relativamente fácil. Concretamente, la muestra de carácter biológico seleccionada en esta Tesis es la orina. Finalmente, destacar que la estrecha relación entre la contaminación ambiental y la salud humana obliga a nuestra sociedad a controlar la calidad de nuestros recursos naturales, en especial aguas y suelos destinados a producción agrícola, siendo estas muestras también objeto de análisis en la Tesis Doctoral presentada.

El principal objetivo de esta Tesis ha sido el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de compuestos orgánicos al nivel de trazas mediante el uso de técnicas de microextracción que permitan alcanzar altos grados de sensibilidad. Los tratamientos de la muestra seleccionados se centran en el uso de técnicas LPME. Teniendo en cuenta las características físico-químicas de los distintos grupos de compuestos estudiados, la técnica instrumental seleccionada para el análisis de los extractos obtenidos en el tratamiento miniaturizado de las muestras ha sido la cromatografía líquida (LC) acoplada a detectores basados en fluorescencia (FLD) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Para el acoplamiento LC-MS/MS, se ha seleccionado la fuente de ionización por electrospray (ESI) como interfase entre ambos sistemas y, como analizador, un triple cuadrupolo (QqQ). Teniendo en cuenta las características de los compuestos separados mediante LC, que unas veces lo han sido en su forma original y otras sometidos a una

reacción de derivatización previa, en todos los casos se ha aplicado la modalidad de LC en fase reversa (RP).

En el Capítulo I de esta Memoria se presenta el desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de glioxal y metilglioxal en muestras de orina mediante LC-FLD. Estos analitos son dos importantes biomarcadores del estrés oxidativo. Se trata de compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos que no presentan características fluorescentes, por lo que es necesario someterlos a una etapa de derivatización previa a la detección. Su reacción con 2,3-diaminonaftaleno da lugar a las correspondientes  $\alpha$ -quinoxalinas, susceptibles de ser detectadas mediante FLD. Como técnica de microextracción se ha utilizado DLLME, basada en este caso en un sistema ternario de fases en el que el disolvente extractante presenta menor densidad que el agua. Además, para facilitar el paso de los analitos de la fase dadora a la fase aceptora, se añadió un surfactante a la fase acuosa.

En el Capítulo II se aborda la aplicación de DLLME para determinar inhibidores sintéticos de la enzima fosfodiesterasa-5, que son compuestos químicos prescritos en el tratamiento de la disfunción eréctil e hipertensión pulmonar. El método DLLME combinado con LC-MS/MS se aplicó a muestras de orina humana y agua obtenida de plantas de tratamiento de aguas residuales. Para estas últimas, la DLLME se ha utilizado en su forma convencional, mientras que, para las muestras de orina, debido a la complejidad de su matriz, se llevó a cabo una extracción previa de los analitos en acetonitrilo, siendo este extracto empleado como agente dispersante en la etapa de preconcentración.

El Capítulo III recoge el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación simultánea de tres formas de la vitamina K en alimentos de origen agrícola. Dos de las vitaminas estudiadas (filoquinona y menaquinona) son formas naturales de la vitamina K, mientras que la menadiona es un derivado sintético utilizado en la industria farmacéutica. Para la preconcentración de los analitos se ha usado la técnica de extracción en punto de nube (CPE), siendo las vitaminas preconcentradas analizadas mediante LC-MS/MS. El agente extractante utilizado fue un surfactante no iónico, Tritón X-45. La aplicación de energía de las microondas permitió acelerar la formación del coacervado y, por tanto, la extracción de las vitaminas en unos pocos segundos.

La determinación de herbicidas no selectivos y de gran uso a nivel mundial ha centrado los estudios presentados en los Capítulos IV y V. Así, el Capítulo IV aborda la optimización y validación de un método de análisis para la determinación de glifosato y su principal metabolito (ácido aminometilfosfónico, AMPA) en aguas y vegetales

mediante LC-FLD. Para la aplicación de FLD, fue necesario incluir una etapa de derivatización previa, seleccionando para ello cloroformiato de 9-fluorenilmetilo como reactivo que, además de proporcionar derivados fluorescentes, disminuyó la polaridad de los compuestos, favoreciendo su preconcentración en un disolvente orgánico. La formación de pares iónicos entre los analitos derivatizados y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) permitió el uso de metil isobutil cetona como extractante, proponiéndose así la técnica de microextracción líquido-líquido basada en pares iónicos (IP-LLME). La misma metodología de preconcentración se aplicó a la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA en aguas, vegetales y suelos mediante LC-MS/MS, cuyas características se presentan en el Capítulo V.

Los objetivos específicos que se establecieron en esta Tesis Doctoral se estructuraron de la siguiente forma:

1. Selección de los compuestos de interés y de las matrices de muestras objeto de análisis, teniendo en cuenta el interés generado o que pueda generar en la sociedad.
2. Elección de la metodología a aplicar en la etapa de preparación de la muestra, donde en primer lugar, se determinará el procedimiento de extracción y aislamiento más adecuado de los analitos, intentando que el extracto sea lo más limpio posible para facilitar su inyección en el sistema cromatográfico, intentando evitar etapas de limpieza de la fase extractante. En segundo lugar, se selecciona la técnica de microextracción, en nuestro trabajo siempre en fase líquida, más apropiada para resolver el problema analítico al que nos enfrentamos. Y, en tercer lugar, la optimización de los parámetros que puedan influir en la eficiencia de la técnica miniaturizada seleccionada, mediante procedimientos univariantes y/o multivariantes.
3. Las características físico-químicas de los compuestos estudiados han llevado a la selección de RP-LC en todos los métodos propuestos, siendo necesaria la selección de la fase estacionaria más adecuada, así como de la naturaleza, composición y flujo de la fase móvil.
4. Selección del sistema de detección. Los sistemas de detección acoplados a LC han sido FLD y MS/MS. Cuando se utiliza FLD para la monitorización de compuestos no fluorescentes, es necesario recurrir a una etapa de derivatización previa para dotarlos de esa propiedad. La selección del reactivo derivatizante, así como de las condiciones experimentales bajo las que se lleva

a cabo la reacción química, resulta determinante para la reproducibilidad de los resultados, así como para la sensibilidad de los procedimientos propuestos.

5. Todos los métodos desarrollados han sido validados atendiendo a los criterios de las normas europeas:
  - a. Obtención de curvas de calibrado para el estudio de los intervalos de linealidad.
  - b. Estudio de la posible existencia de efecto matriz en las muestras, para seleccionar el método de cuantificación más apropiado que, en los casos aquí propuestos, ha implicado calibración frente a patrones externos, usando una matriz blanco o el método de adiciones estándar a las muestras, dependiendo de cada aplicación particular.
  - c. Determinación de los límites de detección y cuantificación para establecer la sensibilidad del método.
  - d. Establecimiento de la precisión del procedimiento analítico en base a estudios de repetitividad y reproducibilidad.
  - e. La exactitud de los métodos se ha establecido a través de estudios de recuperación.
6. Análisis de las muestras. Se lleva a cabo el análisis de las muestras aplicando el método de cuantificación seleccionado previamente. Además, en este punto resulta de especial interés la confirmación de la identidad de los compuestos detectados, lo que se llevará a cabo mediante comparación de datos de retención cromatográfica, de los espectros de fluorescencia y los espectros de masas, permitiendo en este último caso la identificación inequívoca gracias a los patrones de fragmentación.



# Introducción



## 1. LA MUESTRA EN EL PROCESO ANALÍTICO

La preparación de la muestra se considera la etapa más desafiante del proceso analítico, ya que determina la metodología analítica a aplicar, así como su nivel de compatibilidad con la defensa del medio ambiente. No solo las especies químicas a analizar determinan cómo preparar la muestra, sino que la matriz de la misma tiene mucho que decir al respecto.

Gran parte de las investigaciones analíticas más recientes se ha centrado en la miniaturización de la etapa de preparación de la muestra. Para ello, se desarrollan procedimientos implicando preconcentración, que permite un aumento de la sensibilidad de la instrumentación científica disponible en el laboratorio, y consiguiendo que los métodos analíticos sean más versátiles.

Las ventajas que ofrece la miniaturización de la preparación de la muestra siguen el camino marcado por la Química Analítica Verde (QAV), en cuanto a la reducción del consumo de disolventes orgánicos, de reactivos y de muestra, así como de la generación de residuos, a la vez que se acortan los tiempos de análisis.

La gran mayoría de las muestras a las que se aplican métodos de separación presentan algún problema para llevar a cabo su análisis por inyección directa en el sistema instrumental. Las principales dificultades que puede presentar una muestra para su análisis es que sea incompatible con el sistema cromatográfico utilizado, que el nivel de concentración de los analitos sea muy bajo o que la matriz presente una complejidad muy alta.

Debido a la importancia de la preparación de la muestra y a que de ella depende en gran medida el éxito del método analítico que se quiere desarrollar, resulta crucial la optimización de todas las variables o parámetros que puedan influir en su eficiencia. Hay que considerar tanto factores que puedan influir en el comportamiento de los analitos, como con la naturaleza de la matriz bajo estudio.

En esta Tesis Doctoral se ha abordado el análisis de muestras biológicas, ambientales y de alimentos. A continuación se describen para este tipo de matrices las características más relevantes en relación a su análisis químico.

## 1.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Uno de los objetivos más importantes de los estudios bioanalíticos es la determinación de fármacos, metabolitos, toxinas y biomarcadores. El bioanálisis es una disciplina de gran interés en muchas áreas de investigación, tales como el desarrollo de nuevos fármacos, análisis forense, control de dopaje e identificación de biomarcadores para el diagnóstico de muchas enfermedades [1].

No cabe duda que el desarrollo de los productos farmacéuticos supuso una verdadera revolución para la salud humana. El incremento de la esperanza de vida en el hombre, así como su calidad de vida tienen su origen principalmente en el uso de compuestos químicos sintéticos, de entre los que indudablemente destacan los productos farmacéuticos.

El destino de los fármacos en el organismo es estudiado por la farmacología que, a su vez, puede abordarse desde dos puntos de vista: farmacodinámico y farmacocinético. Mientras que el primer aspecto se centra en la forma en la que el compuesto afecta a una persona con el tiempo, el segundo estudia la ruta y la velocidad de transformación del fármaco una vez suministrado [2].

La información farmacológica de los principios activos es esencial para un uso óptimo de estos compuestos, de ahí la importancia de la determinación de los mismos así como de sus metabolitos en los fluidos biológicos.

Otro grupo de compuestos cuya monitorización en fluidos biológicos resulta de gran interés son los biomarcadores. Se define biomarcador como “una sustancia específica que se asocia a una condición específica, como el inicio, la manifestación o la progresión de una enfermedad o una respuesta a un tratamiento”. Además, se sugiere que los biomarcadores se definan únicamente por su asociación con una enfermedad, a menos que exista evidencia mecánica adicional, y que se evite la extrapolación a enfermedades similares pero dispares [3]. Los biomarcadores cubren un amplio número de compuestos químicos, desde gases hasta macromoléculas biológicas. Su detección y cuantificación ha despertado mucho interés en el campo de la medicina con objeto de evaluar la progresión de una enfermedad y la programación del tratamiento médico más adecuado.

La principal limitación de los metabolitos libres como biomarcadores es su rápida eliminación de la circulación sistémica. A la hora de seleccionar una sustancia como biomarcador de una exposición o enfermedad ha de tenerse en cuenta su perfil de

eliminación y su estabilidad química, así como la sensibilidad del método analítico empleado para su monitorización. Es por ello que la implementación de estudios relacionados con biomarcadores requiere una metodología simple y fiable. La identificación de biomarcadores y el avance en metodologías bioanalíticas relacionadas para el diagnóstico de enfermedades en etapas tempranas es un tema de total actualidad en los estudios clínicos. Como ejemplo, que además se trata en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral, destacamos los aldehídos como biomarcadores de daños tisulares causados por estrés oxidativo. Los aldehídos aparecen en el organismo como subproductos de procesos de peroxidación lipídica. Sin embargo, no todos los biomarcadores están ligados a enfermedades, existe otro grupo que sirve para evaluar el riesgo potencial para la salud iniciado por otros tóxicos y se les conoce como biomarcadores de exposición. Por ejemplo, la exposición a n-hexano y 2-etoxietanol puede ser detectada a partir de la presencia en orina de hexano-2,5-diona y ácido 2-etoxiacético, respectivamente, que a su vez provocan síntomas neurotóxicos y reproductivos [4].

La complejidad de las muestras biológicas dificulta los análisis en una doble vertiente. En primer lugar, la mayoría de los fluidos biológicos no son compatibles con la instrumentación analítica, ya que por sus complejas matrices conteniendo un amplio rango de iones, proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., no pueden ser inyectados directamente en los dispositivos analíticos. Por otro lado, la presencia de altos contenidos de especies interferentes perturba la identificación y cuantificación de analitos al nivel de  $\text{sub-ng mL}^{-1}$ . Por ello, cualquier protocolo de análisis de muestras biológicas debería considerar su composición para planificar el tratamiento más adecuado.

Las muestras biológicas incluyen en su composición una fracción orgánica, que implica tanto moléculas de pequeño y gran tamaño, como proteínas y enzimas, y un contenido inorgánico, que corresponde a sales o complejos de iones comunes con especies orgánicas [5]. Las muestras biológicas más frecuentemente sometidas a análisis son sangre (suero, plasma), orina, fluido cerebroespinal, fluido linfático, bilis, heces, saliva, células y tejidos intactos u homogeneizados. Por diversos motivos, orina y sangre son las matrices biológicas más ampliamente estudiadas. En estos motivos, destaca el hecho de que la toma de muestra puede ser no invasiva, en el caso de orina, o mínimamente invasiva para sangre, a diferencia de otras muestras como tejido o fluido cerebroespinal. Especialmente la orina es una muestra de fácil accesibilidad, en términos de cantidad, y su recogida no requiere de personal entrenado. Además, sangre y orina son considerados biofluidos integradores que incorporan en una sola muestra las funciones y fenotipos de diferentes partes del cuerpo. Cuando con estas muestras no

pueden detectarse pequeños cambios metabólicos en una parte específica del cuerpo, resulta más apropiado el análisis de tejidos (por ejemplo, hígado para enfermedades hepáticas). Sangre y orina contienen cientos e incluso miles de metabolitos (se estima que el metaboloma humano contiene 7800 metabolitos, sin incluir muchos de los relacionados con la microflora intestinal, los lípidos y el metabolismo de los fármacos) y, por tanto, proporcionan una visión general del metabolismo de muchas áreas del cuerpo [5].

Considerando que la orina humana ha sido objeto de análisis en dos procedimientos analíticos presentados en esta Tesis Doctoral, veamos en más detalle algunos aspectos de este fluido biológico. La orina se compone de alrededor de un 95% de agua y sus solutos incluyen sales (conteniendo iones sodio, amonio, fosfato, sulfato), moléculas de pequeña masa molecular (urea, creatinina), proteínas solubles e insolubles, vesículas extracelulares, ácidos nucleicos, células y residuos celulares. Aproximadamente la mitad del total de proteínas en la orina se hallan solubilizadas (típicamente <40 kDa), la mayor parte de la otra mitad corresponde a proteínas de células epiteliales desprendidas del sistema renal o urogenital sedimentadas, y finalmente, un porcentaje menor incluye la fracción exosomal (los exosomas son vesículas derivadas de células presentes en el fluido) [3].

La orina es ligeramente ácida por la mañana (pH = 6,5-7,0), alcalinizándose levemente (pH = 7,5-8,0) por la noche en personas sanas, principalmente debido a que no se consumen alimentos ni bebidas. Como objeto de análisis, la orina tiene sus propias ventajas respecto del suero: puede obtenerse en mayor volumen a través de métodos no invasivos, la repetición de su muestreo no es un problema y además requiere una preparación más simple debido a su menor contenido en proteínas (60-80 g L<sup>-1</sup> en suero frente a 0,5-1 g L<sup>-1</sup> en orina), lípidos y otros compuestos de elevado peso molecular debido a la filtración glomerular [6].

Los riñones filtran diariamente unos 180 litros de plasma, lo que supone una masa de proteínas de 13±3 kg. Se denomina coeficiente de cribado a la relación entre las concentraciones de proteína en orina y en sangre. Por ejemplo, dicho coeficiente para la albúmina es aproximadamente 6:10000, lo que significa que por cada 10000 unidades de albúmina por mililitro de plasma, solo 6 U mL<sup>-1</sup> terminan en la orina final [7].

Las muestras de orina pueden recogerse de forma aleatoria, planificada o lo que se conoce como composición de muestras de un ciclo de 24 h. El muestreo aleatorio se realiza en cualquier momento del día, mientras que para estudiar tendencias relacionadas con el tiempo, para detección de metabolitos o biomarcadores, se recolecta la orina de

forma cronometrada. Si, por el contrario, se quiere evitar la gran variabilidad en los perfiles de metabolitos obtenidos en periodos cortos, se recoge la muestra de orina de 24 h. En la práctica clínica, generalmente se recolectan muestras de orina limpia de la primera hora de la mañana [6]. La orina se suele recoger en recipientes de polipropileno y para análisis clínicos se utilizan recipientes estériles. En ocasiones, se añaden surfactantes para incrementar la solubilidad de las especies de interés, minimizando así posibles efectos de adsorción sobre las paredes internas del recipiente contenedor. Sin embargo, no se recomienda el uso de surfactantes cuando los análisis implican espectrometría de masas, para evitar supresión de la ionización, siendo este problema minimizado usando estándares internos marcados isotópicamente.

La refrigeración suele ser la solución más adecuada para garantizar una buena conservación de la muestra de orina hasta el momento de su análisis. En líneas generales, se recomienda mantener la orina a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para tiempos largos de almacenamiento (de hasta 6 meses), no superar los nueve ciclos de congelación-descongelación y mantener a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para tiempos cortos de almacenamiento (hasta 48 h). Sin embargo, no existen unas condiciones de conservación establecidas como válidas para todos los componentes de la orina, así que, en cada caso particular, es necesario aplicar condiciones específicas.

La adición de preservantes suele ser una práctica habitual para impedir cambios metabólicos o contaminación bacteriana. Sin embargo, algunos preservantes pueden afectar a ciertas propiedades químicas y provocar la aparición de partículas. El ácido bórico es muy útil para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas spp.*, aunque es necesario tener en cuenta que modifica el pH inicial de la orina. El uso de azida de sodio para evitar sobrecrecimiento bacteriano, debe considerar no solo la toxicidad de dicho agente sino también su posible impacto sobre metabolitos desconocidos en la muestra. Entre otros preservantes usados en muestras biológicas cabe destacar formaldehído, sales de mercurio y clorhexidina [6].

La concentración de las especies de interés en orina varía enormemente ya que el volumen de orina excretado se halla relacionado con el consumo de agua y con otros factores fisiológicos. Por ello, es necesario llevar a cabo una corrección de volumen, que generalmente se realiza a través de la concentración de creatinina.

La cromatografía líquida (LC) es probablemente la técnica más empleada en bioanálisis. Las columnas analíticas disponibles en el mercado ofrecen un amplio rango de selectividad, por lo que no resulta difícil encontrar fases estacionarias adecuadas para la separación de fármacos, metabolitos y biomarcadores. La detección mediante

espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible (UV-Vis) ha sido una de las técnicas más comúnmente acopladas a LC debido a su bajo coste, aunque presenta una serie de desventajas que hacen que sea reemplazada por otros detectores, como la espectrometría de masas (MS) [1]. Los últimos avances en la instrumentación aplicada para LC-MS han conducido a incrementos importantes de selectividad en tiempos de análisis reducidos. De hecho, LC con MS *tándem* (MS/MS) se ha convertido en una tecnología primordial en bioanálisis. Por otro lado, la cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) ha mejorado la eficiencia y el grado de resolución de las separaciones, para una determinada longitud de columna, al emplear fases estacionarias de menor tamaño de partícula. La tecnología UPLC es relativamente nueva y la bibliografía no muestra muchas aplicaciones en el ámbito bioanalítico, aunque algunas ventajas tales como la reducción de la supresión de ionización en MS ha sido comprobada por algunos autores [1].

## 1.2. MUESTRAS AMBIENTALES

El número de productos químicos actualmente usados a nivel mundial desde distintos ámbitos es muy alto y su entrada al medio ambiente es inevitable, afectando a todos los compartimentos ambientales (hidrosfera, geosfera, biosfera y atmósfera) y, por consiguiente, a los ecosistemas relacionados [8]. Además, sus productos de transformación y sus metabolitos contribuyen al aumento de contaminantes traza objeto de monitorización, ya que su toxicidad puede ser parecida e incluso superior a la de los compuestos originales. El conocimiento de las estructuras químicas, ocurrencia y efectos de los subproductos es parcial a día de hoy. Por ello, la disponibilidad de estrategias analíticas que permitan monitorizar un número elevado de compuestos e investigar su destino ambiental es actualmente una línea prioritaria. No cabe duda que dicha prioridad no es nada fácil de afrontar teniendo en cuenta la amplia variedad de compuestos y sus muy diferentes propiedades físico-químicas ( $pK_a$ ,  $K_{ow}$ , etc.), por lo que la comunidad científica se esfuerza en desarrollar instrumentación de cada vez mejores prestaciones, nuevos materiales cromatográficos y técnicas analíticas de máxima eficacia [8].

Una evaluación rigurosa de la contaminación ambiental requiere innovación constante en tecnologías y enfoques analíticos para conseguir una identificación temprana e inequívoca, así como una cuantificación precisa de cada sustancia capaz de comprometer la flora, la fauna y la integridad de la salud pública.

Muchos contaminantes orgánicos tienen carácter polar y alcanzan el medio ambiente durante su producción, consumo o eliminación, encontrándose a nivel de ppm o concentraciones inferiores. Además de los contaminantes clásicos, grupo principalmente integrado por los pesticidas, los “contaminantes emergentes” engloban un grupo muy importante de compuestos orgánicos que se hallan en el punto de mira. Se denomina contaminante emergente a aquella sustancia que entra en el medio ambiente en cantidades apreciables, persiste sin degradarse durante tiempos más o menos largos y puede provocar efectos adversos a los organismos vivos. Dichas sustancias pueden ser de origen natural (toxinas, hormonas, etc.) o sintéticas (fármacos, nanomateriales, compuestos perfluorados, filtros UV, plastificantes, retardantes de llama, drogas ilícitas, etc.) [8]. En este sentido, la determinación de fármacos y de pesticidas en aguas y suelos ha sido abordada en esta Tesis Doctoral, en los Capítulos II y IV, respectivamente.

El consumo de medicamentos es un acto cotidiano que forma parte de la vida de muchas personas. Por poner un ejemplo, tan solo en los Estados Unidos de América (USA) más de 10 millones de mujeres utilizan anticonceptivos orales, por lo que es muy probable que estas sustancias acaben de una u otra forma en el medio natural. El envejecimiento de la población y la drogadicción son algunos de los principales factores que contribuyen a que los fármacos estén cada vez más presentes en los ecosistemas. Los hábitos de consumo de bebidas que contienen cafeína, teína y otras sustancias estimulantes, también elevan las cantidades. Tras la administración de los medicamentos, el organismo no hace desaparecer totalmente los compuestos que los constituyen. Aunque sufren procesos de metabolización y transformación dentro del cuerpo, una parte de ellos es expulsada sin metabolizar a través de la orina o de las heces. Así llegan a las aguas residuales, y a través de éstas, a arroyos, ríos, lagos, pantanos y depuradoras.

La Oficina Federal Alemana de Medio Ambiente muestra en su página web los resultados de una revisión de 1016 artículos originales y 150 de revisión, gestando así una base de datos con las concentraciones ambientales de residuos farmacéuticos humanos y veterinarios en todo el mundo en agua superficial, agua potable, estiércol, suelo y otras matrices ambientales. Esta base de datos muestra que tanto fármacos como sus productos de transformación han sido detectados en 71 países cubriendo las cinco regiones de las Naciones Unidas [9].

Los fármacos con mayor probabilidad de ser detectados en el medio ambiente pueden clasificarse en: analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, fármacos

cardiovasculares, psicoestimulantes, antidepresivos, estrógenos y compuestos hormonales, antineoplásicos, antiepilépticos y antiulcerosos/antihistamínicos.

Pero el principal problema no es que muchos fármacos se encuentran en distintos estamentos del medio ambiente, sino que el efecto adverso de algunos de ellos sobre la fauna silvestre se halla documentado y que las consecuencias sobre el ser humano son cada vez más directas, teniendo en cuenta que muchos medicamentos han sido detectados en el agua de bebida. Por todo ello, es imprescindible un control riguroso de su presencia en el medio ambiente y, para ello, se requieren métodos de análisis que cuenten con las mejores características analíticas [10].

La bibliografía presenta tres soluciones al problema medioambiental de los compuestos farmacéuticos [10]:

1. Desarrollar fármacos más “verdes”: Para que un fármaco sea realmente efectivo no debe sufrir degradación hasta llegar a su objetivo. Esto resulta algo difícil teniendo en cuenta que ha de pasar por el sistema gastrointestinal y llegar hasta el hígado, donde puede ser desactivado por enzimas. El fármaco necesita ser resistente; sin embargo, esto no es deseable cuando llega al medioambiente pues se haría persistente.
2. Impedir que los fármacos alcancen el medio ambiente: En esta línea existen diferentes posibilidades como el rediseño de inodoros que impidan la entrada directa de la orina en el alcantarillado o la disposición adecuada de los fármacos no usados. Sin embargo, tratar el problema de los fármacos veterinarios en el medio ambiente no es fácil, ya que estas líneas abordan solo el problema de los fármacos de uso humano.
3. Mejorar la eficiencia de las plantas depuradoras de aguas residuales: En los países desarrollados, prácticamente la totalidad de las aguas residuales pasa por plantas depuradoras antes de ser descargadas al medio acuático. Si bien la mayoría de los tratamientos consiguen reducir las concentraciones de fármacos en un 90%, no todas las plantas son igual de efectivas en la eliminación de estos microcontaminantes. En este sentido, las investigaciones acerca de los procesos en los tratamientos secundario y terciario podrían ayudar a evitar que los fármacos alcancen el medio acuático en concentraciones que puedan provocar problemas.

Otro grupo de compuestos químicos que suponen un problema medioambiental son los pesticidas. Es sabido que juegan un papel clave en la protección de cultivos y

ganado, incrementando considerablemente el rendimiento de estas actividades. Sin embargo, debido a su toxicidad, su uso extensivo y al hecho de que entre el 80 y el 90% de los aplicados afectan a la vegetación no objetivo, alcanzando el suelo, agua, aire, y entrando en la cadena alimentaria, los pesticidas están en el punto de mira en cuanto a control ambiental. Se estima que el setenta por ciento de los pesticidas utilizados en agricultura entra en la matriz del suelo agrícola afectando de distintas formas no solo a su calidad sino a la producción agrícola. Un aumento en la concentración de herbicidas por encima del nivel recomendado de aplicación podría modificar el crecimiento y actividad de los microorganismos del suelo influyendo en su ciclo de nutrientes. Se ha detectado reducción de la masa de las raíces en ciertas especies de plantas tratadas con determinados herbicidas, así como disminución de la concentración de macro y micronutrientes, como fósforo, azufre, potasio, magnesio y manganeso, en los tejidos foliares de plantas tratadas respecto de las no tratadas [11].

La contaminación de suelos y sedimentos resultante de la descarga de desechos industriales y municipales, las actividades mineras, el uso indebido de pesticidas y fertilizantes químicos y el riego con aguas residuales ha despertado en los últimos años una preocupación creciente en la sociedad. Los contaminantes orgánicos y los metales pesados son los dos tipos de contaminantes más importantes que se encuentran en suelos y sedimentos. Estas especies representan una amenaza para la seguridad alimentaria, la salud humana y el medio ambiente [12]. El destino de los compuestos orgánicos contaminantes en el medio edáfico depende principalmente de la naturaleza del contaminante, pudiendo ser transferido a especies vegetales o a otros organismos vivos o también ser lixivado hacia el medio hidrosférico. Aunque, como ya se ha mencionado, el origen de la contaminación orgánica en el suelo es diverso, la fuente más importante es la aplicación directa de pesticidas y herbicidas para el control de plagas. Una vez en el suelo, el contaminante orgánico puede sufrir diferentes procesos. Generalmente, tanto en las fases sólidas minerales como en las orgánicas, es retenido en una extensión que depende de su grado de funcionalización química. La retención inmoviliza al contaminante, retarda su degradación y dificulta su transferencia a otros medios. La degradación tiene lugar principalmente en la atmósfera y la hidrosfera, donde el contaminante accede por volatilización y disolución, respectivamente. Sin embargo, es necesario recordar que los contaminantes orgánicos de baja solubilidad, y por tanto, asociados a las fases sólidas, presentan cierto grado de movilidad cuando se incorporan a los coloides del suelo. En el extracto del suelo, al que el contaminante llega por disolución, según su naturaleza química y el estado redox del suelo, puede sufrir hidrólisis

o procesos de oxidación-reducción. Aunque la principal vía de degradación de los contaminantes orgánicos en el suelo tiene lugar mediante biodegradación [13].

La contaminación del medio acuático es causada principalmente por el lavado de los contaminantes presentes en el suelo, bien disueltos o en escorrentías superficiales, o bien incorporados en las partículas coloidales. En los grandes reservorios de agua, la entrada vía atmosférica por deposición seca o húmeda no es despreciable. Otras causas de contaminación de la hidrosfera son los vertidos directos de aguas residuales de núcleos urbanos o vertidos accidentales [13]. Los procesos que sufre un contaminante orgánico en el medio hidrosférico son básicamente del mismo tipo que los que tienen lugar en el suelo, aunque difiere la importancia relativa entre ellos.

El suelo no solo es un recurso vital para la vida vegetal en el medio ambiente, sino también un importante recurso natural que sustenta la supervivencia y el desarrollo de los seres humanos. Este compartimento ambiental es el mayor sumidero de contaminantes orgánicos, por lo que la calidad de los cultivos y la inocuidad de los alimentos está estrechamente relacionada con la calidad de los suelos agrícolas. Pero además, los pesticidas pueden llegar a los acuíferos subterráneos desde los campos de cultivo [14].

La primera lista de contaminantes prioritarios, creada por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) estadounidense englobaba casi exclusivamente compuestos orgánicos detectables mediante cromatografía de gases (GC) combinada con MS. Sin embargo, desde finales de los años 80, LC-MS ha ido ganando en popularidad, siendo actualmente el análisis ambiental su principal campo de aplicación, enfocado al estudio de ocurrencia y destino de contaminantes a nivel de trazas. De entre las ventajas de LC-MS, en comparación con GC-MS, destaca su compatibilidad con la naturaleza polar de un amplio rango de contaminantes, su aplicación directa para compuestos no volátiles y termolábiles y la reducción del tiempo total de análisis [8].

### **1.3. ALIMENTOS**

La amplitud del campo del análisis de alimentos es indiscutible, como también lo es su constante evolución, ya que involucra determinaciones de compuestos de muy diversa naturaleza y con propósitos muy variados. La caracterización química de alimentos requiere la determinación de toda una variedad de macromoléculas como proteínas, otros macronutrientes como lípidos y carbohidratos, componentes bioactivos

como los polifenoles, micronutrientes inorgánicos y compuestos organometálicos, así como residuos indeseables de otros compuestos que pueden aparecer en la muestra durante su producción, procesado, almacenamiento y/o transporte, como son los pesticidas, plastificantes, fármacos veterinarios, toxinas o contaminantes orgánicos persistentes. Dado que todavía se aplican protocolos tradicionales de preparación de muestra en el análisis de estas matrices, existen muchas oportunidades para mejorar y desarrollar la metodología analítica que, además, vienen demandadas por la legislación vigente para controles de rutina de alimentos y programas para el aseguramiento de la protección de la salud humana.

Aunque en ocasiones es posible llevar a cabo determinaciones *in situ*, generalmente la muestra ha de ser transportada al laboratorio para su análisis químico. Por tanto, en estos casos, es necesario considerar cuántas muestras deben tomarse, qué cantidad y de dónde, con el fin de garantizar la representatividad de las mismas y así obtener resultados significativos e interpretables. En algunos casos, el procedimiento de muestreo y la mínima cantidad de muestra necesaria para aplicar un determinado método de análisis se halla claramente establecido en la legislación. Por supuesto, las muestras han de mantenerse inalteradas durante su transporte y almacenamiento, que por regla general, ha de ser mínimo, hasta el momento de su análisis. Si fuera necesario, se aplicarían procedimientos de estabilización; por ejemplo, para retardar actividad microbiológica, hidrólisis de compuestos químicos y procesos de adsorción o volatilización. De forma previa al análisis propiamente dicho, las muestras se someten generalmente a tratamientos que dependen de su naturaleza, del nivel de concentración esperado para las especies de interés, así como de la presencia de compuestos de la matriz que afecten a la selectividad y/o sensibilidad de la técnica analítica seleccionada. Así pues, la preparación de la muestra suele incluir tratamientos para la liberación y enriquecimiento de los analitos en fases compatibles con el detector empleado.

Los componentes determinados con mayor frecuencia en matrices alimentarias así como los principales contaminantes monitorizados, se muestran en la Tabla 1, donde puede apreciarse la diversa naturaleza química de estos compuestos: desde metales y especies organometálicas hasta componentes volátiles. Muchos componentes mayoritarios y minoritarios de valor nutricional o funcional añadido, como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y antioxidantes, se analizan generalmente para comprobar que el alimento cumple determinados requisitos de calidad o, por supuesto, con fines de investigación. Además, los aditivos alimentarios, así como contaminantes de diversa naturaleza y origen, son monitorizados con objeto de chequear que se cumple la legislación vigente. La presión social creciente en materia de calidad alimentaria

contribuye a que diferentes líneas de investigación sean enfocadas hacia el desarrollo de metodologías analíticas seguras y de alta sensibilidad en análisis alimentario [15].

**Tabla 1.** Compuestos químicos de interés en control de alimentos

- 
- Componentes volátiles
    - Aromas y fragancias
    - Olores desagradables (off-flavours)
  - Componentes semivolátiles y no volátiles
    - Lípidos, proteínas, hidratos de carbono, carotenoides, vitaminas...
    - Antioxidantes, polifenoles...
  - Aditivos alimentarios y contaminantes
    - Pesticidas y fármacos de uso veterinario
    - Bifenilos policlorados, dibenzodioxinas policloradas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), ésteres de polibromodifenilo, ftalatos, aceites minerales...
    - Mico- y ficotoxinas
    - Compuestos liberados desde el material de envasado
    - Residuos del procesado y/o almacenamiento
  - Metales y compuestos organometálicos
- 

Los métodos aplicados al análisis de alimentos van desde los catalogados como subjetivos (por ejemplo, determinaciones organolépticas) hasta procedimientos objetivos basados en determinaciones físicas, químicas, microscópicas y microbiológicas [15].

Cada vez más, los métodos de análisis de alimentos se basan en el uso de LC, pues ha demostrado ser una tecnología óptima para cribado, detección y cuantificación de una gran variedad de analitos [16].

## 2. LA QUÍMICA VERDE EN LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra es una etapa crítica en el proceso analítico, e incluye todos los pasos necesarios para aislar los analitos contenidos en la muestra original y proceder a la etapa de medida con el mínimo grado de interferencias y máxima sensibilidad. Así, podríamos decir que la preparación de la muestra tiene como objetivo

transformar los analitos en formas medibles. La realidad es que solo en unos pocos casos, la determinación directa es posible y puede omitirse la preparación de la muestra. Las situaciones más simples, implican una extracción exhaustiva y no selectiva de los compuestos de interés desde la matriz de la muestra, una limpieza para aislar los analitos de las especies co-extraídas y una preconcentración del extracto purificado para asegurar una detección segura.

En los últimos años, la preparación de la muestra ha tendido a su miniaturización con la finalidad de reducir el impacto medioambiental y sobre la salud de los seres vivos. La tendencia a la reducción del uso de disolventes orgánicos y a la reducción de residuos generados en los correspondientes análisis viene enmarcada dentro de los doce principios de la Química Verde [17]:

1. Prevención de formación de residuos en lugar de su remediación.
2. Economía atómica.
3. Reducción de productos químicos tóxicos/peligrosos.
4. Generación de productos eficaces pero no tóxicos.
5. Reducción del uso de disolventes volátiles y tóxicos, y de sustancias auxiliares.
6. Disminución en el consumo energético.
7. Utilización de materias primas renovables.
8. Reducción del número de etapas de los procesos de síntesis y, en concreto, de las reacciones de derivatización.
9. Potenciación de catálisis de alta selectividad, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. Generación de productos biodegradables.
11. Desarrollo de metodologías analíticas para la prevención de la contaminación.
12. Minimización del riesgo de accidentes químicos.

Las limitaciones impuestas a la actividad humana con objeto de no poner en riesgo las necesidades de generaciones futuras se han visto también plasmadas en distintas etapas del proceso analítico. Los primeros métodos descritos en la bibliografía en los que se aprecia la aplicación de la ideología de la Química Verde a los laboratorios analíticos data de 1995, hablando entonces de “Química Analítica Verde, Green Analytical Chemistry, (QAV)” [18]. La aplicación de la QAV a los métodos de análisis se ha abordado a través de tres líneas diferentes [19]:

- 1) Reducción del consumo de disolventes en el tratamiento de la muestra.

- 2) Reducción en cantidad y toxicidad de los disolventes y reactivos empleados en la etapa de medida analítica.
- 3) Desarrollo de metodologías analíticas directas que eviten el uso de disolventes o reactivos.

En lo que se refiere al primer punto, como ya se ha indicado anteriormente, la mayoría de las muestras analizadas por métodos instrumentales de separación no pueden ser introducidas de forma directa en el sistema debido a la complejidad de sus matrices, porque presenten contenidos analíticos muy bajos y/o sean incompatibles con el sistema cromatográfico empleado. Por ello, una preparación previa de la muestra resulta imprescindible antes de su introducción en el sistema instrumental. El desarrollo de nuevas técnicas de extracción rápidas y fiables ha sido notorio en los últimos años [20]. Debe aquí resaltarse el hecho de que, en no pocas ocasiones, los nuevos sistemas instrumentales de medida no son suficientemente sensibles como para determinar gran cantidad de analitos en diferentes tipos de muestras. Así pues, la optimización de las distintas etapas y operaciones asociadas a la preparación de la muestra, ocupan una parte importante de las investigaciones actuales en el área de Química Analítica.

El proceso de preparación de la muestra seleccionado depende de la matriz de la misma y de las propiedades y nivel de concentración de los analitos. Además, la preparación de la muestra debe adaptarse al análisis final, considerándose la instrumentación a emplear, el grado de exactitud requerido y si se va a llevar a cabo un análisis cualitativo o cuantitativo. En análisis cuantitativo, también es necesario considerar la forma más adecuada de preparación de los patrones de calibración. En algunos casos, la calibración directa frente a patrones acuosos no es posible y es necesario aplicar el método de adiciones estándar a las muestras o emplear una muestra exenta de los analitos como matriz o disolvente de calibración. El uso de un estándar interno adecuado ha de ser considerado. En cualquier caso, la técnica seleccionada, ya sea manual o automática, ha de ser robusta y reproducible [21].

Generalmente, las diferentes etapas en la preparación de la muestra se llevan a cabo en modo discontinuo, por lo que suelen calificarse como laboriosas y largas y su complejidad suele estar inversamente relacionada con la concentración de los analitos en la muestra. En los últimos años, numerosas investigaciones se han enfocado hacia la minimización de estos problemas, desarrollándose técnicas de extracción de alta eficacia y versatilidad. Así, cabe destacar las aplicaciones de las técnicas de purga y trampa (PT), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción por adsorción en espacio de cabeza (HSSE) para compuestos volátiles, así como una serie de técnicas de microextracción en

fase líquida (LPME) adaptadas para la extracción de analitos semi- y no volátiles en muestras líquidas y, por último, otras técnicas aplicables a muestras viscosas o semisólidas, tales como dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y técnicas de extracción en disolventes como extracción en fluidos supercríticos (SFE), extracción líquida presurizada (PLE), extracción en agua subcrítica (SWE), extracción asistida por microondas (MAE) y extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Estas técnicas modernas de preparación de la muestra ofrecen en mayor o menor medida la posibilidad de automatización, son limpias, selectivas, rápidas, eficaces y, en muchos de los casos, baratas y de aplicación sencilla.

La metodología LPME es una versión miniaturizada de la técnica clásica extracción líquido-líquido (LLE) que usa una fase líquida como extractante para aislar los analitos que habrán sido previamente sometidos a una etapa de extracción sólido-líquido (SLE) cuando se trate de muestras sólidas. El número de variantes de la técnica LPME es casi tan elevado como la lista de abreviaturas [22]. Las técnicas LPME pueden ser clasificadas de acuerdo a la naturaleza de la fase extractante. En este sentido, podemos distinguir aquellas técnicas que usan disolventes orgánicos inmiscibles con el agua, líquidos iónicos (ILs), disolventes supramoleculares (SUPRASs), disolventes eutécticos profundos (DESS) y aquellos que inicialmente son miscibles en agua.

Los ILs consisten en asociaciones entre cationes voluminosos de carácter orgánico con aniones que pueden tener carácter orgánico o inorgánico. Las propiedades físico-químicas de los ILs, como presión de vapor baja, gran estabilidad térmica o puntos de fusión bajos les han convertido en fases extractantes de gran interés en LPME. Los SUPRASs son disolventes no volátiles capaces de interactuar con una amplia variedad de compuestos debido a sus diferentes polaridades y sus numerosos puntos de interacción proporcionados por los grupos anfífilos. Estos disolventes se generan a partir de compuestos con carácter anfífilo a través de un proceso de autoensamblaje que produce estructuras tridimensionales que coacervan. Los SUPRASs más comunes se forman a partir de ácido octanoico o decanoico con hidróxido de tetrabutilamonio. La extracción en punto de nube (CPE) puede considerarse como una técnica de microextracción que emplea SUPRASs, ya que al calentar el surfactante no iónico por encima de su temperatura de punto de nube, se forma una estructura supramolecular.

La bibliografía indica varias ventajas de los DESS frente a los ILs, como su síntesis a través de procesos sencillos, alta pureza y bajo costo. Estos disolventes se forman a partir de dos componentes que se combinan por medio de enlaces por puentes de hidrógeno, dando lugar a estructuras de menor punto de fusión que sus componentes

individuales. Los DESs se forman al mezclar una sal de amonio cuaternario, como cloruro de colina, con un aminoácido, ácido orgánico o polialcohol que actúa como dador en enlaces por puente de hidrógeno.

El uso de disolventes orgánicos miscibles con el agua como fases extractantes en LPME ha sido propuesto a través del incremento de la fuerza iónica de la mezcla de las fases dadora y aceptora que tiene como resultado la separación de las mismas. Los disolventes de polaridad conmutable (SPSs) son considerados una interesante alternativa a este procedimiento clásico del efecto salino. Los SPSs pueden modificarse reversiblemente entre formas con diferentes propiedades físicas. En este sentido, el aumento de la fuerza iónica mediante reacciones entre CO<sub>2</sub> con bases nitrogenadas ha sido utilizado para separar mezclas de agua con disolventes orgánicos polares [23].

Por otro lado, dentro de cada una de estas categorías, pueden distinguirse dos grupos, considerando el modo en que la fase aceptora es expuesta a la fase dadora: exposición de un volumen discreto y dispersión en el seno de la fase aceptora. La exposición de un volumen discreto de fase extractante puede llevarse a cabo manteniéndolo suspendido en la punta de la aguja de una microjeringa (microextracción en gota simple, SDME), directamente colocado en el vórtice formado al mantener la fase aceptora en agitación o inmovilizado en una fibra hueca (HF). Cuando la fase extractante no es dispersada, LPME puede aplicarse bajo dos modos diferentes, según la gota extractante se mantenga en contacto con la fase dadora (DI, modo de inmersión directa) o se exponga al espacio de cabeza sobre la muestra (HS, modo de espacio de cabeza). La dispersión de la fase aceptora en gotas nanométricas acelera la transferencia de masa de analito. Para la formación de las nanogotas puede usarse un agente dispersante (un disolvente orgánico o un surfactante) o aplicarse energía externa como ultrasonidos o agitación vórtex.

La versatilidad de las técnicas LPME queda patente a través de sus numerosas aplicaciones en distintos ámbitos, tales como análisis ambiental [24, 25], de fluidos biológicos [26, 27] y de alimentos [23, 28].

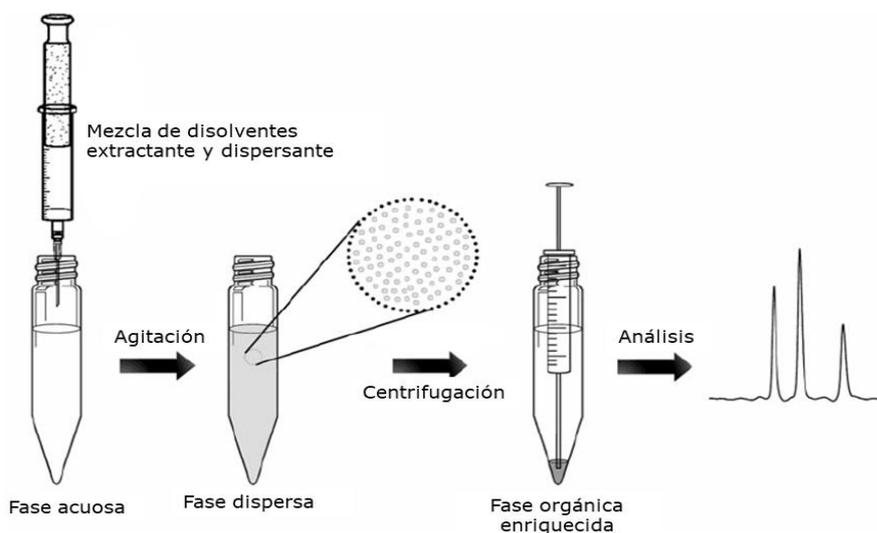
Teniendo en cuenta que en la presente Tesis Doctoral se han aplicado técnicas miniaturizadas basadas en LPME de dos fases, a continuación explicaremos con más detalle las aquí aplicadas: microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) y CPE.

## 2.1. MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO

La primera aplicación descrita en la bibliografía de la técnica DLLME data de 2006 [29], siendo desarrollada por el grupo de Rezaee y colaboradores. Las características analíticas y de aplicación encontradas para la preconcentración de PAHs permitió a este grupo de investigación catalogar la técnica como de fácil manejo para el operador, rápida, de bajo costo y que proporciona altas recuperaciones y factores de enriquecimiento.

La técnica se basa en un sistema ternario de disolventes que, en su aplicación convencional, consiste en una fase acuosa conteniendo los analitos, un disolvente orgánico inmisible con el agua y más denso que ésta, que actúa como extractante, y un disolvente también de carácter orgánico que actúa como dispersante. El extractante es dispersado en finísimas gotas en el seno de la fase acuosa por acción del disolvente dispersante que es miscible tanto en la fase acuosa como en la extractante. La ruptura de la fase aceptora en multitud de gotas aumenta la superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora, incrementando sensiblemente la eficiencia de extracción. Una vez alcanzado el equilibrio de distribución, se procede a centrifugar la mezcla, de modo que la fase extractante enriquecida con los analitos sedimenta en el fondo del tubo cónico, siendo recogida con ayuda de una microjeringa para proceder a su análisis.

La Figura 1 muestra un esquema del procedimiento de aplicación descrito.



**Figura 1.** Representación del proceso DLLME [30].

De entre las características anteriormente citadas de la técnica DLLME, merece la pena destacar:

- El mínimo gasto de disolventes orgánicos, ya que implica el uso de volúmenes del orden de los microlitros
- La consiguiente mínima generación de residuos
- El bajo volumen de muestra usada, ya que el volumen de fase acuosa se encuentra en torno a los 10 mL
- Altos factores de enriquecimiento
- Rapidez para alcanzar el equilibrio de reparto, gracias al estado de turbidez alcanzado al generar una gran superficie de contacto entre las finas gotas de disolvente extractante y la fase acuosa. De hecho, el equilibrio se alcanza de forma inmediata, siendo la eficiencia del proceso independiente del tiempo, lo que supone una de las principales ventajas de DLLME.

Conviene en este punto definir los términos factor de enriquecimiento (EF) y recuperación de la extracción (ER) ya que sus valores numéricos determinan la eficacia de la técnica como herramienta para incrementar la sensibilidad y selectividad de los métodos de análisis. Se define EF como la relación de la concentración de analito en la fase sedimentada ( $C_{sed}$ ) y la concentración inicial de analito ( $C_0$ ) en la fase acuosa:

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

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

Por otro lado, se define ER como el porcentaje de la cantidad total de analito ( $n_0$ ), extraída a la fase sedimentada ( $n_{sed}$ ):

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

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

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

El principal campo de aplicación de DLLME se centra en la preconcentración de compuestos de carácter orgánico conteniendo una gran variedad de grupos funcionales, tales como aminas, ésteres, éteres, fenoles, aldehídos, nitrocompuestos o ácidos; siendo el número de aplicaciones a especies inorgánicas considerablemente inferior. En cuanto al tipo de matrices para las que la técnica ha sido aplicada con éxito destacan aguas de diferentes orígenes y otras muestras ambientales como suelos y sedimentos. En los últimos años, DLLME ha sido introducida en el campo del análisis de alimentos y de fluidos biológicos [23, 31].

### **2.1.1. Parámetros que afectan a DLLME**

Las principales variables que determinan la eficiencia del proceso DLLME son la naturaleza y el volumen de la fase extractante. Para la selección del disolvente orgánico se tiene en consideración su mayor densidad que el agua, su capacidad para extraer los compuestos de interés, su habilidad para formar disoluciones turbias estables, que su solubilidad en agua sea mínima y que presente un buen comportamiento cromatográfico, ya que, en la mayoría de las aplicaciones, la fase enriquecida es finalmente sometida a análisis mediante cromatografía. En este sentido, los hidrocarburos halogenados convencionales (cloroformo, tetracloruro de carbono, clorobenceno, etc.) son los disolventes más comúnmente seleccionados. No todas las aplicaciones de DLLME implican el uso de disolventes orgánicos de mayor densidad que el agua. De hecho, los ILs y algunos disolventes orgánicos menos densos que el agua, 1-undecanol, 1-octanol, 1-dodecanol y 2-dodecanol, han proporcionado muy buenos resultados para la extracción de determinadas especies químicas [31]. Ciertamente, aquellos disolventes con punto de fusión cercanos a temperatura ambiente (10-30 °C) cuentan con la posibilidad de recuperar la fase enriquecida por enfriamiento, evitando la etapa de centrifugación, en este caso hablamos de la técnica conocida como DLLME con solidificación de gota orgánica flotante (SFOD) [32].

Como ya hemos mencionado, el volumen de fase extractante tiene un efecto importante en el EF. Aumentando el volumen del disolvente extractante, aumenta el volumen de la fase sedimentada o flotante obtenida tras la centrifugación, lo que implica un aumento de la eficiencia de extracción y una disminución del EF como consecuencia de un efecto de dilución. Por tanto, el volumen óptimo del disolvente extractante debe asegurar tanto EFs altos como un volumen suficiente de la fase enriquecida que permita su análisis. Se precisa una baja relación fase aceptora/fase dadora y una relación de reparto alta, entendiendo esta última como la relación entre la concentración de analito

en la fase extractante y la concentración inicial en la disolución de la muestra. Los volúmenes generalmente empleados de disolvente extractante se encuentran en el intervalo comprendido entre 10 y 50  $\mu\text{L}$ .

La naturaleza del disolvente dispersante determina la distribución del tamaño de gota en que es dispersada la fase extractante, así como la viscosidad de la emulsión formada. La selección del disolvente dispersante viene condicionada en primera instancia por su miscibilidad tanto en el disolvente extractante como en la fase acuosa. Los disolventes dispersantes más ampliamente empleados, ordenados según su frecuencia de uso son metanol, acetonitrilo, acetona y etanol. Los surfactantes Tween-20, Tween-80 y dodecilsulfato sódico, así como algunos ILs se han empleado también como agentes dispersantes, aunque en menor extensión [31].

El volumen del disolvente dispersante influye de forma directa en la formación de la emulsión (agua/disolvente dispersante/disolvente extractante), en el grado de dispersión de la fase aceptora en la fase dadora y, por tanto, determina la eficiencia de extracción. Este volumen modifica el volumen de fase enriquecida finalmente obtenida, por lo que se recomienda en la optimización de este parámetro, modificar los volúmenes del disolvente dispersante y extractante simultáneamente, para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada. El volumen óptimo de dispersante viene determinado por el volumen tanto de la fase acuosa como del disolvente extractante. Los volúmenes más empleados de agente dispersante en DLLME se hallan entre 1 y 2 mL.

Otros parámetros que afectan en DLLME, aunque en menor extensión que los anteriormente citados son volumen de muestra acuosa, concentración de sal y pH de la disolución de la muestra, así como el tiempo y la velocidad de centrifugación.

El valor de EF es directamente proporcional a la relación volumen de muestra/volumen de fase extractante. Los volúmenes de muestra generalmente aplicados en DLLME se hallan en el intervalo 10-20 mL, ya que volúmenes mayores dificultan la transferencia de masa y la extracción de los analitos. La presencia de ciertos agentes químicos en el medio de extracción puede disminuir la solubilidad de los analitos en la fase acuosa favoreciendo su transferencia a la fase extractante. El cloruro sódico, en concentraciones entre 1 y 30% m/v, ha sido usado en la preconcentración de ciertos compuestos orgánicos. Por otro lado, el pH de la fase acuosa influye en la extracción de compuestos ionizables, debiéndose ajustar en el intervalo de valores en el que los analitos no se hallen en formas ionizadas.

La etapa de centrifugación es incluida en el proceso DLLME para romper la dispersión. Las condiciones aplicadas en esta etapa son muy variadas, encontrando en la bibliografía con mayor frecuencia velocidades y tiempos de centrifugación en los intervalos 3000-4000 rpm y 2-3 min, respectivamente [31].

El tiempo de extracción no es una variable que afecte en DLLME, como ya se ha comentado anteriormente, el equilibrio de reparto se alcanza casi de forma instantánea al producirse la dispersión de la fase aceptora en el seno de la dadora, proporcionando una altísima área superficial de contacto entre ambas fases.

### 2.1.2. Modalidades de DLLME

DLLME es la técnica LPME que ha dado lugar a un mayor número de publicaciones científicas en los últimos años, habiendo sido aplicada en dos Capítulos de esta Tesis Doctoral. Una búsqueda en la base de datos Web of Science encuentra casi 1600 artículos de investigación que hacen referencia a DLLME en los últimos 5 años (2015-2019). Sin embargo, en su forma de aplicación convencional, presenta algunos inconvenientes y limitaciones que se hallan en continua revisión, tales como [26]:

- a) Los disolventes organoclorados no son respetuosos con el medio ambiente. Para paliar este inconveniente, su sustitución por disolventes menos densos que el agua, ferrofluidos y disolventes verdes como los ILs, ha sido propuesta en diferentes ocasiones.
- b) El uso de un disolvente dispersante compite con el disolvente extractante durante la extracción y puede reducir los EFs. En este sentido, la aplicación de energía de ultrasonidos o vórtex, así como el uso de surfactantes y dióxido de carbono disuelto, han proporcionado efectos comparables a los de los disolventes orgánicos dispersantes.
- c) La centrifugación es necesaria para que se produzca la separación de las fases. El uso de nuevos dispositivos para la ruptura de la turbidez, implicando purga con aire, adsorción física sobre nanomateriales, o demulsificación asistida por disolventes resultan interesantes opciones para obviar la etapa de centrifugación.
- d) Aunque de muy sencilla aplicación, la automatización del proceso DLLME siempre puede facilitar y agilizar el tratamiento de un número elevado de

muestras. En este sentido, aparece en la bibliografía la implicación de sistemas de análisis por inyección en flujo, análisis por inyección en flujo con multijeringas o análisis de inyección secuencial.

- e) La combinación de DLLME con otros métodos de tratamiento de muestra ha sido propuesta para incrementar la sensibilidad y selectividad de procedimientos. Así podemos encontrar combinaciones con otras técnicas de extracción convencionales, como extracción en fase sólida (SPE), y con técnicas miniaturizadas de extracción como extracción por adsorción sobre barras agitadoras (SBSE), extracción en fase sólida magnética (MSPE) o incluso combinación de varias etapas DLLME [31].

En resumen, se han propuesto numerosas variaciones de la DLLME aplicada en modo convencional con objeto de solucionar cada una de sus desventajas y desarrollar una técnica más eficiente, más sencilla y más respetuosa con el medio ambiente. Esto ha dado lugar a un gran número de acrónimos para técnicas que tienen variaciones mínimas o incluso para referirse a la misma técnica, lo que hace que muchas veces sea tediosa la clasificación. Šandrejová y colaboradores [22] propusieron una estandarización y simplificación en relación a la terminología en el ámbito de la DLLME.

### **2.1.3. Acoplamiento DLLME-Técnicas cromatográficas**

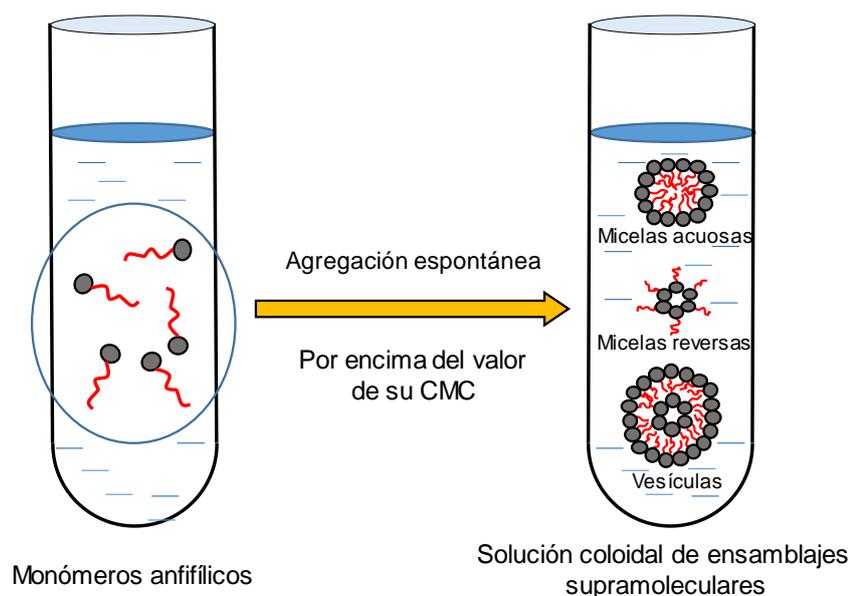
El uso de disolventes orgánicos volátiles e inmiscibles en agua como fases extractantes en DLLME convierte a la GC en la técnica de análisis preferida para los extractos preconcentrados. Ahora bien, si los analitos no son compatibles con GC, por presentar marcado carácter polar, ser termolábiles, o de baja volatilidad, será necesario someterlos a reacciones de derivatización que los transformen en derivados con características adecuadas para su análisis mediante GC. En este sentido, los reactivos derivatizantes compatibles con medios acuosos, como el anhídrido acético, han sido empleados de forma previa a la aplicación de la etapa DLLME, incrementando al mismo tiempo su eficiencia de extracción. La combinación de derivatización y microextracción en una única etapa también ha sido propuesta, teniendo lugar la formación de los derivados en la fase orgánica extractante [33]. La derivatización de los analitos también ha sido llevada a cabo una vez preconcentrados mediante DLLME, previa evaporación del disolvente extractante [34] o en el puerto de inyección del sistema cromatográfico [35], en ambos casos aplicando una reacción de silylación usando bis(trimetilsilyl) trifluoroacetamida (BSTFA) como reactivo derivatizante.

Para el análisis directo de los extractos DLLME mediante LC, el disolvente extractante empleado debe ser compatible con la fase móvil. Sin embargo, los disolventes orgánicos halogenados, debido a sus altas densidades y naturaleza hidrofóbica, no son compatibles con LC en fase reversa (RP). Para resolver este problema es necesario incluir etapas adicionales como la evaporación del disolvente y reconstitución del residuo seco en otro compatible con LC, o aplicar una re-extracción de los analitos en un disolvente adecuado [33].

## 2.2. EXTRACCIÓN EN PUNTO DE NUBE

Los tensioactivos son moléculas que presentan una parte polar hidrofílica de pequeño tamaño (cabeza) y una parte apolar hidrofóbica larga (cola) que, comúnmente, es una cadena hidrocarbonada lineal, aunque también puede ser ramificada o conteniendo anillos aromáticos. El uso de surfactantes en procesos de extracción ha despertado un interés creciente debido a que estos agentes no son tóxicos, y a que proporcionan rápidas y eficientes preconcentraciones con cantidades mínimas de los mismos [36].

En disolución acuosa y a muy bajas concentraciones, los tensioactivos generalmente se hallan en forma de monómeros. Cuando la concentración de tensioactivo supera un determinado valor, conocido como concentración micelar crítica (CMC), los monómeros sufren asociación espontánea formando agregados, de entre 60 a 100 monómeros, pudiendo dar lugar a las llamadas micelas normales o acuosas, en las que las colas de los monómeros se hallan blindadas, vesículas y micelas reversas, encontrándose blindadas las cabezas de los monómeros en este último caso. Normalmente las micelas tienen forma esférica, aunque pueden tener otras formas, dependiendo de la naturaleza del surfactante y de las propiedades de la disolución. La Figura 2 muestra un esquema del proceso de asociación espontánea de los monómeros, donde puede apreciarse la estructura para los distintos tipos de micelas.

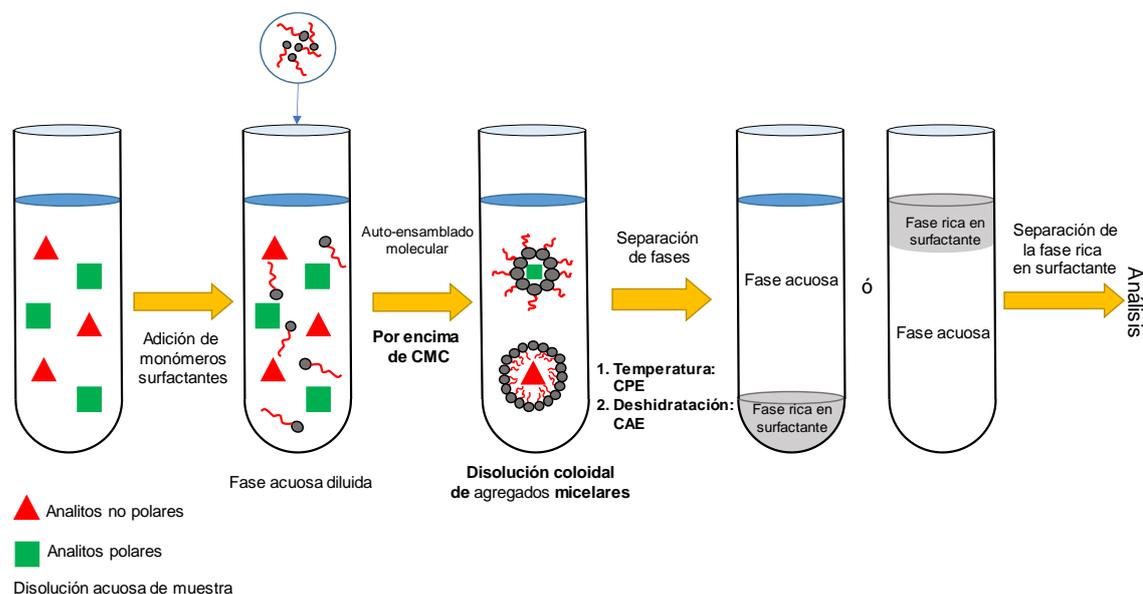


**Figura 2.** Procesos de agregación de monómeros [36].

Las micelas tienen capacidad para extraer solutos de diferente naturaleza, lo que es aprovechado desde el punto de vista analítico para el desarrollo de procedimientos de extracción. La técnica CPE fue introducida en 1976 por Watanabe y colaboradores [37], siendo la metodología de extracción más conocida que emplea surfactantes. Estos agentes también se usan en extracción coacervativa (CAE), siendo esta técnica mucho menos popular que CPE. En el proceso de coacervación aparecen dos fases diferenciadas por lo que la disolución muestra turbidez.

Los coacervados son líquidos ricos en surfactantes inmiscibles en agua que se producen en disoluciones coloidales por acción de agentes deshidratantes. La técnica CAE utiliza coacervados obtenidos a partir de surfactantes iónicos anfífilos por adición de un electrolito, un disolvente miscible en agua en el que la macromolécula presenta baja solubilidad o por cambios de pH en la disolución. En la técnica CPE el coacervado se forma a partir de surfactantes no iónicos por un aumento de temperatura de la disolución hasta un valor conocido como temperatura de punto de nube. La temperatura de punto de nube depende de la naturaleza del tensioactivo, de su concentración, así como de la presencia de sales, ácidos y bases, entre otros compuestos. Aunque la formación de dos fases a partir de una única fase homogénea es inducida de forma diferente en CAE y CPE, la Figura 3 muestra que los procesos físicos y químicos en ambas técnicas de extracción son similares. Las etapas implicadas en CPE son: a) asociación de los analitos presentes en la fase dadora con los agregados micelares, b) aumento de la temperatura por encima de la temperatura de punto de nube, provocando

la separación del coacervado de la fase acuosa, y c) separación de las fases, generalmente por centrifugación o decantación, con enfriamiento previo de la mezcla.



**Figura 3.** Comparación de las etapas implicadas en CPE y CAE [38].

Los surfactantes neutros más empleados en CPE son los basados en polioxietileno, tales como Tritón X-100, Tritón X-114, Brij 30, Brij 56, Brij 97 y Tween 80, con temperaturas de punto de nube comprendidas entre 2 y 69 °C, que corresponden a Brij 30 y Brij 56, respectivamente.

La extracción y preconcentración de compuestos inorgánicos ha ocupado el grueso de aplicaciones de CPE durante mucho tiempo, habiendo sido ampliado su campo de aplicación en los últimos años también a compuestos orgánicos [38].

La aplicación de CPE implica el uso de equipamiento básico de laboratorio y se caracteriza por su sencillez y velocidad. En la mayoría de los casos, no se requieren etapas adicionales de limpieza de los extractos obtenidos antes de su análisis cromatográfico. Sin embargo, en ocasiones, los surfactantes pueden provocar interferencias dependiendo del análisis. Además, la eficiencia de extracción del proceso CPE disminuye al aumentar el carácter polar de los analitos y para compuestos de elevada volatilidad o térmicamente inestables [38]. Cuando se compara con otras técnicas de extracción, el uso de pequeños volúmenes de surfactantes no volátiles, la fácil aplicación y la combinación de extracción y enriquecimiento en una única etapa, son ventajas que han de ser destacadas.

### 2.2.1. Acoplamiento de CPE a sistemas cromatográficos

Debido a la elevada viscosidad y baja volatilidad de los coacervados, el uso de GC para el análisis de los extractos se halla muy limitado, aunque se han propuesto algunas aplicaciones mediante desorción térmica con microviales provistos de insertos [39] o llevando a cabo una re-extracción en un disolvente compatible con GC [40]. La técnica más comúnmente empleada para el análisis de los extractos obtenidos mediante CPE es LC-UV o LC-MS, aunque también debido a la elevada viscosidad de la fase extractante, ésta es diluida de forma previa a su inyección en el sistema cromatográfico.

CPE ha sido la técnica de preconcentración aplicada en esta Tesis Doctoral para la preconcentración de vitamina K aplicando LC-MS/MS para el análisis.

## 3. LA DERIVATIZACIÓN EN EL PROCESO ANALÍTICO

La inclusión de una etapa de derivatización en el análisis de muestras se lleva a cabo para facilitar el aislamiento, separación o detección de los analitos o incluso cuando proporciona resultados más robustos, mejora la precisión del método o simplifica su aplicación. Son numerosos los compuestos que carecen de grupos cromóforos para su detección mediante espectrometría UV-visible, fluoróforos para detección fluorescente y quimioluminiscente, electróforos para detección electroquímica, o no son eficientemente ionizados para su detección por MS.

Aquellos compuestos que presentan grupos funcionales reactivos, pueden adquirir las características de detección requeridas modificando su estructura química a través de una reacción química adecuada. La derivatización también puede usarse para minimizar interferencias de la matriz de la muestra, desplazando el analito a una zona del cromatograma en la que la respuesta del detector sea despreciable para dicha matriz. Aunque también podría ocurrir que los compuestos derivatizados sean más difíciles de separar en columna o se alargue demasiado el tiempo de separación. No todos los reactivos derivatizantes se comportan de igual modo, y por supuesto, un reactivo adecuado para la detección no tiene por qué conducir a una separación cromatográfica poco eficiente.

Las reacciones de derivatización pueden llevarse a cabo de forma previa a la separación cromatográfica o posterior, en este último caso afectando solo a la detección de los compuestos. En ocasiones, la reacción se aplica antes del aislamiento de los analitos desde la muestra con objeto de mejorar su recuperación y/o incrementar la

selectividad del método de extracción aplicado. Las reacciones de derivatización aplicadas pre-columna deben ser cuantitativas y la generación de productos secundarios debe ser mínima. Siempre que sea posible, las muestras se procesan en lotes con un alto nivel de automatización, controlando las condiciones de reacción que habrán sido previamente optimizadas. Cuando el reactivo y el analito derivatizado comparten una estructura común, que será la responsable de la respuesta en el detector, debe eliminarse el exceso de reactivo derivatizante y otros productos de la reacción, si interfieren en la separación o detección de los analitos. Para ello, resulta muy interesante disponer de un método sencillo.

Las derivatizaciones post-columna se llevan a cabo en reactores de flujo continuo y no necesitan ser cuantitativas, aunque sí reproducibles. El diseño del reactor condiciona el tiempo de reacción, que debe ser suficientemente corto como para que la resolución de la columna no se vea disminuida por difusión en este dispositivo. En estos casos, si el exceso de reactivo y subproductos de la reacción no son separados de los analitos derivatizados, es necesario que no respondan al detector en las condiciones seleccionadas, en caso contrario será necesario su separación antes de su entrada en el detector [41].

#### **4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

Como ya se ha indicado anteriormente, el análisis de los extractos obtenidos en la etapa de preparación de muestra suele llevarse a cabo mediante técnicas de separación de alta eficiencia, como las técnicas cromatográficas, que generalmente se usan para separar mezclas en sus especies químicas individuales de forma previa a su determinación final con un detector adecuado.

La complejidad de las muestras objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral, (muestras biológicas, ambientales y de alimentos) implica que, aún cuando se usen técnicas de detección altamente selectivas como las basadas en MS o espectrofluorimetría (FLD), es necesario incluir una etapa previa de separación cromatográfica.

#### 4.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS ACOPLADA A LC

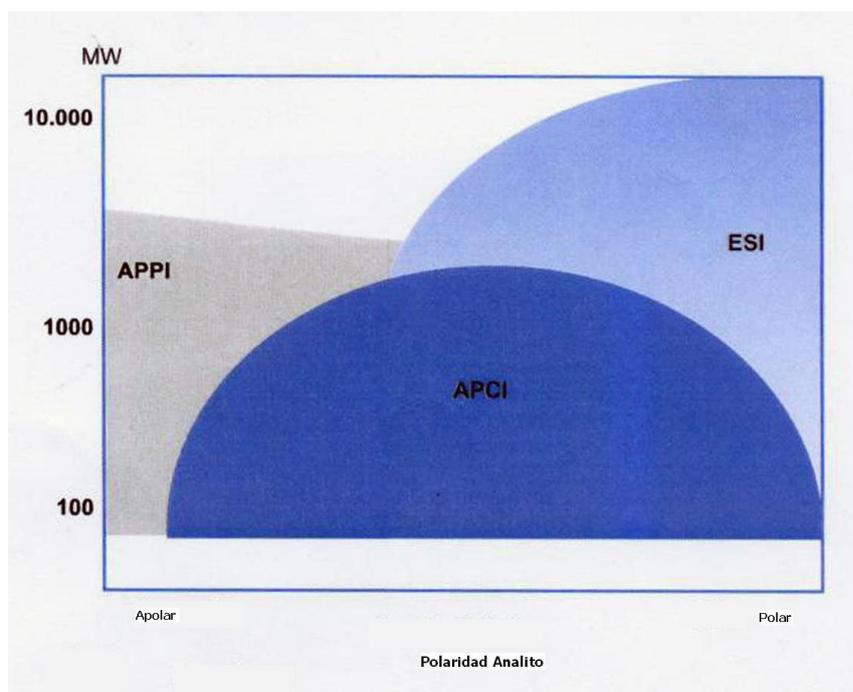
La combinación de la cromatografía con MS ha atraído gran interés en los últimos años. La primera combinación comercial data de 1967, siendo para GC con MS. La hibridación GC-MS se ha aceptado como una técnica de análisis de rutina, lo que muchos autores adjudican a la disponibilidad de interfases tanto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

Sin embargo, esto no es así cuando se considera la combinación LC-MS. Las incompatibilidades entre ambas técnicas impiden que puedan combinarse de forma directa, ya que LC opera en fase condensada y MS a alto vacío. Por ello, resulta necesario incluir una interfase capaz de eliminar la fase móvil. Hasta hace dos décadas, no se disponía de una interfase apropiada de LC con MS porque este acoplamiento no se consideraba natural, ya que no sólo los analitos han de ser ionizados sino que también se requiere la vaporización de la fase móvil. En la actualidad, este problema ha sido resuelto con las fuentes de ionización a presión atmosférica (API), que han convertido LC-MS en un método ideal y ampliamente usado debido a su gran especificidad, sensibilidad y eficiencia [15, 42]. Las técnicas API son compatibles con los sistemas eluyentes de RP-LC, considerando el uso de disolventes volátiles y aditivos en la separación cromatográfica y manteniendo las ventajas de LC [43].

Desde finales de los años 80, LC-MS ha incrementado notablemente su popularidad en distintos ámbitos, tales como bioanálisis [1], análisis medioambiental [8] y de alimentos [16, 44, 45]. Comparada con GC-MS, el acoplamiento LC-MS muestra una serie de ventajas como su compatibilidad con el carácter polar de muchos compuestos de interés bioanalítico y de la mayoría de los contaminantes. Además, la etapa de derivatización de compuestos de baja volatilidad o térmicamente inestables es aquí eludida, aumentando el número de compuestos químicos susceptibles de ser analizados de forma directa, reduciendo además el tiempo total de análisis.

## 4.2. INTERFASES PARA LC-MS

Las interfases LC-MS más usadas son fuentes de ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI), siendo todas ellas fuentes API de ionización débil [15]. La Figura 4 compara la aplicabilidad de las tres técnicas de ionización ESI, APCI y APPI de acuerdo con el peso molecular de los compuestos y su polaridad.



**Figura 4.** Comparación del campo de aplicación de los tres modos de ionización a presión atmosférica [15].

Con ESI y APCI, se han desarrollado estrategias analíticas de LC-MS en muy diferentes áreas, como análisis ambiental, desarrollo de fármacos, análisis de residuos de fármacos de uso veterinario, caracterización de productos naturales y caracterización de biomoléculas como péptidos, proteínas, oligosacáridos, lípidos y oligonucleótidos [46].

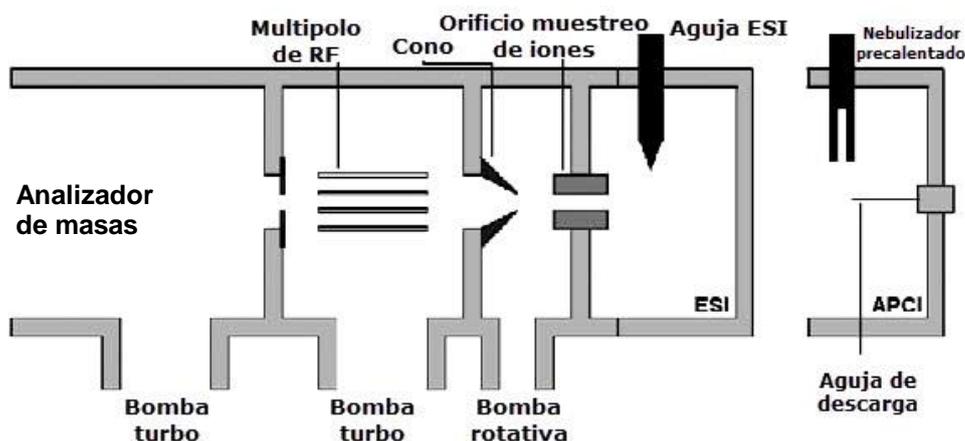
Así, ESI resulta la técnica de ionización más adecuada para compuestos orgánicos de polaridad moderada a alta y elevado peso molecular (>1000 Da) [47]. APCI es más útil para compuestos no iónicos, de polaridad baja a alta y de peso molecular moderado. APPI se considera complementaria a ESI y APCI ya que amplía el intervalo de compuestos analizables a moléculas de muy baja polaridad que no son fácilmente ionizables. Puede concluirse que no existe ninguna técnica de ionización útil para todo tipo de compuestos; es decir, ciertas moléculas son más eficientemente ionizadas en un

modo y otras requieren otro tipo de ionización, por ejemplo ESI o APCI. Además, una vez seleccionada la técnica de ionización, algunas sustancias son determinadas de forma más efectiva a partir de sus iones cargados positivamente, mientras que para otras es preferible la ionización negativa. Por ejemplo, los ácidos son más fácilmente ionizados con ESI en modo negativo, mientras que las aminas se ionizan mejor con ESI en modo positivo.

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

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

La Figura 5 muestra un esquema de una fuente API [46]. Es posible cambiar entre ESI y APCI simplemente colocando el lateral derecho correspondiente.



**Figura 5.** Esquema de una fuente API para LC-MS.

El principio operacional de la mayoría de interfases API y diseños generales de fuente de iones es el siguiente [48]: el efluente de la columna de LC (o cualquier otro flujo

líquido) es nebulizado en una región de fuente de iones a presión atmosférica. La nebulización se lleva a cabo:

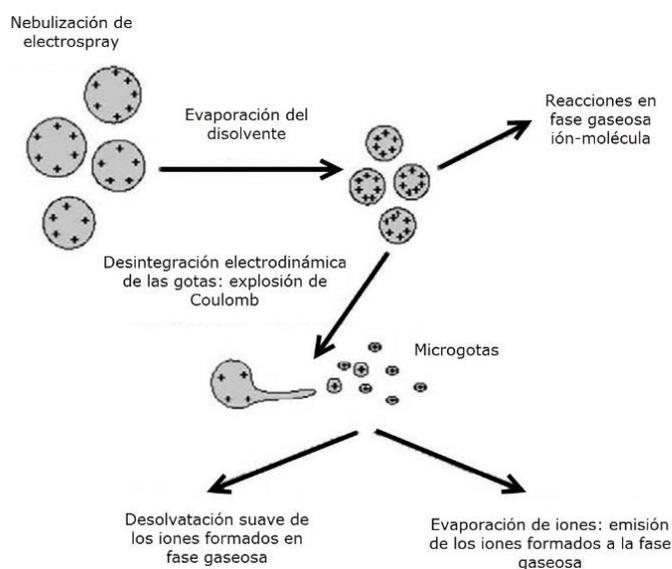
1. Neumáticamente, es decir, en el nebulizador calentado APCI.
2. Por medio de la acción de un campo eléctrico fuerte, es decir, en ESI.
3. Por una combinación de ambos, es decir, en ESI por spray de iones o asistido neumáticamente.
4. Por impacto de fotones, APPI.

Los iones son producidos a partir de las gotas evaporadas, o por reacciones ion-molécula en fase gaseosa, por la desorción, evaporación o desolvatación suave de iones a partir de estas gotas o por impacto de fotones. Los iones generados, junto con el vapor del disolvente y el gas del baño de nitrógeno, son muestreados por una apertura de muestreo de iones en una primera etapa de bombeo. La mezcla del gas, vapor del disolvente e iones se expande supersónicamente en esta región de baja presión. El núcleo de la expansión se muestrea por una boquilla en una segunda etapa de bombeo, conteniendo los iones enfocados y dispositivos de transferencia para transportar de forma óptima los iones al analizador de masas.

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

La fuente más ampliamente usada en LC-MS es ESI, donde la ionización tiene lugar directamente desde la disolución, que pasa a presión atmosférica a través de una aguja coaxial, construida de acero inoxidable o un capilar interno de sílice fundida donde se aplica un elevado potencial (generalmente de 3 a 4 kV). El gas nebulizador se introduce a través de un capilar externo de acero inoxidable. La nebulización del líquido se debe a la acción combinada de la aplicación de un campo eléctrico grande resultante de la diferencia de potencial entre la aguja ESI y un contraelectrodo circundante, y la nebulización neumática. La evaporación del disolvente desde las gotas es asistida por una corriente de gas nitrógeno. Con la evaporación del disolvente, las gotas van disminuyendo progresivamente de volumen hasta alcanzar un punto crítico en el que la repulsión electrostática es mayor que la tensión superficial, por lo que la gota sufre una

desintegración electrohidrodinámica inducida por el campo o explosión de Coulomb. Esto da como resultado la formación de microgotas altamente cargadas. De las microgotas, aparecen iones en la fase gaseosa debido a la emisión o desorción de iones preformados de la superficie de la gota (modelo de evaporación de iones) o debido a la desolvatación suave de iones preformados (modelo de carga-residuo) [49]. Esta secuencia de eventos que lleva a la formación de iones en fase gaseosa en ionización por electrospray se muestra en la Figura 6. Los iones producidos son principalmente los derivados de la incorporación o cesión de uno o varios protones a las moléculas, aunque también pueden formarse iones correspondientes a aductos con otras especies presentes en la fase móvil.



**Figura 6.** Secuencia de eventos conducente a la formación de iones en ESI.

Existen algunas reglas básicas para la elección del modo de ionización y la interfase más adecuados [42, 50].

Una característica de la especificidad de LC-MS es su habilidad para simplificar o incluso eliminar la preparación de la muestra, por lo que la separación cromatográfica adquiere una mayor frecuencia de muestreo. A pesar de esto, la complejidad de la muestra y el número de compuestos que co-eluyen con los analitos generan un problema muy importante en LC-MS, las interferencias de la matriz. Como ya se ha comentado con anterioridad, estas interferencias son causadas por los coextractantes presentes en la muestra inyectada que pueden causar aumento o supresión de la señal de los analitos. El efecto matriz se relaciona con la fuente de ionización y es atribuido a la influencia de los componentes de la matriz en los procesos de ionización en las interfases API,

causando un efecto positivo o negativo en la cantidad de iones formados a partir de los analitos.

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

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

Los efectos matriz en LC-API-MS pueden ser compensados con [47]:

- Dilución de la muestra para diluir los componentes de la matriz.
- El uso de un estándar marcado isotópicamente.
- Cambiando la selectividad de la fase estacionaria empleada para la separación.

- Examinando el modo positivo y negativo de ionización. El modo negativo es menos propenso a sufrir efectos matriz.
- Probar otras fuentes ionizantes.

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

- Barrido de todos los iones (*full scan*). Bajo este modo de adquisición, todas las moléculas ionizadas en la interfase alcanzan al detector. Se realiza el barrido de iones con el cuadrupolo y se obtiene un espectro de barrido total.
- Adquisición de iones seleccionados (*selected ion monitoring*, SIM). La adquisición SIM está dirigida a la medida de determinados iones que son seleccionados en el analizador de masas.

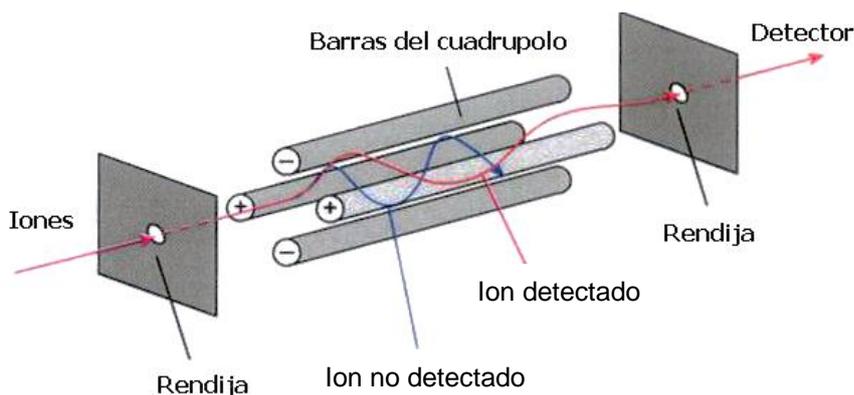
### 4.3. ANALIZADORES DE MASAS EMPLEADOS EN LC-MS

El analizador de masas se considera el corazón del espectrómetro de masas, el principio físico en el que se basa su diseño y forma de dispersar los iones y después focalizarlos en función de la relación masa/carga ( $m/z$ ) es el que establece la diferencia entre los distintos analizadores. El interés en la aplicación de las técnicas LC-MS ha estimulado significativamente el desarrollo y mejora en la tecnología de los analizadores de masas. Sin lugar a dudas, la espectrometría de masas ha adquirido una rápida y creciente importancia, con propósitos de detección, identificación y/o confirmación y cuantificación, especialmente cuando se combina con técnicas cromatográficas en línea. Desde el año 2002, la revista científica *Journal of Chromatography A* ha publicado números especiales titulados "*Mass Spectrometry: Innovation and Application*" dedicados a reviews o trabajos regulares sobre investigaciones en MS [51-58].

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

El cuadrupolo simple (Q) ha sido el analizador más común en los laboratorios hasta hace pocos años, ya que ofrece un buen compromiso entre el rango de masas (de

40 a 4000 amu), reproducibilidad y precisión para la cuantificación, además de una alta sensibilidad a un precio razonable. Consta de cuatro barras metálicas en posiciones paralelas. Cada par de barras opuestas están conectadas eléctricamente y entre los dos pares de barras se aplica un voltaje de radiofrecuencia (RF), sobre el que se superpone un voltaje de corriente continua (DC). Los iones viajan a través del cuadrupolo entre las barras. Sólo los iones con un cierto valor de  $m/z$  alcanzan el detector para una relación dada de voltajes, los otros iones mostrarán trayectorias inestables y colisionarán con las barras. Esto permite la selección de un ion particular, o el barrido variando los voltajes. En el experimento de barrido completo, los componentes de DC y RF se aplican a una relación constante, y los iones que entran de la fuente pueden pasar a través de las barras sucesivamente. Para una combinación específica de DC y RF, sólo puede pasar a su través un rango muy pequeño de  $m/z$ , cuyo tamaño determina la resolución del instrumento. Esto puede traducirse en baja sensibilidad que hace este modo inapropiado para determinar compuestos al nivel de trazas en la muestra. La Figura 7 muestra un esquema de la separación de iones mediante un analizador de tipo cuadrupolo.



**Figura 7.** Esquema de separación de iones mediante analizador tipo cuadrupolo [15].

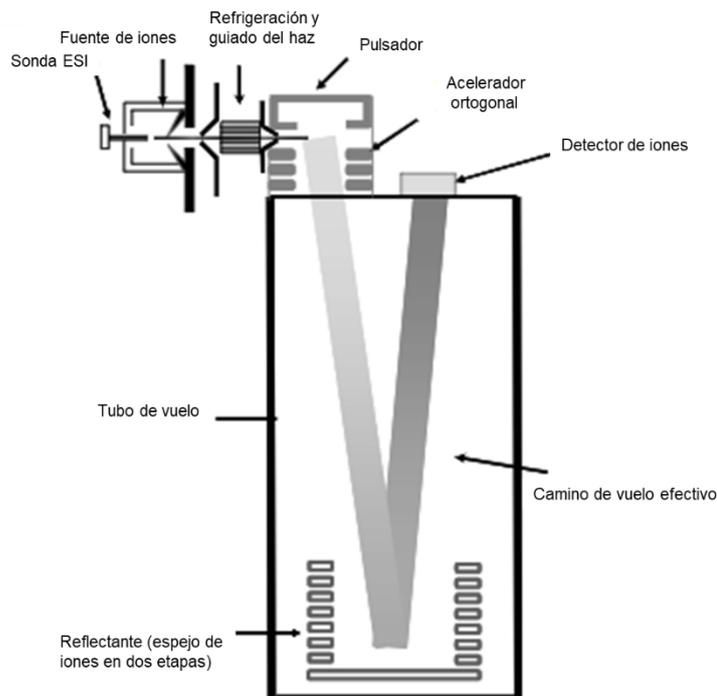
La sensibilidad es mucho mayor cuando se trabaja en el modo SIM, para el que los potenciales DC y RF se mantienen constantes, así sólo pasa a su través una relación  $m/z$  específica. También se puede saltar entre diferentes voltajes para permitir detectar secuencialmente más de una relación específica  $m/z$ . Sin embargo, un inconveniente de este modo es que sólo se puede medir un número limitado de iones para cada compuesto, porque ESI y APCI se han diseñado para llevar a cabo un proceso de ionización débil que conduce a un espectro de masas con sólo unos pocos iones. La fragmentación escasa de las moléculas se traduce en especificidad deficiente porque

frecuentemente se observan interferencias isobáricas (compuestos con la misma relación  $m/z$ ) en los extractos de matrices complejas.

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

Se puede incrementar la selectividad de la detección con analizadores Q, operando con una fuente ESI o APCI, cuando se induce la fragmentación en la región de la fuente de iones aumentando el voltaje. Este proceso es conocido como disociación por colisión inducida (CID). Este procedimiento se refiere a la activación de los iones en la región entre la fuente de iones y el analizador, en la cual se puede iniciar la fragmentación por colisiones con moléculas de gas residual a presiones intermedias. Los iones fragmentados generados se pueden utilizar para una elucidación limitada de estructuras o con propósitos de confirmación. Las aplicaciones típicas de los cuadrupolos simples cuando se debe cumplir el criterio de la Unión Europea 2002/657/EC o cualquier otro relacionado, incluyen barrido y cuantificación. Sin embargo, un cuadrupolo triple (QqQ) o una trampa de iones (IT) debería utilizarse también con propósitos de confirmación [42].

El diseño de diferentes interfases LC-MS para permitir un proceso de ionización suave que conduce a un espectro de masas con solo unos pocos iones hace que, la mayoría de las veces, no sean suficientes para reconocer y cuantificar todos los analitos de interés en la muestra. Progresivamente, por tanto, se han desarrollado otros analizadores de masas para ayudar a resolver problemas analíticos. Entre estos analizadores cabe destacar [42]: IT y el de tiempo de vuelo (TOF) (Figura 8), así como aquellas conformaciones capaces de llevar a cabo MS/MS, tales como el QqQ, la trampa de iones cuadrupolar (QIT) o el híbrido QTOF. El poder de estas nuevas tecnologías proporciona información estructural para la identificación de compuestos desconocidos, aumenta la especificidad de identificación de los analitos a determinar y consigue alta sensibilidad para determinación de trazas.

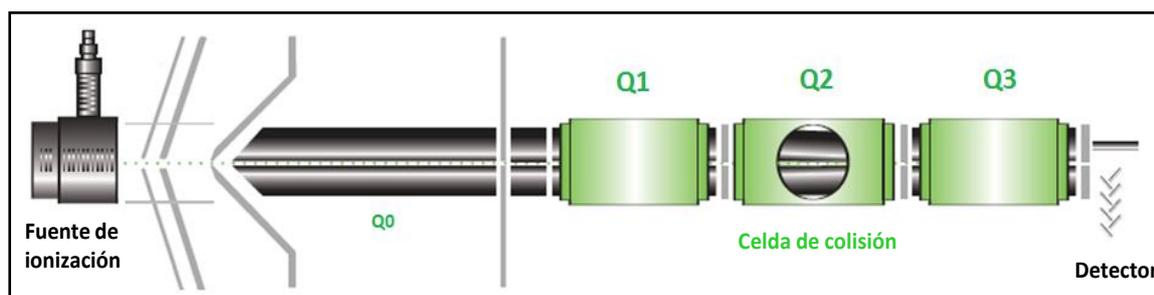


**Figura 8.** Esquema analizador tipo TOF.

Puesto que en esta Tesis Doctoral se ha aplicado el analizador QqQ en varios de los procedimientos desarrollados, a continuación detallaremos sus características más importantes. El analizador QqQ es posiblemente el más usado en MS/MS. En su modo de operación se aplican campos eléctricos para separar los iones de acuerdo con su relación  $m/z$ , a medida que pasan a través del espacio central comprendido entre cuatro barras longitudinales dispuestas en torno a un eje central y equidistantes entre sí. Se aplica sobre dichas barras un voltaje de DC y un voltaje de RF que permiten que sólo las moléculas con una relación  $m/z$  determinada atraviesen el espacio cuadrupolar hasta alcanzar el detector. El sistema global se halla sometido a alto vacío, evitando choques entre los fragmentos iónicos generados o con otras moléculas, que podrían dar lugar a fragmentaciones indeseadas.

La Figura 9 muestra el esquema de un analizador QqQ, donde puede apreciarse el acoplamiento de dos cuadrupolos, entre los que se encuentra la celda de colisión. La fragmentación de los iones transmitidos en el primer cuadrupolo por colisión del ion seleccionado con un gas inerte y la focalización hacia el detector, tanto de los fragmentos ionizados como los no ionizados, constituyen las funciones de la celda de colisión.

De esta forma, se pueden medir los fragmentos generados en la celda de colisión, trabajando en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM). La adquisición en esta modalidad de MS/MS permite alcanzar una gran selectividad, ya que ofrece la posibilidad de aislar un determinado ion en la celda de colisión, eliminando otros iones o fragmentos de iones que puedan interferir. Además, esta elevada selectividad se traduce en una mejora de la sensibilidad, pues la relación señal-ruido (S/N) se ve altamente favorecida. Por todo ello, la información proporcionada por estos sistemas MS/MS aumenta la selectividad y la información generada para la elucidación estructural.



**Figura 9.** Esquema de un analizador de masas QqQ [60].

Aún con todas estas ventajas, la técnica puede presentar algunas limitaciones cuando se aplica en el modo MRM, tales como:

- Se requieren tiempos relativamente largos: es necesario caracterizar cada analito (tanto iones precursores como fragmentos de iones) de forma individual y hay que delimitar ventanas de tiempo para la localización de cada analito, ya que las medidas en modo de barrido continuo no permiten medir un número muy elevado de compuestos de forma simultánea.
- Cuando el número de compuestos en estudio es muy alto, el periodo de tiempo que el instrumento dedica a la medida de cada ion será forzosamente menor, lo que dificulta el análisis, ya que el tiempo dedicado por el detector a la medida de cada analito queda limitado.
- Los periodos de tiempo para la adquisición de cada analito tienen que actualizarse periódicamente, puesto que los tiempos de elución cromatográfica pueden verse modificados incluso dentro de una misma serie de análisis.

- La resolución alcanzada con equipos de cuadrupolo es baja en muchos casos, especialmente cuando la matriz de la muestra es compleja. Además, a mayor nivel de complejidad, se incrementa la probabilidad de encontrar compuestos isóbaros que dificultan la identificación.

La combinación de LC o GC con analizadores QqQ es muy usada en las determinaciones multiresiduo [61, 62], principalmente debido a la alta sensibilidad, permitiendo llevar a cabo la detección y cuantificación de los compuestos de interés con gran exactitud. Por ello, la combinación de QqQ-MS con LC o GC se utiliza también con fines de confirmación.

## 5. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Las técnicas de optimización multivariante son en la actualidad ampliamente aplicadas en la búsqueda de las condiciones experimentales ideales para llevar a cabo determinaciones analíticas, tanto para la evaluación preliminar de los factores como para la determinación de las condiciones críticas de dichos factores. Así, las técnicas de optimización se pueden dividir en dos tipos de diseños: herramientas para evaluación preliminar de los factores y metodologías de superficie de respuesta [63].

El diseño factorial completo de dos niveles es el que comúnmente se emplea para la evaluación preliminar de los factores, mientras que para la determinación de las condiciones críticas, el diseño central compuesto (CCD) es el más aplicado [64].

La optimización de métodos analíticos es cada vez más llevada a cabo a través de técnicas quimiométricas, ya que permiten seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para los factores, considerando la interacción entre éstos, con un mínimo consumo de reactivos y de tiempo.

La teoría y metodología de los diseños experimentales de matriz ortogonal (OAD) como método quimiométrico para la optimización de procedimientos analíticos ha sido descrita en detalle [65-68]. OAD es un método de diseño experimental efectivo, rápido y económico que implica el estudio de múltiples niveles de factores y se basa en la ortogonalidad de partes seleccionadas de los datos experimentales. Las principales ventajas de OAD sobre otros diseños experimentales existentes son las siguientes:

- 1) OAD hace hincapié en un valor característico promedio cercano al valor objetivo más que a un valor entre ciertos límites especificados.

- 2) OAD es sencillo y fácil de aplicar a muchas situaciones experimentales, lo que hace de él una herramienta simple y poderosa.
- 3) Se puede usar para reducir rápidamente el alcance de un proyecto de investigación a partir de datos ya existentes.
- 4) El método OAD permite el análisis de muchos parámetros diferentes sin una cantidad excesivamente elevada de experimentalidad. De esta forma, permite identificar los parámetros clave que pueden tener mayor efecto sobre las características de rendimiento del proceso. Así, se pueden llevar a cabo posteriores experimentos sobre estos parámetros e ignorar los parámetros que tengan un efecto pequeño.

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

El método OAD ha sido aplicado para la optimización de diversos procedimientos de tratamiento de muestra, tales como los basados en LPME aplicados en la presente Tesis Doctoral: DLLME [69] y CPE [70].

Los procedimientos analíticos se pueden optimizar utilizando OAD basados en el método Taguchi [71]. De este modo, todos los factores son considerados conjuntamente en un diseño de matriz ortogonal balanceado de acuerdo con el número de parámetros, llevando a cabo experimentos basados en el OAD, analizando los datos, identificando las condiciones óptimas y realizando experimentos de confirmación con los niveles optimizados para todos los parámetros.

Se considera la influencia de los factores tanto sobre la respuesta media como sobre la S/N, que es calculada como la respuesta más alta:

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

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

Posteriormente, se lleva a cabo un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para establecer cuáles de los parámetros estudiados influyen significativamente en el rendimiento del proceso y sus porcentajes de contribución, calculando la suma de las desviaciones al cuadrado, la media al cuadrado y el valor de las relaciones de varianza,

F. A partir de los valores de F calculados, se puede deducir cuáles son los factores considerados en el diseño experimental que estadísticamente son significativos al nivel de confianza del 95% (en aquellos casos en que el valor de F calculado sea mayor que el valor crítico). La bondad del experimento diseñado viene dada por la contribución del error residual a la variabilidad de la señal. Por tanto, a partir de los porcentajes de contribución se puede deducir cuál es el factor más importante. Se aplican entonces las condiciones optimizadas para el método analítico.

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

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.M. Moein, A. El Beqqali, M. Abdel-Rehim, Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1043 (2017) 3-11.
- [2] S. Bell, *Drugs, poisons and chemistry. Collection: Essentials of forensic science.* Editor: Facts on File, Primera edición, Nueva York, USA, 2009.
- [3] S. Thomas, L. Hao, W.A. Ricke, L. Li, Biomarker discovery in mass spectrometry-based urinary proteomics, *Proteomics Clinical Applications*, 10 (2016) 358-370.
- [4] S. Hamidi, N. Alipour-Ghorbani, A. Hamidi, Solid phase microextraction techniques in determination of biomarkers, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48 (2018) 239-251.
- [5] A. Medvedovici, E. Bacalum, V. David, Sample preparation for large-scale bioanalytical studies based on liquid chromatographic techniques, *Biomedical Chromatography*, 32 (2018).
- [6] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 102 (2018) 123-146.
- [7] T. Saritas, C. Kuppe, M.J. Moeller, Progress and controversies in unraveling the glomerular filtration mechanism, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24 (2015) 208-216.
- [8] V. Pérez-Fernández, L.M. Rocca, P. Tomai, S. Fanali, A. Gentili, Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 983 (2017) 9-41.
- [9] Umwelt Bundesamt, Database: Pharmaceuticals in the environment, <https://www.umweltbundesamt.de/en/database-pharmaceuticals-in-the-environment-0>. Último acceso en marzo de 2020.
- [10] K. Kümmerer, Why green and sustainable pharmacy?. In: K. Kümmerer, M. Hempel (Eds.) *Green and sustainable pharmacy*, Springer, Berlin, Alemania, 2010, pp. 3-10.

- [11] P.A. Jones, J.T. Brosnan, D.A. Kopsell, G.R. Armel, G.K. Breeden, Preemergence herbicides affect hybrid bermudagrass nutrient content, *Journal of Plant Nutrition*, 38 (2014) 177-188.
- [12] B. Song, G. Zeng, J. Gong, J. Liang, P. Xu, Z. Liu, Y. Zhang, C. Zhang, M. Cheng, Y. Liu, S. Ye, H. Yi, X. Ren, Evaluation methods for assessing effectiveness of in situ remediation of soil and sediment contaminated with organic pollutants and heavy metals, *Environment International*, 105 (2017) 43-55.
- [13] X. Domènech, J. Peral, *Química ambiental de sistemas terrestres*, Reverté, Barcelona, España, 2006.
- [14] S. Sun, V. Sidhu, Y. Rong, Y. Zheng, Pesticide pollution in agricultural soils and sustainable remediation methods: a review, *Current Pollution Reports*, 4 (2018) 240-250.
- [15] Y. Picó, *Chemical analysis of food: techniques and applications*, Academic Press, Boston, USA, 2012, pp. 785-798.
- [16] C. Cortés-Herrera, G. Artavia, A. Leiva, F. Granados-Chinchilla, Liquid chromatography analysis of common nutritional components, in feed and food, *Foods*, 8 (2018) 1-62.
- [17] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green chemistry: theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, 1998.
- [18] M. de la Guardia, J. Ruzicka, Towards environmentally conscientious analytical-chemistry through miniaturization, containment and reagent replacement, *Analyst*, 120 (1995) N17-N17.
- [19] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Green analytical chemistry*, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 497-511.
- [20] J.L. Luque García, M.D. Luque de Castro, *Acceleration and automation of solid sample treatment*, Elsevier, 1ª edición, Ámsterdam, Holanda, 2002.
- [21] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, *Journal of Chromatography A*, 1153 (2007) 36-53.
- [22] J. Šandrejová, N. Campillo, P. Viñas, V. Andruch, Classification and terminology in dispersive liquid-liquid microextraction, *Microchemical Journal*, 127 (2016) 184-186.

- [23] N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, P. Viñas, Food and beverage applications of liquid-phase microextraction, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 109 (2018) 116-123.
- [24] B. Hashemi, P. Zohrabi, K.-H. Kim, M. Shamsipur, A. Deep, J. Hong, Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 97 (2017) 83-95.
- [25] H. Prosen, Applications of liquid-phase microextraction in the sample preparation of environmental solid samples, *Molecules*, 19 (2014) 6776-6808.
- [26] S. Seidi, M. Rezazadeh, Y. Yamini, Pharmaceutical applications of liquid-phase microextraction, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 108 (2018) 296-305.
- [27] S. Hamidi, N. Alipour-Ghorbani, Liquid-phase microextraction of biomarkers: A review on current methods, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40 (2017) 853-861.
- [28] Y. Yan, X. Chen, S. Hu, X. Bai, Applications of liquid-phase microextraction techniques in natural product analysis: A review, *Journal of Chromatography A*, 1368 (2014) 1-17.
- [29] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseinia, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.
- [30] M. Saraji, M.K. Boroujeni, Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2027-2066.
- [31] N. Campillo, P. Viñas, J. Šandrejová, V. Andruch, Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques, *Applied Spectroscopy Reviews*, 52 (2017) 267-415.
- [32] P. Viñas, N. Campillo, V. Andruch, Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 68 (2015) 48-77.
- [33] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2067-2099.
- [34] K. Yuan, H. Kang, Z. Yue, L. Yang, L. Lin, X. Wang, T. Luan, Determination of 13 endocrine disrupting chemicals in sediments by gas chromatography-mass

- spectrometry using subcritical water extraction coupled with dispersed liquid-liquid microextraction and derivatization, *Analytica Chimica Acta*, 866 (2015) 41-47.
- [35] M.K.R. Mudiam, R. Jain, R. Singh, Application of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and automated in-port silylation for the simultaneous determination of phenolic endocrine disruptor chemicals in water samples by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Analytical Methods*, 6 (2014) 1802-1810.
- [36] A. Melnyk, L. Wolska, J. Namiesnik, Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds, *Journal of Chromatography A*, 1339 (2014) 1-12.
- [37] J. Miura, H. Ishii, H. Watanabe, Extraction and separation of nickel chelate of 1-(2-thiazolylazo)-2-naphthol in nonionic surfactant solution, *Bunseki Kagaku*, 25 (1976) 808-809.
- [38] D.E. Raynie, Surfactant-mediated extractions, Part 1: Cloud-point extraction, *LC GG Europe*, 29 (2016) 36-38.
- [39] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Cloud point extraction and gas chromatography with direct microvial insert thermal desorption for the determination of haloanisoles in alcoholic beverages, *Talanta*, 160 (2016) 282-288.
- [40] A.R. Fontana, A.B. Camargo, J.C. Altamirano, Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphate pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 6334-6341.
- [41] C.F. Poole, Chapter 2 - Derivatization in liquid chromatography, in: S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, P. Schoenmakers, D. Lloyd (Eds.) *Liquid Chromatography*, Elsevier, Ámsterdam, Holanda, 2013, pp. 25-56.
- [42] C. Blasco, Y. Picó, Chapter 14 - Liquid chromatography-mass spectrometry, in: Y. Picó (Ed.) *Food Toxicants Analysis*, Elsevier, Ámsterdam, Holanda, 2007, pp. 509-559.
- [43] I. Ferrer, E.M. Thurman, Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 750-756.
- [44] R. Rossi, G. Saluti, S. Moretti, I. Diamanti, D. Giusepponi, R. Galarini, Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography

- coupled to mass spectrometry: A review, *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 35 (2018) 241-257.
- [45] A.K. Malik, C. Blasco, Y. Picó, Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4018-4040.
- [46] W.M.A. Niessen, Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 413-436.
- [47] M. Farre, L. Kantiani, M. Petrovic, S. Pérez, D. Barceló, Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques, *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 86-99.
- [48] W.M.A. Niessen, State-of-the-art in liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 179-197.
- [49] B.N. Pramanik, A.K. Ganguly, M.L. Gross, *Applied electrospray mass spectrometry: practical spectroscopy series*, CRC Press, Florida, USA, 2002.
- [50] R.E. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2003.
- [51] W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part I, *Journal of Chromatography A*, 970 (2002) 1.
- [52] W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part II, *Journal of Chromatography A*, 974 (2002) 1.
- [53] W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part III, *Journal of Chromatography A*, 1058 (2004) 1-1.
- [54] W.M.A. Niessen, U.A.T. Brinkman, Mass spectrometry: innovation and application. Part IV, *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005) 1.
- [55] G.W. Somsen, W.M.A. Niessen, Mass spectrometry: innovation and application - Part V. Capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1159 (2007) 1-1.
- [56] M. Holcapek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VI, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3907-3907.

- [57] M. Holcapek, P.J. Schoenmakers, Mass spectrometry: innovation and application. Part VII, *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 1-2.
- [58] M. Holcapek, P.J. Schoenmakers, G. Hopfgartner, Mass spectrometry: innovation and application. Part VIII, *Journal of Chromatography A*, 1439 (2016) 1-2.
- [59] M. Holcapek, R. Jirasko, M. Lisa, Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques, *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 3-15.
- [60] SCIEX. Advantages of using triple quadrupole over single quadrupole mass spectrometry to quantify and identify the presence of pesticides in water and soil samples. <https://sciex.com/x51131>. Último acceso en marzo de 2020.
- [61] A. Stachniuk, E. Fornal, Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food, *Food Analytical Methods*, 9 (2016) 1654-1665.
- [62] T. Rejczak, T. Tuzimski, Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes, *Journal of AOAC International*, 98 (2015) 1143-1162.
- [63] S.L.C. Ferreira, M.M. Silva Jr, C.S.A. Felix, D.L.F. da Silva, A.S. Santos, J.H. Santos Neto, C.T. de Souza, R.A. Cruz Jr, A.S. Souza, Multivariate optimization techniques in food analysis - A review, *Food Chemistry*, 273 (2019) 3-8.
- [64] S.L.C. Ferreira, V.A. Lemos, V.S. de Carvalho, E.G.P. da Silva, A.F.S. Queiroz, C.S.A. Felix, D.L.F. da Silva, G.B. Dourado, R.V. Oliveira, Multivariate optimization techniques in analytical chemistry-an overview, *Microchemical Journal*, 140 (2018) 176-182.
- [65] W.G. Lan, M.K. Wong, N. Chen, Y.M. Sin, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 1. Two-level design and its application in microwave dissolution of biological samples, *Analyst*, 119 (1994) 1659-1667.
- [66] W.G. Lan, M.K. Wong, N. Chen, Y.M. Sin, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 2. Four-level design and its application in microwave dissolution of biological samples, *Analyst*, 119 (1994) 1669-1675.
- [67] W.G. Lan, M.K. Wong, K.K. Chee, Y.M. Sin, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 3. Five-level

- design and its application in a polarographic reaction system for selenium determination, *Analyst*, 120 (1995) 273-279.
- [68] W.G. Lan, K.K. Chee, M.K. Wong, H.K. Lee, Y.M. Sin, Orthogonal array design as a chemometric method for the optimization of analytical procedures. Part 4. Mixed-level design and its application to the high-performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Analyst*, 120 (1995) 281-287.
- [69] L. Mousavi, Z. Tamiji, M.R. Khoshayand, Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid-liquid microextraction method - A review, *Talanta*, 190 (2018) 335-356.
- [70] E. Heidarizadi, R. Tabaraki, Simultaneous spectrophotometric determination of synthetic dyes in food samples after cloud point extraction using multiple response optimizations, *Talanta*, 148 (2016) 237-246.
- [71] R.K. Roy, *A primer on Taguchi method*, Van Nostrand Reinhold, New York, USA, 1990.

# **Capítulo I**

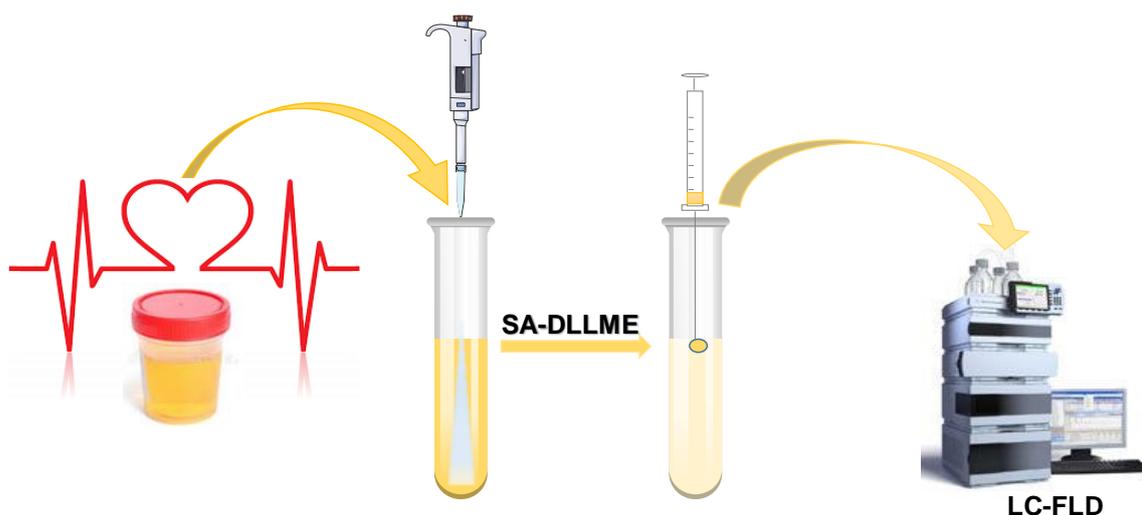
**DETERMINACIÓN DE GLIOXAL Y  
METILGLIOXAL EN ORINA MEDIANTE  
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-  
LÍQUIDO ASISTIDA POR SURFACTANTE Y  
CROMATOGRFÍA LÍQUIDA**



## DETERMINACIÓN DE GLIOXAL Y METILGLIOXAL EN ORINA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO ASISTIDA POR SURFACTANTE Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

### RESUMEN

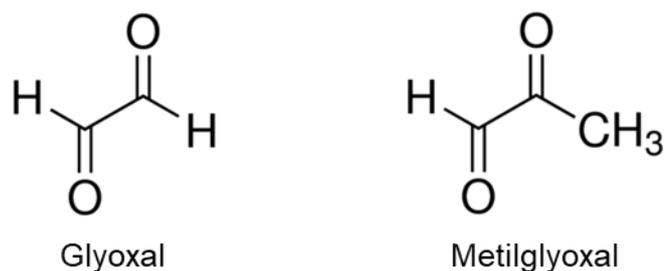
Se propone la determinación de dos importantes marcadores del estrés oxidativo, glioxal (GO) y metilglioxal (MGO), en orina humana mediante cromatografía líquida con detección fluorescente (LC-FLD). Los analitos son previamente transformados en derivados fluorescentes por reacción con 2,3-diaminonaftaleno (0,8 mM) y seguidamente preconcentrados mediante la técnica de microextracción dispersiva líquido-líquido asistida por surfactante (SA-DLLME). La etapa de preconcentración se lleva a cabo por adición de 500  $\mu\text{L}$  de una disolución reguladora ( $\text{pH} = 10,5$ ) y 25  $\mu\text{L}$  de Tritón X-114 (0,03 M) a 2,5 mL de muestra, y dilución hasta 10 mL, antes de proceder a la inyección rápida de una mezcla conteniendo 75  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol (disolvente extractante) y 0,5 mL de etanol (disolvente dispersante). El método puede ser utilizado para la determinación de GO y MGO en orina humana con límites de detección de 13 y 16  $\text{ng L}^{-1}$ , respectivamente. La exactitud del método desarrollado fue estudiada a través de ensayos de recuperación obteniendo valores dentro del intervalo 88-103%.





## I.1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos objeto de estudio en este capítulo pertenecen a la familia química de los  $\alpha$ -oxoaldehídos. Se trata de glioxal (GO), también conocido como oxaldehído o etanodial, y metilglioxal (MGO), que también puede nombrarse como 2-oxopropanal, actilformaldehído o piruvaldehído. En la Figura I.1 se muestra la fórmula química de ambos compuestos orgánicos, donde puede apreciarse que se trata de estructuras muy sencillas tipo RCO-CHO, donde R es un hidrógeno o un grupo metilo según se trate de GO o MGO, respectivamente.



**Figura I.1.** Estructura de los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos estudiados.

Para la síntesis de GO a nivel industrial se proponen dos alternativas: oxidación de etilenglicol en fase gaseosa en presencia de catalizadores de plata o cobre u oxidación de acetaldehído en fase acuosa en presencia de ácido nítrico [1]. En los organismos vivos, la síntesis de MGO tiene lugar por degradación de carbohidratos mediada por la enzima metilglioxal sintetasa. Ambos compuestos se comercializan generalmente en disolución acuosa a una concentración del 40% m/v. Si bien en fase acuosa se encuentran en forma de oligómeros hidratados.

Las aplicaciones comerciales de GO y MGO son muy variadas. El GO se utiliza principalmente como agente de reticulación o endurecimiento en la síntesis de resinas que, posteriormente, serán usadas en la industria textil o del papel, para mejorar la resistencia a la humedad de sus productos. Además, GO también se usa en la síntesis orgánica de imidazoles y en la investigación sobre el ácido ribonucleico ya que interacciona con las guaninas libres. A pesar de los efectos adversos que la acumulación de MGO puede provocar en la salud humana, este compuesto despierta interés en la industria farmacéutica, ya que se le atribuyen propiedades antibacterianas y, a muy bajas concentraciones, se emplea en el tratamiento terapéutico de diversas patologías menores [2]. Aunque el interés industrial de estos dos compuestos es importante, la mayoría de

los estudios realizados sobre ellos van dirigidos a determinar su grado de implicación en procesos químicos, en muchos casos relacionados con enfermedades humanas, lo que explica el interés que suscitan como biomarcadores.

La presencia de niveles altos de azúcar en sangre ha sido relacionada con la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs). Ciertos compuestos del grupo de los  $\alpha$ -oxoaldehídos, como GO y MGO, están implicados en los procesos de glicación no enzimática de proteínas, una reacción endógena que tiene lugar entre el grupo aldehído de un azúcar reductor y una amina primaria proteica, de ácido nucleico o de lípido. Los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos así formados son más reactivos que los azúcares de los que provienen, y sus reacciones con las proteínas dan lugar a los AGEs [3]. GO y MGO, así como otros AGEs, han sido relacionados con complicaciones diabéticas, ineficiencia de los mecanismos de eliminación y otros desórdenes relacionados con la edad, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson [4, 5].

Debido a la implicación de estos compuestos en procesos que pueden provocar daños en la célula como, por ejemplo: estrés oxidativo, activación del sistema inmune, problemas con la activación de enzimas, disfunciones en las mitocondrias, daños en la bicapa lipídica e incluso muerte celular, el organismo cuenta con mecanismos para su eliminación, en los que se hallan involucradas enzimas. Las enzimas glicolasas juegan un papel fundamental en los mecanismos de eliminación de MGO, en los que el glutatión actúa como cofactor para transformar el MGO en el correspondiente hemitioacetal [6].

Los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos más simples son GO y MGO, considerándose glicotoxinas que pueden provocar complicaciones específicas en diabetes mellitus [7]. Debido al aumento a escala mundial de casos de diabetes en la población, especialmente en los países desarrollados [8], resulta de gran importancia disponer de métodos analíticos de alta selectividad y sensibilidad para la monitorización de ambos compuestos.

La evaluación de biomarcadores para el control clínico rutinario de pacientes se realiza normalmente a través de la orina, ya que este tipo de muestra es fácil de obtener y posee una matriz relativamente simple, si la comparamos con otros fluidos biológicos. Además, se ha demostrado que el análisis de orina recogida por la mañana proporciona resultados muy fiables para el control clínico [9].

En la bibliografía aparecen varios métodos para la determinación GO y MGO en orina, incluyendo cromatografía líquida (LC), que es la técnica de separación más utilizada, y cromatografía de gases (GC) [10, 11]. Para la separación mediante LC, se

han empleado diferentes agentes derivatizantes para formar compuestos cromóforos, fluoróforos o derivados adecuados para la determinación mediante espectrometría de masas (MS). Así, estos compuestos pueden ser determinados mediante LC con detección fluorescente (FLD) usando diferentes reactivos derivatizantes, tales como 2,3-diaminonaftaleno (DAN) [12], 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina [13, 14], 6-hidroxi-2,4,5-triaminopirimidina [3, 15] y 4-metoxi-o-fenilendiamina [16]. Además, la derivatización de MGO con 2,4-dinitrofenilhidracina se ha propuesto para el análisis de orina usando LC acoplada a un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) [17]. Por otro lado, ambos compuestos, GO y MGO, se han cuantificado en orina mediante electroforesis capilar (CE) con detección amperométrica usando para la derivatización, ácido 2-tiobarbitúrico [18].

Otras muestras biológicas, tales como plasma, células, tejidos y sangre, también se han analizado mediante LC para la determinación de su contenido en GO y MGO. Para ello, los compuestos son transformados en derivados tipo quinoxalina, por reacción con 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno [19, 20], 1,2-diaminobenceno [7, 21, 22] y DAN [23-26].

La complejidad de las muestras biológicas obliga a incluir varias etapas en el tratamiento de las muestras para obtener extractos limpios y enriquecidos con los analitos. En este contexto, las técnicas extracción líquido-líquido (LLE) [17] y extracción en fase sólida (SPE) [3] se han usado para la determinación de GO y MGO en orina, aunque estas técnicas clásicas no cumplen los principios de la Química Analítica Verde (QAV). Algunos autores, han aplicado LLE usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos [11, 16], pero los procedimientos propuestos no se consideran incluidos en el ámbito de las técnicas de microextracción. Las técnicas miniaturizadas de extracción/preconcentración han conseguido que las etapas de preparación de la muestra sean consideradas dentro de la ideología de la QAV, ya que pueden alcanzar extracciones muy eficientes utilizando cantidades mínimas de disolventes orgánicos. En este sentido, la extracción por adsorción sobre barras agitadoras (SBSE) ha proporcionado resultados muy satisfactorios en la cuantificación de GO y MGO en orina [12].

En la mayoría de los casos, los tiempos requeridos para el tratamiento de la muestra son menores cuando se utilizan técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) en lugar de SBSE, así como en otras técnicas miniaturizadas donde los analitos son extraídos hacia una fase sólida. Además, las técnicas de LPME implican un bajo coste y han demostrado sobradamente su robustez. Entre los diferentes tipos de técnicas

de LLME, destaca la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) como técnica miniaturizada muy simple y consistente en la generación de microgotas de la fase aceptora dentro de la fase acuosa usando un disolvente dispersante para aumentar la superficie de contacto. La dispersión de la fase aceptora tiene como consecuencia la extracción casi instantánea de los compuestos de interés [27, 28].

En este estudio se propone por primera vez un procedimiento analítico para la determinación de GO y MGO en orina humana empleando DLLME. Así, se presenta la optimización, validación y aplicación de un nuevo método analítico basado en DLLME y LC-FLD, siendo detectados los analitos como sus derivados fluorescentes de quinoxalina obtenidos mediante reacción con DAN.

## I.2. PARTE EXPERIMENTAL

### I.2.1. REACTIVOS

Se utilizaron disoluciones individuales de GO (oxaldehído, fórmula molecular:  $C_2H_2O_2$ ) y MGO (acetilformaldehído, fórmula molecular:  $C_3H_4O_2$ ) en agua al 40% m/v (6,89 y 5,55 M para GO y MGO, respectivamente), 2,3-diaminonaftaleno (DAN, 99% pureza), 3,4-hexanodiona (95%, empleada como estándar interno, IS), creatinina anhidra (98%) y ácido pícrico (98%) de Sigma (St. Louis, MO, USA). Las disoluciones estándar de GO y MGO de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  se prepararon en agua y se guardaron en viales ámbar a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las disoluciones estándar de trabajo fueron preparadas diariamente en agua y guardadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . El agente derivatizante se preparó en dimetilsulfóxido (DMSO) a una de concentración de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  (158 mM).

Acetonitrilo, etanol, metanol, acetona, 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, tolueno, xileno, 2-octanona, 2-undecanona y DMSO, todos de calidad cromatográfica, se obtuvieron también de Sigma. El agua usada se purificó previamente mediante un sistema Milli-Q (Millipore, MA, USA). Otros reactivos utilizados fueron cloruro de sodio, hidróxido de sodio, Tritón X-114, dodecilsulfato de sodio (SDS), ácido fosfórico (85%), hidrogenocarbonato de sodio, fosfato de sodio y carbonato de sodio, todos obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania).

La disolución reguladora de pH 10,5 utilizada en el procedimiento de preconcentración mediante DLLME se preparó mezclando 64 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 M y 36 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M. La disolución reguladora usada en el análisis de creatinina se preparó ajustando el pH de una disolución de fosfato de sodio 300 mM con hidróxido de

sodio hasta pH 12,7. Se preparó orina sintética [29] como una disolución acuosa conteniendo  $3,1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $5,1 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ ,  $0,418 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$ ,  $0,312 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ,  $60 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido úrico,  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de urea,  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  de creatina,  $1,2 \text{ mg L}^{-1}$  de fenilalanina,  $0,067 \%$  v/v de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y  $0,087\%$  v/v de  $\text{HCl}$  concentrado.

## I.2.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema cromatográfico de alta resolución (HPLC) consiste en una bomba cuaternaria Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) (G1311A) operando con un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Los disolventes fueron desgasificados en línea usando un sistema de membrana (G1379A). El detector de fluorescencia (G1321A) operó con una longitud de onda de excitación de 267 nm y una longitud de onda de emisión de 503 nm. Los valores de límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron calculados utilizando el parámetro relación señal-ruido, siendo medido el ruido en zonas del cromatograma próximas a los tiempos de retención de los analitos a través del programa informático Agilent ChemStation para sistemas LC 3D (Rev. B.04.03 16) y considerando el nivel de concentración de los analitos que daba lugar a una señal igual a tres y diez veces la señal del ruido para LOD y LOQ, respectivamente. La columna analítica usada para la técnica en fase reversa (RP) fue una Tracer Extrasil ODS2 ( $15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}$  y  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de partícula) de Teknokroma (Barcelona, España). Se empleó como fase móvil una mezcla 60:40 metanol:agua, operando bajo condiciones isocráticas. Alícuotas de  $20 \mu\text{L}$  se inyectaron manualmente mediante una válvula de inyección modelo 7125-075 Rheodyne (Rheodyne, CA, USA). Las disoluciones se guardaron en viales ámbar de 2 ó 10 mL de capacidad.

La homogeneización de las muestras se llevó a cabo usando un procesador de ultrasonidos UP 200 H (Dr Hielscher, Teltow, Alemania), con una salida efectiva de 200 W en medio líquido, equipado con un sonotrodo de titanio de 7 mm de diámetro. La potencia de la sonda de ultrasonidos se ajustó al 60% ( $105 \mu\text{m}$  de amplitud,  $180 \text{ W cm}^{-2}$  de densidad de potencia), aplicando 20 ciclos de 0,25 segundos cada uno, mientras que la inmersión del sonotrodo en la disolución fue aproximadamente de 7 cm. En el tratamiento de la muestra se utilizó también una centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania). Las muestras homogeneizadas se filtraron a través de filtros de Nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  (Teknokroma).

Para la cuantificación de creatinina en las muestras se utilizó un espectrofotómetro ultravioleta-visible ATI Unicam UV2, equipado con el programa informático VISION V3.00

para la adquisición de los datos espectrofotométricos. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico.

### I.2.3. PREPARACIÓN DE LOS DERIVADOS $\alpha$ -DICARBONÍLICOS

La derivatización de los analitos se llevó a cabo usando DAN como reactivo, cuya disolución fue preparada en DMSO a una concentración de 25 mg mL<sup>-1</sup>. Así, se adicionaron 50  $\mu$ L de agente derivatizante a 10 mL de una disolución estándar conteniendo GO y MGO a una concentración de 1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> cada uno, y la mezcla se mantuvo toda la noche a 4 °C. El IS, 3,4-hexanodiona, se derivatizó separadamente de la misma manera, por adición de 50  $\mu$ L de DAN a 10 mL de una disolución del compuesto a una concentración 0,1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

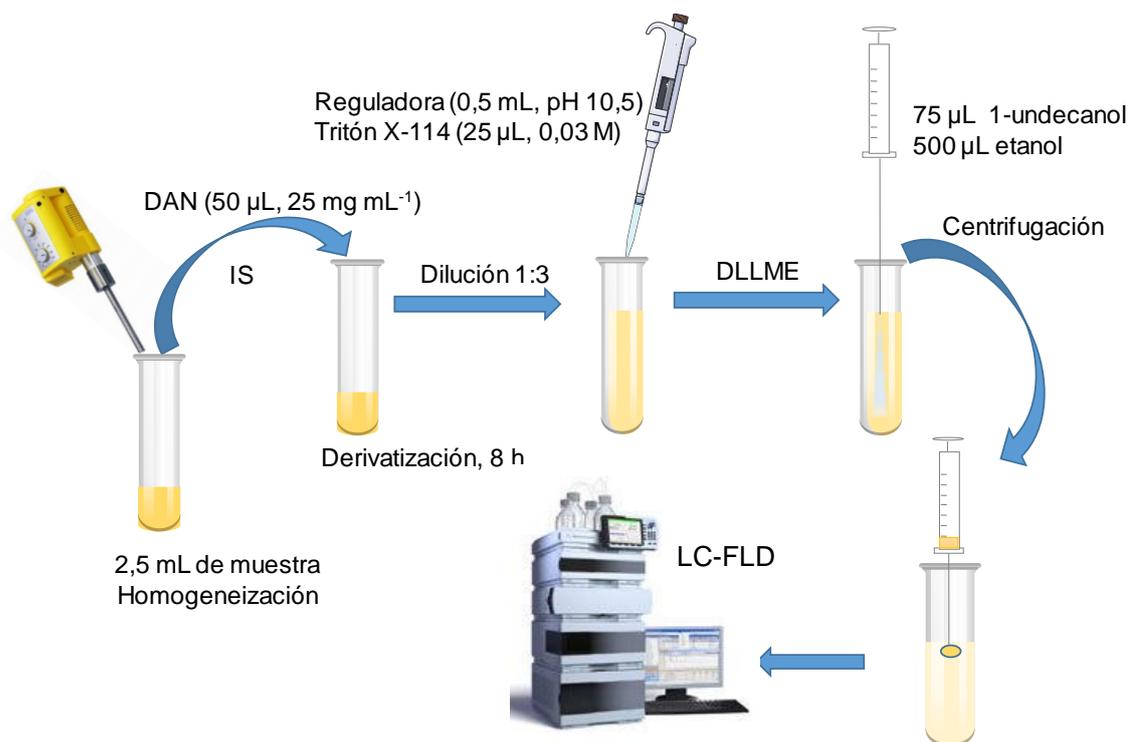
### I.2.4. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Las muestras de orina obtenidas de 12 voluntarios se recogieron en vasos estériles de plástico, almacenándose a 4 °C hasta el momento de su análisis, que se llevó a cabo dentro de las 24 h siguientes a su llegada al laboratorio. Tres de las muestras se obtuvieron de niños y el resto de adultos con edades comprendidas entre 22 y 47 años. Cuatro de las muestras correspondían a mujeres (M) y ocho a hombres (H). Solamente una de las muestras era de un individuo diabético (muestra 4).

Antes de su análisis, las muestras se homogeneizaron mediante inmersión directa de la sonda de ultrasonidos durante 1 minuto, trabajando a 60% de amplitud y 0,5 ciclos por segundo. Seguidamente, se adicionaron 50  $\mu$ L de DAN de 25 mg mL<sup>-1</sup> y 100  $\mu$ L de una disolución de IS (0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) a 2,5 mL de muestra de orina homogeneizada, y la mezcla se guardó a 4 °C, en ausencia de luz, dejando transcurrir la reacción durante la noche.

Tras la derivatización, a la disolución de muestra sometida a derivatización, se adicionaron 0,5 mL de una disolución reguladora 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 10,5) y 25  $\mu$ L de Tritón X-114 0,03 M, siendo diluida la mezcla finalmente hasta 10 mL con agua y colocada en un tubo de centrifuga de cristal. La preconcentración mediante DLLME se llevó a cabo por inyección rápida de una mezcla conteniendo 500  $\mu$ L de etanol (dispersante) y 75  $\mu$ L de 1-undecanol (extractante), utilizando una microjeringa. Se obtuvo una disolución turbia, consistiendo en finísimas gotas de 1-undecanol dispersado

a través de la fase acuosa, en las que fueron extraídos los analitos derivatizados. Después de centrifugar durante 3 min a 3000 rpm, se recuperó la fase sobrenadante ( $80 \pm 10 \mu\text{L}$ ), inyectándose  $20 \mu\text{L}$  en el sistema LC. El tiempo total del análisis fue de 8 h para la etapa de derivatización, no más de 5 min para la preconcentración y 15 min para la separación cromatográfica. En la Figura I.2 se muestra un esquema del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de GO y MGO en muestras de orina.



**Figura I.2.** Procedimiento DLLME para la determinación de GO y MGO.

### I.2.5. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Los estudios de recuperación se realizaron adicionando diferentes volúmenes de una disolución estándar de los analitos a 2,5 mL de muestra, proporcionando niveles de fortificación de 5 y 10 ng mL<sup>-1</sup>. Las muestras fortificadas fueron homogeneizadas por agitación manual durante 1 min y mantenidas en reposo durante 1 h a temperatura ambiente antes de proceder a las etapas de derivatización y DLLME anteriormente descritas. El proceso de fortificación se llevó a cabo sobre tres muestras diferentes de orina, analizándose de forma separada tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración.

## I.2.6. ANÁLISIS DE CREATININA EN MUESTRAS DE ORINA

La creatinina se genera a partir de la degradación de la creatina, siendo un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el organismo y que filtran los riñones excretándola a la orina. La concentración de creatinina en orina puede ser utilizada en los análisis de este fluido como un factor de corrección, ya que la creatinina se produce y se elimina de manera relativamente constante, la cantidad de creatinina en orina puede ser comparada con la cantidad de otras sustancias que se estén midiendo.

Para la determinación de creatinina en orina se colocaron 2 mL del reactivo picrato en una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Dicho reactivo está compuesto a partes iguales por una disolución de ácido pícrico 25 mM y una disolución reguladora de fosfato 300 mM (pH = 12,7) conteniendo 2 g L<sup>-1</sup> de SDS (6,9 mM). La curva de calibración se obtuvo por adición de 200 µL de una disolución acuosa estándar de creatinina de concentraciones en el intervalo de 10 a 150 µg mL<sup>-1</sup>, y monitorización durante 2 min de la absorbancia a 510 nm del complejo de picrato formado. Se usó la velocidad de reacción como señal analítica. El análisis de las muestras de orina se llevó a cabo midiendo la velocidad de reacción de una mezcla de 200 µL de muestra con 2 mL de la mezcla de reactivo picrato [3].

Para comprobar la exactitud del método de determinación de creatinina se dispuso del material de referencia certificado "Contaminantes orgánicos en orina de fumadores" (Standard Reference Material, SRM 3672), suministrado por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, MD, USA), con un contenido certificado de creatinina de 734±5 mg kg<sup>-1</sup>.

## I.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

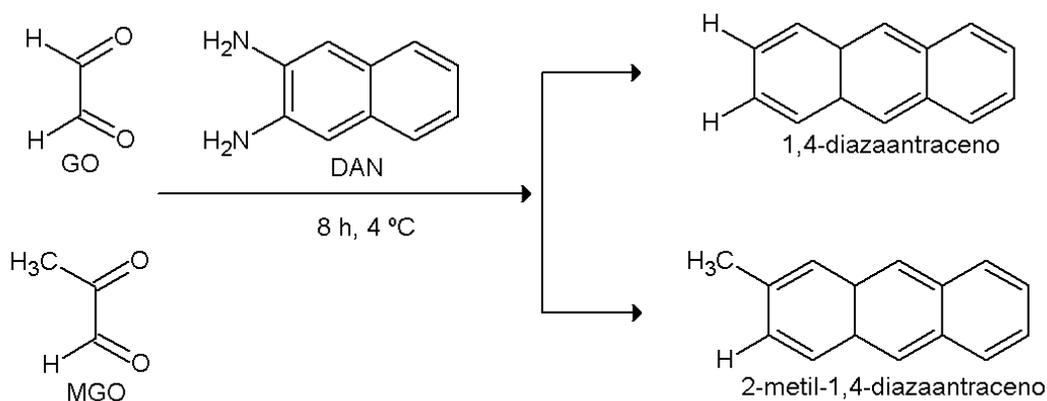
### I.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL SISTEMA LC-FLD

La separación cromatográfica se optimizó mediante RP-LC con una fase estacionaria de octadecilsilano (ODS). Se ensayaron diferentes fases móviles correspondiendo a mezclas de metanol y agua en diferentes porcentajes y bajo elución isocrática. La mejor separación se logró con una proporción 60% de metanol y 40% de agua, propulsada con una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

Bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas, los derivados de GO, MGO y 3,4-hexadiona eluyeron con tiempos de retención de 6,74, 9,07 y 13,32 min, respectivamente.

### I.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE DERIVATIZACIÓN

Debido a que los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos no absorben radiación UV-Vis, no pueden ser determinados espectrofotométricamente de forma directa, sino que se requiere de una etapa previa de derivatización. Como se muestra en la Figura I.3, el agente derivatizante DAN reacciona con los dos grupos carbonilo de GO y MGO, formando los aductos 1,4-diazaantraceno o benzo[g]quinoxalina y 2-metil-1,4-diazaantraceno o 2-metil-benzo[g]quinoxalina, respectivamente.



**Figura I.3.** Derivatización entre DAN y las especies  $\alpha$ -dicarbonílicas GO y MGO.

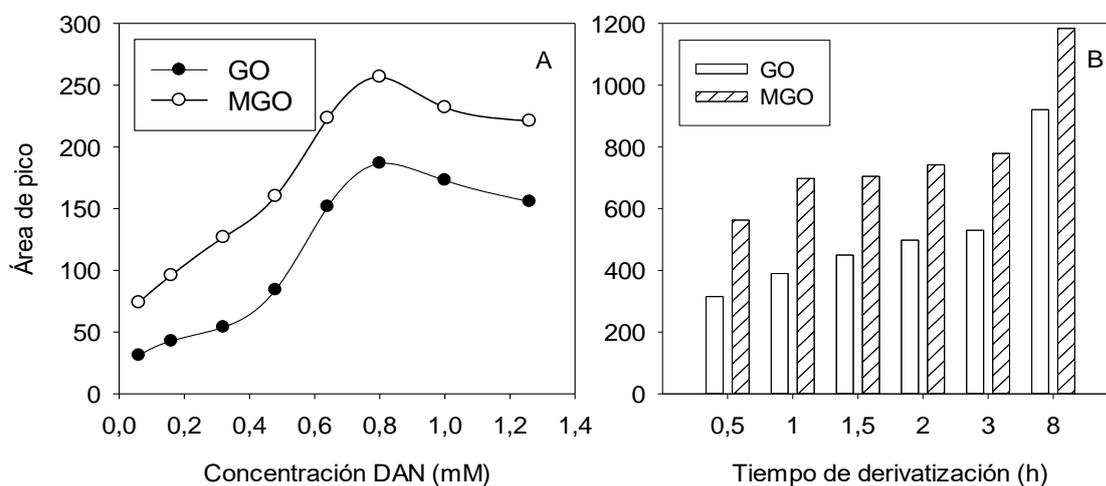
Los compuestos resultantes de la derivatización no solo presentan propiedades fluorescentes, sino que, además, son menos polares que los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos, por lo que su microextracción en disolventes orgánicos resulta favorecida. Los compuestos  $\alpha$ -oxoaldehídos están envueltos en una reacción de glicación no enzimática de las proteínas, que comienza con la formación reversible de una base de Schiff y después con la formación de una cetoamina estable, la cual, a través de reacciones de oxidación y deshidratación, es degradada a compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos, tales como GO y MGO [3].

La reacción de derivatización con DAN ha sido usada en diferentes procedimientos propuestos para análisis de fluidos biológicos, ajustando el pH de la reacción a 7,4 con una disolución reguladora de fosfato [22, 23], y a valores de pH

inferiores por adición de ácido perclórico [12]. Los resultados obtenidos se compararon cuando la derivatización con DAN se llevó a cabo en presencia de ácido perclórico 0,25 M y de una disolución reguladora de fosfato, dejando transcurrir la reacción durante 90 min a 25 °C. Dado que no se observaron diferencias significativas en cuanto a sensibilidad, se optó por no ajustar el pH en la etapa de formación de los derivados fluorescentes.

La influencia de la concentración de DAN en la etapa de derivatización se estudió entre 0,06 y 1,26 mM, tras someter la mezcla a una extracción con acetato de etilo, para eliminar el exceso de derivatizante y así preservar la fase estacionaria. La señal aumentó para ambos compuestos hasta una concentración de DAN 0,8 mM, disminuyendo ligeramente para concentraciones más elevadas (Figura I.4A). Por consiguiente, se seleccionó esta concentración, que es similar a la recomendada por otros autores [25, 26].

Cuando la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante diferentes tiempos comprendidos entre 0,5 y 3 h, o durante toda la noche a 4 °C, la mayor sensibilidad se observó para ambos derivados fluorescentes dejando la reacción proceder durante toda la noche a 4 °C (Figura I.4B). Por tanto, la reacción de derivatización se llevó a cabo manteniendo la muestra durante la noche en la oscuridad en presencia de DAN al nivel de concentración 0,8 mM.



**Figura I.4.** Variación de la señal analítica de GO y MGO con la concentración de DAN (A) y el tiempo de derivatización (B).

### I.3.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DLLME

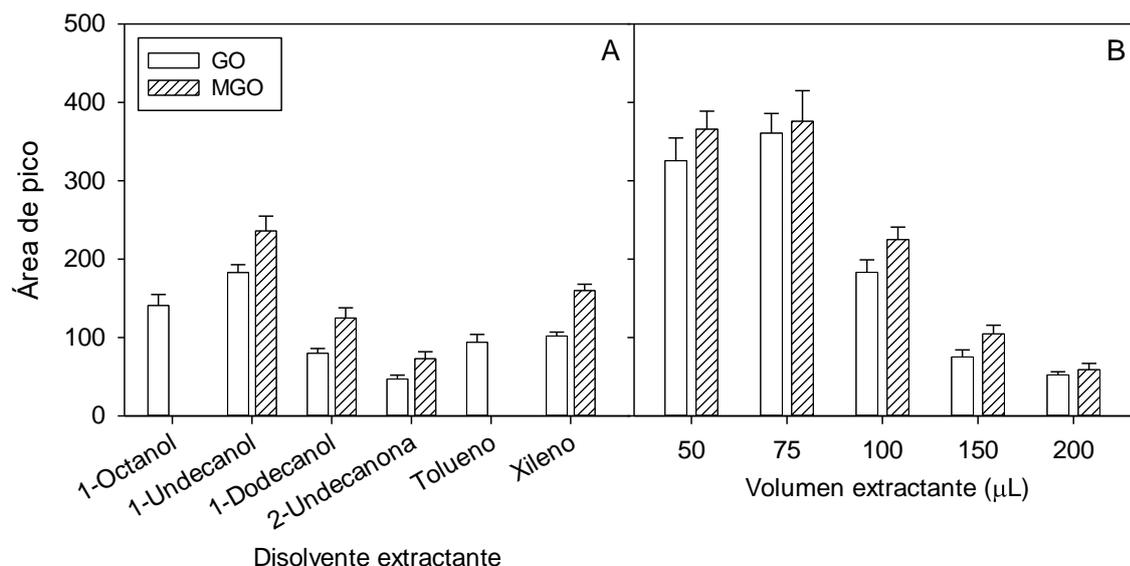
La etapa de DLLME se incluyó en el método analítico propuesto con objeto de no solo mejorar la sensibilidad, al ser los analitos preconcentrados, sino también purificar el extracto orgánico enriquecido, eliminando el exceso de DAN, así como otros componentes de la matriz de las muestras de orina.

Los parámetros de la etapa de DLLME se optimizaron utilizando orina sintética fortificada con los analitos al nivel de concentración de 100 ng mL<sup>-1</sup> y 50 ng mL<sup>-1</sup> para GO y MGO, respectivamente. La orina sintética incubada para la formación de los derivados fluorescentes se diluyó con agua en proporción 1:1, y se utilizó un volumen de 10 mL como fase dadora en el procedimiento de preconcentración mediante DLLME. Los experimentos preliminares se llevaron a cabo por duplicado usando 100 µL de fase extractante y 1 mL de metanol como dispersante.

La aplicación de un diseño multivariable para la selección de los disolventes extractante y dispersante, así como sus volúmenes, no proporcionó datos concluyentes ya que en algunos de los ensayos no se obtenía gota enriquecida discernible. Por ello, se optó por llevar a cabo la optimización usando un diseño univariante.

Ya que la mayoría de los disolventes extractantes, de menor densidad que el agua, resultan compatibles con las fases móviles que normalmente se emplean en RP-LC, se estudió la eficiencia de los mismos en un intento de evitar la etapa de evaporación del extracto enriquecido y su posterior reconstitución con un disolvente compatible.

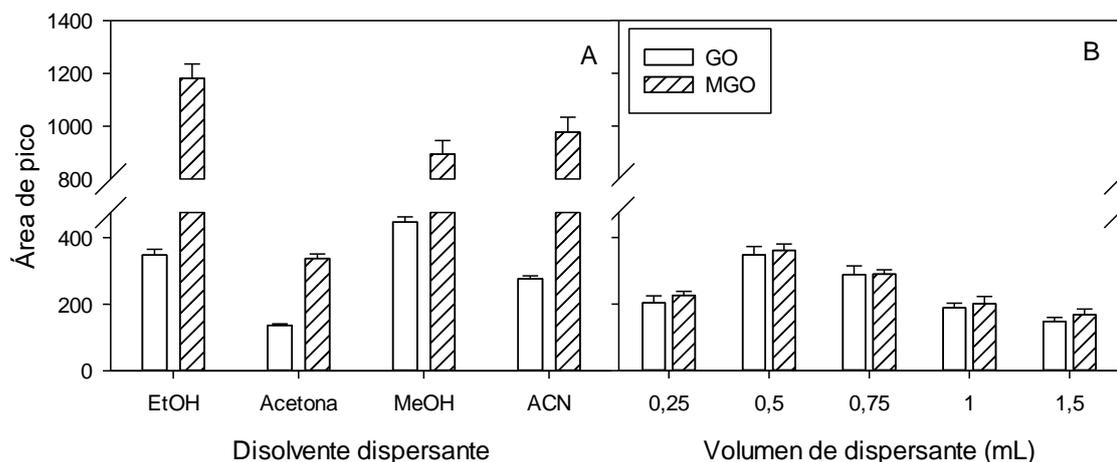
Por esta razón, se ensayó con 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-octanona, 2-undecanona, tolueno y xileno como disolventes extractantes. Las diferencias detectadas en el comportamiento de GO y MGO en cuanto a su extracción se atribuyeron a sus diferentes estructuras químicas como, por ejemplo, que solo GO fuese extraído con 1-octanol. Cuando se utilizó tolueno como extractante, una gran banda cromatográfica aparecía al tiempo de retención del producto de derivatización de MGO, impidiendo su detección; por ello, 1-octanol y tolueno se descartaron. Por otro lado, 2-octanona no extrajo ninguno de los analitos. De los disolventes restantes, 1-undecanol proporcionó la mayor eficiencia en la extracción para los dos analitos, tal como se muestra en la Figura I.5A, probablemente debido a las fuertes interacciones entre el disolvente y los compuestos.



**Figura I.5.** Influencia de la naturaleza del disolvente extractante (A) y su volumen (B) en la etapa de microextracción.

El efecto del volumen de 1-undecanol se estudió entre 50 y 200  $\mu\text{L}$ . Como puede observarse en la Figura I.5B, las señales de los analitos aumentaron hasta 75  $\mu\text{L}$  al aumentar la eficiencia en la extracción, disminuyendo para volúmenes mayores de extractante, probablemente debido a efectos de dilución. Por tanto, se seleccionó el volumen de 75  $\mu\text{L}$  para la fase extractante.

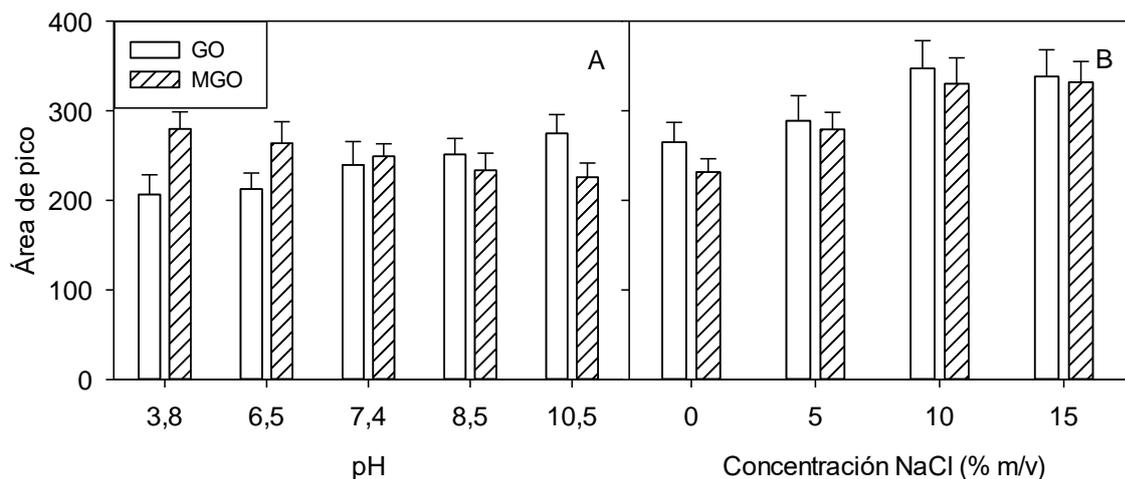
El disolvente dispersante debe ser miscible tanto en la fase extractante como en la acuosa. En nuestro caso, el disolvente óptimo se eligió mediante inyección rápida de una mezcla que contenía 1 mL de cada disolvente ensayado (metanol, etanol, acetona y acetonitrilo) y 75  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol en 10 mL de orina diluida conteniendo los analitos. Metanol proporcionó una señal para GO ligeramente superior a la alcanzada con etanol. Dado que la mejora en la sensibilidad de MGO sí fue apreciable con el uso de etanol, respecto de metanol (Figura I.6A) y, teniendo en cuenta la menor toxicidad de etanol, éste fue finalmente seleccionado como dispersante. Cuando se varió su volumen entre 0,25 y 1,5 mL, la máxima sensibilidad para ambos analitos se encontró usando 0,5 mL de dispersante (Figura I.6B) y, por tanto, este fue adoptado.



**Figura I.6.** Efecto de la naturaleza del disolvente dispersante (A) y su volumen (B) en la eficiencia de microextracción.

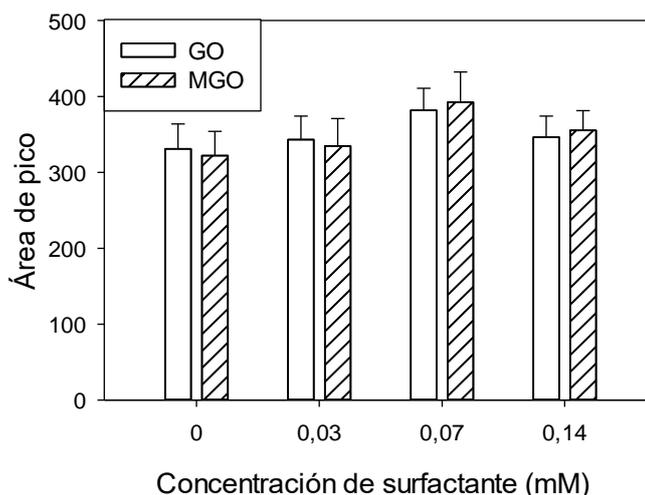
El efecto del pH de la fase dadora se estudió entre 3,8 y 10,5, usando disoluciones reguladoras de acetato/ácido acético, cloruro de amonio/amoniaco e hidrogenocarbonato de sodio/carbonato de sodio. Como muestra la Figura I.7A, la señal de GO aumentó ligeramente al aumentar el pH dentro del rango estudiado, mientras que para MGO se observó el efecto opuesto. La dependencia del pH fue ligeramente diferente para GO y MGO, probablemente debido a su diferente estructura química. Finalmente, el valor de pH seleccionado fue de 10,5 para mejorar la sensibilidad de GO, ya que mostraba menor sensibilidad que MGO.

Se adicionó cloruro de sodio a la orina diluida para incrementar la fuerza iónica de la fase acuosa, en un intento de reducir la solubilidad de los analitos derivatizados y favorecer su transferencia hacia la fase extractante. El efecto de la concentración de cloruro de sodio en la eficacia de extracción se estudió entre 0 y 15% m/v (Figura I.7B). La señal analítica aumentó para ambos analitos hasta una concentración del 10% m/v de sal y después se mantuvo prácticamente constante, por lo que esta concentración de NaCl fue seleccionada.



**Figura I.7.** Influencia del pH (A) y de la concentración de NaCl (B) en la fase acuosa en la etapa de microextracción.

Los surfactantes reducen la tensión interfacial entre la fase orgánica y la acuosa, adsorbiéndose en la interfase líquido-líquido y sirviendo como emulsionantes para mejorar la velocidad de transferencia de masa desde la muestra acuosa al disolvente extractante. En algunos casos se ha demostrado que la presencia de surfactantes en el medio de extracción incrementa la eficiencia de extracción, debido a su estructura, ya que contienen grupos hidrofóbicos e hidrofílicos que les hacen solubles en disolventes orgánicos y en fases acuosas. Consecuentemente, estas especies son fácilmente adsorbidas a través de la interfase entre la fase dadora y aceptora, proporcionando una fina dispersión y estabilizando el medio [28]. Cuando se ensayó la adición de Tritón X-114 a concentraciones comprendidas entre 0 y 0,14 mM, se observó un ligero aumento de la eficiencia de la extracción hasta una concentración 0,07 mM (Figura I.8). A concentraciones de surfactante mayores, la eficiencia disminuyó, formándose además una cantidad excesiva de espuma durante la etapa de agitación. Por ello, se seleccionó la adición de Tritón X-114, al nivel de concentración 0,07 mM.



**Figura I.8.** Influencia de la concentración de Tritón X-114.

Los tiempos de extracción y agitación no fueron considerados como variables porque es bien sabido que, en DLLME, el equilibrio de distribución se alcanza rápidamente. La agitación manual de la mezcla ternaria de disolventes durante unos pocos segundos (aproximadamente 30 s) fue suficiente.

Teniendo en cuenta la complejidad de la matriz de las muestras reales de orina, se estudió la proporción muestra/agua en la fase acuosa usando orina real. Cuando en el procedimiento DLLME optimizado se utilizaron volúmenes superiores a 5 mL de orina, los cuales se diluyeron hasta 10 mL con agua, se observó la aparición de un sólido blanco en la interfase entre las fases orgánica y acuosa, tras la etapa de centrifugación, dificultando la recogida de la fase de 1-undecanol para su análisis. Por ello, se tomaron volúmenes de 2,5 mL de muestra de orina diluidos hasta 10 mL con agua, para proceder a la etapa DLLME. Para la centrifugación de la dispersión, necesaria para la separación de la fase enriquecida, se seleccionó un tiempo de 3 min a la velocidad de 3000 rpm.

Con el fin de facilitar la recogida de la gota orgánica flotante enriquecida con los analitos, se ensayó la posibilidad de solidificar la gota de disolvente extractante, manteniendo la mezcla ternaria en un baño de hielo, y recogiendo la fase de 1-undecanol con ayuda de una espátula antes de transferirla a un vial cónico. Una vez fundida la fase solidificada, se observó cierto grado de turbidez en la gota orgánica, probablemente debido a los componentes de la matriz también extraídos en 1-undecanol. Consecuentemente, se descartó la solidificación de la gota.

Cuando el procedimiento de DLLME se aplicó a diferentes muestras de orina, la complejidad de algunas de ellas daba lugar a la aparición de turbidez en la mezcla

ternaria de disolventes. Como se ha indicado anteriormente, se ensayaron diferentes proporciones de agua:orina, y se seleccionó finalmente la proporción 3:1, que correspondía a 2,5 mL de muestra diluida hasta 10 mL con agua. No se ensayaron volúmenes superiores de fase acuosa en la DLLME, considerando la capacidad de los tubos de vidrio utilizados.

### I.3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

La linealidad del método se estudió usando estándares acuosos en el intervalo de concentraciones de 0,1 a 25 ng mL<sup>-1</sup>, siendo dichas disoluciones acuosas sometidas a derivatización y a la etapa de preconcentración DLLME, como se ha descrito anteriormente. Las curvas de calibración para cada analito fueron construidas representando las áreas de los picos cromatográficos frente a la concentración, a seis niveles de concentración y analizados por duplicado. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla I.1, junto con los valores de R<sup>2</sup>, que demostraron buena linealidad para el intervalo estudiado de concentraciones.

**Tabla I.1**

Características analíticas del método DLLME-LC-FLD.

Parámetro	GO	MGO
Pendiente (mL ng <sup>-1</sup> )	177 ± 2,0 (1,57 ± 0,08)	205 ± 4,6 (2,58 ± 0,04)
R <sup>2</sup>	0,9995	0,9989
Intervalo de linealidad (ng mL <sup>-1</sup> )	0,1-25	0,1-25
LOD <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	13	16
LOQ <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	43	53
RSD <sup>c</sup> (%)	5,0 (2,9)	6,4 (3,0)
RSD <sup>d</sup> (%)	9,8 (6,9)	10 (8,9)
Factor de enriquecimiento	102	108

<sup>a</sup> Calculado para S/N=3. <sup>b</sup> Calculado para S/N=10. <sup>c</sup> n=10, análisis consecutivos.

<sup>d</sup> n=6, análisis en días diferentes. Los valores entre paréntesis son los correspondientes considerando el estándar interno.

Los valores de LOD y LOQ se calcularon como la concentración que proporciona una señal 3 y 10 veces superior a la del ruido, respectivamente. Así, los valores de LOD y de LOQ fueron 13 y 43 ng L<sup>-1</sup> para GO, y 16 y 53 ng L<sup>-1</sup> para MGO, respectivamente. Considerando los volúmenes de muestra sometidos al procedimiento propuesto, LODs de 52 y 64 ng L<sup>-1</sup> para GO y MGO, respectivamente, se encontraron en el análisis de las muestras. Estos resultados reflejaron un mayor grado de sensibilidad que los logrados en estudios anteriores [3, 13, 16, 17].

La precisión del método desarrollado se estudió mediante ensayos de repetitividad y reproducibilidad, calculando los valores de desviación estándar relativa (RSD) de una serie de diez análisis consecutivos y seis análisis realizados en días diferentes, respectivamente. Para ello, se utilizaron muestras de orina fortificadas con los analitos a una concentración de 5 ng mL<sup>-1</sup>. Los valores de RSD obtenidos en el mismo día y en días diferentes fueron 5,0 y 9,8% para GO y 6,4 y 10% para MGO, respectivamente. Los factores de enriquecimiento (EFs), calculados comparando la pendiente de las curvas de calibración del método desarrollado DLLME y las obtenidas por aplicación del método LC-FLD sin etapa de preconcentración, fueron 102 y 108 para GO y MGO, respectivamente.

### **I.3.5. EFECTO MATRIZ Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN**

Para evaluar el posible efecto matriz debido a compuestos que coeluyen con los analitos, se llevó a cabo una comparación de las pendientes de calibración mediante estándares acuosos y las obtenidas por aplicación del método de adiciones estándar a cuatro muestras diferentes de orina, de acuerdo con la Directiva de la EU 2002/657 [30]. Se utilizó un test ANOVA para comparar las pendientes de las diferentes muestras y los estándares acuosos, llegando a la conclusión de que no había diferencias estadísticamente significativas, ya que los valores de “p” fueron mayores de 0,05 para los dos analitos. Consecuentemente, las muestras fueron cuantificadas frente a estándares acuosos.

Aunque no se observó efecto matriz, se adicionó 3,4-hexanodiona (a una concentración de 5 ng mL<sup>-1</sup>) a las muestras y a las disoluciones estándar de los analitos, siendo utilizado como estándar interno con el fin de compensar posibles pérdidas durante la aplicación del procedimiento analítico desarrollado. Se seleccionó este compuesto como estándar interno debido a que su comportamiento químico y cromatográfico es similar al de los analitos. Los valores de las pendientes obtenidas mediante la relación

entre el área de pico de cada analito con respecto al área de pico del estándar interno frente a la concentración de analito se muestran en la Tabla I.1, junto con los datos de repetitividad y reproducibilidad obtenidos para estos compuestos. Puede apreciarse que los valores de RSD obtenidos para GO fueron ligeramente inferiores que para MGO.

Como no se disponía de material de referencia con contenidos certificados para GO y MGO, la exactitud del método fue testada mediante estudios de recuperación, fortificando cuatro muestras de orina con los analitos a dos niveles de concentración (5,0 y 10 ng mL<sup>-1</sup>). Las recuperaciones obtenidas estuvieron en los intervalos de 90-94% y 95-102% para el nivel de concentración más bajo y más alto, respectivamente (Tabla I.2).

**Tabla II.2**

Porcentajes<sup>a</sup> de recuperación obtenidos para cuatro muestras de orina

Compuesto	Nivel de fortificación (ng mL <sup>-1</sup> )	Orina 1	Orina 2	Orina 3	Orina 4
GO	5	93 ± 4	91 ± 5	94 ± 4	94 ± 4
	10	95 ± 6	97 ± 6	98 ± 7	101 ± 7
MGO	5	92 ± 5	93 ± 4	90 ± 6	91 ± 4
	10	95 ± 4	102 ± 6	99 ± 5	98 ± 6

<sup>a</sup> Valores medios ± desviación estándar (n=3).

Una comparación del método propuesto con otros previamente publicados para la determinación de GO y MGO mostró una mayor sensibilidad para el método DLLME-LC-FLD aquí desarrollado (Tabla I.3). Solamente Neng y colaboradores [12] lograron una sensibilidad similar usando SBSE, técnica de preconcentración que requirió alrededor de 20 h para su aplicación, lo que se considera una desventaja con respecto a la aplicación de DLLME, donde la preconcentración se alcanza casi instantáneamente.

Tabla I.3.

Comparación del método propuesto con otros previamente publicados basados en LC y derivatización con DAN para la determinación de GO y MGO

Técnica de detección	Muestra	Tratamiento de la muestra	Intervalo de linealidad (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng L <sup>-1</sup> )		Ref.
				GO	MGO	
DAD	Agua, cerveza, levadura y orina, células de levadura	SBSE (~20 h)	0,1 – 120	15	25	[12]
MS/MS	Tejidos animales	Precipitación de proteínas y SPE	-	-	-	[22]
MS/MS	Plasma urémico	LLE	58 – 34825 (GO) 72 – 43236 (MGO)	-	-	[23]
MS/MS <sup>a</sup>	Suero y sangre	LLE	5 – 500	-	1300	[25]
MS/MS	Plasma	LLE	2,9 – 580 (GO) 3,6 – 720 (MGO)	4060	12250	[26]
LC-FLD	Orina	DLLME	0,1 – 25	13	16	Este trabajo

<sup>a</sup> Solo se determina MGO. DAD: Detector de diodos en serie.

### I.3.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El método propuesto se aplicó al análisis de 12 muestras de orina humana. Los resultados se muestran en la Tabla I.4, donde la concentración se refiere tanto al volumen de muestra, como a la relación normalizada a creatinina urinaria. La concentración de creatinina de cada muestra fue evaluada mediante la aplicación del método espectrofotométrico propuesto por Hurtado-Sánchez y colaboradores [3]. La linealidad de este método fue comprobada en el intervalo 2-150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  con la ecuación de regresión  $\text{Absorbancia} = -0,0031(\pm 0,0003) + 0,00171(\pm 3,4 \times 10^{-5}) C$ , donde "C" es la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,999.

La concentración de creatinina obtenida en las muestras analizadas se encontró entre 17 y 111  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El contenido de creatinina en el material de referencia certificado se obtuvo aplicando el método descrito anteriormente, y el resultado obtenido ( $733 \pm 9 \text{ mg kg}^{-1}$ ) demostró la exactitud de estas determinaciones para cada muestra de orina.

Los contenidos de los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos estudiados en las muestras analizadas se hallaron en el intervalo comprendido entre 1,1 y 28,4  $\text{ng mL}^{-1}$  (0,02 y 0,91  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) para GO y entre 15,8 y 217  $\text{ng mL}^{-1}$  (0,23 y 4,13  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ) para MGO. Los valores obtenidos fueron similares a los encontrados anteriormente por otros autores [3, 14, 16, 18]. Se observaron niveles de MGO altos en todas las muestras comparados con los correspondientes contenidos de GO. Sin embargo, teniendo en cuenta el bajo número de muestras analizadas, no se pueden extraer conclusiones de los resultados obtenidos, relacionadas con el sexo o la edad o para individuos diabéticos o no diabéticos.

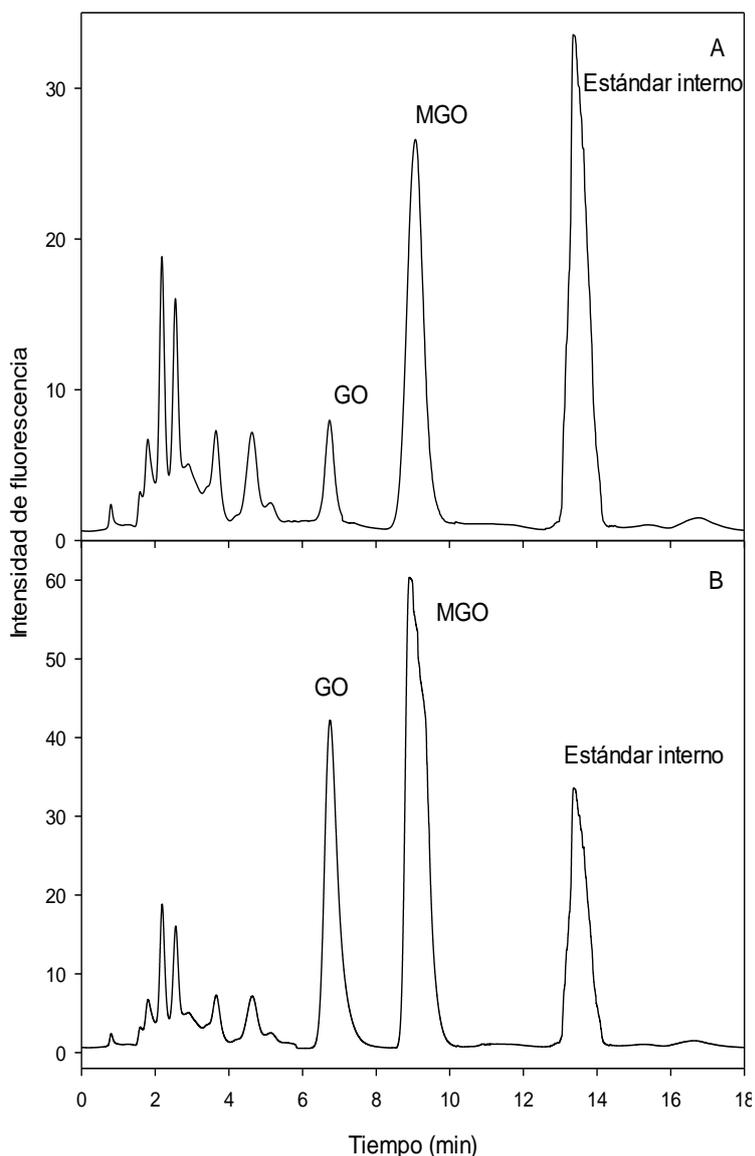
**Tabla III.4**Resultados<sup>a</sup> obtenidos en el análisis de las muestras de orina

Muestra	Sexo	Edad (años)	GO (ng mL <sup>-1</sup> )	MGO (ng mL <sup>-1</sup> )
1	H	35	28 ± 1,8 (0,57 ± 0,04)	153 ± 16 (3,1 ± 0,32)
2	M	5	16 ± 0,8 (0,91 ± 0,04)	63 ± 5,0 (3,5 ± 0,27)
3	H	35	16 ± 0,6 (0,21 ± 0,01)	182 ± 15 (2,4 ± 0,19)
4	H	47	20 ± 1,5 (0,31 ± 0,02)	84 ± 7,0 (1,3 ± 0,11)
5	H	46	11 ± 0,5 (0,49 ± 0,02)	92 ± 8,2 (4,1 ± 0,37)
6	H	12	9,2 ± 0,5 (0,17 ± 0,01)	217 ± 17 (4,1 ± 0,32)
7	H	35	7,1 ± 0,6 (0,13 ± 0,01)	69 ± 6,8 (1,3 ± 0,12)
8	M	5	1,1 ± 0,1 (0,07 ± 0,01)	19 ± 2,0 (1,1 ± 0,01)
9	H	35	15 ± 0,7 (0,16 ± 0,02)	148 ± 12 (1,5 ± 0,12)
10	M	24	1,5 ± 0,2 (0,02 ± 0,003)	16 ± 1,3 (0,23 ± 0,02)
11	H	35	3,8 ± 0,4 (0,03 ± 0,003)	32 ± 2,2 (0,28 ± 0,02)
12	H	22	20 ± 1,8 (0,50 ± 0,04)	45 ± 3,5 (1,1 ± 0,08)

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=3). Los valores entre paréntesis corresponden a la concentración de analito ajustada al contenido de creatinina ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ).

La Figura I.9 muestra los cromatogramas obtenidos usando DLLME combinada con LC-FLD para una muestra de orina no fortificada y fortificada al nivel de concentración de 20 ng mL<sup>-1</sup> para los analitos y de 5 ng mL<sup>-1</sup> para el estándar interno. Se usaron los cromatogramas obtenidos a partir de diferentes muestras para establecer la selectividad del método desarrollado, de acuerdo a la ausencia de picos interferentes en los tiempos de elución de los compuestos  $\alpha$ -dicarbonílicos bajo estudio.

El uso de co-cromatografía usando el criterio de rendimiento recomendado en la Directiva europea 2002/657/EC [30] confirmó que los compuestos de la matriz no causaron interferencias. Además, la selectividad se confirmó comparando los espectros de fluorescencia obtenidos a partir de estándares de calibración, muestras y muestras fortificadas. La similitud entre estos espectros permitió confirmar la identidad de los compuestos.



**Figura I.9.** Cromatogramas obtenidos utilizando el procedimiento DLLME-LC-FLD para una muestra de orina no fortificada (A) y una muestra de orina fortificada con  $20 \text{ ng mL}^{-1}$  para los analitos y  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  para el IS (B).

#### I.4. CONCLUSIÓN

Queda demostrado que la técnica analítica miniaturizada DLLME es una alternativa barata, simple y eficiente para preconcentrar GO y MGO en muestras de orina, si se compara con las técnicas tradicionales de extracción. Se comprobó el efecto potenciador del surfactante no iónico Tritón X-114, ya que ayudó a la acción del disolvente dispersante en la formación de multigotas de 1-undecanol. Una derivatización sencilla con DAN proporcionó una cuantificación sensible y selectiva de los analitos mediante LC-FLD.

## I.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.A. Salaev, O.K. Poleschchuk, O.V. Vodyankina, Ethylene glycol oxidation over Ag-containing catalysts: A theoretical study, *Journal of Molecular Catalysis A-Chemical*, 396 (2015) 61-67.
- [2] S.E.L. Bulman, G. Tronci, P. Goswami, C. Carr, S.J. Russell, Antibacterial properties of nonwoven wound dressings coated with manuka honey or methylglyoxal, *Materials*, 10 (2017) N°. 954.
- [3] M.C. Hurtado-Sánchez, A. Espinosa-Mansilla, M.I. Rodríguez-Cáceres, E. Martín-Tornero, I. Durán-Merás, Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 2575-2584.
- [4] J.L.J.M. Scheijen, C.G. Schalkwijk, Quantification of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in blood and plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: evaluation of blood specimen, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52 (2014) 85-91.
- [5] M. Daglia, A. Amoroso, D. Rossi, D. Mascherpa, G. Maga, Identification and quantification of alpha-dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells, *Journal of Food Composition and Analysis*, 31 (2013) 67-74.
- [6] D.E.M. Maessen, C.D.A. Stehouwer, C.G. Schalkwijk, The role of methylglyoxal and the glyoxalase system in diabetes and other age-related diseases, *Clinical Science*, 128 (2015) 839-861.
- [7] Y.K. Shiryayeva, V.V. Krylin, V.N. Titov, Chromatographic determination of methyl glyoxal in blood plasma as the test for glycototoxicity and accumulation of glycation end-products, *bulletin of experimental biology and medicine*, 153 (2012) 114-117.
- [8] WHO, World Health Organization. [www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/](http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/). Último acceso en marzo de 2020.
- [9] T. Cvetković, P. Vlahović, L. Zvezdanović, D. Pavlović, G. Kocić, D. Sokolović, The significance of urinary markers in the evaluation of diabetic nephropathy, *Journal of Medical Biochemistry*, 27 (2008) 376-382.

- [10] A. Lapolla, R. Flamini, T. Tonus, D. Fedele, A. Senesi, R. Reitano, E. Marotta, G. Pace, R. Seraglia, P. Traldi, An effective derivatization method for quantitative determination of glyoxal and methylglyoxal in plasma samples by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17 (2003) 876-878.
- [11] L.A. Zardari, M.Y. Khuhawar, A.J. Laghari, Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent, *Chromatographia*, 70 (2009) 891-897.
- [12] N.R. Neng, C.A.A. Cordeiro, A.P. Freire, J.M.F. Nogueira, Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with *in-situ* derivatization, *Journal of Chromatography A*, 1169 (2007) 47-52.
- [13] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F.C. Cañada, M. Prado-Márquez, High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors, *Analytical Biochemistry*, 371 (2007) 82-91.
- [14] K. Akira, Y. Matsumoto, T. Hashimoto, Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42 (2004) 147-153.
- [15] A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, F. Salinas, High-performance liquid chromatographic fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings, *Analytical Biochemistry*, 255 (1998) 263-273.
- [16] A. Gómez Ojeda, K. Wrobel, A.R. Corrales Escobosa, M.E. Garay-Sevilla, K. Wrobel, High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent, *Analytical Biochemistry*, 449 (2014) 52-58.
- [17] Y.L. Deng, P.H. Yu, Simultaneous determination of formaldehyde and methylglyoxal in urine: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in diabetic complications, *Journal of Chromatographic Science*, 37 (1999) 317-322.

- [18] J. Zhang, H. Zhang, M. Li, D. Zhang, Q. Chu, J. Ye, A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5124-5129.
- [19] A.C. McLellan, S.A. Phillips, P.J. Thornalley, The assay of methylglyoxal in biological-systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene, *Analytical Biochemistry*, 206 (1992) 17-23.
- [20] I. Nemet, L. Varga-Defterdarovic, Z. Turk, Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography, *Clinical Biochemistry*, 37 (2004) 875-881.
- [21] C. Cordeiro, A.F. Freire, Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent, *Analytical Biochemistry*, 234 (1996) 221-224.
- [22] E.W. Randell, S. Vasdev, V. Gill, Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 51 (2005) 153-157.
- [23] H. Odani, T. Shinzato, Y. Matsumoto, J. Usami, K. Maeda, Increase in three  $\alpha,\beta$ -dicarbonyl compound levels in human uremic plasma: specific in vivo determination of intermediates in advanced Maillard reaction, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256 (1999) 89-93.
- [24] Y. Han, E. Randell, S. Vasdev, V. Gill, V. Gadag, L.A. Newhook, M. Grant, D. Hagerty, Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 305 (2007) 123-131.
- [25] C. Hess, B. Stratmann, W. Quester, D. Tschoepe, B. Madea, F. Musshoff, Clinical and forensic examinations of glycaemic marker methylglyoxal by means of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *International Journal of Legal Medicine*, 127 (2013) 385-393.
- [26] S.J. Chen, C. Aikawa, T. Matsui, Quantitative analysis of methylglyoxal, glyoxal and free advanced glycation end-products in the plasma of wistar rats during the oral glucose tolerance test, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 38 (2015) 336-339.
- [27] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseinia, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.

- [28] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2067-2099.
- [29] S. Sacmaci, S. Sahan, U. Sahin, S. Kartal, A. Ulgen, On-line solid-phase separation/preconcentration for the determination of copper in urine by flame atomic absorption spectrometry, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 44 (2014) 240-245.
- [30] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC, concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun. L221* (2002) 8-36.

# **Capítulo II**

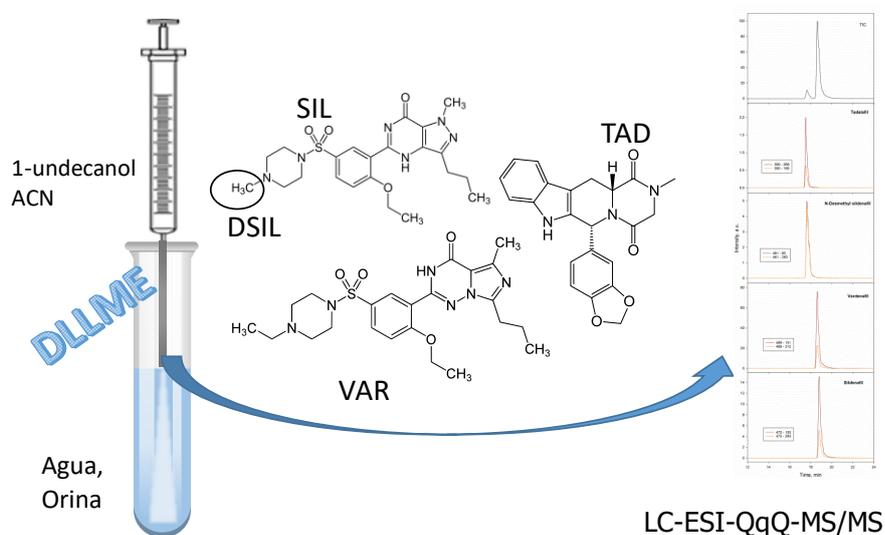
**DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES SINTÉTICOS DE  
LA FOSFODIESTERASA-5 EN AGUA Y ORINA  
HUMANA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA  
CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y  
MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO**



## DETERMINACIÓN DE INHIBIDORES SINTÉTICOS DE LA FOSFODIESTERASA-5 EN AGUA Y ORINA HUMANA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA LÍQUIDO-LÍQUIDO

### RESUMEN

Se propone la cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem utilizando ionización con electrospray y triple cuadrupolo (LC-ESI-QqQ-MS/MS) para la determinación de los inhibidores sintéticos de la enzima fosfodiesterasa-5, sildenafil, tadalafil y vardenafil, así como del metabolito activo N-desmetilsildenafil. El método se aplicó con éxito al análisis de aguas de diferentes orígenes y orina humana. Se utilizó la técnica microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) en su forma clásica para el análisis de aguas, mientras que, para las muestras de orina, fue necesario una extracción previa en un disolvente orgánico, empleando el extracto de acetonitrilo como disolvente dispersante en la etapa DLLME. Se obtuvieron límites de detección (LODs) en los intervalos 5-50 y 15-250 ng L<sup>-1</sup> para agua y orina, respectivamente. Los factores de enriquecimiento estuvieron entre 75 y 81. La exactitud del procedimiento se calculó mediante ensayos de recuperación, obteniéndose recuperaciones promedio  $\pm$  SD (n=48) de 94 $\pm$ 3 y 91 $\pm$ 4 para agua y orina, respectivamente. En ninguna de las muestras analizadas se encontraron los analitos, al menos por encima de sus correspondientes LODs.

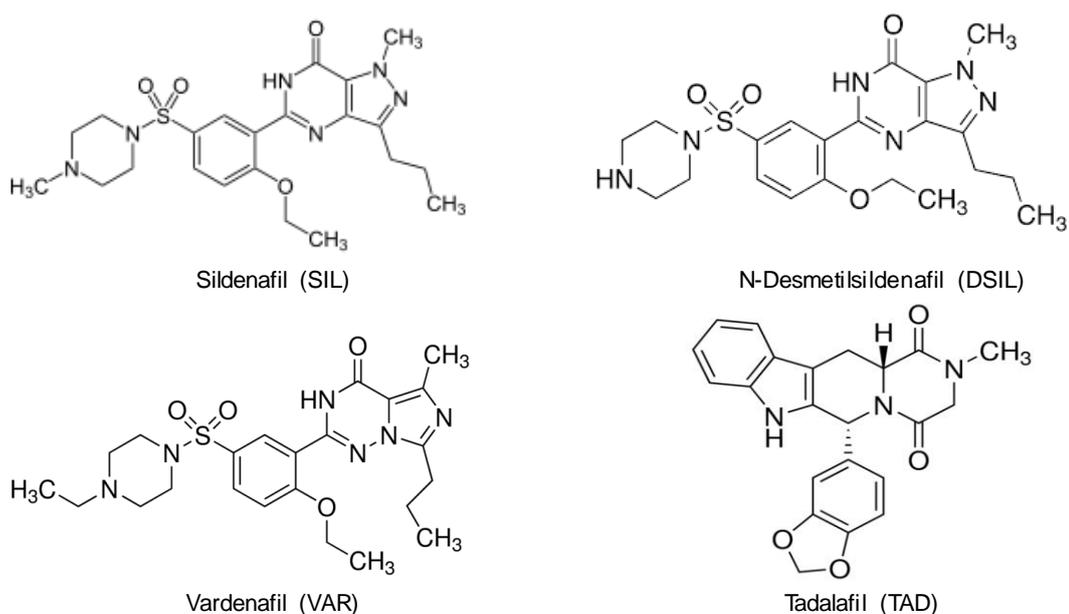




## II.1. INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de la enzima fosfodiesterasa tipo-5 (PDE-5) son fármacos sintéticos utilizados en un tipo de terapia dirigida para el tratamiento de la disfunción eréctil en hombres y también, en el tratamiento de personas con hipertensión pulmonar [1], siendo aceptados por la agencia gubernamental estadounidense Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). Estos compuestos actúan inhibiendo el nucleótido monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) generado en las células musculares por la entrada de monóxido de nitrógeno. Más específicamente, inhiben la acción de la enzima PDE-5, evitando así el aumento de la dilatación de los vasos sanguíneos generado por cGMP.

En la actualidad existen dos tipos de inhibidores de la PDE-5: sildenafil (SIL) y vardenafil (VAR), con estructuras moleculares similares, y tadalafil (TAD) que presenta una estructura diferente, como puede apreciarse en la Figura II.1. Estas diferencias estructurales se reflejan en las propiedades farmacocinéticas de TAD y su selectividad para interactuar con las isoenzimas PDE. Predominantemente, SIL es metabolizado a N-desmetilsildenafil (DSIL) que, a su vez, también presenta actividad farmacológica, aunque menor que su precursor. El compuesto VAR también cuenta con un metabolito activo que representa aproximadamente el 7% de la actividad farmacológica total. La actividad de TAD solamente se debe al fármaco original, ya que no tiene ningún metabolito activo [2].



**Figura II.1.** Estructura de los compuestos inhibidores de PDE-5 estudiados.

El objetivo inicial del uso farmacológico de SIL fue el tratamiento de enfermedades cardíacas, y se observó el rendimiento esperado para este fin. Sin embargo, se detectaron, entre otros efectos secundarios del medicamento, un aumento en la función eréctil de un grupo de voluntarios a los que se les había suministrado el fármaco. La comercialización de VAR comenzó en 2003 y, aunque este compuesto presenta una estructura molecular similar a SIL, proporcionó mejores resultados en los pacientes con disfunción eréctil, ya que aumenta considerablemente la acción del óxido nítrico endógeno.

La comercialización de TAD como inhibidor de la PDE-5 también comenzó en 2003, con la particularidad de ser mucho más selectivo para esta enzima que para otras PDEs como PDE-3 y PDE-7, que se encuentran en mayor concentración en el corazón y en la retina, respectivamente, por lo que consigue minimizar los efectos adversos que presentan tanto SIL como VAR. Además, en humanos, el tiempo de vida media de TAD es de aproximadamente 17,5 h, frente a las 4 h de SIL y VAR [3].

Todos los inhibidores de PDE-5 son excretados como metabolitos, predominantemente por las heces y, en menor medida, a través de la orina. La orina presenta ciertas ventajas como matriz analítica, entre las que se encuentra la posibilidad de disponer de grandes cantidades de muestra, facilidad en su recolección, y el hecho de presentar elevadas concentraciones de la mayoría de los medicamentos y sus metabolitos. Esta es la razón por la que el análisis de orina se utiliza habitualmente en aplicaciones clínicas como, por ejemplo, el control de drogas ilegales y la determinación de biomarcadores [4].

Por otra parte, este tipo de fármacos se añaden con bastante frecuencia como adulterantes en las formulaciones de suplementos dietéticos a base de hierbas, resultando productos nocivos, que son etiquetados de forma fraudulenta en lo que se refiere a sus ingredientes o sus riesgos para la salud, lo que conlleva serios problemas farmacológicos y toxicológicos para los usuarios, incluyendo efectos adversos en la función cardiovascular [5, 6].

La presencia de fármacos y sus metabolitos en medios acuáticos, también es motivo de preocupación cuando se evalúa el riesgo medioambiental para los seres humanos, y el análisis de muestras de aguas residuales es una forma de estimar la concentración total de residuos de medicamentos en muestras medioambientales [7].

Debido a la importancia de la determinación de inhibidores de la PDE-5, ya sea como medicamentos legales o fármacos adicionados fraudulentamente a suplementos

dietéticos en cantidades inapropiadas o como ingredientes no declarados en su composición, se han propuesto diferentes procedimientos de análisis en una amplia variedad de matrices, incluyendo muestras biológicas como orina y plasma [8-11], preparados farmacéuticos [8, 12] y suplementos dietéticos [5, 6, 13-16].

Las técnicas analíticas aplicadas con mayor frecuencia para la determinación de estos compuestos son cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS o MS/MS), detector de diodos en serie (DAD), fluorescencia (FLD) o detección electroquímica, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (CE-MS). Sin embargo, en los últimos años, la técnica LC-MS se ha convertido en la metodología más utilizada para la detección de fármacos, debido a sus características de alta sensibilidad y especificidad. La alta resolución de la técnica MS/MS está siendo particularmente adecuada para el reconocimiento inequívoco de iones marcadores fragmentados, lo que permite una identificación exacta [5, 6, 8, 12, 13].

Los procedimientos analíticos para muestras biológicas deben incluir la extracción de los analitos desde las matrices, así como una adecuada limpieza del extracto y una etapa de preconcentración. En principio, la extracción en fase sólida (SPE) [17] y la extracción líquido-líquido (LLE) [6] son las técnicas recomendadas para este tipo de muestras. Recientemente, se han propuesto nuevas técnicas de preconcentración miniaturizadas basadas en los principios de la Química Analítica Verde para evitar el alto consumo de disolventes orgánicos [18]. Sin embargo, los procedimientos de microextracción para la determinación de los inhibidores de la PDE-5 se han aplicado en pocas ocasiones. Wang y colaboradores propusieron la extracción por adsorción sobre barras agitadoras (SBSE), utilizando un recubrimiento de polímeros de impresión molecular (MIPs) basados en dendrímeros para extraer SIL y VAR desde matrices de alimentos [19]. La microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME) se utilizó para la determinación de SIL y VAR en plasma humano [11]. La extracción en fase sólida magnética (MSPE) también se aplicó para la determinación de SIL y su metabolito DSIL en muestras de orina y plasma humano, utilizando nanopartículas magnéticas (MNPs), funcionalizando el núcleo con fenilo y un recubrimiento hidrofílico de metilcelulosa [9]. También se han usado MIPs como revestimiento del núcleo de las MNPs como extractantes en MSPE combinada con LC y detección ultravioleta (UV) para la extracción y detección selectiva de TAL en medicamentos [14], SIL y VAR en suplementos dietéticos a base de hierbas [15] y seis inhibidores sintéticos de la PDE-5 en hierbas medicinales [16].

La microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) usa una mezcla ternaria de disolventes, en la que el disolvente orgánico utilizado como extractante se mezcla con un disolvente dispersante antes de proceder a su rápida inyección en la fase acuosa. La gran superficie de contacto creada entre las fases dadora y aceptora permite alcanzar el equilibrio de extracción casi instantáneamente [20, 21]. Este enfoque se utilizó para la determinación de SIL, VAR y aildenafil en plasma humano usando un líquido iónico (IL) como extractante y una extracción posterior a una disolución acuosa acidificada, lo que implica alargar el tiempo necesario para llevar a cabo el procedimiento; además la detección se realizó mediante un sistema no selectivo como es el de DAD [10].

En este estudio, se lleva a cabo la determinación de inhibidores de la PDE-5 y metabolitos en muestras de orina y agua procedente de plantas de tratamiento de aguas residuales, usando DLLME como etapa de preconcentración de los analitos, y como método de separación se utilizó la cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo en modo de monitorización de reacción múltiple (MRM) para proporcionar una identificación inequívoca de los inhibidores.

## II.2. PARTE EXPERIMENTAL

### II.2.1. REACTIVOS

Sildenafil (1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol[4,3-d]pirimidin-5-il)fenilsulfonil]-4-metilpiperazina, fórmula molecular:  $C_{22}H_{30}N_6O_4S$ ), vardenafil dihidrocloruro (4-[2-etoxi-5-(4-etil-piperazina-1-il)sulfonil-fenil]-9-metil-7-propil-3,5,6,8-tetrazabicyclo[4.3.0]nona-3,7,9-trien-2-ona dihidrocloruro, fórmula molecular:  $C_{23}H_{32}N_6O_4S$ ) y tadalafil ( [(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], fórmula molecular:  $C_{22}H_{19}N_3O_4$ ) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) como disoluciones estándar de 1 mg mL<sup>-1</sup> en metanol. N-Desmetilsildenafil (1-[4-etoxi-3-(6,7-dihidro-1-metil-7-oxo-3-propil-1H-pirazol[4,3-d]pirimidin-5-il) fenilsulfonil]piperazina, fórmula molecular:  $C_{21}H_{28}N_6O_4S$ ) fue suministrado por LGC GmbH Standards (Luckenwalde, Alemania) como disolución estándar de 1 mg mL<sup>-1</sup> en metanol. Las disoluciones estándar individuales de concentración intermedia fueron preparadas por dilución en metanol y la mezcla estándar de trabajo fue preparada diariamente en agua. Todas las disoluciones se almacenaron a 4 °C.

Acetonitrilo (ACN), etanol, metanol, acetona, cloroformo, tetracloruro de carbono, diclorometano, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano, 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, tolueno, xileno, 2-octanona y 2-undecanona, de alta calidad, fueron obtenidos de Sigma. El agua utilizada para los ensayos se purificó previamente con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). También se utilizaron cloruro de sodio, acetato de amonio, hidrógeno fosfato de dipotasio y dihidrógeno fosfato de potasio de Fluka (Buchs, Suiza).

## II.2.2. INSTRUMENTACIÓN

Para el análisis por cromatografía líquida se utilizó un sistema Agilent 1200 HPLC con una bomba binaria (G1311A) equipado con una columna de RP Zorbax Eclipse XDB-C18 de dimensiones 50 x 4,6 mm y 1,8  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent, Waldbronn, Alemania). Los eluyentes usados como fase móvil fueron ACN y una disolución reguladora de acetato de amonio 50 mM (pH = 6,9). El programa seleccionado se inició con una etapa isocrática con 40:60 v/v ACN:acetato de amonio durante 6 min, después un gradiente lineal hasta 90% de ACN en 1 min, porcentaje que se mantuvo durante 4 min. Finalmente, antes del siguiente ensayo, se restablecieron las condiciones iniciales en 1 min y se mantuvieron 5 min. Se trabajó a velocidad de flujo de fase móvil constante ( $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ ) durante todo el proceso. El volumen de inyección fue de 5  $\mu\text{L}$  y se realizó mediante un muestreador automático y usando viales de 2 mL de capacidad, provistos con microinsertos de 250  $\mu\text{L}$  con pies poliméricos.

Para el análisis por MS, se utilizó un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent modelo G6410A. La fuente ESI operó en modo de ionización positiva, usando los siguientes parámetros de operación: voltaje del capilar, 4000 V; presión del nebulizador, 60 psi; flujo de gas de secado de  $11 \text{ L min}^{-1}$  y temperatura del gas de secado  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los espectros de masas se registraron en el rango de  $m/z$  desde 50 a 1000 amu. El nitrógeno sirvió como gas nebulizador y de colisión. Se empleó el software Agilent MassHunter Data Acquisition (Qualitative and Quantitative Analysis) para el desarrollo del método y la adquisición de datos.

Un estudio preliminar de las transiciones óptimas MRM para los compuestos se llevó a cabo por inyección directa de cada analito individualmente, a una concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , en la fuente de ionización, y aplicando diferentes voltajes de fragmentación y energías de colisión (Tabla II.1). El procedimiento de identificación de los analitos se basó en el tiempo de retención y en el análisis de dos transiciones MRM que implican la

formación de los iones producto con las mayores relaciones  $m/z$ , siendo la transición más sensible utilizada para cuantificar y ambas transiciones con fines de identificación.

Para romper las emulsiones se utilizó una centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania).

**Tabla II.1**

Condiciones de detección de los compuestos estudiados

Compuestos	DSIL	TAD	VAR	SIL
$t_R$ (min)	1,75	3,01	3,97	4,16
MRM <sub>1</sub>	461→85	390→268	489→151	475→100
Voltaje de fragmentación 1 (V)	220	140	245	220
Energía de colisión 1 (V)	40	5	50	30
MRM <sub>2</sub>	461→283	390→169	489→312	475→283
Voltaje de fragmentación 2 (V)	220	120	245	220
Energía de colisión 2 (V)	40	40	40	40

### II.2.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

Se analizaron diez muestras de agua, suministradas por diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs) del sureste de España, siendo recogidas por trabajadores de dichas plantas. Se obtuvieron siete muestras de agua desde una misma WWTP en siete días consecutivos de lunes a domingo (muestras 1-7), y las otras tres muestras de agua (muestras 8-10) procedían de tres WWTPs diferentes y recogidas en domingo. En todos los casos, las muestras estudiadas se obtuvieron tomando cuatro alícuotas cada seis horas a lo largo del día y fueron recolectadas después del screening primario y antes de ningún tratamiento secundario de las aguas en la planta, y guardadas en botes ámbar cerrados herméticamente. Una vez en el laboratorio, se guardaron en la oscuridad a 4 °C hasta el análisis, el cual se realizó dentro de las 24 horas siguientes a su llegada al laboratorio.

Antes del análisis, todas las muestras de agua se filtraron con filtros de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ . Después, a cada alícuota de 10 mL de muestra filtrada se adicionaron 0,5 mL de disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH = 8,7) y 1 g de cloruro de sodio, homogeneizando por agitación manual durante unos segundos. Seguidamente, para la etapa de microextracción, se inyectó de forma rápida en la muestra acuosa, una mezcla

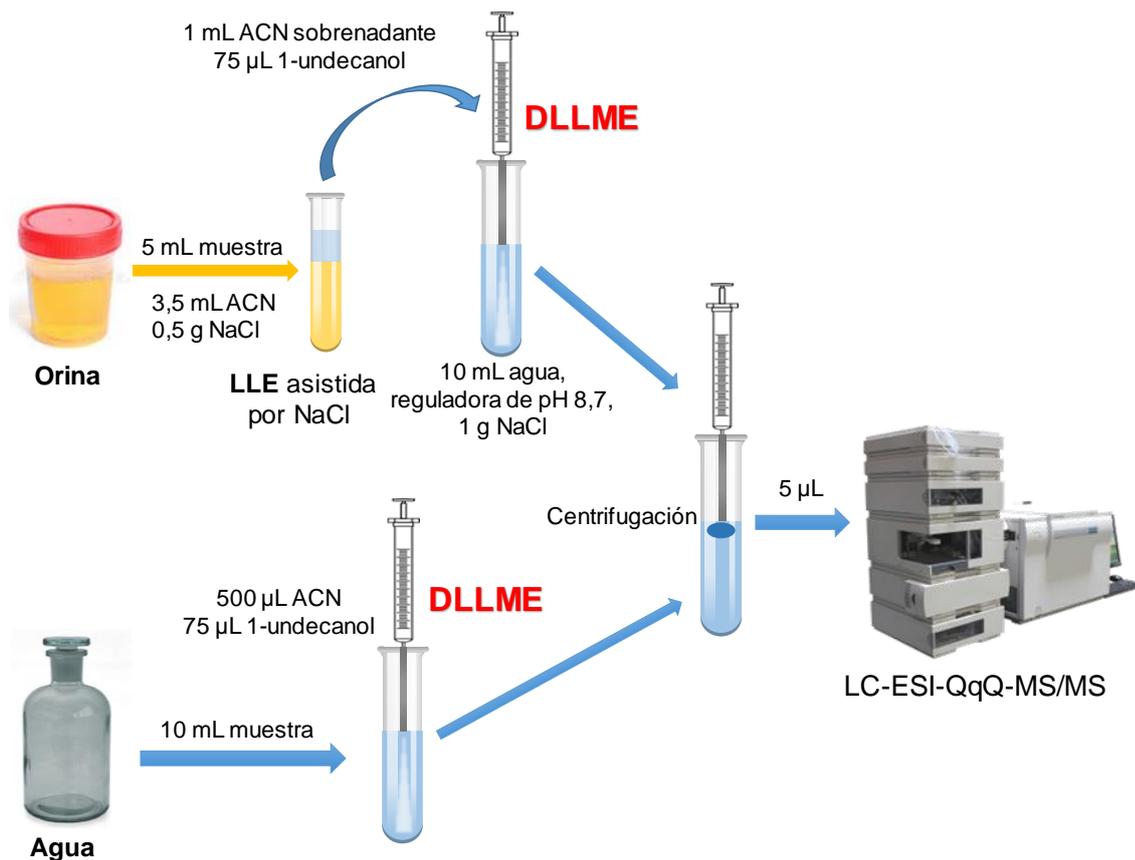
que contenía 75  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol (agente extractante) y 500  $\mu\text{L}$  de ACN (agente dispersante) usando una microjeringa. Esto generó una disolución turbia, que consistía en finas gotas de 1-undecanol dispersadas a través de la fase acuosa, en las que se extrajeron los analitos. Posteriormente, se procedió a la centrifugación durante 3 min a 867 g, recuperando la fase sobrenadante (volumen  $65 \pm 5 \mu\text{L}$ ), de la que se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo.

Se obtuvieron diez muestras de orina humana de diferentes varones voluntarios sanos, ninguno de ellos sometido a ningún tratamiento con fármacos. Se tomaron volúmenes de aproximadamente 100 mL de la primera orina de la mañana, siendo recogidos en vasos estériles de plástico y mantenidos a 4 °C hasta el análisis, el cual se llevó a cabo dentro de las 24 horas siguientes a su llegada al laboratorio.

En el tratamiento de las muestras de orina se incluyó una etapa de extracción con un disolvente orgánico. Esta etapa consistió en la adición de 3,5 mL de ACN a 5 mL de muestra conteniendo 10% m/v de cloruro de sodio, procediendo a su agitación manual durante 30 s antes de centrifugar durante 3 min a 867 g.

Tras la centrifugación, se recuperó 1 mL del sobrenadante (ACN), que se utilizó como disolvente dispersante en la etapa DLLME. A este volumen, se adicionaron 75  $\mu\text{L}$  de 1-undecanol y la mezcla se inyectó rápidamente en una disolución que contenía 10 mL de agua, 0,5 mL de disolución reguladora fosfato (50 mM, pH = 8,7) y 1 g de cloruro de sodio. La turbidez formada en la disolución se rompió mediante centrifugación durante 3 min a 867 g. Posteriormente, se inyectaron 5  $\mu\text{L}$  de la fase sobrenadante (1-undecanol) en el cromatógrafo.

En la Figura II.2 se muestra un esquema del procedimiento analítico desarrollado para determinar los compuestos en orina y aguas residuales.



**Figura II.2.** Esquema del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de inhibidores PDE-5.

#### II.2.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación, se fortificaron dos muestras de agua y dos de orina a dos niveles de concentración por triplicado: 2 y 20 ng mL<sup>-1</sup> para agua y 5 y 20 ng mL<sup>-1</sup> para orina.

Las muestras fortificadas se dejaron reposar durante 1 hora a temperatura ambiente para conseguir una distribución uniforme de los analitos y su interacción con la matriz, antes de proceder a su análisis. Se verificó previamente que las muestras usadas para los estudios de recuperación estaban libres de los analitos estudiados.

## II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### II.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

La separación cromatográfica se optimizó mediante RP-LC inyectando 5  $\mu\text{L}$  de una disolución estándar acuosa conteniendo los analitos a un nivel de concentración de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y usando tres columnas analíticas distintas: ODS Hypersil (10 x 0,4 cm, 5  $\mu\text{m}$ ), Tracer Extrasil ODS2 (15 x 0,4 cm, 5  $\mu\text{m}$ ) y Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 x 0,46 cm, 1,8  $\mu\text{m}$ ). Como fase móvil se emplearon diferentes mezclas de disolventes, consistiendo en ACN:ácido fórmico y ACN:acetato de amonio en diferentes proporciones, distintos valores de pH y considerando diferentes gradientes de elución a velocidades de flujo de 0,4 y 0,6  $\text{mL min}^{-1}$ .

Las primeras dos columnas proporcionaron resultados similares, los picos cromatográficos no tuvieron una buena resolución, bajo ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. La mejor resolución se consiguió con la columna más corta y con menor diámetro de partícula, Zorbax Eclipse XDB-C18. Las condiciones seleccionadas finalmente consistieron en una etapa isocrática inicial de 40:60 ACN:acetato de amonio (50 mM, pH = 6,9) de 6 min de duración y, seguidamente, un gradiente lineal hasta la mezcla 90:10, composición alcanzada en 1 min y, a su vez, mantenida durante 4 min. El volumen de inyección se estudió entre 5 y 20  $\mu\text{L}$ , seleccionando el volumen de 5  $\mu\text{L}$ , ya que condujo a picos cromatográficos mejor definidos.

Bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas, los tiempos de retención obtenidos fueron 1,75; 3,01; 3,97 y 4,16 min, para DSIL, TAD, VAR y SIL, respectivamente.

Para el sistema de detección, se estudió el modo de ionización aplicado en la fuente de electrospray usando el modo barrido completo para cada analito, y la mejor sensibilidad se consiguió operando en modo de ionización positiva para los cuatro compuestos, siendo la molécula protonada  $[\text{M}+\text{H}]^+$  el ion precursor dominante.

La Tabla II.1 muestra las transiciones MRM precursor/producto junto con el voltaje del fragmentador y la energía de colisión aplicada para cada compuesto. Hay que tener en cuenta que, aunque los compuestos VAR y SIL prácticamente coeluyen, la cuantificación individual de cada compuesto fue posible, ya que muestran diferentes iones precursores y distintas transiciones.

### II.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DLLME

El procedimiento de preconcentración mediante DLLME se optimizó utilizando una disolución estándar que contenía los analitos a una concentración de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$ . Las Figuras II.3 a II.5 muestran el comportamiento observado para TAD y SIL, respecto a las variables estudiadas. Dado que VAR y DSIL mostraron un comportamiento similar a SIL, debido a la similitud de sus estructuras químicas, no han sido incluidos en las figuras con objeto de simplificarlas. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo por duplicado, mostrándose en las figuras las barras de error correspondientes a la desviación estándar de los distintos experimentos.

En primer lugar, se llevó a cabo la selección de los disolventes extractante y dispersante más apropiados.

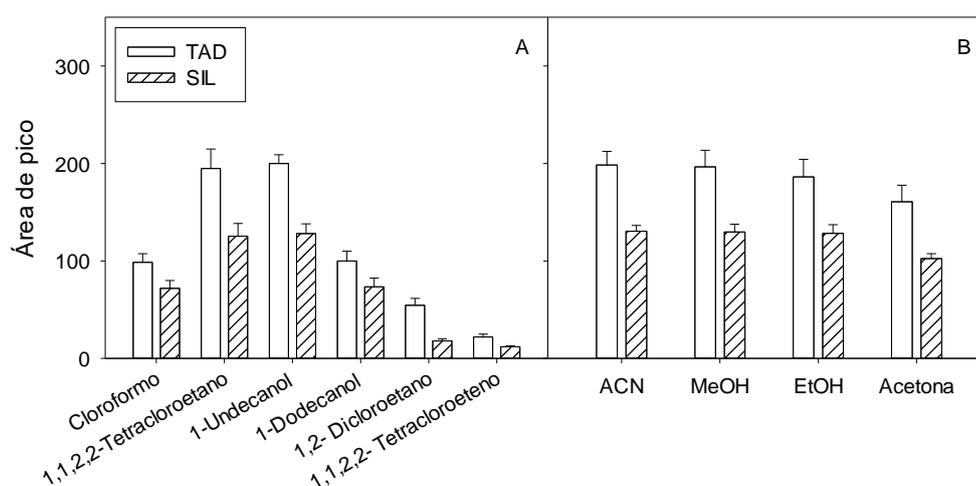
Un buen disolvente extractante debería mostrar una alta capacidad de extracción, alta solubilidad en la fase dispersante, baja solubilidad en agua, baja volatilidad y buen comportamiento cromatográfico. Se realizaron experimentos preliminares usando disolventes orgánicos más densos que el agua, ya que la recogida de la fase orgánica enriquecida resulta más sencilla desde el punto de vista práctico que cuando dicha fase orgánica presenta menor densidad que el agua. Se ensayó tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, 1,2-dicloroetano, 1,1,2,2-tetracloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano, usando  $100 \mu\text{L}$  de disolvente extractante, que se combinó con  $0,5 \text{ mL}$  de ACN, y la mezcla fue inyectada rápidamente en  $10 \text{ mL}$  de disolución estándar acuosa. Debido a la incompatibilidad de los disolventes orgánicos clorados con las fases móviles empleadas en RP-LC, la fase sedimentada obtenida detrás la centrifugación, se evaporó usando una corriente de nitrógeno y, posteriormente, se reconstituyó en  $100 \mu\text{L}$  de ACN.

No se observó fase orgánica discernible tras la centrifugación cuando se utilizó diclorometano como extractante, debido probablemente a su elevada solubilidad en la fase acuosa. Como se muestra en la Figura II.3A la sensibilidad más alta se alcanzó utilizando 1,1,2,2-tetracloroetano, mientras que con 1,2-dicloroetano y 1,1,2,2-tetracloroetano, las señales analíticas fueron muy bajas.

Para obviar la necesidad de evaporar la fase orgánica enriquecida y su reconstitución en un disolvente compatible con RP-LC, se estudiaron diferentes disolventes extractantes menos densos que el agua: 1-octanol, 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-octanona, 2-undecanona, tolueno y xileno. Solamente 1-undecanol y 1-dodecanol extrajeron los analitos de interés, el primero con una sensibilidad ligeramente superior. Finalmente, se seleccionó 1-undecanol como disolvente extractante, ya que

proporcionó una sensibilidad similar y una repetitividad superior a 1,1,2,2-tetracloroetano y, además, con su uso puede prescindirse de la etapa de evaporación del extracto (Figura II.3A).

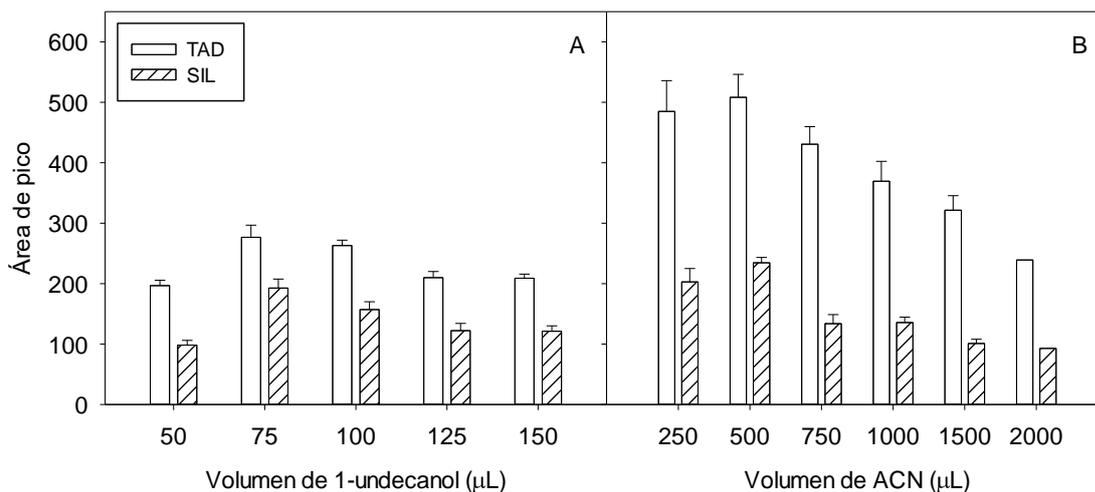
Como disolventes dispersantes se ensayaron ACN, metanol, etanol y acetona, considerando su solubilidad tanto en 1-undecanol como en la fase acuosa. Cuando se utilizó acetona, se observó una sensibilidad ligeramente inferior a la proporcionada por los otros tres disolventes, entre los que no se observaron diferencias significativas. Por tanto, se seleccionó ACN ya que también era utilizado en la fase móvil (Figura II.3B).



**Figura II.3.** Influencia de la naturaleza de los disolventes extractante (A) y dispersante (B) en la etapa de microextracción.

Para estudiar el efecto del volumen del disolvente extractante, se adicionaron diferentes volúmenes de 1-undecanol (50, 75, 100, 125 y 150  $\mu\text{L}$ ) a 0,5 mL de ACN, y la mezcla se inyectó rápidamente en la fase acuosa. Las áreas de los picos aumentaron hasta 75  $\mu\text{L}$ , y posteriormente, se observó una ligera disminución, debido probablemente a efectos de dilución (Fig. II.4A).

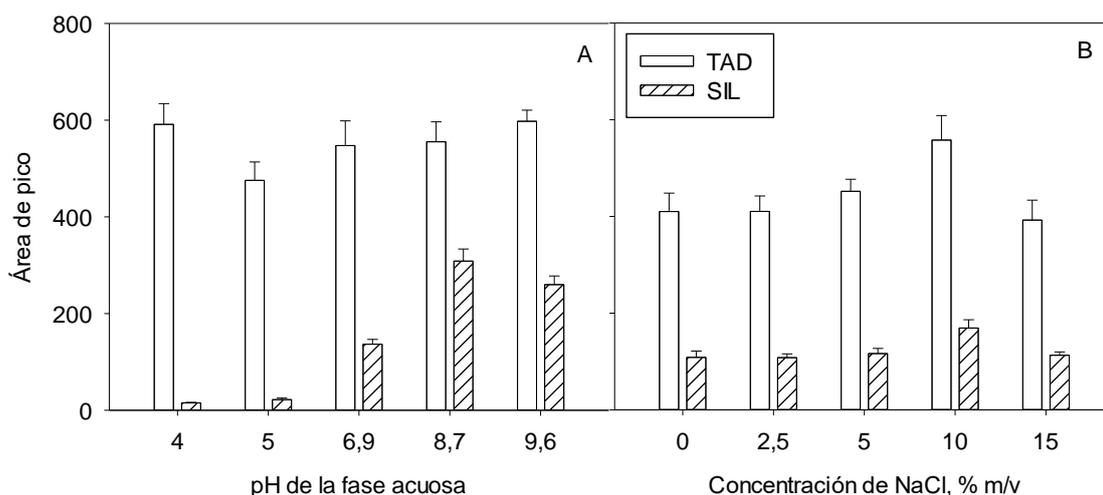
Los volúmenes ensayados para el disolvente dispersante estuvieron en el rango entre 0,25 y 2 mL. La sensibilidad aumentó hasta 0,5 mL, disminuyendo para volúmenes superiores, debido probablemente a un aumento de la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, empeorando la eficiencia de la extracción (Fig. II.4B). Consecuentemente, el volumen seleccionado de ACN fue de 0,5 mL.



**Figura II.4.** Influencia de los volúmenes de los disolventes extractante (A) y dispersante (B) en la sensibilidad del procedimiento DLLME.

La influencia del pH de la fase acuosa se estudió entre 4 y 9,6, usando disoluciones reguladoras 50 mM de acetato de amonio/ácido acético o fosfato. Como se muestra en la Figura II.5A, no se observaron diferencias significativas en el rango de pH estudiado para TAD, mientras que los mejores resultados para SIL se obtuvieron a pH 8,7, siendo este valor seleccionado. Estos diferentes comportamientos pueden ser explicados considerando los diferentes valores de  $pK_a$  para estos compuestos, siendo 0,55 y 6,03 para TAD y SIL, respectivamente [6].

La fuerza iónica de la fase acuosa se incrementó mediante la adición de cloruro de sodio en el intervalo de concentración entre 0 y 15% m/v. La señal analítica aumentó ligeramente hasta alcanzar la concentración de 10% m/v (Figura II.5B), debido probablemente a una disminución de la solubilidad de los analitos en la fase acuosa. A concentraciones superiores se aprecia una ligera disminución de la señal, probablemente por la mayor dificultad de difusión de los analitos a través de la fase acuosa. Por tanto, para los experimentos posteriores se seleccionó la concentración de NaCl de 10% m/v.



**Figura II.5.** Influencia del pH (A) y la fuerza iónica (B) de la fase acuosa en la eficiencia DLLME.

Se estudió la influencia del volumen de la fase acuosa entre 5 y 10 mL y, como se esperaba, se obtuvieron los mejores resultados con un volumen de 10 mL. No se consideraron volúmenes mayores debido a la capacidad de los tubos de centrifuga usados para la etapa de DLLME.

Es conocido que, para algunos compuestos, la presencia de surfactantes en la fase acuosa mejora la eficiencia de la extracción mediante DLLME. Por esta razón, se incorporó dodecil sulfato de sodio (SDS) en concentraciones entre 0,1 y 0,5 mM, pero como no se observó ningún efecto, su uso fue descartado.

Una etapa de centrifugación durante 3 min a la velocidad máxima que soportan los tubos centrifuga de vidrio usados (867 g) proporcionó una fase enriquecida flotante claramente discernible, con un volumen de aproximadamente  $65 \pm 5$   $\mu$ L.

Utilizando las condiciones finalmente seleccionadas, la gota orgánica enriquecida fue solidificada por disminución de su temperatura para comprobar si esta forma de proceder presentaba alguna ventaja. Sin embargo, al no observarse ninguna mejora solidificando la gota orgánica, no se incluyó esta etapa en el procedimiento DLLME.

La complejidad de la matriz de las muestras de orina impidió su uso directo como fase acuosa en el procedimiento DLLME optimizado para muestras de agua. Así, estas muestras tenían que someterse a un alto grado de dilución, conduciendo a una notable disminución de la sensibilidad del procedimiento propuesto. Para evitar esta etapa de dilución, se estudió la adición de un disolvente orgánico a las muestras de orina, con el

fin de extraer los analitos de la matriz. Se ensayaron diferentes volúmenes de etanol y de ACN dentro del rango de 3 a 5 mL, adicionados a 5 mL de orina conteniendo un 10% m/v de cloruro sódico. Al utilizar etanol, no se observó ningún efecto beneficioso en la etapa de extracción. Sin embargo, la adición de ACN, facilitó la precipitación de componentes de la matriz y la recogida de una segunda fase orgánica discernible, que posteriormente, puede ser utilizada como fase dispersante en la etapa de preconcentración DLLME. La adición de 3,5 mL de ACN a 5 mL de muestra de orina conteniendo un 10% m/v de cloruro de sodio permitió, tras agitación manual y centrifugación, recuperar 1 mL de la fase orgánica enriquecida con los analitos. El uso de volúmenes más elevados de ACN dio lugar a una disminución en la sensibilidad de los analitos.

### II.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para estudiar la posibilidad de la existencia de efecto matriz, se aplicó el método de adiciones estándar a tres muestras de agua y a tres muestras de orina diferentes, analizando dos alícuotas de las muestras no fortificadas y fortificadas con los analitos de interés, a tres niveles de concentración comprendidos entre 15 y 50 ng mL<sup>-1</sup>. Se llevó a cabo un estudio estadístico usando el test-t de una muestra, que compara las pendientes obtenidas para las gráficas de calibrado mediante el método de adiciones estándar a las muestras con las pendientes de las gráficas de calibrado con estándares acuosos para cada analito.

Para las muestras de agua, se confirmó la ausencia de interferencias de la matriz, ya que los valores de "p" fueron superiores a 0,05 en todos los casos. Sin embargo, en las muestras de orina, los compuestos extraídos de la matriz junto a los analitos de interés o el aislamiento no cuantitativo de los analitos en la fase de ACN, condujo a pendientes menores para la calibración por adiciones estándar a las muestras que por calibración con patrones acuosos. Para las muestras de orina, el test-t proporcionó valores de "p" inferiores a 0,05 en todos los casos.

Además, utilizando un test ANOVA de un factor al nivel de confianza del 95%, también se obtuvieron diferencias significativas entre las pendientes de las tres muestras de orina distintas. En consecuencia, se recomienda el método de adiciones estándar para la cuantificación de las muestras de orina.

Las curvas de calibración usando DLLME con LC-ESI-QqQ-MS/MS se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, representando la

concentración de analito frente al área de pico, usando cinco niveles de concentración analizados por duplicado. Se obtuvo linealidad entre 0,5 y 100 ng mL<sup>-1</sup> para las muestras de agua y entre 1,0 y 200 ng mL<sup>-1</sup> para orina, dependiendo del compuesto. Los valores de los coeficientes de regresión fueron superiores a 0,9985 en todos los casos.

Dependiendo del compuesto, los límites de detección (LODs), calculados como la concentración que proporciona una señal tres veces superior a la del ruido, estuvieron en los intervalos 5-50 y 15-250 ng L<sup>-1</sup> para aguas (Tabla II.2) y orinas (Tabla II.3), respectivamente. Los límites de cuantificación (LOQs), calculados como la concentración que proporciona una señal 10 veces superior a la del ruido, estuvieron entre 17-170 y 50-825 ng L<sup>-1</sup> para muestras de agua y orina, respectivamente, de nuevo dependiendo del compuesto.

La repetitividad se calculó usando la desviación estándar relativa (RSD) para una serie de diez análisis DLLME-LC-ESI-MS/MS consecutivos de muestras de agua (Tabla II.2) y orina (Tabla II.3), fortificadas a dos niveles de concentración diferentes. Los valores de RSD obtenidos estuvieron entre 3,6% y 10% en todos los casos.

**Tabla II.2**

Características analíticas del método DLLME con LC-MS/MS para muestras de agua

Compuestos	LOD <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	RSD <sup>c</sup> (%)	
			2 ng mL <sup>-1</sup>	20 ng mL <sup>-1</sup>
DSIL	50	170	5,4	3,9
TAD	50	170	5,1	4,3
VAR	5	17	6,2	3,6
SIL	20	70	7,1	6,8

<sup>a</sup> Calculado para S/N=3. <sup>b</sup> Calculado para S/N=10. <sup>c</sup> n=10.

Los factores de enriquecimiento (EFs), calculados como la relación de la pendiente de la curva de calibración obtenida por el método DLLME y la obtenida sin preconcentración, fueron 75 para DSIL, 77 para TAD, 81 para VAR y 78 para SIL.

**Tabla II.3**

Características analíticas del método DLLME con LC-MS/MS para muestras de orina

Compuestos	LOD <sup>a</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>b</sup> (ng L <sup>-1</sup> )	RSD <sup>c</sup> (%)	
			5 ng mL <sup>-1</sup>	20 ng mL <sup>-1</sup>
DSIL	250	825	8,8	7,6
TAD	150	500	9,0	8,5
VAR	15	50	9,6	10
SIL	50	170	9,4	8,9

<sup>a</sup> Calculado para S/N=3. <sup>b</sup> Calculado para S/N=10. <sup>c</sup> n=10.

La selectividad del método se comprobó por la ausencia de picos interferentes a los tiempos de retención de los compuestos de interés para diferentes muestras control. Los cromatogramas de muestras blanco, que no contenían los analitos, no mostraron compuestos en la matriz que dieran señales positivas falsas.

La Tabla II.4 muestra una comparación entre el método desarrollado y otros publicados con anterioridad, basados en microextracción y LC. Como ventajas del método propuesto, se pueden destacar la elevada sensibilidad alcanzada, así como la sencillez y rapidez en el tratamiento de las muestras, ya que esta etapa implica tan solo 5 min para aguas y 3 min adicionales para muestras de orina. Estos tiempos son comparables con los 15 min requeridos en las técnicas MSPE e IL-DLLME propuestas por los grupos de investigación de Tang [9] y Xiao [10], respectivamente; y significativamente más bajos que los requeridos en los métodos de extracción en fase sólida dispersa (DSPE) y SBSE, que se hallan entre 40 y 70 min. Además, hay que destacar que los LODs del procedimiento aquí desarrollado son mejores que los proporcionados a través de otros procedimientos, que se encontraron entre 0,5 y 10 ng mL<sup>-1</sup> [22-26]. Esta mejora se debe al procedimiento de microextracción.

Tabla II.4

Comparación del método propuesto con otros métodos de microextracción para determinación de inhibidores de la PDE-5

Analitos	Muestras	Tratamiento de muestra	Tiempo tratamiento (min)	Detección	Linealidad (ng mL <sup>-1</sup> )	LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Ref.
SIL y VAR	Plasma humano	LLLME	40	LC	5-1000	1 y 0,5	11
SIL y VAR	Comida saludable	SBSE	70	LC-UV	-	3,76 y 4,21	19
SIL y DSIL	Orina y plasma humano	MSPE	15	LC-DAD	5-200 y 5-400	0,41 y 0,96	9
TAD	Medicamentos	MSPE	50	LC-UV	98-1960	-	14
SIL y VAR	Suplementos dietéticos de hierbas	MSPE	50	LC-UV	46-924 y 23-936	3,66 y 4,15	15
SIL y VAR	Hierbas medicinales	MSPE	55	LD-DAD	47,5-949 y 49-977	9,49 y 9,77	16
SIL y VAR	Plasma humano	IL-DLLME	15	LC-UV	5-100 y 10 -200	1,19 y 0,92	10
SIL, DSIL, VAR y TAD	Agua y orina humana	DLLME	5 - 8	LC-MS/MS	0,5-100 para agua 1-200 para orina	0,005 - 0,05	Este trabajo

DAD: detector de diodos en serie; IL, líquido iónico; LLLME: microextracción líquido-líquido-líquido.

### II.3.4. ANÁLISIS DE MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

El procedimiento DLLME-LC-ESI-QqQ-MS/MS optimizado se aplicó al análisis de diez muestras de agua y diez muestras de orina diferentes, no detectándose ninguno de los compuestos bajo estudio.

La exactitud del procedimiento se comprobó mediante estudios de recuperación para dos muestras de agua y dos muestras de orina diferentes, fortificadas a dos niveles de concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II.5. Las dos muestras de agua seleccionadas para este estudio se obtuvieron de la misma WWTP en martes y domingo (muestras 2 y 7), considerando de esta forma, posibles comportamientos diferentes en la población a lo largo de la semana.

**Tabla II.5**

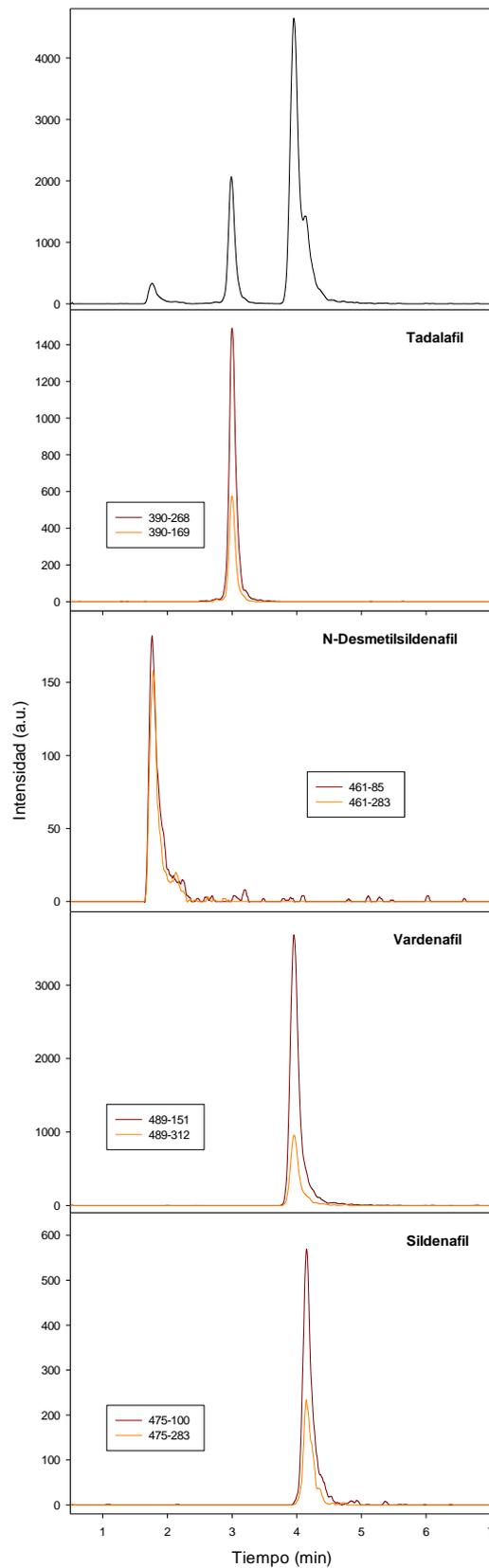
Porcentajes de recuperación de muestras fortificadas analizadas mediante DLLME

Compuestos	Nivel de fortificación (ng mL <sup>-1</sup> )	Agua 2	Agua 7	Nivel de fortificación (ng mL <sup>-1</sup> )	Orina 1	Orina 2
DSIL	2	93 ± 4	92 ± 5	5	89 ± 6	89 ± 7
	20	94 ± 5	94 ± 4	20	91 ± 6	93 ± 6
TAD	2	89 ± 6	87 ± 6	5	87 ± 5	85 ± 5
	20	90 ± 5	91 ± 6	20	90 ± 7	88 ± 8
VAR	2	98 ± 6	96 ± 5	5	94 ± 5	92 ± 7
	20	98 ± 4	99 ± 5	20	97 ± 4	98 ± 5
SIL	2	95 ± 6	90 ± 6	5	88 ± 7	91 ± 6
	20	96 ± 3	95 ± 4	20	92 ± 5	93 ± 4
Recuperación media ± desviación estándar (n = 3)						

Los valores de recuperación se obtuvieron utilizando calibración acuosa para aguas y mediante el método de adiciones estándar para las muestras de orina. Las recuperaciones para las muestras de agua fortificadas oscilaron entre 87 y 99%, con una recuperación promedio ± SD (n = 48) de 94 ± 3, mientras que para las muestras de orina fortificada estuvieron entre 85 y 98%, con una recuperación promedio ± SD (n = 48) de 91 ± 4. Los valores obtenidos para las recuperaciones promedio confirmaron la buena exactitud del método propuesto en ambos tipos de matrices.

Los analitos en las muestras fortificadas fueron identificados por sus tiempos de retención, sus transiciones, y la relación de la transición  $MRM_1/MRM_2$  entre las muestras y las obtenidas para las disoluciones estándar, considerando una variabilidad del 20%.

La Figura II.6 muestra el cromatograma de iones totales (TIC) y los cromatogramas extraídos de cada uno de los iones (EIC) obtenidos para una muestra de orina fortificada a  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  y usando el método optimizado DLLME-LC-ESI-MS/MS. Se obtuvieron similares cromatogramas para otras muestras de orina y para las muestras de agua.



**Figura II.6.** Cromatograma de iones totales (TIC) y cromatogramas de iones extraídos (dos transiciones) obtenidos para una muestra de orina fortificada ( $5 \text{ ng mL}^{-1}$ ), usando DLLME-LC-ESI-MS/MS operando en modo positivo.

## II.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se demuestra el potencial de la técnica LC-MS/MS para la determinación rápida de sildenafil, tadalafil, vardenafil y N-desmetilsildenafil, en muestras de agua y orina. Para la identificación de los inhibidores de la PDE-5 y sus metabolitos se utilizaron los patrones de fragmentación MS/MS. La elevada sensibilidad alcanzada y los cortos tiempos de análisis usando el procedimiento de microextracción confirman que el procedimiento de preparación de la muestra desarrollado sigue las directrices de QAV. Además, los fragmentos iónicos generados mediante MS/MS son marcadores característicos útiles para la identificación de los fármacos.

## II.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H.P. Rang, M.M. Dale, J.M. Ritter, P.K. Moore, *Pharmacology*, 5<sup>a</sup> ed. Elsevier, Nueva Delhi, India, 2003.
- [2] U. Gresser, C.H. Gleiter, Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil. Review of the literature, *European Journal of Medical Research*, 7 (2002) 435-446.
- [3] K. Socala, D. Nieoczym, M. Pierog, E. Wyska, M. Szafarz, U. Doboszewska, P. Wlaz, Effect of tadalafil on seizure threshold and activity of antiepileptic drugs in three acute seizure tests in mice, *Neurotoxicity Research*, 34 (2018) 333-346.
- [4] N. Mali, M. Karpe, V. Kadam, A review on biological matrices and analytical methods used for determination of drug of abuse, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1 (2011) 58-65.
- [5] B.J. Venhuis, D. de Kaste, Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: a history, analytical aspects and health risks, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69 (2012) 196-208.
- [6] S. Singh, B. Prasad, A.A. Savaliya, R.P. Shah, V.M. Gohil, A. Kaur, Strategies for characterizing sildenafil, vardenafil, tadalafil and their analogues in herbal dietary supplements, and detecting counterfeit products containing these drugs, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 28 (2009) 13-28.
- [7] M. Petrovic, M.J. López de Alda, S. Díaz-Cruz, C. Postigo, J. Radjenovic, M. Gros, D. Barcelo, Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration, *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 367 (2009) 3979-4003.
- [8] C.F. Codevilla, T.S. Castilhos, A.M. Bergold, A review of analytical methods for the determination of four new phosphodiesterase type 5 inhibitors in biological samples and pharmaceutical preparations, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49 (2013) 1-11.
- [9] M. Tang, Q. Wang, M. Jiang, L. Xu, Z.G. Shi, T. Zhang, Y. Liu, Magnetic solid-phase extraction based on methylcellulose coated-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-SiO<sub>2</sub>-phenyl for HPLC-DAD analysis of sildenafil and its metabolite in biological samples, *Talanta*, 130 (2014) 427-432.

- [10] C. Xiao, M. Tang, J. Li, C. Yin, G. Xiang, L. Xu, Determination of sildenafil, vardenafil and aildenafil in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction-back extraction based on ionic liquid and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 931 (2013) 111-116.
- [11] Z. Zhang, S. Kang, M. Xu, M. Ma, B. Chen, S. Yao, Determination of sildenafil and vardenafil in human plasma by high performance liquid chromatography coupled with liquid-liquid-liquid microextraction, *Chinese Journal of Chromatography*, 23 (2005) 358-361.
- [12] A.A. Bunaciu, R.M. El Nashar, H.Y. Aboul-Enein, Mini review: determination of sildenafil citrate in pharmaceutical preparations, *Analytical Letters*, 44 (2011) 2085-2093.
- [13] 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, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87 (2014) 176-190.
- [14] Y. Li, M.J. Ding, S. Wang, R.Y. Wang, X.L. Wu, T.T. Wen, L.H. Yuan, P. Dai, Y.H. Lin, X.M. Zhou, Preparation of imprinted polymers at surface of magnetic nanoparticles for the selective extraction of tadalafil from medicines, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3 (2011) 3308-3315.
- [15] M. Ding, X. Wu, L. Yuan, S. Wang, Y. Li, R. Wang, T. Wen, S. Du, X. Zhou, Synthesis of core-shell magnetic molecularly imprinted polymers and detection of sildenafil and vardenafil in herbal dietary supplements, *Journal of Hazardous Materials*, 191 (2011) 177-183.
- [16] 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.
- [17] S. Magiera, J. Hejniak, J. Baranowski, Comparison of different sorbent materials for solid-phase extraction of selected drugs in human urine analyzed by UHPLC-UV, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 958 (2014) 22-28.
- [18] A. Gjelstad, K.F. Seip, Sample extraction techniques for biological samples: recent advances and novel applications, *Bioanalysis*, 7 (2015) 2133-2134.

- [19] Y. Wang, J. Wu, C. Xue, R. Wang, T. Wen, J. Hong, Q. Hu, F. Li, X. Zhou, Dumbbell-shaped stir bar coated with dendrimer-based MIPs for selective extraction and analysis of vardenafil and its analogue sildenafil in health foods, *Analytical Methods*, 5 (2013) 4494-4500.
- [20] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 1-9.
- [21] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 2067-2099.
- [22] S.K. Lee, Y. Kim, T.K. Kim, G.J. Im, B.Y. Lee, D.H. Kim, C. Jin, H.H. Yoo, Determination of mirodenafil and sildenafil in the plasma and corpus cavernous of SD male rats, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (2009) 513-518.
- [23] S. Lee, S.Y. Kang, D. Ji, S. Baeck, 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, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405 (2013) 3185-3194.
- [24] P. Proenca, C. Mustra, M. Marcos, J.M. Franco, F. Corte-Real, D. Nuno Vieira, Validated UPLC-MS/MS assay for the determination of synthetic phosphodiesterase type-5 inhibitors in postmortem blood samples, *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20 (2013) 655-658.
- [25] Y. Yokoyama, M. Tomatsuri, H. Hayashi, K. Hirai, Y. Ono, Y. Yamada, K. Todoroki, T. Toyo'oka, H. Yamada, K. Itoh, Simultaneous microdetermination of bosentan, ambrisentan, sildenafil, and tadalafil in plasma using liquid chromatography/tandem mass spectrometry for pediatric patients with pulmonary arterial hypertension, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89 (2014) 227-232.
- [26] M. Simiele, D. Pensi, D. Pasero, F. Ivaldi, M. Rinaldi, G. Di Perri, V.M. Ranieri, A. D'Avolio, Development and validation of an ultra performance liquid chromatography tandem mass method for sildenafil and N-desmethyl sildenafil plasma determination and quantification, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1001 (2015) 35-40.

# **Capítulo III**

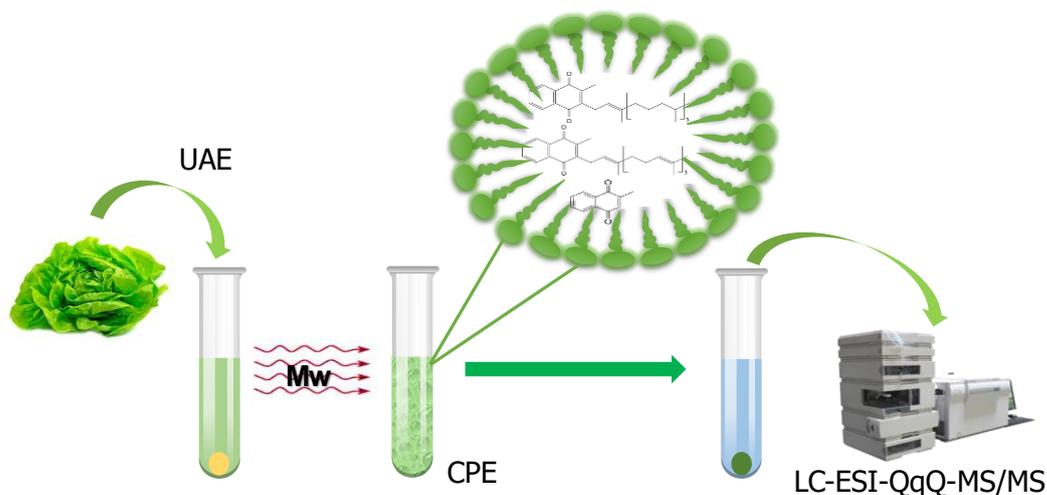
**EXTRACCIÓN EN PUNTO DE NUBE ASISTIDA  
POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN  
DE VITAMINA K MEDIANTE CROMATOGRFÍA  
LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**



## EXTRACCIÓN EN PUNTO DE NUBE ASISTIDA POR MICROONDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA K MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

### RESUMEN

En este capítulo se describe un método para la determinación simultánea de tres formas de la vitamina K, filoquinona o vitamina K<sub>1</sub> (PK), menaquinona o vitamina K<sub>2</sub> (MK-4) y menadiona o vitamina K<sub>3</sub> (MD), en vegetales utilizando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS) y analizador de triple cuadrupolo (QqQ). Los analitos se aislaron de la matriz de la muestra (1-1,5 g) mediante extracción asistida por ultrasonidos (UAE) usando 2 mL de acetonitrilo, siendo dicho extracto sometido a extracción en punto de nube (CPE) asistida por microondas y empleando Tritón X-45 como surfactante. Los factores de enriquecimiento obtenidos se encontraron entre 20 y 50, dependiendo de la vitamina en cuestión. Los compuestos de interés se determinaron mediante LC-ESI-QqQ-MS/MS en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), proporcionando identificación inequívoca y cuantificación, con límites de detección de 0,8, 1,0 y 16 ng g<sup>-1</sup> para MK, PK y MD, respectivamente. Los ensayos de recuperación para muestras fortificadas a dos niveles de concentración, 40 y 600 ng g<sup>-1</sup> dependiendo del compuesto, proporcionaron porcentajes de recuperación en el intervalo 90-114%. Solo se detectó PK en las muestras analizadas, en concentraciones comprendidas entre 90 y 2350 ng g<sup>-1</sup>.

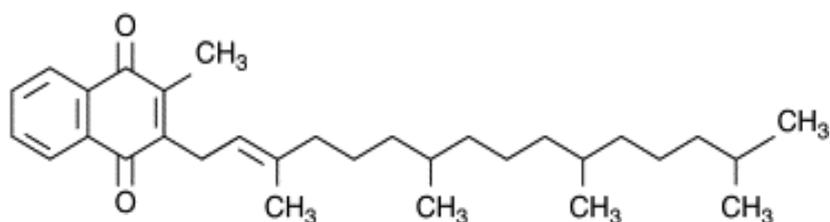




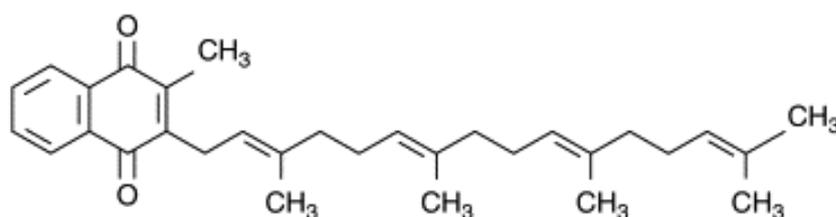
### III.1. INTRODUCCIÓN

La vitamina K comprende dos familias de compuestos, la vitamina K<sub>1</sub> o filoquinona (PK) y la vitamina K<sub>2</sub> o menaquinona (MK-n). Ambos compuestos contienen en su estructura un anillo 2-metil-1,4-naftoquinona, diferenciándose en el sustituyente de la posición tres de la naftoquinona, que para PK es una cadena fitílica y para MK es una cadena lateral con unidades isoprenoides repetidas. Mientras que PK se encuentra en la naturaleza como un compuesto único, MK comprende una serie de vitaminas conteniendo de 3 a 14 unidades de isopreno (MK-3 a MK-14) [1, 2].

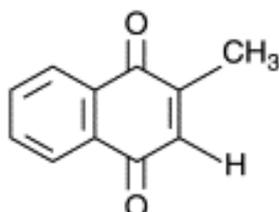
Las vitaminas PK y MK son formas naturales de la vitamina K, mientras que la vitamina K<sub>3</sub> o menadiona (MD) es un derivado sintético utilizado como producto farmacéutico, aunque se ha descrito la formación de MD mediante ruptura, por acción de bacterias intestinales, de PK suministrada en la dieta [3]. En la Figura III.1 se muestran las estructuras químicas de las vitaminas estudiadas.



Filoquinona o vitamina K<sub>1</sub> (PK)



Menaquinona o vitamina K<sub>2</sub> (MK)



Menadiona o vitamina K<sub>3</sub> (MD)

**Figura III.1.** Estructura de las formas estudiadas de vitamina K.

En materia de salud humana, las principales funciones de la vitamina K se hallan relacionadas con la coagulación sanguínea, la reducción de la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares [1, 3]. Estudios recientes muestran distintas perspectivas de la vitamina K en el tratamiento de la diabetes tipo 2, debido al papel que juega esta vitamina en el metabolismo de la glucosa [4].

La forma química de la vitamina K que se encuentra con mayor frecuencia en alimentos es PK, la cual es producida por todas las plantas y algas verdes, donde actúa como receptor de electrones durante la fotosíntesis. La intensidad del color verde en los vegetales está asociada generalmente con el contenido de PK, aunque también se ha descrito la influencia del contenido de esta vitamina en el crecimiento de las plantas [5, 6]. Aunque la vitamina K<sub>1</sub> presenta una distribución ubicua en la dieta humana, los alimentos con mayor contenido son los vegetales de hoja verde y los aceites vegetales [1].

La síntesis de MK es llevada a cabo por una bacteria que se encuentra en la flora intestinal, actuando como portador de electrones en la cadena de transporte involucrada en la respiración [1]. Esta variante de la vitamina K se encuentra en carne, productos lácteos y alimentos fermentados como el queso [7].

El interés en la MD, que actúa como precursor de la vitamina K y como inductor de las transiciones de permeabilidad mitocondrial, ha aumentado en los últimos años debido, entre otras razones, a su actividad contra células cancerosas [3].

La cromatografía líquida (LC) acoplada a detectores ultravioleta (UV) [5, 6, 8-13] y de fluorescencia (FLD) [14-21] se ha aplicado para la determinación de vitamina K en una amplia variedad de muestras, siendo necesaria una etapa de derivatización de los analitos cuando se utiliza FLD. Sin embargo, las ventajas inherentes a la espectrometría de masas (MS) le han convertido en el sistema de detección preferentemente seleccionado para la determinación de estos compuestos.

Así, la bibliografía muestra aplicaciones de LC acoplada a MS y MS en tándem (MS/MS) con ionización química a presión atmosférica (APCI) [9, 10, 13, 22-27] e ionización por electrospray (ESI) [3, 28-31], ambas fuentes de ionización trabajando en modo positivo. Cuando se ha utilizado MS para la determinación de MD, se ha detectado una disminución de la sensibilidad con respecto a PK y MK, lo que puede explicarse por las diferencias entre la estructura química de MD frente a PK y MK [3].

Los alimentos que se analizan con mayor frecuencia para la determinación de vitamina K son frutas y vegetales [5, 6, 9, 13, 15, 18, 19, 23, 26, 28, 30, 31], aceites

vegetales [6, 8, 12], productos lácteos y alimentos infantiles [10, 12, 14, 21, 22, 29, 32]. El tratamiento de la muestra debe evitar condiciones que puedan afectar a la estabilidad de las vitaminas, como la exposición a la luz ultravioleta, así como medios fuertemente alcalinos y ácidos [2]. Las matrices de alimentos de naturaleza lipídica, como la leche, requieren de una etapa previa de hidrólisis, de este modo, los lípidos neutros pueden ser eliminados por saponificación [10, 12, 22] o digestión enzimática [21, 29]. La extracción en disolventes orgánicos como hexano para aislar las vitaminas de la matriz de la muestra y la posterior purificación del extracto obtenido por medio de extracción en fase sólida (SPE) ha sido ampliamente discutida [5, 15, 18, 19, 23, 25, 28, 30]. La bibliografía también muestra procedimientos basados en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [9, 14] y extracción acelerada con disolventes (ASE) [23] para el aislamiento de vitamina K en distintos tipos de alimentos.

Las técnicas miniaturizadas para el tratamiento de la muestra permiten obtener altos factores de enriquecimiento con un mínimo impacto ambiental. Así, las técnicas de microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [13] y microextracción en fase sólida (SPME) [33] han demostrado su efectividad en la preconcentración de vitamina K. Los coacervados formados a partir de surfactantes no iónicos se han utilizado extensivamente en la preconcentración de compuestos hidrofóbicos, dando lugar a la técnica conocida como extracción en punto de nube (CPE) [34]. El uso de surfactantes, frente a los disolventes orgánicos tóxicos e inflamables empleados normalmente en los métodos de extracción convencionales, coloca a CPE como procedimiento de microextracción verde de valor añadido. En el caso de MD, las posibilidades de CPE fueron previamente exploradas mediante determinación espectrofotométrica [35] y para PK usando LC-UV [36], esta última aplicación sin fines de cuantificación.

Teniendo en cuenta las características ventajosas de CPE, para limitar el uso de disolventes orgánicos en la etapa de preconcentración, en este capítulo se describe un nuevo procedimiento para la determinación de PK, MK y MD en vegetales mediante LC-ESI-QqQ-MS/MS.

## III.2. PARTE EXPERIMENTAL

### III.2.1. REACTIVOS

Filoquinona (PK, vitamina K<sub>1</sub>, fórmula molecular: C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>), menaquinona-4 (MK-4, vitamina K<sub>2</sub>, fórmula molecular: C<sub>31</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>) y menadiona (MD, vitamina K<sub>3</sub>, fórmula

molecular:  $C_{11}H_8O_2$ ) fueron adquiridas en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Las disoluciones madre individuales de  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  de PK, MK-4 y MD se prepararon en etanol. Con el fin de prevenir la fotodegradación de las vitaminas, estas disoluciones madre se guardaron en viales ámbar a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las disoluciones estándar de trabajo se prepararon diariamente en etanol y se guardaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

El surfactante no iónico utilizado fue polietilenglicol 4-*tert*-octilfenil éter (Tritón X-45) y fue proporcionado por Fluka (Buchs, Suiza), siendo usado al 15% (m/v) en disolución acuosa. Otros surfactantes empleados fueron *tert*-octil-fenoxipolietoxietanol (Tritón X-100) y octil-fenoxipolietoxietanol (Tritón X-114).

Cloruro de sodio (99,5% de pureza), acetato de amonio y ácido fórmico fueron obtenidos de Fluka. La disolución 5 M de formiato de amonio (Agilent, Waldbronn, Alemania) fue convenientemente diluida y usada en la fase móvil. Metanol, etanol, acetonitrilo e isopropanol se obtuvieron de Sigma.

### III.2.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema cromatográfico utilizado consistió en un equipo Agilent 1200 HPLC provisto de una bomba binaria (G1311A) y un compartimento termostático para la columna cromatográfica (Agilent 1200, G1316B), operando bajo las condiciones indicadas en la Tabla III.1. Se utilizó un muestreador automático para la inyección en el sistema LC, manteniéndose las disoluciones en microinsertos de vidrio de  $250 \mu\text{L}$  provistos de pies poliméricos, colocados dentro de viales de 2 mL de capacidad.

El sistema LC se acopló a un espectrómetro de masas Agilent G6410A operando bajo las condiciones experimentales especificadas en la Tabla III.1. Los espectros de masas registrados estuvieron dentro del rango entre 50 y 700  $m/z$  una. Para la adquisición de datos, el control del instrumento y el análisis cualitativo y cuantitativo, se utilizó el software Agilent MassHunter Data Acquisition (Qualitative and Quantitative Analysis).

Para identificar las transiciones óptimas de cada vitamina se emplearon disoluciones individuales de cada analito, a un nivel de concentración de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , introducidas directamente por infusión en la fuente de iones, aplicando varios voltajes de fragmentación y energías de colisión. Las transiciones finalmente seleccionadas se muestran en la Tabla III.2.

Para la identificación inequívoca de los compuestos se utilizaron los tiempos de retención y las distintas transiciones MRM que implican la formación de los iones producto con los valores de  $m/z$  más elevados. La transición más sensible se utilizó con fines de cuantificación.

**Tabla III.1**

Condiciones experimentales del sistema LC-ESI-QqQ-MS/MS

Separación cromatográfica	
Columna analítica	Tracer Extrasil ODS2 (150 x 4 mm, 5 $\mu$ m de tamaño de partícula)
Temperatura de la columna	35 °C
Composición de la fase móvil	Disolvente A: Disolución acuosa de formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 0,1% v/v Disolvente B: Disolución metanólica de formiato de amonio 10 mM y ácido fórmico 0,1% v/v
Gradiente de elución	0-3 min 10:90 A:B 4 min 100% B (mantenida 13 min) 18 min 10:90 A:B (mantenida 3 min)
Flujo de fase móvil	0,6 mL min <sup>-1</sup>
Sistema de detección MS/MS	
Condiciones del sistema de ionización	ESI: modo ion positivo Voltaje del capilar: 3000 V Presión del nebulizador: 40 psi Flujo del gas de secado: 9 L min <sup>-1</sup> Temperatura del gas de secado: 350 °C
Gas nebulizador y de colisión	Nitrógeno
Analizador	Triple cuadrupolo

En el tratamiento de la muestra se utilizó un homogeneizador IKA A11 (IKA Works, INC., Wilmington, NC, USA), una sonda de ultrasonidos (Dr. Hielscher, Teltow, Alemania) equipada con un sonotrodo de titanio de 7 mm de diámetro interno y una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania). En la etapa CPE se utilizó un microondas doméstico.

Tabla III.2

Condiciones analíticas de las vitaminas estudiadas.

Vitamina	Peso molecular	t <sub>R</sub> (min)	Modo de ionización	Transiciones (m/z)	Voltaje del fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	Abundancia (%)
Menadiona (MD)	172,18	2,85	[M+H] <sup>+</sup>	173 <sup>a</sup> → 77	110	40	
				173 → 105	110	20	83
				173 → 42	110	50	42
Menaquinona (MK-4)	444,65	12,24	[M+H] <sup>+</sup>	445 <sup>a</sup> → 187	130	15	
				445 → 81	130	40	99
				445 → 363	130	5	12
Filoquinona (PK)	450,70	17,20	[M+H] <sup>+</sup>	451 <sup>a</sup> → 187	140	20	
				451 → 57	140	40	22
				451 → 185	140	20	17

<sup>a</sup> Transición usada para cuantificación.

### III.2.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

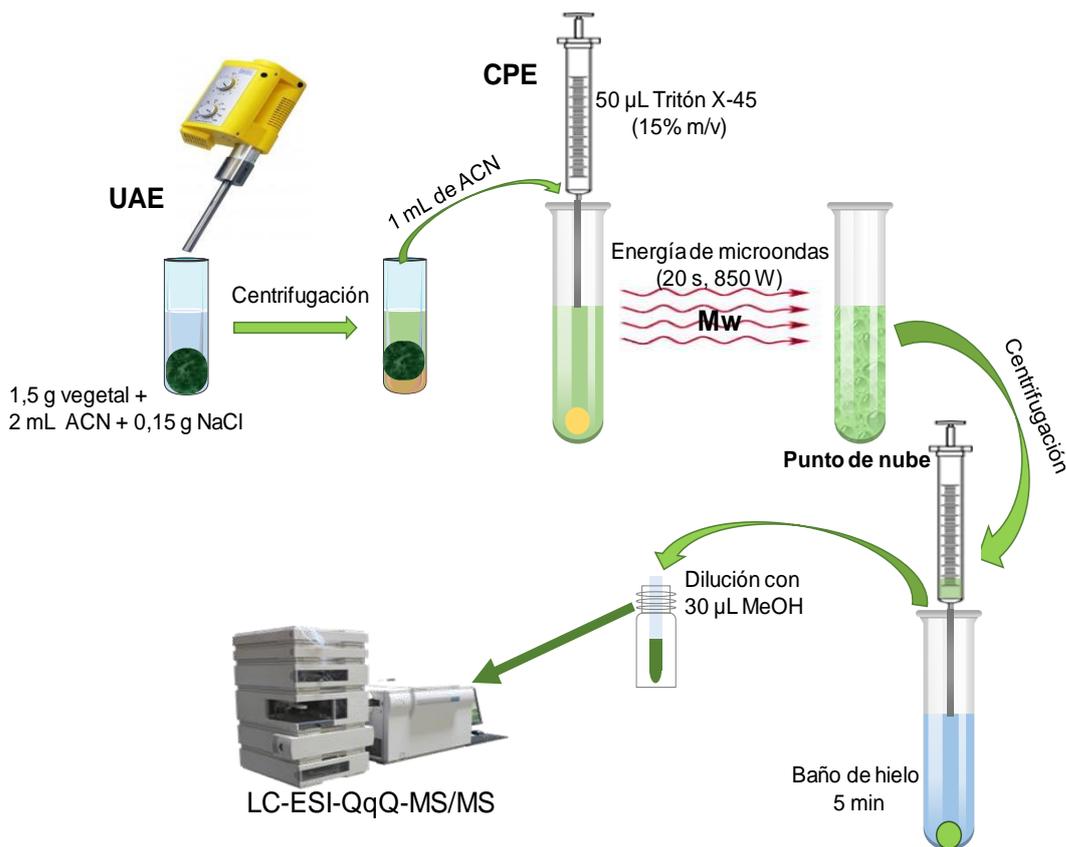
Un total de diez vegetales distintos (lechuga iceberg, lechuga romana, escarola, canónigos, col rizada, espinacas, berro, nabo, chirivía y zanahoria) fueron adquiridos en un supermercado local. Las muestras se lavaron con agua destilada y se dejaron secar para eliminar el agua de lavado. Para evitar el deterioro de las vitaminas, las muestras se conservaron a 4 °C y evitando su exposición a la luz, hasta su análisis, que se realizó generalmente en las 48 horas siguientes a su llegada al laboratorio. Todas las muestras fueron troceadas manualmente en porciones de aproximadamente 0,5 cm y homogeneizadas usando un homogeneizador eléctrico.

Para aislar las vitaminas de la matriz sólida de las muestras se aplicó una etapa de extracción asistida por ultrasonidos (UAE). Para ello, se pesó entre 1 y 1,5 g de muestra homogeneizada (dependiendo del contenido de vitamina) en un tubo de centrífuga de 15 mL, conteniendo 0,15 g de cloruro de sodio. Seguidamente se añadieron 2 mL de acetonitrilo y se sonicó la mezcla mediante la inmersión directa de la sonda de ultrasonidos, durante 1 minuto y operando con pulsos de 0,75 s y 105  $\mu$ m de amplitud. Seguidamente, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min. Se recogió 1 mL de acetonitrilo sobrenadante y se diluyó con 5 mL de una disolución de acetato de amonio (0,01 M, pH 7), que contenía 0,04% m/v de cloruro de sodio.

A continuación, se adicionaron 50  $\mu$ L de una disolución acuosa de Tritón X-45 al 15% m/v, siendo la mezcla agitada manualmente durante unos pocos segundos, antes de colocarse en un baño de agua para ser introducida en un horno microondas doméstico operando a potencia máxima durante 20 s, lo que dio lugar a la aparición de turbidez en la disolución. Las vitaminas fueron extraídas en las pequeñísimas gotas del coacervado dispersadas en el seno de la disolución de la muestra.

Para facilitar la separación de la fase acuosa y la fase rica en surfactante se sumergió el tubo en un baño de hielo durante 5 min. La fase enriquecida con los analitos (volumen aproximado 15  $\mu$ L) sedimentó en el fondo del tubo cónico y fue recogida utilizando una microjeringa. La gota recuperada se colocó en un microinserto y se diluyó con 30  $\mu$ L de metanol, antes de ser inyectados 20  $\mu$ L en el sistema cromatográfico usando un inyector automático.

En la Figura III.2 se muestra un esquema del procedimiento seguido para la determinación de las tres vitaminas K en vegetales.



**Figura III.2.** Esquema del procedimiento analítico para determinar vitaminas K en muestras vegetales mediante CPE.

Como control de calidad positivo de la muestra, se utilizó una mezcla de los analitos a una concentración de  $50 \text{ ng mL}^{-1}$  para PK y MK y  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  para MD, preparada en etanol. Esta mezcla estándar se analizó antes de cada lote de muestras y entre análisis se almacenó a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , siendo verificada su estabilidad durante un mes. Además, también se utilizó un blanco de muestra (chirivía) también como muestra de control de calidad.

La precisión del método propuesto se estudió por análisis de diez alícuotas de 1,5 g de chirivía homogeneizada y fortificada por adición de  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de una disolución patrón preparada en etanol y conteniendo las vitaminas a la concentración de  $1,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para PK y MK y  $3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para MD, lo que condujo a niveles de fortificación de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  para PK y MK y de  $200 \text{ ng g}^{-1}$  para MD. Las alícuotas de muestra fortificadas se homogeneizaron durante 5 min y se mantuvieron en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, antes de proceder a su análisis, con el fin de establecer la precisión dentro del mismo día y en días diferentes.

### III.2.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación, se fortificaron alícuotas de muestra de 1 a 1,5 g previamente homogeneizadas por adición de volúmenes comprendidos entre 50 y 225  $\mu\text{L}$  de una disolución estándar preparada en etanol y conteniendo las vitaminas a concentraciones de  $0,8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para PK y MK y  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  para MD. Los niveles de fortificación se hallaron en los intervalos de 40 a  $120 \text{ ng g}^{-1}$  para PK y MK y de 200 a  $600 \text{ ng g}^{-1}$  para MD. Las muestras fortificadas se homogeneizaron durante 5 min y se mantuvieron en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de permitir que los analitos interactuaran con la matriz y se distribuyeran de manera uniforme, antes de proceder a su análisis, aplicando el protocolo descrito en el apartado anterior.

Este procedimiento de fortificación se aplicó a dos muestras diferentes (lechuga iceberg y nabo) y se analizaron por separado tres alícuotas de cada muestra a cada nivel de concentración. También se obtuvieron los porcentajes de recuperación cuando el proceso de fortificación se llevó a cabo tras la aplicación de las etapas de UAE y CPE.

## III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### III.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Se utilizó cromatografía líquida en fase reversa llevándose a cabo la selección de las condiciones de separación mediante inyección directa de  $20 \mu\text{L}$  de una disolución estándar conteniendo las vitaminas a la concentración de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Se emplearon diferentes mezclas de los disolventes A (disolución acuosa de ácido fórmico 0,1% v/v y formiato de amonio 10 mM) y B (disolución metanólica de ácido fórmico 0,1% v/v y formiato de amonio 10 mM).

El programa de elución seleccionado finalmente consistió en una etapa isocrática de 3 min con una mezcla 10:90 v/v de los disolventes A y B, durante la que eluyó MD, después se aplicó un gradiente lineal de 1 min alcanzando el 100% del disolvente B, composición que se mantuvo durante 13 min para la elución de MK y PK. Por último, se restablecieron las condiciones iniciales en 1 min, que se mantuvieron 3 min antes de la siguiente inyección. El flujo de la fase móvil que se adoptó fue de  $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ , ya que proporcionó buena separación y sensibilidad para los analitos (Tabla III.1).

Los tiempos de retención de cada vitamina mostraron una desviación estándar, dependiendo del compuesto, en el rango de 0,02 a 0,06 min para 10 análisis consecutivos

llevados a cabo en el mismo día y entre 0,03 y 0,16 min, para 10 análisis llevados a cabo en días diferentes.

### III.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

La etapa de preparación de muestra en la determinación de vitaminas liposolubles en alimentos incluye generalmente una saponificación, extracción sólido-líquido y extracción líquido-líquido, en ocasiones con hidrólisis enzimática [37]. El proceso de saponificación cáustica es muy eficaz en la extracción de vitaminas liposolubles para la eliminación de interferencias de origen lipídico, pero debido a la inestabilidad de la vitamina K en condiciones alcalinas, no es recomendable su utilización. Por ello, se eligió una extracción directa sólido-líquido en acetonitrilo, ya que previamente se ha demostrado su eficacia para el aislamiento de vitamina K desde matrices vegetales [13]. Además, teniendo en cuenta la influencia de la luz y el calor en la estabilidad de estos analitos, el tratamiento de la muestra se llevó a cabo a temperatura ambiente y evitando al máximo la exposición a la luz.

Para la optimización de esta etapa, se utilizó una muestra de lechuga romana, fortificada con MD y PK a una concentración de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Se ensayaron diferentes masas de muestra, entre 1 y 3 g, y diferentes volúmenes de acetonitrilo, comprendidos entre 1 y 3 mL. La homogeneización de las muestras se llevó a cabo usando un agitador orbital operando a máxima potencia durante 5 min, y centrifugando seguidamente a 3000 rpm durante otros 5 min. Las señales analíticas más altas se obtuvieron para 1,5 g de masa de muestra extraída con 2 mL de acetonitrilo, siendo esta la proporción utilizada para los experimentos posteriores.

El efecto de la aplicación de ultrasonidos usando un baño de agua durante 5 min, operando a una frecuencia de 40 kHz, se comparó con el obtenido al sumergir una sonda directamente en la mezcla de muestra y acetonitrilo durante 1 min. Las áreas de los picos obtenidos para las tres vitaminas utilizando la sonda de ultrasonidos fueron cuatro veces mayores que las obtenidas con el baño de agua. A la luz de estos resultados, la etapa de UAE se aplicó mediante la inmersión directa de la sonda, ya que demostró su mayor eficacia para la extracción de los analitos con acetonitrilo en muestras vegetales. Además, se constató que la aplicación de ultrasonidos durante un tiempo más prolongado no aumentaba la eficacia de la extracción.

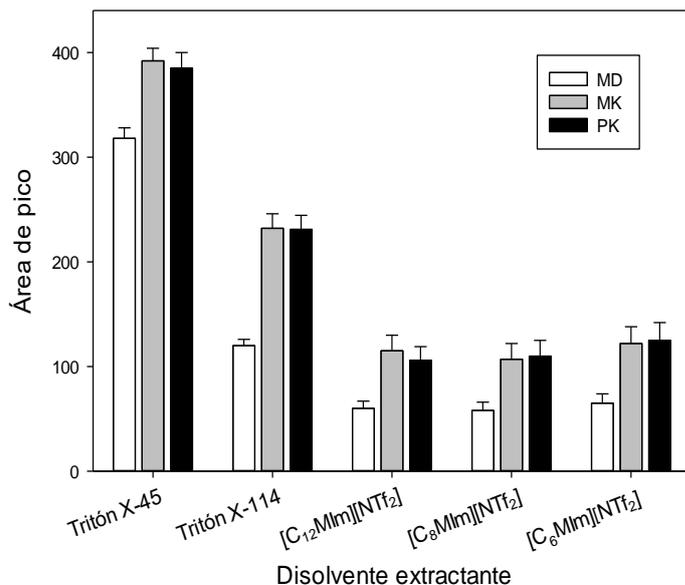
La adición de cloruro de sodio a la mezcla de muestra y acetonitrilo mejoró la transferencia de las vitaminas a la fase orgánica y, además, facilitó la separación de las fases. Cuando se adicionaron diferentes masas de NaCl, comprendidas entre 0,1 y 0,5 g, los mejores resultados se encontraron con 0,15 g de sal, mientras que la sensibilidad disminuyó para cantidades superiores. Por ello, se seleccionó la masa de 0,15 g de sal para los ensayos posteriores.

### III.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN

Inicialmente se estudió la posibilidad de utilizar la técnica de DLLME con líquidos iónicos (IL-DLLME) como disolventes extractantes, para la preconcentración de las vitaminas K. Se probaron los siguientes ILs de bis(trifluorometilsulfonil) imida: 1-hexil-3-metilimidazolio [ $C_6MIm][NTf_2]$ ), 1-metil-3-octilimidazolio ( $[C_8MIm][NTf_2]$ ) y 1-dodecil-3-metilimidazolio ( $[C_{12}MIm][NTf_2]$ ), utilizando un volumen de 100  $\mu$ L de IL, 0,5 mL de acetonitrilo como disolvente dispersante y 10 mL de fase acuosa conteniendo los analitos a una concentración de 100 ng mL<sup>-1</sup>. La fase enriquecida de IL recuperada tras la centrifugación (entre 25 y 30  $\mu$ L) fue diluida, antes de su inyección en el sistema LC, por adición de 30  $\mu$ L de metanol con objeto de disminuir la viscosidad del extracto. Además, se ensayó la extracción mediante la formación *in situ* del IL [ $C_6MIm][NTf_2]$ ), añadiendo 50  $\mu$ L de sus componentes iónicos, no observándose diferencias significativas en relación a la adición de IL ya formado. Se descartó la aplicación de IL-DLLME, ya que la capacidad de extracción de los diferentes ILs estudiados fue, en todos los casos, en torno a la tercera parte de la proporcionada por CPE (Figura III.3), siendo esta última metodología adoptada con fines de preconcentración.

Los surfactantes empleados como extractantes para CPE fueron Tritón X-45, Tritón X-100 y Tritón X-114, utilizando volúmenes de 100  $\mu$ L de disoluciones acuosas de los surfactantes de concentración 15% m/v y calentando la mezcla de extracción durante 10 min en un baño de agua, hasta la correspondiente temperatura de punto de nube de cada extractante.

Cuando se utilizó como agente extractante Tritón X-100, no se obtuvo fase discernible de tensioactivo tras la centrifugación, por lo que se descartó este surfactante. Las eficiencias de extracción de Tritón X-45 y Tritón X-114 se muestran en la Figura III.3, donde puede observarse que la sensibilidad más alta se alcanzó con Tritón X-45, por lo que se seleccionó como agente extractante.



**Figura III.3.** Influencia de la naturaleza de la fase extractante en la microextracción. Las líneas verticales indican la desviación estándar para  $n=3$ .

Las diferentes variables experimentales que afectan a la eficiencia de extracción con CPE se optimizaron mediante un diseño ortogonal Taguchi [38] aplicado para cuatro factores, cada uno de ellos a tres niveles: volumen de surfactante, volumen de fase acuosa, concentración de cloruro de sodio y tiempo de calentamiento (Tabla III.3).

Para llevar a cabo este estudio, se utilizó 1 mL del extracto de acetonitrilo obtenido en la etapa UAE aplicada a lechuga romana, fortificado con MK y MD a  $300 \text{ ng mL}^{-1}$ , y se diluyó con diferentes volúmenes de agua comprendidos entre 5 y 9 mL.

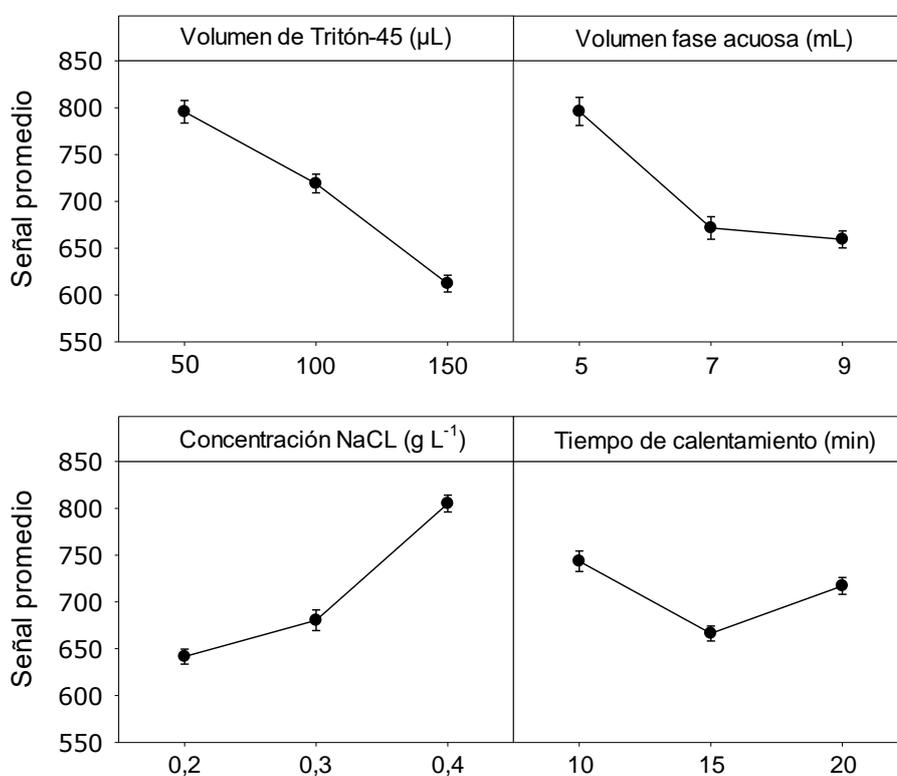
Se ensayaron volúmenes de fase extractante comprendidos entre 50 y 150  $\mu\text{L}$ . El efecto de la fuerza iónica en la fase acuosa se estudió utilizando concentraciones de cloruro de sodio dentro del rango de 0,2 a 0,4  $\text{g L}^{-1}$ . Cuando la mezcla se calentó por encima de la temperatura de punto de nube del surfactante, que dependiendo de la concentración se halla entre 25 y 38  $^{\circ}\text{C}$  [39], se formó el coacervado, siendo detectada turbidez en la disolución. El tiempo de calentamiento se estudió entre 10 y 20 min, usando un baño de agua. En todos los ensayos, la mezcla se centrifugó a 3500 rpm durante 3 min. Tras la centrifugación y con el fin de facilitar la separación de las fases, se enfrió la mezcla a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. Finalmente, se inyectaron en el sistema cromatográfico 20  $\mu\text{L}$  de fase extractante previamente diluida con metanol.

**Tabla III.3**

Variables estudiadas en el diseño ortogonal Taguchi para el método CPE

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Volumen de Tritón X-45 ( $\mu\text{L}$ )	50	100	150
Volumen de fase acuosa (mL)	5	7	9
Concentración de NaCl ( $\text{g L}^{-1}$ )	0,2	0,3	0,4
Tiempo de calentamiento (min)	10	15	20

Los efectos de los cuatro factores estudiados sobre la eficiencia media de extracción de las vitaminas se muestran en la Figura III.4. Los mejores resultados se obtuvieron con el menor volumen de surfactante y de fase acuosa. Los efectos de dilución se ven lógicamente minimizados con el uso de 50  $\mu\text{L}$  de Tritón X-45. La alta eficiencia de extracción proporcionada por la técnica CPE, incluso a bajas concentraciones de surfactante, queda aquí verificada [34]. Cuando se ensayaron volúmenes inferiores de surfactante, la recogida de la fase enriquecida fue muy difícil, debido a la cantidad mínima recuperada. Respecto a la fuerza iónica de la fase acuosa, se observaron las áreas de pico más altas con una concentración de sal igual a 0,4  $\text{g L}^{-1}$ .

**Figura III.4.** Efecto de cuatro factores en la eficiencia de extracción de las vitaminas.

En la práctica, resulta más conveniente sustituir la etapa de calentamiento en baño de agua por la utilización de un horno microondas, ya que con ello se consigue acortar considerablemente el tiempo de análisis [40]. Además, utilizando un microondas doméstico se obtuvo incluso una mayor sensibilidad en la etapa CPE, calentando durante 20 s, lo que corresponde a aproximadamente 50 °C, temperatura suficiente para alcanzar el punto de nube del Tritón X-45.

La influencia del pH de la fase dadora se estudió usando disoluciones reguladoras 0,01 M, como fase acuosa, con valores de pH comprendidos entre 3 y 9. La sensibilidad de las tres vitaminas se incrementó hasta pH 7, disminuyendo para valores de pH superiores, seleccionando este pH para realizar ensayos posteriores.

Obsérvese que el volumen de la fase extractante recuperada (15 µL) se diluyó por adición de 30 µL de metanol para reducir la viscosidad de la disolución, facilitando su paso a través del sistema cromatográfico. En consecuencia, se puede afirmar que el procedimiento CPE optimizado permite la preconcentración de las vitaminas K eficazmente, pudiendo ser catalogado como procedimiento rápido, verde y de fácil aplicación.

### III.3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Se aplicó un test ANOVA para comparar las pendientes de las gráficas de calibración estándar y las obtenidas a través del método de adiciones estándar aplicado sobre tres muestras diferentes, con objeto de comprobar la relevancia de cualquier efecto matriz. Dado que para las tres vitaminas se obtuvieron valores de “p” superiores a 0,05 en todos los ensayos, se confirmó la ausencia de efecto matriz. Por tanto, se propone el procedimiento de calibración con estándares externos con fines cuantitativos. Para ello, los patrones se prepararon en una mezcla acetonitrilo:agua en la proporción 1:5, siendo sometidos a la etapa de preconcentración CPE optimizada antes de su inyección en el sistema LC.

El método propuesto, CPE combinado con LC-ESI-QqQ-MS/MS, se validó a través de los parámetros de linealidad, límites de detección (LODs), límites de cuantificación (LOQs) y repetitividad. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados del área de pico frente a la concentración de analito, utilizando seis niveles de concentración. Se encontró comportamiento lineal entre 15 y 500 ng mL<sup>-1</sup> para MD y entre 1 y 500 ng mL<sup>-1</sup> para MK

y PK. Los valores de las pendientes de calibración obtenidas, expresadas como el valor medio  $\pm$  desviación estándar ( $n=6$ ), fueron  $59\pm 4$ ,  $894\pm 49$  y  $825\pm 71$  mL ng<sup>-1</sup> para MD, MK y PK, respectivamente. En todos los casos se obtuvieron coeficientes de regresión superiores a 0,9970.

Los valores de LOD y LOQ se calcularon sobre la base de tres y diez veces, respectivamente, el valor de la desviación estándar de la ordenada en el origen de las curvas de calibración. Los LOD obtenidos para MD, MK y PK fueron 4, 0,20 y 0,25 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Los valores encontrados de LOQ para MD, MK y PK fueron 13, 0,7 y 0,8 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando el tratamiento de muestra optimizado los LOD y LOQ variaron dentro de los intervalos 0,8-16 y 2,8-52 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente, dependiendo del compuesto. El valor de LOD obtenido para PK (0,8 ng g<sup>-1</sup>) permite su detección en vegetales, de los que un consumo de 100 g contribuye en un 0,1% a la ingesta diaria recomendada para una persona adulta (1  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> de peso corporal al día), establecida por la comisión técnica de productos dietéticos, nutrición y alergias de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) [41].

El estudio de la precisión del método se llevó a cabo en base a repetitividad y reproducibilidad, expresándose como la desviación estándar relativa (RSD) para diez análisis llevados a cabo en el mismo día y en días distintos, utilizando una muestra de chirivía fortificada a 100 ng g<sup>-1</sup> de PK y MK y 200 ng g<sup>-1</sup> de MD. Los valores de RSD fueron 8,8 y 9,2% para PK, 5,1 y 6,3% para MK y 10,5 y 10,9% para MD, para la precisión en el mismo día y en días diferentes, respectivamente. A la vista de los resultados obtenidos, puede afirmarse que el método desarrollado tiene un grado satisfactorio de precisión.

Los factores de enriquecimiento (EF) se calcularon como la relación entre la pendiente de la curva de calibración aplicando el procedimiento CPE y la obtenida al omitir la etapa de preconcentración, obteniéndose valores de 50, 45 y 20 correspondientes a PK, MK y MD, respectivamente. Estos valores de EF mostraron una mayor preconcentración mediante CPE para las vitaminas PK y MK, mientras que MD mostro una menor afinidad en la extracción con Tritón X-45, debido probablemente a la ausencia en su estructura química de la cadena lateral en la posición C-3, que sí se halla presente en MK y PK.

La Tabla III.4 muestra una comparación del método desarrollado con otros procedimientos previamente publicados para la determinación de vitamina K en alimentos mediante LC. Hay que destacar que se presenta aquí por primera vez la aplicación de CPE para la preconcentración de estas vitaminas y que se obtienen, para PK y MK, sensibilidades comparables a las encontradas con otros tratamientos de muestra

convencionales como SPE [18, 23, 25, 30] o a otros procedimientos miniaturizados como DLLME [13] y MSPD [14], tratándose CPE de un método sencillo, rápido y que evita el uso de disolventes orgánicos tóxicos. Las características analíticas obtenidas muestran que la combinación del tratamiento de la muestra UAE-CPE con LC-ESI-QqQ-MS/MS permite su uso en análisis rutinario de alimentos vegetales, minimizando la manipulación de la muestra.

Tabla III.4

Comparación del método propuesto con otros previos para la determinación de vitamina K en alimentos

Compuestos	Muestra	Tratamiento			Técnica de detección	LOD (ng g <sup>-1</sup> )	Referencia
	Naturaleza	Masa (g)					
PK, MK	Harina de maíz, kiwi	MSPD	2,0	LC-DAD-APCI-MSMS	PK: 0,4-18 MK:1-5	10	
PK	Frutas, vegetales	ASE-SPE	0,1-1,3	LC-APCI-MS/MS	1,5	23	
PK	Frutas, vegetales	UAE-SPE	5	ID-LC-ESI-MS/MS	1,0	30	
PK	Col, col rizada	SLE-SPE	0,3	LC-DAD	-	5	
PK	Hierbas, especias, condimentos	UAE-SPE	0,05-0,2	LC-FLD	-	19	
PK, MK	Raíces de <i>Rhodiola imbricata</i>	UAE	1	RRLC-ESI-MS/MS	4,1; 2,1	31	
PK, MK, MD	Vegetales	UAE-SPE	1	LC-FLD	1,4; 0,6; 0,8	18	
PK, MK, MD	Vegetales	SLE-DLLME	0,2-2	LC-DAD-APCI-MS	DAD: 0,45; 0,45; 0,3 MS: 0,45; 0,3; 0,75	13	
PK	Fórmulas infantiles a base de soja	MSPD	0,5	LC-FLD	27	14	
PK, MK	Alimentos infantiles	SLE-SPE	0,2	LC-APCI-MS	13,5; 13,3	25	
PK	Leche, aceite de soja	Digestión alcalina-LLE	30	LC-DAD	138	12	
PK, MK, MD	Vegetales	UAE-CPE	1,5	LC-ESI-MS/MS	1,0; 0,8; 16	Este trabajo	

ASE, extracción acelerada con disolventes; ID, dilución isotópica; MSPD, extracción en fase sólida dispersa; RR, rápida resolución

### III.3.5. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El método optimizado basado en UAE-CPE combinado con LC-ESI-QqQ-MS/MS se aplicó al análisis por triplicado de diez muestras de distintos vegetales. Los contenidos de PK obtenidos estuvieron en el rango entre 90 y 2350 ng g<sup>-1</sup> que correspondieron a lechuga iceberg y canónigos, respectivamente (Tabla III.5). En las muestras estudiadas, no se detectaron MK ni MD, y tampoco se encontró ninguna de las vitaminas K analizadas en las muestras de chirivía, nabo y zanahoria, al menos por encima de sus correspondientes LODs. Se llevó a cabo un segundo tratamiento UAE-CPE para verificar que la recuperación había sido completa.

Como era de esperar, se confirmó que los vegetales de hoja verde eran buenas fuentes de vitamina K, mientras que ésta se hallaba ausente en los tubérculos analizados.

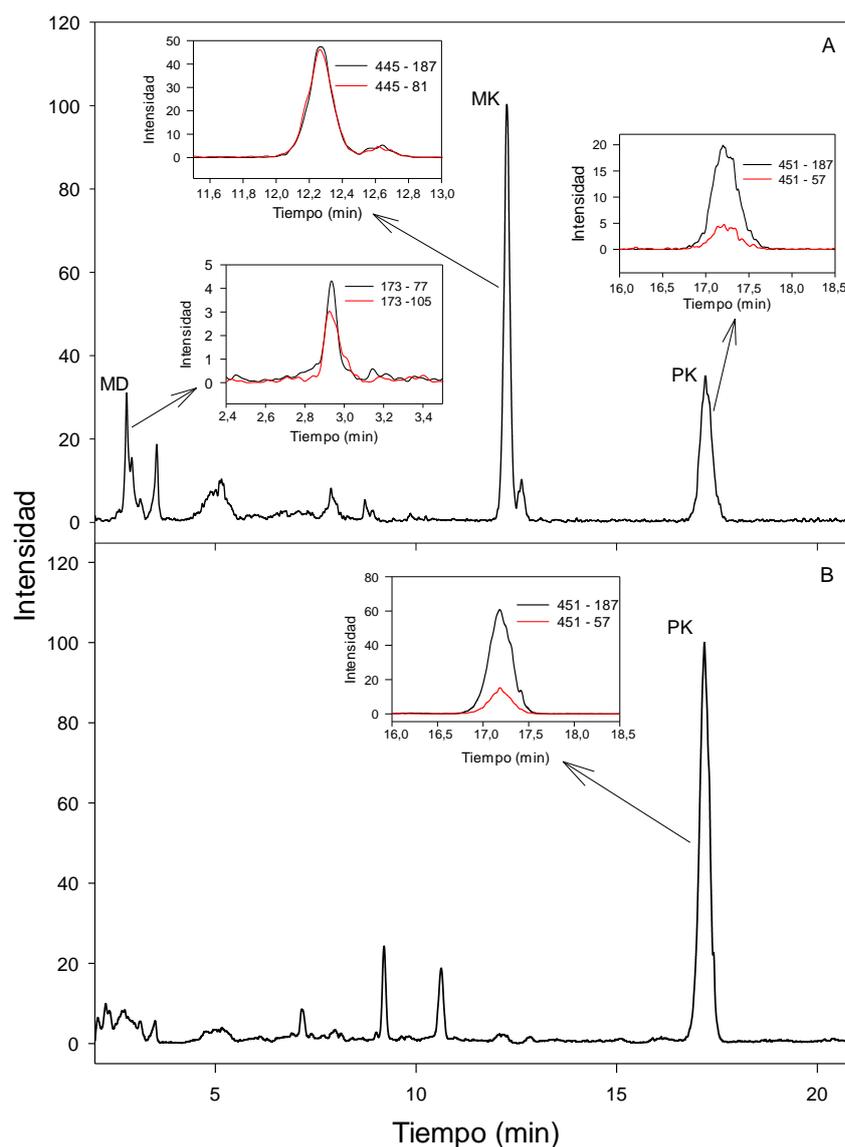
**Tabla III.5**

Contenidos de filoquinona en los vegetales analizados

Muestra	Concentración (ng g <sup>-1</sup> )
Lechuga iceberg	90 ± 7
Lechuga romana	197 ± 15
Escarola	264 ± 20
Canónigos	2350 ± 198
Col rizada	710 ± 55
Espinacas	980 ± 70
Berro	955 ± 68

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=3)

En la Figura III.5 se muestra el cromatograma de iones totales (TIC) obtenido para una disolución estándar conteniendo una mezcla de las vitaminas a una concentración de 40 ng mL<sup>-1</sup> para PK y MK y 80 ng<sup>-1</sup> mL para MD, y para una muestra de espinacas utilizando el método optimizado.



**Figura III.5.** Cromatogramas de iones totales para una disolución estándar ( $40 \text{ ng mL}^{-1}$  para PK y MK, y  $80 \text{ ng mL}^{-1}$  para MD) (A) y una muestra de espinacas (B) usando el método desarrollado.

### III.3.6. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

La fiabilidad del procedimiento optimizado se comprobó mediante estudios de recuperación para dos muestras diferentes fortificadas a tres niveles de concentración. Las recuperaciones de las vitaminas de las muestras fortificadas (nabo y lechuga iceberg) variaron entre 90,3 y 114%, con un valor medio  $\pm$  SD ( $n = 18$ ) de  $101 \pm 7$  (Tabla III.6), cuando las muestras fueron fortificadas antes de ser sometidas a la etapa UAE. Se obtuvieron valores de recuperación en el intervalo de 93,2 a 110%, al comparar las áreas de pico obtenidas cuando los analitos fueron añadidos antes y después del procedimiento

UAE-CPE. No se observaron diferencias significativas en los valores obtenidos de RSD para las recuperaciones de las tres vitaminas en las muestras fortificadas, oscilando estos valores entre 3,9 y 8,4%.

Los analitos se identificaron utilizando sus tiempos de retención, las transiciones proporcionadas por los espectros de masas y comparando el porcentaje de cada transición obtenida a partir de las disoluciones patrón y de las muestras. No se observaron picos interferentes en los tiempos de elución de los analitos.

**Tabla III.6**

Estudios de recuperación de las vitaminas en muestras fortificadas.

Compuesto	Nivel de fortificación (ng g <sup>-1</sup> )	Lechuga iceberg	Nabo
PK	40	109 ± 5,3 (4,8)	97 ± 4,9 (5,0)
	80	101 ± 6,3 (6,2)	108 ± 5,2 (4,8)
	120	98 ± 6,9 (7,0)	102 ± 6,1 (5,9)
MK	40	109 ± 4,3 (3,9)	97 ± 8,0 (8,3)
	80	90 ± 5,6 (6,2)	96 ± 5,5 (5,7)
	120	93 ± 6,0 (6,4)	106 ± 4,6 (4,3)
MD	200	109 ± 5,4 (4,9)	114 ± 6,2 (5,4)
	400	100 ± 6,9 (6,9)	92 ± 7,8 (8,4)
	600	91 ± 7,8 (8,6)	95 ± 5,8 (6,1)

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=3). Los valores entre paréntesis corresponden a las RSDs.

### III.4. CONCLUSIONES

En este estudio ha quedado demostrado que la extracción en punto de nube es una técnica de preconcentración respetuosa con el medio ambiente y una excelente alternativa para la determinación de tres formas de vitamina K (PK, MK y MD) en vegetales. La aplicación de energía de microondas en la etapa CPE permite acortar el tiempo del tratamiento de la muestra. La técnica LC-MS/MS proporciona, para el análisis de los extractos preconcentrados, una separación óptima de las vitaminas y una identificación inequívoca, ofreciendo alta sensibilidad y precisión.

### III.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Berenjian, R. Mahanama, J. Kavanagh, F. Dehghani, Vitamin K series: current status and future prospects, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35 (2015) 199-208.
- [2] C. Fanali, G. D'Orazio, S. Fanali, A. Gentili, Advanced analytical techniques for fat-soluble vitamin analysis, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 87 (2017) 82-97.
- [3] R. Liu, M. Wang, L. Ding, A novel liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of menadione in human plasma after derivatization with 3-mercaptopropionic acid, *Talanta*, 128 (2014) 51-57.
- [4] O. Bourron, F. Phan, Vitamin K: a nutrient which plays a little-known role in glucose metabolism, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 22 (2019) 174-181.
- [5] M. Kim, Y. Chiu, K. Ku, Glucosinolates, carotenoids, and vitamins E and K variation from selected kale and collard cultivars, *Journal of Food Quality*, (2017).
- [6] S. Otles, O. Cagindi, Determination of vitamin K1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV-Vis detection, *Food Chemistry*, 100 (2007) 1220-1222.
- [7] S.L. Booth, Vitamin K: food composition and dietary intakes, *Food & Nutrition Research*, 56 (2012) 5505-5509.
- [8] S. Carballo, S. Prats, S. Maestre, J. Todolí, Determination of fat-soluble vitamins in vegetable oils through microwave-assisted high-performance liquid chromatography, *Journal of Separation Science*, 38 (2015) 1075-1081.
- [9] A. Gentili, F. Caretti, Evaluation of a method based on liquid chromatography-diode array detector-tandem mass spectrometry for a rapid and comprehensive characterization of the fat-soluble vitamin and carotenoid profile of selected plant foods, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 684-697.
- [10] A. Gentili, F. Caretti, S. Bellante, S. Ventura, S. Canepari, R. Curini, Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (2013) 1628-1639.
- [11] D.B. Gomis, M.P. Fernandez, M.D. Gutiérrez Alvarez, Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 891 (2000) 109-114.

- [12] V. Kiemen, W.F. Costa, J.V. Visentainer, N.E. Souza, C.C. Oliveira, Development of a green chromatographic method for determination of fat-soluble vitamins in food and pharmaceutical supplement, *Talanta*, 75 (2008) 141-146.
- [13] P. Viñas, M. Bravo-Bravo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of vitamins D and K in foods by liquid chromatography with diode-array and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry detection, *Talanta*, 115 (2013) 806-813.
- [14] G.W. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, The liquid chromatographic analysis of vitamin K<sub>1</sub> in soy based infant formula using matrix solid phase dispersion, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23 (2000) 423-432.
- [15] M. Damon, N.Z. Zhang, D.B. Haytowitz, S.L. Booth, Phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) content of vegetables, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 (2005) 751-758.
- [16] H. Iwase, Determination of vitamin K<sub>1</sub> in emulsified nutritional supplements by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with postcolumn reduction on a platinum catalyst and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 881 (2000) 261-266.
- [17] M. Kamao, Y. Suhara, N. Tsugawa, T. Okano, Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 816 (2005) 41-48.
- [18] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, M.D. García, J. Martín, High-performance liquid chromatography-photochemical reduction in aerobic conditions for determination of K vitamins using fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1141 (2007) 67-72.
- [19] N. Presse, S. Potvin, B. Bertrand, M.S. Calvo, G. Ferland, Phylloquinone content of herbs, spices and seasonings, *Journal of Food Composition and Analysis*, 41 (2015) 15-20.
- [20] G.M. Ware, G.W. Chase, R.R. Eitenmiller, A.R. Long, Determination of vitamin K<sub>1</sub> in medical foods by liquid chromatography with postcolumn reduction and fluorometric detection, *Journal of AOAC International*, 83 (2000) 957-962.

- [21] D.C. Woollard, H.E. Indyk, B.Y. Fong, K.K. Cook, Determination of vitamin K<sub>1</sub> isomers in foods by liquid chromatography with C-30 bonded-phase column, *Journal of AOAC International*, 85 (2002) 682-691.
- [22] A. Gentili, A. Miccheli, P. Tomai, M.E. Baldassarre, R. Curini, V. Pérez-Fernández, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of vitamin K homologues in human milk after overnight cold saponification, *Journal of Food Composition and Analysis*, 47 (2016) 21-30.
- [23] R.B. Jäpelt, J. Jakobsen, Analysis of vitamin K<sub>1</sub> in fruits and vegetables using accelerated solvent extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization, *Food Chemistry*, 192 (2016) 402-408.
- [24] M. Kamao, Y. Hirota, Y. Suhara, N. Tsugawa, K. Nakagawa, T. Okano, H. Hasegawa, Determination of menadione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using pseudo multiple reaction monitoring, *Analytical Sciences*, 33 (2017) 863-867.
- [25] J.P. Karl, X.Y. Fu, G.G. Dolnikowski, E. Saltzman, S.L. Booth, Quantification of phylloquinone and menaquinones in feces, serum, and food by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 963 (2014) 128-133.
- [26] A.C. Kurilich, S.J. Britz, B.A. Clevidence, J.A. Novotny, Isotopic labeling and LC-APCI-MS quantification for investigating absorption of carotenoids and phylloquinone from kale (*Brassica oleracea*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 4877-4883.
- [27] X.Y. Fu, X.H. Shen, E.G. Finnan, D.B. Haytowitz, S.L. Booth, Measurement of multiple vitamin K forms in processed and fresh-cut pork products in the US food supply, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64 (2016) 4531-4535.
- [28] F.A. Claussen, M.L. Taylor, M.L. Breeze, K. Liu, Measurement of vitamin K-1 in commercial canola cultivars from growing locations in North and South America using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015) 1076-1081.
- [29] B.F. Huang, F.F. Zheng, S.S. Fu, J.H. Yao, B.H. Tao, Y.P. Ren, UPLC-ESI-MS/MS for determining trans- and cis-vitamin K<sub>1</sub> in infant formulas: method and applications, *European Food Research and Technology*, 235 (2012) 873-879.

- [30] B. Huang, Z. Wang, J. Yao, X. Ke, J. Xu, X.-. Pan, X. Xu, M. Lu, Y. Ren, Quantitative analysis of vitamin K<sub>1</sub> in fruits and vegetables by isotope dilution LC-MS/MS, *Analytical Methods*, 8 (2016) 5707-5711.
- [31] A.B. Tayade, P. Dhar, J. Kumar, M. Sharma, O.P. Chaurasia, R.B. Srivastava, Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in *Rhodiola imbricata* root from trans-Himalaya with rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 789 (2013) 65-73.
- [32] J.M. Oberson, E. Campos-Giménez, J. Rivière, F. Martin, Application of supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry to the determination of fat-soluble vitamins in selected food products, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1086 (2018) 118-129.
- [33] M. Reto, M.E. Figueira, H.M. Filipe, C.M.M. Almeida, Analysis of vitamin K in green tea leaves and infusions by SPME-GC-FID, *Food Chemistry*, 100 (2007) 405-411.
- [34] A. Ballesteros-Gómez, M.D. Sicilia, S. Rubio, Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review, *Analytica Chimica Acta*, 677 (2010) 108-130.
- [35] H. Abdollahi, L. Bagheri, Simultaneous spectrophotometric determination of vitamin K<sub>3</sub> and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection-partial least squares regression, *Analytica Chimica Acta*, 514 (2004) 211-218.
- [36] B.M. Cordero, J.L.P. Pavón, C.G. Pinto, M.E.F. Laespada, Cloud point methodology - a new approach for preconcentration and separation in hydrodynamic systems of analysis, *Talanta*, 40 (1993) 1703-1710.
- [37] C. Cortés-Herrera, G. Artavia, A. Leiva, F. Granados-Chinchilla, Liquid chromatography analysis of common nutritional components, in feed and food, *Foods* 8 (2018) 1-63.
- [38] G.S. Peace, *Taguchi methods: a hands-on approach*, Addison Wesley Publishing Company, 1993.
- [39] G.Y.T. Tan, W. Zimmermann, K.H. Lee, J.C.W. Lan, H.S. Yim, H.S. Ng, Recovery of mangostins from *Garcinia mangostana* peels with an aqueous micellar biphasic system, *Food and Bioproducts Processing*, 102 (2017) 233-240.

- 
- [40] J.I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Cloud point extraction and gas chromatography with direct microvial insert thermal desorption for the determination of haloanisoles in alcoholic beverages, *Talanta*, 160 (2016) 282-288.
- [41] EFSA, European Food Safety Authority EFSA Panel on dietetic products, nutrition and allergies. Dietary reference values for vitamin K. *EFSA Journal*, 15 (2017) 4780-4858.



# **Capítulo IV**

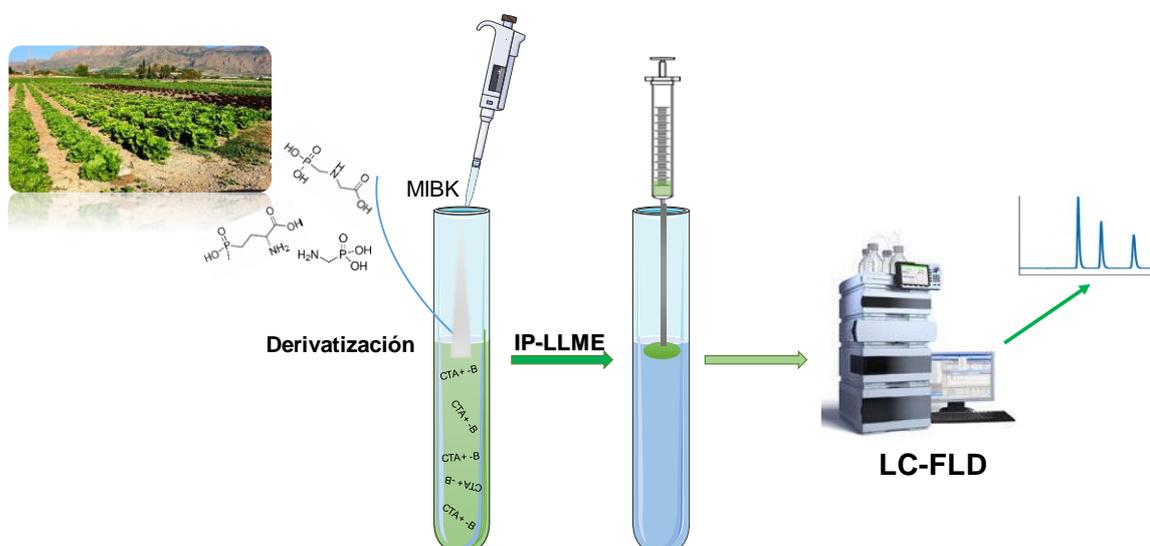
**MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA  
PRECONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO Y SU  
PRINCIPAL METABOLITO. DETERMINACIÓN  
MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON  
DETECCIÓN FLUORESCENTE**



## MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE GLIFOSATO Y SU PRINCIPAL METABOLITO. DETERMINACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE

### RESUMEN

Se propone un procedimiento de microextracción líquido-líquido con formación de pares iónicos (IP-LLME) para la preconcentración del herbicida glifosato (GLI) y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), empleando metil isobutil cetona como disolvente extractante y bromuro de hexadeciltrimetilamonio como reactivo formador de pares iónicos. Los analitos fueron previamente sometidos a reacción con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo dando lugar a derivados fluorescentes de menor carácter polar que los compuestos originales. Los extractos preconcentrados fueron analizados mediante cromatografía líquida con detección fluorescente (LC-FLD). El procedimiento optimizado se aplicó al análisis de aguas y vegetales, incluyendo en este último caso, una etapa previa de extracción asistida por ultrasonidos, y el extracto obtenido fue sometido a IP-LLME. Los factores de enriquecimiento fueron 62 y 85 para GLI y AMPA, respectivamente. La exactitud del método IP-LLME combinado con LC-FLD fue estudiada a través de ensayos de recuperación, obteniéndose valores dentro del intervalo 88-106%. Los límites de detección fueron 0,2 y 0,15 ng mL<sup>-1</sup> para GLI y AMPA, respectivamente.

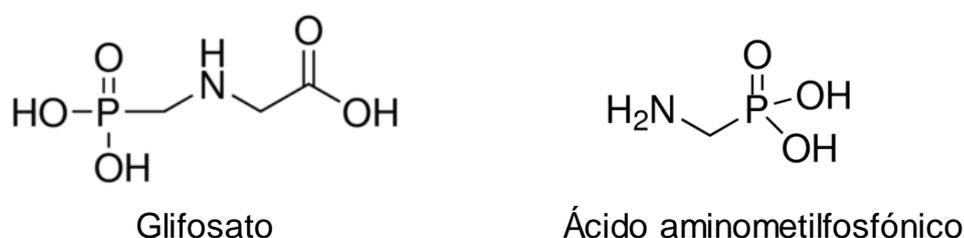




## IV.1. INTRODUCCIÓN

El glifosato (N-fosfometilglicina, GLI) es un herbicida no selectivo, sistémico y de amplio espectro, usado a nivel mundial para el control de hierbas, tanto de hoja perenne como caduca, que lo absorben a través de sus hojas y no de sus raíces. Desde su introducción a finales del siglo pasado, se ha convertido en el herbicida más usado a nivel mundial [1]. Este compuesto actúa por inhibición enzimática impidiendo la síntesis de aminoácidos. Se trata de un análogo aminofosfónico del aminoácido natural glicina, que se halla protonado y presenta diferente carga iónica en función del pH [1].

El principal producto de degradación de GLI es el ácido aminometilfosfónico (AMPA) que aparece por acción de la microflora del suelo, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. A su vez, AMPA es degradado a ácido fosfórico por acción bacteriana o se descompone por acción del óxido de manganeso presente en el suelo [2]. La Figura IV.1 muestra las estructuras de GLI y su principal metabolito.



**Figura IV.1.** Estructura química de los compuestos estudiados.

Desde su introducción en explotaciones agrícolas en 1974, y durante mucho tiempo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) había considerado a GLI como toxicológicamente inofensivo para el hombre y el medio ambiente debido a su rápida degradación. Sin embargo, numerosos estudios obligaron a la OMS a reclasificar en 2018 este herbicida como posible agente carcinogénico, debido a su elevada solubilidad en agua que conduce a la contaminación de los medios acuáticos [1-3].

El control de la presencia de GLI y AMPA en muestras ambientales genera actualmente gran preocupación [1]. Además, puesto que se ha detectado GLI en ciertos cultivos, y teniendo en cuenta sus posibles efectos nocivos sobre el hombre, la Comisión Europea ha establecido niveles máximos de residuos (MRLs) para alimentos de origen agrícola, que varían entre 0,1 y 50 mg kg<sup>-1</sup>, dependiendo del alimento [4].

La determinación de GLI y AMPA no está exenta de dificultades debido a características físico-químicas, tales como elevada solubilidad en agua, baja solubilidad en disolventes orgánicos, carácter anfótero y la simplicidad de sus estructuras químicas que les impiden la absorción de luz de la región ultravioleta-visible. Se han dedicado varias revisiones bibliográficas a recopilar los diferentes métodos analíticos desarrollados para este propósito [1,2,5,6]. La cromatografía líquida (LC) ha sido con diferencia la técnica más aplicada, aunque la bibliografía muestra algunos métodos basados en cromatografía de gases [7-10], electroforesis capilar [11,12] y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) [13,14]. Los sistemas de detección más comúnmente acoplados a LC son los basados en fluorescencia (FLD) [15-25] y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [26-37].

Aunque para LC-MS/MS los analitos pueden ser detectados en su forma original [28-30,35-37] o tras ser sometidos a una reacción química [26,27,31-33], cuando se utiliza FLD, la derivatización de GLI y AMPA resulta imprescindible [15-25]. Son numerosos los agentes químicos empleados para la conversión de GLI en especies fluorescentes [2]. Cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) es el agente derivatizante más ampliamente usado en estas determinaciones [15-17,19,21-24,26,27,31-33], transformando GLI y AMPA en derivados de carbamato. Esta reacción es la base del método recomendado para análisis de aguas en la norma de la Organización Internacional de Estandarización (ISO) 16308:2014. Entre otros reactivos fluoróforos empleados, cabe citar el cloruro de 3,6-dimetoxi-9-fenil-9H-carbazol-1-sulfonilo [20] y el o-ftalaldehído (OPA), siendo necesaria para este último la conversión previa de GLI y AMPA a sus formas de amina primaria y que ha sido aplicada tanto antes como tras la separación cromatográfica con FLD [18, 25].

La formación de productos no deseados en la reacción de derivatización con FMOC, así como el exceso de reactivo, pueden provocar problemas tales como la detección de picos cromatográficos inesperados en FLD y el deterioro de las fases estacionarias de LC. Se han descrito diferentes estrategias con objeto de minimizar estos inconvenientes [1,2,5,6]. La selección de las condiciones de reacción que minimicen el exceso de reactivo derivatizante, la aplicación de tiempos de reacción cortos y de bajas temperaturas, han demostrado su eficacia en la minimización de la formación de FMOC-OH, que aparece como producto de hidrólisis y descarboxilación de FMOC [22,23]. Alternativas más drásticas basadas en la aplicación de extracción líquido-líquido (LLE) [17,27] y extracción en fase sólida (SPE) [21,26,31] han sido también propuestas, consiguiendo en este último caso, en ocasiones, la preconcentración de los compuestos de interés.

Con objeto de incrementar la sensibilidad de los métodos propuestos, la técnica SPE, con fases estacionarias de intercambio iónico [17,19,20] y polímeros de impresión molecular [38], ha proporcionado muy buenos resultados para los compuestos no derivatizados. A pesar de las demostradas ventajas de las técnicas miniaturizadas con fines de preconcentración, son pocas las aplicaciones encontradas: microextracción con membrana líquida (SLME) [18,39], microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [24,33,40] y extracción en fase sólida magnética (MSPE) [11,34,41].

En este capítulo se presenta un método para la determinación de GLI y AMPA en aguas y vegetales mediante LC-FLD. Los analitos sometidos a derivatización con FMOC son preconcentrados empleando microextracción líquido-líquido con formación de pares iónicos (IP-LLME).

## IV.2. PARTE EXPERIMENTAL

### IV.2.1. REACTIVOS

Glifosato (GLI, N-fosfonometilglicina, estándar analítico, fórmula molecular:  $C_3H_8NO_5P$ ) y ácido aminometilfosfónico (AMPA, 99%, fórmula molecular:  $CH_6NO_3P$ ) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). El reactivo derivatizante cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) se adquirió de Fluka (Buchs, Suiza). Para la optimización de la separación cromatográfica se emplearon estándares de los analitos derivatizados: GLI-FMOC (99%) y AMPA-FMOC (98%), ambos obtenidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

Los disolventes acetonitrilo (ACN), metil isobutil cetona (MIBK), diclorometano, acetato de etilo y 1-undecanol fueron comprados a Fisher Scientific (Madrid, España). Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 99,5%), cloruro de tetrabutilamonio (TBAC, 97%), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB, 99%), ácido fórmico (98%), ácido clorhídrico (37%), tetraborato sódico (99%), ácido acético y acetato amónico fueron suministrados por Sigma.

Se prepararon disoluciones estándar individuales de GLI y AMPA ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en agua pura y fueron almacenadas a  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , siendo estables durante 3 meses. Las disoluciones intermedias se prepararon en agua y se guardaron en el frigorífico a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se prepararon disoluciones de calibración de concentraciones entre 1 y  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  en agua, combinando los volúmenes apropiados de las disoluciones intermedias. Para el proceso de derivatización, se usó una disolución reguladora de borato  $0,06 \text{ M}$  y pH 9,5.

El reactivo derivatizante se disolvió en acetonitrilo a la concentración de 7,7 mM (2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

#### IV.2.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema HPLC empleado consistió en una bomba cuaternaria Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Alemania) (G1311A) operando con un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . Los disolventes fueron desgasificados en línea usando un sistema de membrana (G1379A). El detector de fluorescencia (G1321A) operó con una longitud de onda de excitación de 216 nm y una longitud de onda de emisión de 316 nm. Los valores de límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron calculados utilizando el parámetro relación señal-ruido, siendo medido el ruido en zonas del cromatograma próximas a los tiempos de retención de los analitos a través del programa informático Agilent ChemStation para sistemas LC 3D (Rev. B.04.03 16). Se consideró el nivel de concentración de los analitos que daba lugar a una señal igual a tres y diez veces la señal del ruido para calcular LOD y LOQ, respectivamente. La columna analítica usada fue una Discovery HS-PEG 5 (15 cm x 4,6 mm y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) de Supelco (Bellefonte, USA). También se usó una columna Tracer Spherisorb  $\text{NH}_2$  (150 x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) de Teknokroma (Barcelona, España). La fase móvil consistió en una mezcla 20:80 de ACN y acetato amónico 50 mM y pH 4 ajustado con ácido acético, operando en condiciones isocráticas. Se mantuvo un flujo de 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$  durante todo el proceso de separación. Volúmenes de inyección de 20  $\mu\text{L}$  fueron manualmente introducidos en el sistema LC mediante una válvula de inyección modelo 7125-075 Rheodyne (Rheodyne, CA, USA).

La homogeneización de las muestras de vegetales se llevó a cabo usando un homogeneizador eléctrico Polytron PT2000 (Kinematica Ag, Lucerne, Suiza). Para la extracción de los analitos se usó un procesador de ultrasonidos UP 200 H (Dr Hielscher, Teltow, Alemania), con una salida efectiva de 200 W en medio líquido, equipado con un sonotrodo de titanio de 7 mm de diámetro. La potencia de la sonda de ultrasonidos se ajustó al 60% (104  $\mu\text{m}$  de amplitud, 180 W  $\text{cm}^{-2}$  de densidad de potencia), aplicando 75 ciclos de 1 segundo cada uno. En el tratamiento de la muestra se utilizó también una centrifuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) y un sistema de evaporación XcelVap<sup>TM</sup> (Horizon Technology, Salem, USA). Las muestras de aguas y los extractos vegetales se filtraron a través de filtros de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Teknokroma) antes de ser sometidos a preconcentración.

### IV.2.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

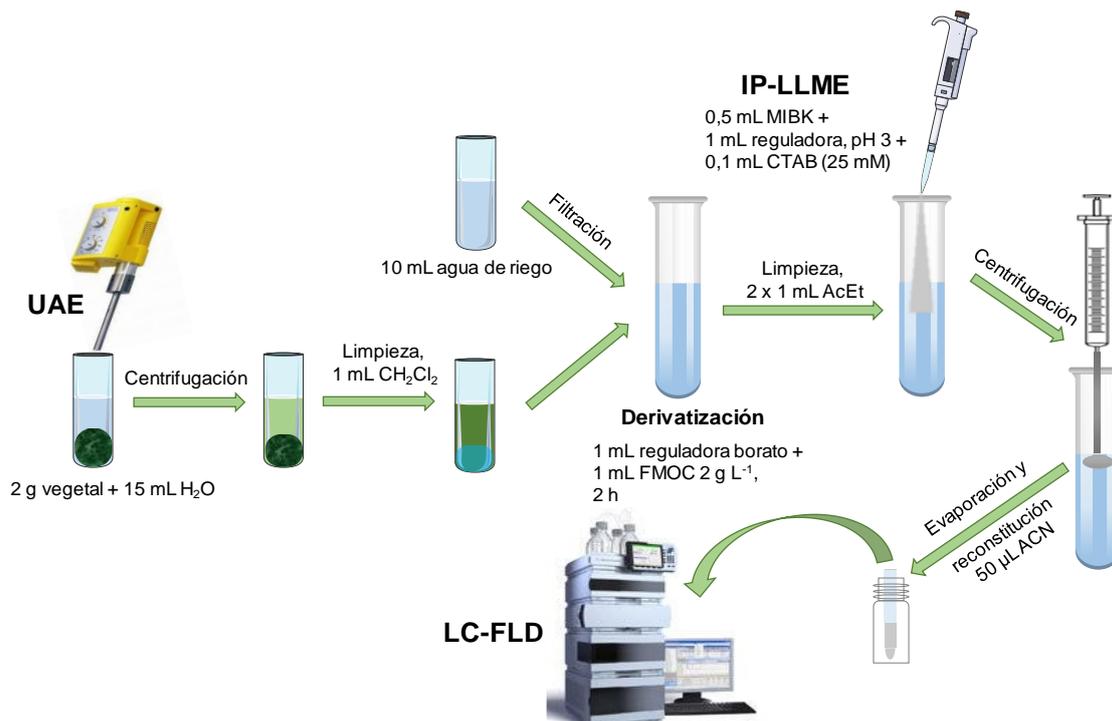
Se analizaron cinco muestras de aguas de riego recogidas en diferentes puntos del sureste español. Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis, que se llevó a cabo dentro de las 24 h siguientes a su llegada al laboratorio. Las partículas sólidas en suspensión fueron eliminadas por filtración a través de filtros de Nylon de 0,45 µm.

Para su análisis, se colocaron 10 mL de muestra filtrada en un tubo de vidrio de centrífuga de 15 mL de capacidad y se añadieron 1 mL de reguladora de borato 60 mM de pH 9,5 y 1 mL de disolución de FMOOC de 2 g L<sup>-1</sup>. La mezcla se agitó manualmente durante unos pocos segundos y se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Se aplicó una etapa LLE por duplicado con adición de 1 mL de acetato de etilo para eliminar el exceso de derivatizante, descartando las fases orgánicas. Seguidamente, para la preconcentración de los analitos derivatizados, se añadieron 1 mL de disolución reguladora de formiato/ácido fórmico (0,1 M, pH 3), 0,1 mL de disolución de CTAB 25 mM y 0,5 mL de MIBK. Se agitó la mezcla de forma manual durante unos segundos y se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. La fase orgánica (aproximadamente 250 µL) se recogió usando una microjeringa y se evaporó hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno. El residuo seco se reconstituyó por adición de 50 µL de ACN, antes de su inyección en el sistema LC.

Las muestras vegetales estudiadas fueron tres variedades de lechuga (iceberg, romana y escarola) y espinacas, todas adquiridas en un supermercado local. Las muestras se homogeneizaron usando un homogeneizador eléctrico.

Para el análisis de los vegetales se aplicó una etapa de extracción asistida por ultrasonidos (UAE), añadiendo 15 mL de agua a 2 g de muestra homogeneizada y la mezcla se sometió a la acción de los ultrasonidos por medio de una sonda directamente sumergida durante 2 min y aplicando 75 ciclos de 1 s de duración y 104 µm de amplitud. Seguidamente, se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 5 min, recuperándose la fase acuosa para ser sometida a una etapa de limpieza mediante LLE usando 1 mL de diclorometano. Finalmente, se filtró una alícuota de 10 mL del extracto limpio usando filtros de Nylon de 0,45 µm y se sometió a las etapas de derivatización y preconcentración anteriormente descritas.

En la Figura IV.2 se muestra un esquema del procedimiento desarrollado para determinar el contenido de GLI y AMPA en muestras de agua de riego y en muestras vegetales.



**Figura IV.2.** Esquema del procedimiento analítico desarrollado para la determinación de GLI y AMPA en agua y en vegetales.

#### IV.2.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación se fortificaron por triplicado dos muestras de aguas de riego y dos vegetales previamente homogeneizados (lechuga iceberg y espinacas) a dos niveles de concentración: 10 y 25 ng mL<sup>-1</sup> para aguas y 50 y 100 ng g<sup>-1</sup> para vegetales. Las muestras fortificadas se homogeneizaron y se mantuvieron en reposo durante 1 h en la oscuridad, con el fin de conseguir una distribución uniforme de los analitos y su interacción con la matriz de la muestra, antes de proceder a su análisis de acuerdo con los protocolos descritos en el apartado anterior.

### IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### IV.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Las condiciones de separación se optimizaron usando los analitos disponibles comercialmente en forma de sus derivados de carbamato con FMOc. Para ello, se estudió la capacidad de separación de dos columnas analíticas con diferentes fases estacionarias (amino- y polietilenglicol (PEG)) usando como fase móvil diferentes

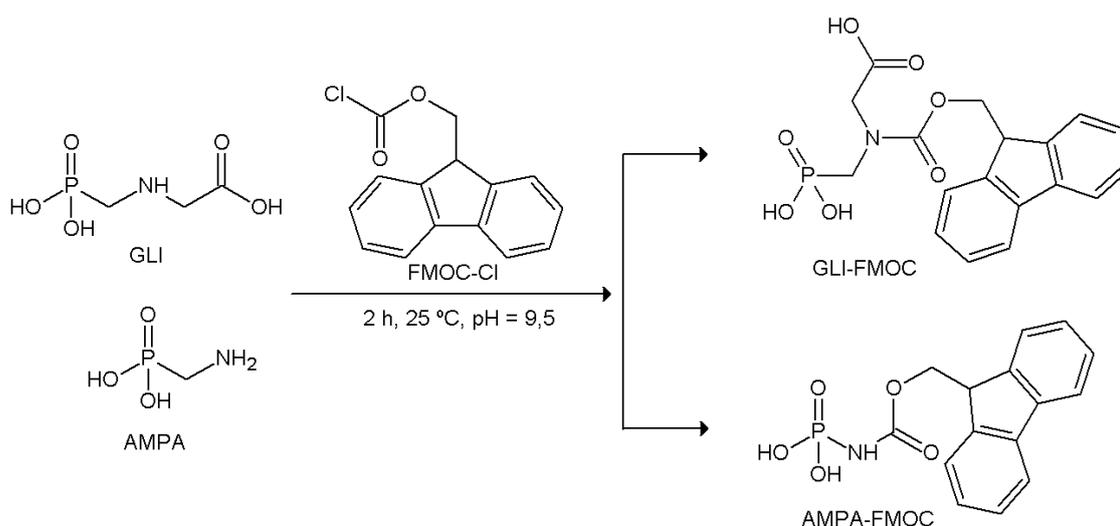
mezclas de ACN con ácido fórmico, acetato amónico o fosfato amónico a concentraciones 0,1 y 0,05 M y valores de pH comprendidos entre 4 y 6,5.

Los mejores resultados se obtuvieron usando la fase estacionaria basada en polietilenglicol y la mezcla ACN:acetato amónico (50 mM, pH 4 ajustado con ácido acético) en la proporción 20:80 como fase móvil, impulsada a  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ . Bajo estas condiciones, los tiempos de retención fueron 7,05 y 9,80 min para GLI y AMPA, respectivamente.

La elución en fase reversa (RP) en condiciones isocráticas ha resultado ventajosa para el análisis de muestras medioambientales, que generalmente contienen especies de alta polaridad como ácidos orgánicos, sustancias húmicas y carbohidratos, evitando así su interferencia con los analitos en estudio [25].

### III.3.2. CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN

Los analitos fueron sometidos a una reacción de derivatización previa a su preconcentración con el fin de disminuir su carácter polar, aumentando así su afinidad hacia disolventes apolares y su retención cromatográfica en fases estacionarias de RP, además de dar lugar a compuestos susceptibles de ser detectados mediante FLD. Teniendo en cuenta las demostradas ventajas de los derivados obtenidos por reacción con FMOC [15-17,19,21-24], éste fue seleccionado como reactivo derivatizante. La Figura IV.3 muestra la reacción química de los compuestos aquí estudiados con FMOC.



**Figura IV.3.** Reacción de derivatización de los analitos con FMOC-Cl.

Las condiciones aplicadas para los parámetros que afectan a los rendimientos de reacción con FMOC y a su cinética varían considerablemente en la bibliografía. Así, en cuanto al tiempo de reacción, se han propuesto procedimientos implicando desde unos minutos [15-17,19,21,27,33] a unas pocas horas [23,26,32], e incluso toda la noche [31]. El intervalo de concentración de FMOC también es muy amplio, usando desde concentraciones en torno a  $150 \mu\text{g mL}^{-1}$  [19,21,23,26] hasta del orden de  $6500 \mu\text{g mL}^{-1}$  [27,31]. En consecuencia, decidimos estudiar las principales variables que afectan a esta etapa.

Los ensayos preliminares se llevaron a cabo usando un volumen de 10 mL de una disolución acuosa conteniendo los analitos al nivel de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a la que se añadió 1 mL de disolución reguladora de borato de pH 9,5 y 1 mL de FMOC de  $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . La reacción se dejó transcurrir durante 30 min y, seguidamente, se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo. Cuando la concentración de la disolución reguladora se varió entre 2 y 20 mM, la máxima sensibilidad para los dos analitos se obtuvo a 5 mM, siendo este valor seleccionado.

La concentración de reactivo derivatizante, el tiempo de reacción y la temperatura se estudiaron simultáneamente usando un diseño ortogonal basado en el método Taguchi. Se llevaron a cabo 16 experimentos por duplicado considerando cuatro niveles para cada parámetro (Tabla IV.1): volumen de reactivo derivatizante (0,25, 0,5, 1 y 2 mL), tiempo (1, 2, 4 y 15 h) y temperatura de reacción (25, 40, 50 y 60 °C).

**Tabla IV.1**

Variables estudiadas en el diseño Taguchi para la derivatización de GLI y AMPA.

Nivel	Volumen de FMOC (mL)	Tiempo de reacción (h)	Temperatura de reacción (°C)
1	0,25	1	25
2	0,5	2	40
3	1	4	50
4	2	15	60

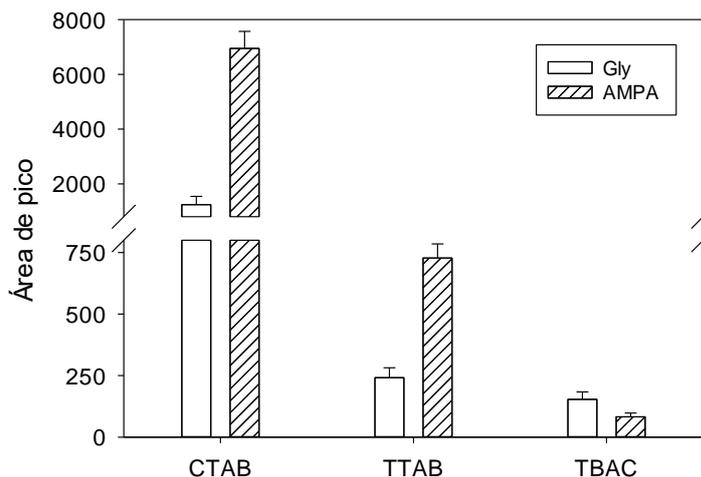
Las condiciones finalmente seleccionadas correspondieron a la adición de 1 mL de reactivo ( $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), dejando transcurrir la reacción durante 2 h a temperatura ambiente.

La eliminación del exceso de reactivo derivatizante o la aparición de subproductos de la reacción, tales como Fmoc-OH, es generalmente recomendada. Para ello, se ha propuesto la aplicación de LLE con diclorometano, acetato de etilo o éter dietílico [17,24,38]. En nuestro caso, comprobamos que la extracción con 1 mL de acetato de etilo por duplicado reducía enormemente la banda cromatográfica debida al exceso de reactivo derivatizante, siendo por tanto incluida en el procedimiento propuesto.

### IV.3.3. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN

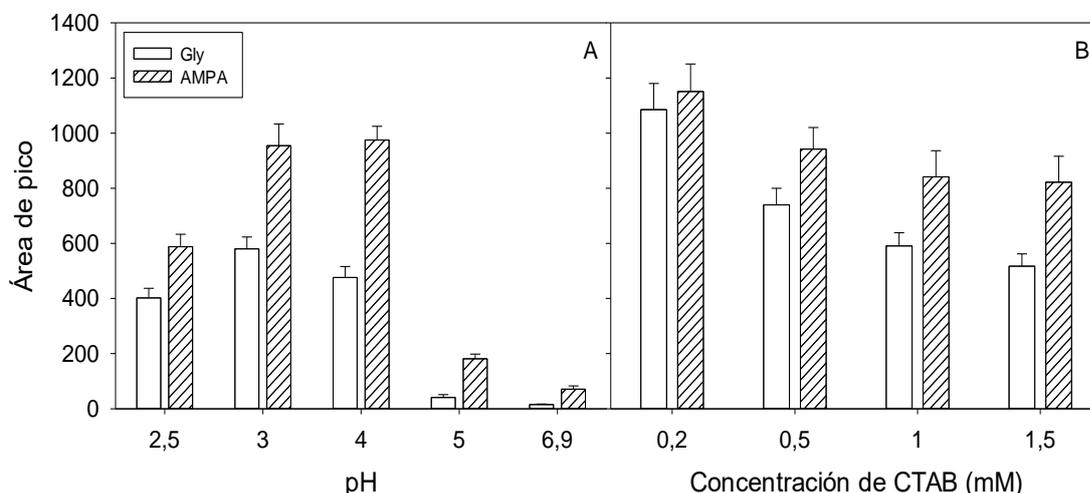
Se llevaron a cabo varios intentos para extraer los analitos derivatizados en microvolúmenes (100-2000  $\mu\text{L}$ ) de diferentes disolventes orgánicos (tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, clorobenceno, metil isobutil cetona (MIBK) y 1-undecanol) mediante DLLME usando ACN (100-500  $\mu\text{L}$ ) como disolvente dispersante y ajustando el pH de la fase acuosa a valores comprendidos entre 3,8 y 9. Bajo ninguna de las condiciones experimentales ensayadas se detectó extracción de los Fmoc-derivados, lo que podía deberse a su carácter iónico.

Con el fin de promover la transferencia de los analitos a la fase orgánica se estudió el efecto de la presencia de surfactantes catiónicos en la fase acuosa. Para ello, se ajustó el pH de la fase dadora a 5, con el fin de asegurar que los compuestos de interés se hallasen mayoritariamente en forma aniónica. La capacidad de CTAB, TTAB y TBAC para formar pares iónicos se estudió añadiendo los surfactantes en concentración 0,5 mM y empleando 1 mL de extractante (tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, clorobenceno, MIBK y 1-undecanol). Solamente MIBK proporcionó extracción, observándose la máxima eficiencia con el empleo de CTBA, como puede observarse en la Figura IV.4.



**Figura IV.4.** Influencia de diferentes surfactantes en la eficiencia de extracción con MIBK.

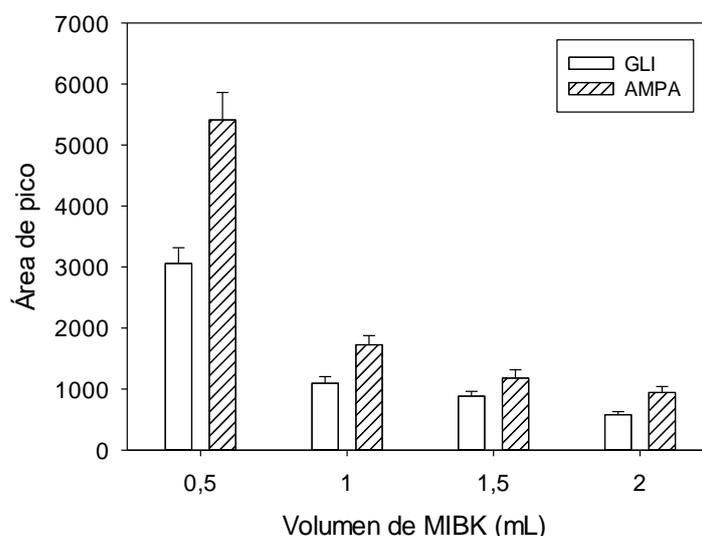
El efecto del pH de la disolución acuosa se estudió entre 2,5 y 7. Como se observa en la Figura IV.5A, la máxima sensibilidad se encontró a pH 3, que se ajustó por adición de ácido fórmico. La influencia de la concentración de CTAB en la fase acuosa se evaluó en el intervalo comprendido entre 0,2 y 1,5 mM. Las señales más altas correspondieron a una concentración 0,2 mM, siendo por tanto seleccionada (Figura IV.5B).



**Figura IV.5.** Variación de la sensibilidad de GLI y AMPA con (A) el pH y (B) la concentración de CTAB.

Finalmente, se estudió el efecto del volumen de MIBK entre 0,5 y 2,0 mL, alcanzándose la máxima eficiencia de extracción con 0,5 mL (Figura IV.6). La

recuperación de la fase orgánica resultaba muy dificultosa para volúmenes inferiores a 0,5 mL, por lo que éste fue el volumen finalmente seleccionado.



**Figura IV.6.** Variación de la sensibilidad de GLI y AMPA con el volumen de MIBK.

La influencia de la fuerza iónica de la fase dadora se evaluó con diferentes concentraciones de cloruro sódico hasta 20% m/v. No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad de los analitos en el rango estudiado, por lo que se descartó la adición de sal.

#### IV.3.4. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE VEGETALES

El tratamiento de las muestras de vegetales se optimizó usando lechuga iceberg fortificada al nivel de concentración de 50 ng g<sup>-1</sup>. Se seleccionó agua como disolvente extractante, teniendo en cuenta la alta solubilidad de GLI y AMPA en medio acuoso [20,28,29]. Se ensayó la extracción usando distintas masas de muestra comprendidas entre 0,3 y 3 g, usando 15 mL de extractante y sometiendo la mezcla a ultrasonidos por medio de una sonda directamente introducida en la mezcla durante 2 min. Los mejores resultados se encontraron con 2 g, siendo ésta la masa seleccionada.

Para ciertos vegetales de matriz especialmente compleja, tales como maíz y soja, se ha propuesto por otros autores una etapa adicional de limpieza mediante LLE con diclorometano combinada con SPE [20,28] para la eliminación de lípidos, con objeto de minimizar el efecto matriz en las muestras. El Método de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) 2000.05 [42], para análisis de GLI en cultivos, implica la

extracción del herbicida en agua y la limpieza del extracto con diclorometano y columnas de intercambio iónico. En nuestro caso, la limpieza del extracto, obtenido a través del tratamiento de 2 g de muestra mediante UAE, con 1 mL de diclorometano permitió obtener extractos más limpios, por lo que esta etapa se incluyó en el tratamiento de la muestra vegetal.

#### IV.3.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

El método optimizado se validó a través de los parámetros de linealidad, límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs), exactitud y precisión. Las rectas de calibración se obtuvieron por análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados del área del pico frente a la concentración de analito, usando seis niveles de concentración comprendidos entre 1 y 100 ng mL<sup>-1</sup>. Los coeficientes de correlación obtenidos demostraron una excelente linealidad en el intervalo de concentración estudiado (Tabla IV.2). Los LODs y LOQs se calcularon atendiendo al criterio de relación señal-ruido (S/N) igual a 3 y 10, respectivamente. La precisión del método se evaluó llevando a cabo diez análisis consecutivos de una disolución estándar acuosa de 10 ng mL<sup>-1</sup> para repetitividad y seis análisis en días diferentes para la reproducibilidad. Desviaciones estándar relativas de 6,7 y 8,6% para GLI y de 5,6 y 9% para AMPA, se obtuvieron de los estudios de repetitividad y reproducibilidad, respectivamente.

**Tabla IV.2**

Características analíticas del método IP-LLME con LC-FLD.

Parámetro	GLI	AMPA
Pendiente (mL ng <sup>-1</sup> )	72 ± 5	188 ± 11
R <sup>2</sup>	0,9992	0,9991
Intervalo de linealidad (ng mL <sup>-1</sup> )	1-100	1-100
LOD <sup>a</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	0,2	0,15
LOQ <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	0,7	0,5
RSD <sup>c</sup> (%)	6,7	5,6
RSD <sup>d</sup> (%)	8,6	9,0
EF	62	85

<sup>a</sup> Calculado para S/N=3. <sup>b</sup> Calculado para S/N=10. <sup>c</sup> n=10. <sup>d</sup> n=6.

Los factores de enriquecimiento (EFs) se calcularon comparando las pendientes de calibración usando IP-LLME con aquellas obtenidas en ausencia de la etapa de preconcentración. Se encontraron EFs de 62 para GLI y 85 para AMPA.

La estructura química similar de GLI y AMPA a la de los aminoácidos presentes en vegetales de forma natural, podría dificultar su determinación por la existencia de efecto matriz, efecto que también podría aparecer en las muestras de aguas como consecuencia de otras especies solubilizadas. Para valorar este posible efecto en las matrices en estudio, se aplicó el método de adiciones estándar a dos muestras diferentes de agua y a dos vegetales (lechuga iceberg y espinacas), usando cuatro niveles diferentes de fortificación comprendidos entre 5 y 20 ng mL<sup>-1</sup> para aguas y entre 25 y 100 ng g<sup>-1</sup> para vegetales. La Tabla IV.3 muestra los valores de pendiente obtenidos. La aplicación de un test estadístico de análisis de varianza (ANOVA) para comparar las pendientes de calibración así obtenidas con las encontradas mediante calibración frente a patrones acuosos, demostró la ausencia de efecto matriz, ya que los valores de “p” fueron mayores de 0,05 en todos los casos.

**Tabla IV. 3**

Pendientes (mL ng<sup>-1</sup>) de calibración obtenidas mediante IP-LLME con LC-FLD.

Muestra	GLY	AMPA
Estándares acuosos	72 ± 5	188 ± 11
Agua de riego 1	68 ± 7	179 ± 12
Agua de riego 2	75 ± 5	175 ± 15
Lechuga iceberg	76 ± 7	174 ± 16
Espinacas	69 ± 8	193 ± 14
Valor medio ± desviación estándar (n=5).		

Considerando la masa de muestra usada para el análisis de vegetales (2 g), los valores de LODs y LOQs fueron, respectivamente, 1 y 3,3 ng g<sup>-1</sup> para GLI y 0,75 y 2,5 ng g<sup>-1</sup> para AMPA. La sensibilidad del método desarrollado permite sobradamente detectar alimentos que incumplan los límites máximos de residuos (MRLs) establecidos por la Comisión Europea, que corresponden a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> para todos los vegetales frescos y

congelados, a excepción de patata ( $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ), maíz dulce ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y setas silvestres ( $50 \text{ mg kg}^{-1}$ ) [4].

La Tabla IV.4 muestra una comparación entre el método propuesto y otros previamente desarrollados para la determinación de GLI y AMPA en aguas y vegetales mediante LC-FLD. Para el análisis de aguas, puede observarse que la mayoría de los autores seleccionan FMOC como reactivo derivatizante llevando a cabo la reacción de forma previa a la separación cromatográfica [15,17,19,22,24,38]. La reacción con OPA se ha propuesto tanto anterior [25] como posterior [18] a la separación. Para la preconcentración de las muestras, la técnica convencional basada en SPE ha sido aplicada usando volúmenes de muestra comprendidos entre 50 [15] y 250 mL [17,19]. La liofilización de la muestra también ha proporcionado buenos resultados, aunque implicando tiempos muy largos, aproximadamente 3 días [22]. Es de resaltar el hecho de que la sensibilidad alcanzada con el método aquí propuesto es del orden de la encontrada implicando otros tratamientos miniaturizados de muestra como SLME [18] y DLLME [24], en el primer caso invirtiendo 60 min en la preconcentración de la muestra, frente a los no más de 4 min necesarios para el procedimiento IP-LLME aquí propuesto. La técnica MSPD ha sido explorada por da Mata y colaboradores [38] usando polímeros de impresión molecular como fase extractante y tiempos de extracción de 4 h. Sin embargo, los autores no proporcionan datos de sensibilidad del procedimiento optimizado.

En relación al análisis de muestras vegetales, cabe destacar la mejor sensibilidad alcanzada por Zhang y colaboradores [20], incluyendo en el procedimiento una etapa de preconcentración basada en SPE, en contraste con la microextracción propuesta en el método aquí desarrollado.

**Tabla IV.4**  
Comparación del método desarrollado con otros métodos previamente propuestos para determinar GLI y AMPA LC-FLD

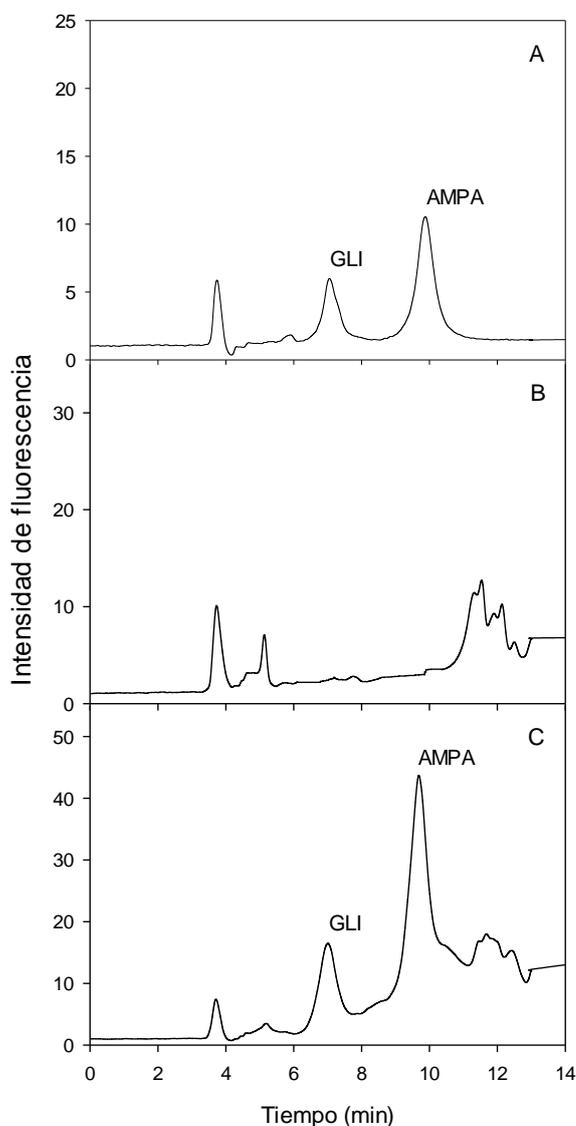
Muestras	Cantidad de muestra	Tratamiento de la muestra	LOD <sup>a</sup> para GLI y AMPA	Ref.
Agua	50 mL	SPE y derivatización con FMOC	LOQ = 0,02	15
Agua	250 mL	SPE y derivatización con FMOC	LOQ = 0,1	17
Agua	20 mL	SLME, separación LC y derivatización post columna con OPA/Thiofluor	0,22; 3,40	18
Agua	250 mL	SPE y derivatización con FMOC	0,012; 0,014	19
Agua	20 mL	Liofilización y derivatización con FMOC	0,058; 0,108	22
Agua	5 mL	IL-DLLME y derivatización con FMOC	0,27; 0,22	24
Agua	0,08 mL	Cromatografía de inyección secuencial (SIC) con derivatización postcolumna con OPA	5; 1,7	25
Agua	25 mL	MSPD con MIP y derivatización con FMOC	---	38
Agua	10 mL	IL-DLLME y derivatización con FMOC	0,2; 0,15	Este trabajo
Tomate	0,5 g	MSPD, limpiar con SPE y derivatizar con FMOC	50; 30	16
Semillas de soja	5 g	UAE en agua, limpieza con LLE, SPE y derivatizar con FMOC	0,02; 0,1	20
Lechuga y espinacas	2 g	UAE en agua, limpieza con LLE, derivatización con FMOC y preconcentración con IP-LLME	1; 0,75	Este trabajo

<sup>a</sup> ng mL<sup>-1</sup> para aguas, ng g<sup>-1</sup> para vegetales. SLME; microextracción con membrana líquida; OPA, o-ftaldehído.

### IV.3.6. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

El método propuesto IP-LLME combinado con LC-FLD se aplicó al análisis de cinco muestras de agua de riego y cuatro muestras de vegetales. No se encontraron los compuestos de interés en ninguna de ellas, por consiguiente, de contener GLI y AMPA las muestras sería por debajo de 0,2 y 0,15 ng mL<sup>-1</sup> para aguas y de 1 y 3,3 ng g<sup>-1</sup> para vegetales, respectivamente.

La Figura IV.7A muestra el perfil de elución obtenido para una muestra de agua de riego fortificada, a la concentración de 5 ng mL<sup>-1</sup> para GLI y AMPA, y analizada mediante IP-LLME con LC-FLD. Asimismo, los cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de lechuga iceberg sin fortificar y fortificada (50 ng g<sup>-1</sup> para ambos analitos) usando el método optimizado aparece en la Figura IV.5.



**Figura IV.7.** Cromatogramas obtenidos usando IP-LLME combinada con LC-FLD para (A) una muestra fortificada (5 ng mL<sup>-1</sup>) de agua de riego, (B) lechuga iceberg no fortificada y (C) fortificada (50 ng g<sup>-1</sup>).

La identidad de los analitos se confirmó comparando el tiempo de retención y los espectros de fluorescencia en las muestras con los obtenidos usando estándares acuosos. En el análisis de alícuotas no fortificadas de las diferentes muestras no se encontraron picos a los tiempos de retención de GLI y AMPA.

### IV.3.7. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

La exactitud del procedimiento se comprobó mediante estudios de recuperación para dos muestras de agua y dos de vegetales, fortificadas a dos niveles de concentración. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.5. Los porcentajes de recuperación estuvieron en los intervalos 88-104% y 87-106% para aguas y vegetales, respectivamente.

**Tabla IV.5**

Porcentajes de recuperación.

Analito	Nivel de fortificación (ng mL <sup>-1</sup> )	Agua 1	Agua 2	Lechuga	Espinacas
GLI	10 (50)	89 ± 8	88 ± 6	87 ± 8	91 ± 8
	25 (100)	95 ± 6	94 ± 6	96 ± 5	106 ± 7
AMPA	10 (50)	90 ± 7	89 ± 7	94 ± 6	92 ± 7
	25 (100)	104 ± 6	103 ± 6	99 ± 8	98 ± 5

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=3). <sup>b</sup> Los valores entre paréntesis corresponden a los niveles de fortificación para vegetales (ng g<sup>-1</sup>).

## IV.4. CONCLUSIONES

Es la primera vez que se emplea una técnica miniaturizada en fase líquida asistida por pares iónicos para la preconcentración de GLI y AMPA a partir de muestras vegetales y agua. Debido a que los analitos no poseen carácter fluorescente, es preciso una etapa de derivatización previa, el reactivo FMOC fue usado con este propósito a la vez que incrementó la eficiencia de extracción en LLME, al disminuir el carácter polar de los analitos. El uso de CTAB como agente formador de pares iónicos potenció asimismo la microextracción.

## IV.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A.L. Valle, F.C.C. Mello, R.P. Alves-Balvedi, L.P. Rodrigues, L.R. Goulart, Glyphosate detection: methods, needs and challenges, *Environmental Chemistry Letters*, 17 (2019) 291-317.
- [2] J.P.K. Gill, N. Sethi, A. Mohan, Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents, *Environmental Chemistry Letters*, 15 (2017) 85-100.
- [3] A.H.C. Van Bruggen, M.M. He, K. Shin, V. Mai, K.C. Jeong, M.R., Finckh, J.G. Jr. Morris, Environmental and health effects of the herbicide glyphosate, *Science of the Total Environment*, 616-617 (2018) 255-268.
- [4] European Commission Pesticide database. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public>. Último acceso en marzo de 2020.
- [5] R. Raina-Fulton, A review of methods for the analysis of orphan and difficult pesticides: glyphosate, glufosinate, quaternary ammonium and phenoxy acid herbicides, and dithiocarbamate and phthalimide fungicides, *Journal of the AOAC International*, 9 (2014) 965- 977.
- [6] Arkan, I. Molnár-Perl, The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography. *Microchemical Journal*, 121 (2015) 99-106.
- [7] S.H. Tseng, Y.W. Lo, P.C. Chang, S.S. Chou, H.Min Chang, Simultaneous quantification of glyphosate, glufosinate, and their major metabolites in rice and soybean sprouts by gas chromatography with pulsed flame photometric detector, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 4057-4063.
- [8] E.O. Mogusu, J.B. Wolbert, D.M. Kujawinski, M.A. Jochmann, M. Elsner, Dual element ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) isotope analysis of glyphosate and AMPA by derivatization-gas chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC/IRMS) combined with LC/IRMS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 5249-5260.
- [9] T. Arkan, A. Csámpai, I. Molnár-Perl, Alkylsilyl derivatization of glyphosate and aminomethylphosphonic acid followed by gas chromatography mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 125 (2016) 219-223.

- [10] W. Zhang, Y. Feng, L. Ma, J. An, H. Zhang, M. Cao, H. Zhu, W. Kang, K. Lian, A method for determining glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid by gas chromatography-flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*, 1589 (2019) 116-121.
- [11] Y.L. Dong, D.Q. Guo, H. Cui, X.J. Li, Y.J. He, Magnetic solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in river water using  $Ti^{4+}$ -immobilized  $Fe_3O_4$  nanoparticles by capillary electrophoresis, *Analytical Methods*, 7 (2015) 5862-5868.
- [12] M.P. Moraes, L.M. Goncalves, E.A. Pereira, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with indirect detection using pyridine-2,6-dicarboxylic acid or 3,5-dinitrobenzoic acid, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 98 (2018) 258-270.
- [13] K. El-Gendy, E. Mosallam, N. Ahmed, N. Alv, Determination of glyphosate residues in Egyptian soil samples, *Analytical Biochemistry*, 557 (2018) 1-6.
- [14] C.J. Berg, H.P. King, G. Delenstarr, R. Kumar, F. Rubio, T. Glaze, Glyphosate residue concentrations in honey attributed through geospatial analysis to proximity of large-scale agriculture and transfer off-site by bees, *PLOS ONE*, 13 (2018) e0198876.
- [15] C. Hidalgo, C. Ríos, M. Hidalgo, V. Salvadó, J.V. Sancho, F. Hernández, Improved coupled-column liquid chromatographic method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in environmental waters, *Journal of Chromatography A*, 1035 (2004) 153-157.
- [16] M.P. García de Llasera, L. Gómez-Almaraz, L.E. Vera-Avila, A. Peña-Alvarez, Matrix-solid-phase dispersion extraction and determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of residues of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in tomato fruit, *Journal of Chromatography A*, 1093 (2005) 139-146.
- [17] M. Corbera, M. Hidalgo, V. Salvadó, Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases, *Microchimica Acta*, 153 (2006) 203-209.
- [18] M. Piriypittaya, S. Jayanta, S. Mitra, N. Leepipatpiboon, Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-

- performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 483-492.
- [19] M. Küsters, M. Gerhartz, Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and gluosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 1139-1146.
- [20] Y. Zhang, Y. Zhang, Q. Qu, G. Wang, C. Wang, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labelling reagent, *Analytical Methods*, 5 (2013) 6465.
- [21] M.E. Báez, E. Fuentes, M.J. Espina, J. Espinoza, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 3125-33132.
- [22] C.E. Ramírez, S. Bellmund, P.R. Gardinali, A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case of study: canals with influence on Biscayne National Park, *Science of the Total Environment*, 496 (2014) 389-401.
- [23] L. Sun, D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, Z. Shan, Y. Wang, N. Wang, Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1502 (2017) 8-13.
- [24] D.J. Padilla-Alonso, M. Garza-Tapia, A. Chávez-Montes, A. González-Horta, N.H. Waksman de Torres, R. Castro-Ríos, A new temperature-assisted ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid water samples, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40 (2017) 147-155.
- [25] E.A. Oliveira Pereira, V. Freitas Melo, G. Abate, J.C. Masini, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by sequential-injection reversed-phase chromatography: method improvements and application in adsorption studies, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 2317-2326.
- [26] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender, Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase extraction followed by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry:

- performance tuning of derivatization, enrichment and detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 2265-2276.
- [27] S. Gosciny, H. Unterluggauer, J. Aldrian, V. Hanot, S. Masselter, Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS, *Food Analytical Methods*, 5 (2012) 1177-1185.
- [28] A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean, *Journal of Chromatography A*, 1313 (2013) 157-165.
- [29] L.J. Marek, W.C. Koskinen, Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Pest Management Science*, 70 (2014) 1158-1164.
- [30] S. Adams, J. Guest, M. Dickinson, R.J. Fussell, J. Beck, F. Schoutsen, Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 7294-7304.
- [31] Y. Liao, J.M. Berthion, I. Colet, M. Merlo, A. Nougadere, R.W. Hu, Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1549 (2018) 31-38.
- [32] L.D. Demonte, N. Michlig, M. Gaggiotti, C.G. Adam, H.R. Beldoménico, M.R. Repetti, Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method, *Science of the Total Environment*, 645 (2018) 34-43.
- [33] E. Pinto, A. Gomes Soares, I.M.P.L.V.O. Ferreira, Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by *in situ* derivatization – dispersive liquid-liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS, *Analytical Methods*, 10 (2018) 554-561.
- [34] S. Pan, X. Chen, X. Li, M. Jin, Non-derivatization method for determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their main metabolites in environmental

- waters based on magnetic metal-organic framework pretreatment, *Journal of Separation Science*, 42 (2019) 1045-1050
- [35] S. Savini, M. Bandini, A. Sannino, An improved, rapid, and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution orbitrap mass spectrometry analysis for the determination of highly polar pesticides and contaminants in processed fruits and vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 2716-2722.
- [36] E. Okada, T. Coggan, T. Anumol, B. Clarke, G. Allison, A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 715-724.
- [37] A. Santilio, C. Pompili, A. Giambenedetti, Determination of glyphosate residue in maize and rice using a fast and easy method involving liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS), *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, (2019) 1-6.
- [38] K. da Mata, M. Zanetti Corazza, F. Midori de Oliveira, A.L. de Toffoli, C.R. Teixeira Tarley, A.B. Moreira, Synthesis and characterization of cross-linked molecularly imprinted polyacrylamide for the extraction/preconcentration of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water samples, *Reactive & Functional Polymers*, 83 (2014) 76-83.
- [39] Y.-W. Liou, S.-H. Wang, C.-H. Hsu, Y.-T. Hsu, C.-H. Chen, C.-C. Chen, C.-H. Lin, Rapid on-line microextraction method for the analysis of glyphosate in soy and pepper based on fiber-spray/mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, 430 (2018) 104-109.
- [40] E. Çetin, S. Şahan, A. Ülgen, U. Şahin, DLLME-spectrophotometric determination of glyphosate residue in legumes, *Food Chemistry*, 230 (2017) 567-571.
- [41] C.-C. Hsu, C.-W. Wang, Microscale solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated iron nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8575-8580.
- [42] M.X. Chen, Z.Y. Cao, Y. Jiang, Z.W. Zhu, Direct determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled

with electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography. A*, 1272 (2013) 90-99.



# **Capítulo V**

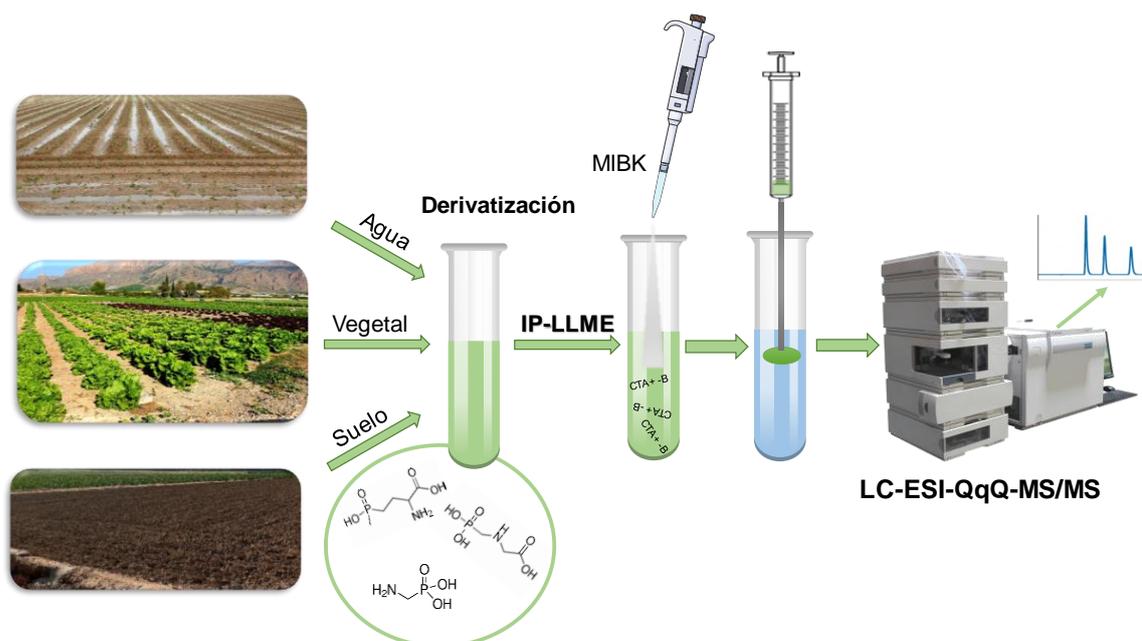
**DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, GLUFOSINATO  
Y AMPA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN  
LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRFÍA LÍQUIDA  
CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM**



## DETERMINACIÓN DE GLIFOSATO, GLUFOSINATO Y AMPA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

### RESUMEN

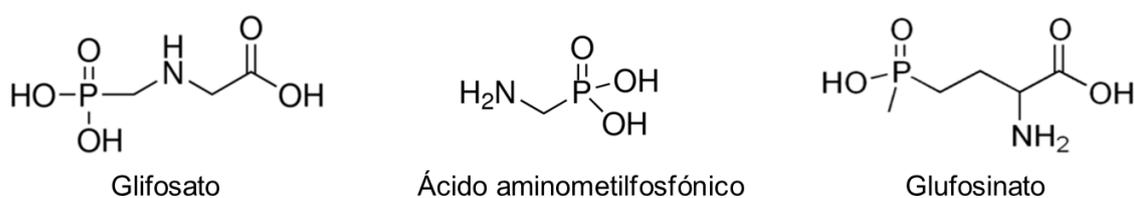
En este capítulo se presenta un método analítico para la determinación simultánea de glifosato (GLI), glufosinato (GLU) y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en aguas, vegetales y suelos, mediante cromatografía líquida en fase reversa con detección por espectrometría de masas en tándem con triple cuadrupolo e ionización por electrospray (LC-ESI-QqQ-MS/MS). La derivatización de los analitos con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo favoreció su preconcentración mediante microextracción líquido-líquido con formación de pares iónicos (IP-LLME). Se obtuvieron factores de enriquecimiento con la aplicación de IP-LLME de 62, 60 y 85 para GLI, GLU y AMPA, respectivamente. Se aplicó una etapa de extracción asistida por ultrasonidos para el aislamiento de los compuestos de interés desde las muestras sólidas. Los límites de detección fueron 0,08, 0,08 y 0,05 ng mL<sup>-1</sup> para GLI, GLU y AMPA, respectivamente. La precisión del método se evaluó en términos de repetitividad y reproducibilidad, obteniéndose valores de desviación estándar relativa entre 6 y 11%, dependiendo del compuesto.





## V.1. INTRODUCCIÓN

La maleza es percibida como plantas nocivas ya que compiten con los cultivos por los recursos básicos, tales como agua y nutrientes. La aplicación de herbicidas es uno de los métodos más comunes para controlar la maleza durante la producción de cultivos. Los compuestos glifosato (N-fosfometilglicina, GLI) y glufosinato (ácido 3-amino-3-carboxipropil)metilfosfónico, GLU) son herbicidas no selectivos, de amplio espectro y sistémicos, muy utilizados a nivel mundial. Ambos pesticidas contienen fósforo y grupos amino y ácido en sus estructuras químicas y su modo de acción se basa en la inhibición enzimática, interfiriendo en la formación de aminoácidos y otros compuestos en la planta [1,2]. En el medio ambiente, GLI sufre una rápida degradación, siendo el ácido aminometilfosfónico (AMPA) su principal metabolito en aguas, suelos y plantas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), AMPA puede ser considerado de toxicidad similar a GLI [3]. La Figura V.1 muestra las estructuras químicas de los compuestos objeto de estudio en este Capítulo.



**Figura V.1.** Estructuras de GLI, AMPA y GLU.

El uso extensivo de GLI y GLU a nivel mundial ha conducido a su detección en diferentes compartimentos ambientales. El control de estos herbicidas en el medio ambiente resulta actualmente de gran interés [1,4,5]. Teniendo en cuenta sus posibles efectos dañinos sobre la salud humana, la Comisión Europea ha establecido unos límites máximos de residuos (MRLs) para alimentos de origen agrícola, que varían entre 0,1 y 50 mg kg<sup>-1</sup> para GLI y entre 0,03 y 5 mg kg<sup>-1</sup> para GLU, dependiendo del producto [6].

La determinación de GLU, GLI y su principal metabolito es difícil por las características físico-químicas de estos compuestos, tales como su alta solubilidad en agua, baja volatilidad y carácter anfótero. Además, sus estructuras químicas no permiten su determinación de forma directa por espectrofotometría de absorción molecular UV-Vis o por espectrofluorimetría. La bibliografía recoge varias revisiones de los métodos analíticos disponibles para este propósito [1,2,4,7]. Aunque se ha propuesto la cromatografía de gases [3,8-10], la mayoría de métodos analíticos se basan en

cromatografía líquida (LC), en este caso, principalmente con detección fluorimétrica (FLD) [11-17] y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) [18-33].

La combinación LC-MS/MS permite la detección de GLU, GLI y AMPA bajo su forma química original [21,23-25,29-33], aunque la derivatización de estos compuestos se propone en no pocas ocasiones para incrementar su afinidad hacia las fases estacionarias empleadas en LC en fase reversa y para mejorar la respuesta del detector, teniendo en cuenta el incremento de la masa molecular. Para ello, el reactivo cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC) ha sido ampliamente usado [18-20,22,26-28], siendo además la base del método recomendado para análisis de aguas según la norma de la Organización Internacional de Estandarización (ISO) 16308:2014.

Las técnicas de preconcentración y/o limpieza, extracción en fase sólida (SPE) empleando resinas de intercambio iónico [10,11,13,21,22] y dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) con polímeros de impresión molecular [34], han proporcionado buenos resultados para las determinaciones de GLI, GLU y AMPA en muestras medioambientales. A pesar de las demostradas ventajas de las técnicas miniaturizadas para preconcentración de muestra, son pocas las aplicaciones a los análisis objeto de estudio en este Capítulo. En este sentido, se han propuesto las técnicas de microextracción con membrana líquida (SLME) [12,35], microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [28,36,37] y extracción en fase sólida magnética [29,38,39]. Solamente cuatro de estas técnicas han sido combinadas con cromatografía para el análisis de los extractos obtenidos [12,28,29,36].

En este Capítulo se evalúa la combinación de la microextracción líquido-líquido con formación de pares iónicos (IP-LLME) con LC-MS/MS para la determinación de GLU, GLI y AMPA en aguas, suelos y vegetales, con derivatización de los analitos con FMOC de forma previa a su preconcentración.

## V.2. PARTE EXPERIMENTAL

### V.2.1. REACTIVOS

Glifosato (GLI, N-fosfonometilglicina, estándar analítico, fórmula molecular:  $C_3H_8NO_5P$ ) y ácido aminometilfosfónico (AMPA, 99%, fórmula molecular:  $CH_6NO_3P$ ) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania); mientras que glufosinato (GLU, ácido 2-amino-4-(hidroximetilfosfinil)butírico, 99,9%, fórmula molecular:  $C_5H_{12}NO_4P$ ), así como el reactivo derivatizante FMOC fueron adquiridos en Fluka (Buchs,

Suiza). Para la optimización de la separación cromatográfica se emplearon estándares de los analitos derivatizados: GLU-FMOC (99%), GLI-FMOC (99%) y AMPA-FMOC (98%), obtenidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

Los disolventes acetonitrilo, metil isobutil cetona (MIBK), diclorometano, acetato de etilo y 1-undecanol fueron comprados a Fisher Scientific (Madrid, España). Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 99,5%), cloruro de tetrabutilamonio (TBAC, 97%), bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB, 99%), ácido fórmico (98%), ácido clorhídrico (37%), tetraborato sódico (99%), n-hexano, ácido acético, hidróxido sódico y acetato amónico fueron suministrados por Sigma.

Se prepararon disoluciones estándar individuales de GLU, GLI y AMPA de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en agua y fueron almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estas disoluciones fueron estables durante 3 meses. Las disoluciones de concentración intermedia ( $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) se prepararon en agua y se mantuvieron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , comprobándose que eran estables durante al menos dos semanas. Se prepararon disoluciones de calibración de entre 0,5 y 200  $\text{ng mL}^{-1}$  en agua, combinando volúmenes apropiados de las disoluciones intermedias. Para el proceso de derivatización se usó una disolución reguladora de borato 0,06 M de pH 9,5. El reactivo derivatizante se disolvió en acetonitrilo a la concentración  $7,7\ \text{mM}$  ( $2000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Se adquirió una fórmula comercial soluble conteniendo  $480\ \text{g L}^{-1}$  de GLI en su forma de sal amónica, así como compuestos inertes y coadyuvantes tales como surfactantes, para llevar a cabo estudios de disipación del herbicida a través del agua de riego. Antes de su aplicación, la fórmula comercial fue diluida 50 veces con agua, siguiendo las recomendaciones del fabricante ( $9,6\ \text{g L}^{-1}$ ).

## V.2.2. INSTRUMENTACIÓN

El sistema cromatográfico de alta resolución (HPLC) empleado consistió en una bomba binaria Agilent 1200 (Agilent, Waldbronn, Alemania) (G1311A). Los disolventes fueron desgasificados en línea usando un sistema de membrana (G1379A). La columna analítica usada para separación en fase reversa (RP) fue una Discovery HS-PEG 5 ( $15\ \text{cm} \times 4,6\ \text{mm}$ ,  $5\ \mu\text{m}$  de tamaño de partícula) de Supelco (Bellefonte, USA). La fase móvil consistió en una mezcla 15:85 de acetonitrilo y acetato amónico 50 mM de pH 4, ajustado con ácido acético, operando en condiciones isocráticas. Se mantuvo un flujo de  $0,5\ \text{mL min}^{-1}$  durante todo el proceso de separación. La inyección ( $20\ \mu\text{L}$ ) se realizó usando un

muestreador automático y viales de 2 mL de capacidad, provistos con micro-insertos de 250  $\mu$ L con pies poliméricos.

El sistema de detección acoplado al LC fue un espectrómetro de masas triple cuadrupolo Agilent modelo G6410A. La fuente ESI operó en modo de ionización positiva, aplicando los siguientes parámetros de operación: voltaje del capilar, 4000 V; presión del nebulizador, 40 psi; flujo del gas de secado, 9 L  $\text{min}^{-1}$  y temperatura del gas de secado, 350 °C. Como gas nebulizador y de colisión se empleó nitrógeno. Los espectros de masas se registraron en el rango de  $m/z$  desde 50 a 1000 amu para seleccionar las transiciones de cada analito. La monitorización de los herbicidas se llevó a cabo en el modo de reacciones múltiples (MRM). El software Agilent Mass Hunter Data Acquisition (Qualitative and Quantitative Analysis) se usó para el desarrollo del método y la adquisición de datos.

Para la homogeneización de las muestras de vegetales se usó un homogeneizador eléctrico Polytron PT2000 (Kinematica Ag, Lucerne, Suiza). La extracción de los herbicidas desde suelos y vegetales se llevó a cabo usando un procesador de ultrasonidos UP 200 H (Dr Hielscher, Teltow, Alemania), con una potencia efectiva de 200 W en medio líquido, equipado con un sonotrodo de titanio de 7 mm de diámetro. La potencia de la sonda de ultrasonidos se ajustó al 60% (104  $\mu$ m de amplitud, 180 W  $\text{cm}^{-2}$  de densidad de potencia), aplicando 75 ciclos de 1 segundo cada uno. Una centrífuga EBA 20 (Hettich, Tuttlingen, Alemania) y un sistema de evaporación XcelVap<sup>TM</sup> (Horizon Technology, Salem, USA) se emplearon también en la preparación de las muestras. Tanto las aguas, como los extractos obtenidos de suelos y vegetales se filtraron usando filtros de Nylon de 0,45  $\mu$ m (Teknokroma) antes de proceder a la etapa IP-LLME.

### V.2.3. MUESTRAS Y PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

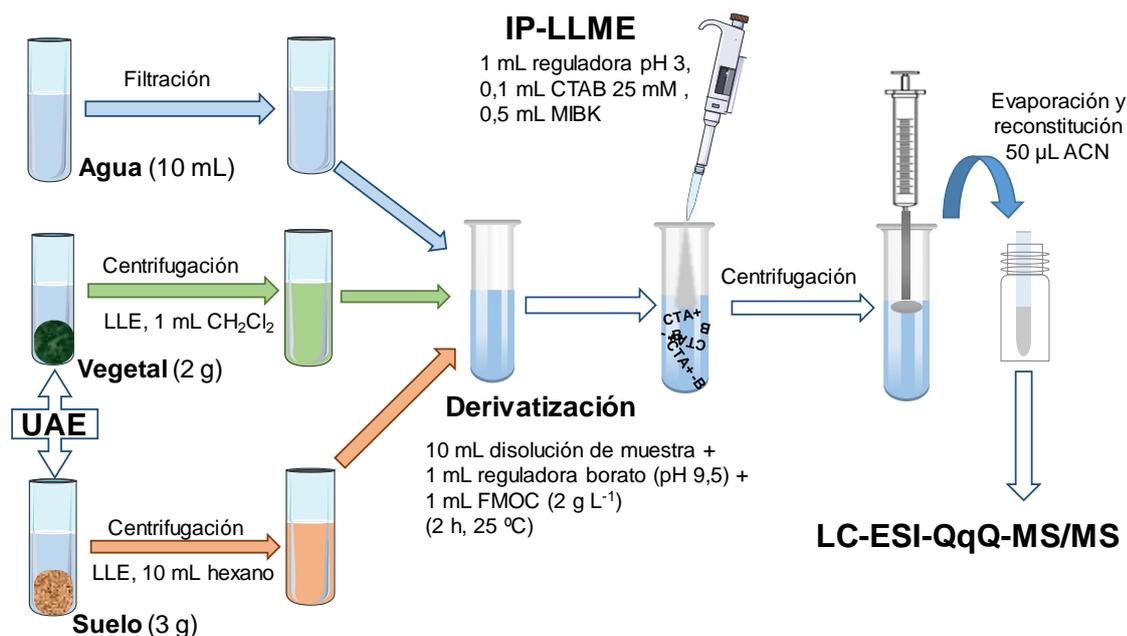
Se recogieron cinco muestras de aguas de riego en diferentes puntos del sureste de España, siendo almacenadas en la oscuridad a 4 °C hasta su análisis, que se llevó a cabo durante las 24 h siguientes a su llegada al laboratorio. Para eliminar las partículas sólidas en suspensión se filtraron a través de filtros de Nylon de 0,45  $\mu$ m (Agilent). Se colocaron 10 mL de agua de riego filtrada en un tubo de vidrio de centrífuga de 15 mL de capacidad, añadiéndose 1 mL de reguladora de borato (60 mM, pH 9,5) y 1 mL de disolución de FMOC (2 g  $\text{L}^{-1}$ ). Se agitó la mezcla manualmente durante unos pocos segundos, dejándose reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se

añadieron 1 mL de disolución reguladora de formiato/ácido fórmico (0,1 M, pH 3), 0,1 mL de disolución de CTAB 25 mM y 0,5 mL de MIBK, para la preconcentración de los analitos derivatizados. Se agitó la mezcla manualmente durante unos pocos segundos y se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm. Se recogieron aproximadamente 250  $\mu$ L de fase orgánica usando una microjeringa, siendo dicha fase evaporada hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno. El residuo seco se reconstituyó en 50  $\mu$ L de acetonitrilo, siendo 20  $\mu$ L sometidos a análisis mediante LC-MS/MS.

Las muestras vegetales estudiadas consistieron en tres variedades de lechuga (iceberg, romana y escarola) y espinacas. Fueron adquiridas en un supermercado local y alícuotas de aproximadamente 100 g fueron homogeneizadas usando un homogeneizador eléctrico antes de proceder a la etapa de extracción en agua, de acuerdo con el Método Oficial de AOAC 2000.05 [23]. Así, se aplicó una etapa de extracción asistida por ultrasonidos (UAE), añadiendo 15 mL de agua a 2 g de muestra homogeneizada y sumergiendo en la mezcla una sonda de ultrasonidos durante 2 min (75 ciclos de 1 s de duración y 104  $\mu$ m de amplitud). Seguidamente, la mezcla se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm, y la fase acuosa fue sometida a una etapa de limpieza mediante LLE con 1 mL de diclorometano. Finalmente, una alícuota de 10 mL del extracto limpio se filtró usando filtros de Nylon de 0,45  $\mu$ m y se sometió a las etapas de derivatización y preconcentración descritas anteriormente.

Se analizaron suelos obtenidos de diferentes plantaciones agrícolas de la región de Murcia, siendo en cada caso recogidas alícuotas de unos 50 g de la zona superficial (25 cm). Las muestras fueron secadas al aire a temperatura ambiente, molidas manualmente, tamizadas a través de un tamiz de 2 mm y almacenadas en un lugar fresco y seco hasta su análisis, que fue llevado a cabo durante las 48 h siguientes a su llegada al laboratorio.

Para el análisis de los suelos se aplicó una etapa de UAE basada en un procedimiento desarrollado por Sun y colaboradores [17] con ligeras modificaciones: se añadieron 15 mL de una disolución acuosa, conteniendo fosfato sódico 0,03 M y citrato trisódico 0,01 M, sobre 3 g de muestra, sometiendo la mezcla a ultrasonidos por inmersión directa de la sonda de ultrasonidos durante 5 min, aplicando 75 ciclos de 1 s de duración y 104  $\mu$ m de amplitud. Seguidamente se centrifugó la mezcla durante 5 min a 5000 rpm, y el sobrenadante, previo ajuste de pH a 9,5 con HCl 1 M, se purificó por LLE con 10 mL de n-hexano. Finalmente, se tomaron 10 mL del extracto purificado y se sometieron a las etapas de derivatización y preconcentración previamente descritas. La Figura V.2 muestra el esquema de preparación de las muestras.



**Figura V.2.** Método IP-LLME para determinar GLI, GLU y AMPA en muestras de suelo.

#### V.2.4. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN

Para los estudios de recuperación se fortificaron por triplicado dos muestras de agua de riego, dos vegetales previamente homogeneizados (lechuga iceberg y espinacas) y dos suelos a dos niveles de concentración: 1 y 5 ng mL<sup>-1</sup> para aguas, 5 y 10 ng g<sup>-1</sup> para vegetales y 2 y 5 ng g<sup>-1</sup> para suelos. Las muestras fortificadas se homogeneizaron, manteniéndose en contacto durante 1 h en la oscuridad, para conseguir una distribución uniforme de los analitos y su interacción con la matriz de la muestra, antes de proceder a su análisis descrito en el apartado V.2.3.

#### V.2.5. ESTUDIO DE DISIPACIÓN DE GLIFOSATO

Para estos estudios se emplearon 3 macetas cilíndricas de 12 L de capacidad conteniendo 9 kg de suelo, donde se plantó lechuga, cuya semilla había sido previamente germinada en otros maceteros. La planta se roció con 5 mL del producto comercial diluido de GLI (9,6 g L<sup>-1</sup>) usando un pulverizador manual (Matabi) provisto de una boquilla de tamaño ajustable de 1 mm, evitando el goteo de la solución. Las plantas se regaron con 50 mL de agua a diferentes tiempos (antes de la aplicación del herbicida (lixiviado 1) y en cuatro periodos de 24 h tras la aplicación (lixiviados 2 a 5). El muestreo del agua filtrada de la maceta continuó aproximadamente 30 min desde el momento del riego hasta que

no se apreciaba salida de agua. Cada muestra se filtró usando filtros de Nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , siendo seguidamente sometidas a derivatización y análisis por IP-LLME con LC-MS/MS siguiendo los procedimientos anteriormente descritos.

### V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### V.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA, DETECCIÓN Y CONDICIONES DE DERIVATIZACIÓN

La optimización de la separación cromatográfica de los dos herbicidas GLI y GLU, así como del metabolito AMPA, se llevó a cabo usando sus correspondientes FMOC-derivados comercialmente disponibles. Se ensayaron diferentes mezclas de acetonitrilo con ácido fórmico y acetato amónico en concentraciones 0,05 y 0,1 M y a valores de pH comprendidos entre 4 y 6, usando una columna analítica de polietilenglicol. La resolución de los picos cromatográficos fue mejor con acetato a pH 4. No se detectaron diferencias significativas al variar la concentración de la disolución de acetato, por lo que se adoptó la concentración más baja con el objetivo de preservar la fuente de ionización del detector. Con respecto a la proporción de ACN, un 15% v/v proporcionó la resolución total de los tres picos cromatográficos en el mínimo tiempo.

La mezcla acetonitrilo:acetato amónico (50 mM, pH 4 ajustado con ácido acético) en la proporción 15:85 impulsada a 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$  permitió la elución de los tres analitos con tiempos de retención de 7,76; 10,10 y 13,88 min para GLI, GLU y AMPA, respectivamente.

Un estudio preliminar de las transiciones óptimas MRM para los compuestos se llevó a cabo inyectando directamente y de forma individual cada analito derivatizado, a una concentración de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , en la fuente de ionización, y aplicando diferentes voltajes de fragmentación y energías de colisión. La Tabla V.1 muestra las condiciones finalmente seleccionadas en el sistema de detección. El procedimiento de identificación se basó en el tiempo de retención y dos transiciones MRM implicando la formación de iones producto con las mayores relaciones  $m/z$ , siendo la transición más sensible utilizada para cuantificar y ambas transiciones con fines de identificación.

**Tabla V.1**

Parámetros del sistema LC-MS/MS

Compuestos	GLI	GLU	AMPA
t <sub>R</sub> (min)	7,76	10,10	13,88
Voltaje de fragmentación (V)	110	110	110
MRM <sub>1</sub>	392→179 <sup>a</sup>	404→182 <sup>a</sup>	334→179 <sup>a</sup>
Energía de colisión 1 (V)	20	10	10
MRM <sub>2</sub>	392→88	404→136	334→156
Energía de colisión 2 (V)	10	20	2
MRM <sub>3</sub>	392→214	404→179	334→112
Energía de colisión 3 (V)	2	30	5

<sup>a</sup> Transición utilizada para cuantificar

Como en el Capítulo anterior, también se selecciona FMOC como reactivo derivatizante. Así, aunque ya se estudió la reacción de derivatización para GLI y AMPA en el Capítulo IV, se procedió ahora a reestudiar las condiciones experimentales de mayor influencia sobre la sensibilidad (concentración de FMOC, tiempo y temperatura de reacción), con detección mediante MS/MS.

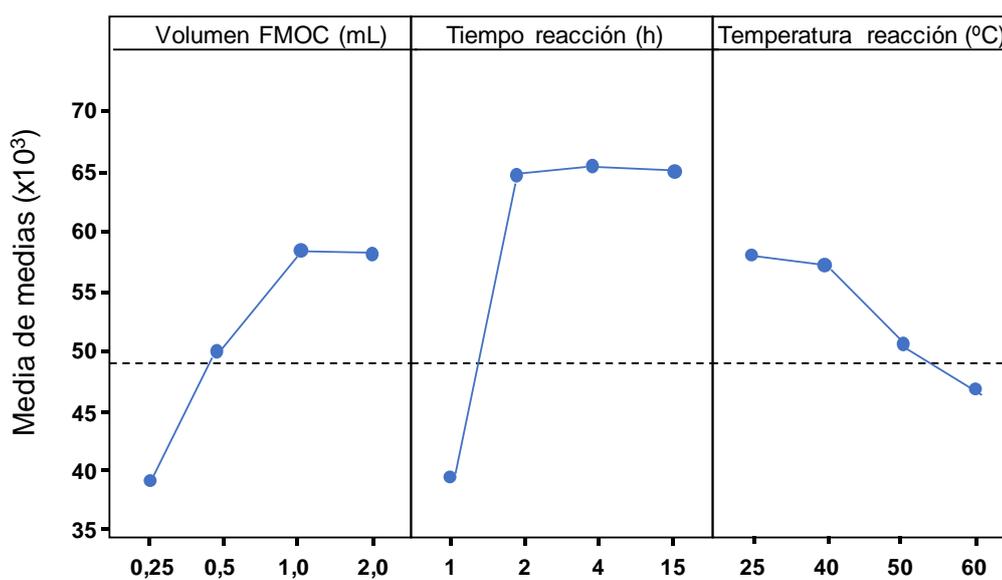
El estudio de las tres variables se llevó a cabo a través de un diseño ortogonal basado en el método Taguchi, programando 16 experimentos por duplicado, al considerar cada variable a 4 niveles: volumen de reactivo derivatizante (0,25, 0,5, 1 y 2 mL), tiempo de reacción (1, 2, 4 y 15 h) y temperatura de reacción (25, 40, 50 y 60 °C). La Tabla V.2 muestra las combinaciones de niveles de los tres factores estudiados que dieron lugar a 16 experimentos diferentes.

**Tabla V.2**

Matriz de diseño aplicada en el desarrollo experimental

Experimento	Volumen de FMOOC (mL)	Tiempo de reacción (h)	Temperatura de reacción (°C)
1	0,25	1	25
2	0,25	2	40
3	0,25	4	50
4	0,25	15	60
5	0,5	1	40
6	0,5	2	25
7	0,5	4	60
8	0,5	15	50
9	1	1	50
10	1	2	60
11	1	4	25
12	1	15	40
13	2	1	60
14	2	2	50
15	2	4	40
16	2	15	25

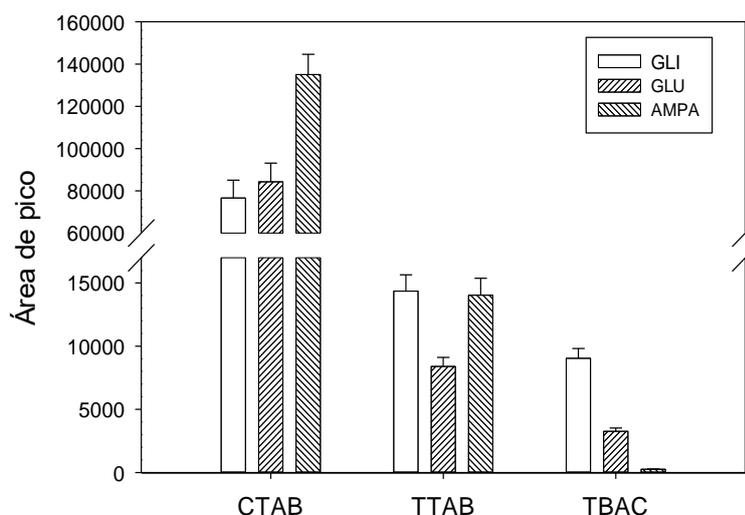
Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.3, donde se representa la media de las señales obtenidas para GLI, GLU y AMPA.

**Figura V.3.** Influencia de las condiciones de derivatización en la señal media.

Las condiciones óptimas para la derivatización de GLU coincidieron con las seleccionadas para GLI y AMPA en el Capítulo IV: adición de 1 mL de reactivo ( $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 10 mL de disolución de muestra y dejando la reacción transcurrir durante 2 h a  $25^\circ\text{C}$ . Se estudió la concentración de la disolución reguladora de borato entre 2 y 20 mM y la mayor sensibilidad se obtuvo para 5 mM.

### V.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE PRECONCENTRACIÓN

Considerando la elevada eficiencia de extracción encontrada para GLI y AMPA mediante el procedimiento IP-LLME propuesto en el Capítulo anterior, se procedió aquí directamente a estudiar el efecto de los surfactantes CTAB, TBAC y TTAB en concentración 0,5 mM sobre GLU usando MIBK como fase extractante. Aunque se conocía el comportamiento de GLI y AMPA, se incluyeron en el estudio. La Figura V.4 muestra la mayor eficiencia de CTAB para los tres analitos.

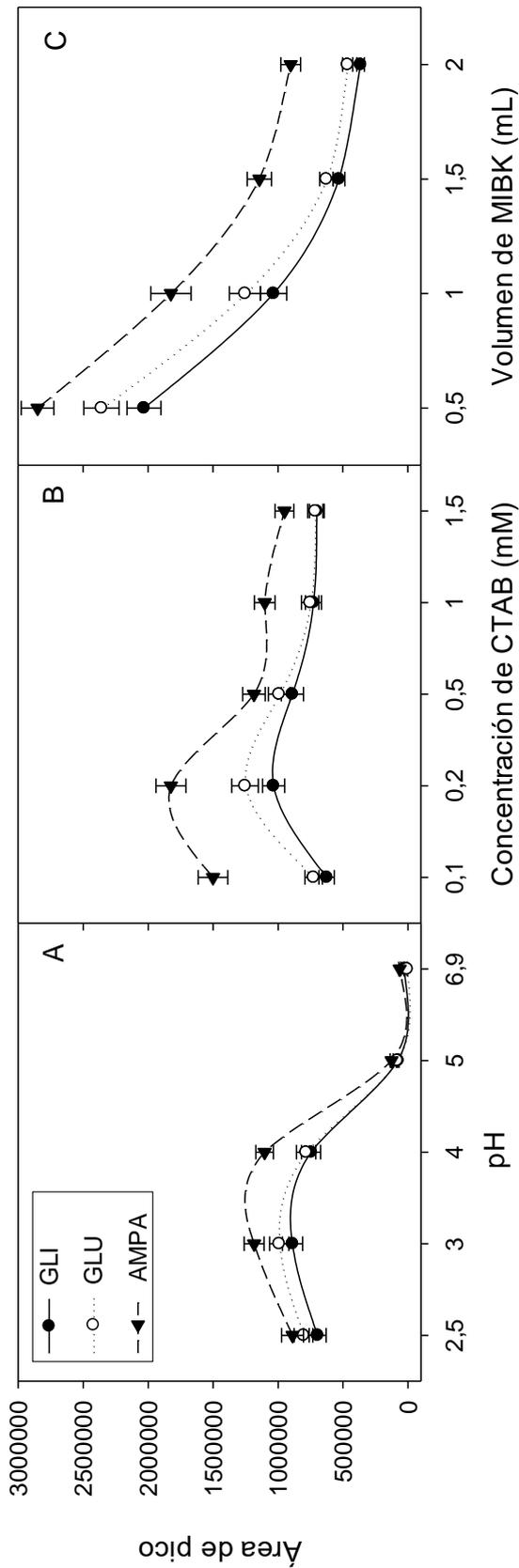


**Figura V.4.** Efecto de diferentes surfactantes en la eficiencia de extracción con MIBK. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar para  $n=3$ .

Se estudió la influencia del pH y la concentración de CTAB en la disolución acuosa, así como el volumen de fase extractante. Los resultados se muestran en la Figura V.5.

El herbicida GLU mostró un comportamiento muy similar al de los otros dos analitos y así fueron seleccionadas las mismas condiciones que las adoptadas para la determinación de GLI y AMPA mediante FLD, que correspondieron a pH 3, concentración

de CTAB 0,2 mM y 0,5 mL de MIBK. Volúmenes de MIBK inferiores a 0,5 mL dificultaban la recogida de la fase orgánica.



**Figura V.5.** Influencia de: (A) pH, (B) concentración de CTAB y (C) volumen de disolvente extractante, sobre la sensibilidad del procedimiento IP-LLME. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar para n=3.

### V.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Para la validación del método se obtuvieron las rectas de calibrado por análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados del área del pico frente a la concentración de analito, usando seis niveles de concentración comprendidos entre 0,5 y 200 ng mL<sup>-1</sup>. Los coeficientes de correlación obtenidos, en todos los casos mayores de 0,996, demostraron una excelente linealidad en el intervalo de concentración estudiado (Tabla V.3). Los límites de detección (LODs) y de cuantificación (LOQs), calculados según el criterio de relación señal/ruido igual a 3 y 10, respectivamente, se muestran en la Tabla V.3. El análisis consecutivo de diez alícuotas de una disolución estándar de 10 ng mL<sup>-1</sup> mediante el método desarrollado, permitió evaluar su repetitividad, obteniéndose valores de desviación estándar relativa (RSD) entre 6,2 y 8,3%, dependiendo del compuesto. Para la estimación de la precisión a través de la reproducibilidad, se analizaron seis alícuotas de la misma disolución estándar en días diferentes, obteniéndose valores de RSD de 10, 9,1 y 11% para GLI, GLU y AMPA, respectivamente (Tabla V.3).

**Tabla V.3**

Características analíticas del método IP-LLME con HPLC-MS/MS

Parámetros	GLI	GLU	AMPA
Pendiente (mL ng <sup>-1</sup> )	767	1517	2479
R <sup>2</sup>	0,9987	0,9964	0,9990
Intervalo de linealidad (ng mL <sup>-1</sup> )	0,5-200	0,5-200	0,5-200
LOD <sup>a</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	0,09	0,08	0,05
LOQ <sup>b</sup> (ng mL <sup>-1</sup> )	0,33	0,30	0,17
RSD <sup>c</sup> (%)	7,8	6,2	8,3
RSD <sup>d</sup> (%)	10	9,1	11

<sup>a</sup> Calculado para S/N=3. <sup>b</sup> Calculado para S/N=10. <sup>c</sup> n=10. <sup>d</sup> n=6.

La comparación de las pendientes de calibración usando el método propuesto y en ausencia de la etapa de preconcentración, permitió obtener los factores de enriquecimiento (EFs): 62 para GLI, 60 para GLU y 85 para AMPA.

Se estudió el efecto matriz para los distintos tipos de muestras analizadas (aguas, vegetales y suelos), con objeto de evaluar la posible supresión de las señales analíticas por coelución de compuestos de la matriz de la muestra que influyeran en la eficiencia de ionización de los analitos. El efecto matriz se puede atribuir en la detección MS a

desprotonación, a la presencia de componentes no volátiles y, en matrices complejas, a cantidades grandes de especies competitivas por los iones disponibles, aunque también puede ser atribuido a la etapa de preparación de la muestra.

Se compararon las pendientes de las gráficas de calibrado de estándares acuosos y de adiciones estándar para las diferentes muestras, obtenidas representando concentración (a cuatro niveles comprendidos entre 1 y 20 ng mL<sup>-1</sup> para aguas, 5 y 100 ng g<sup>-1</sup> para vegetales y 5 y 20 ng g<sup>-1</sup> para suelos) frente a área de pico y realizando un análisis de regresión lineal (Tabla V.4).

La aplicación de un estudio estadístico de análisis de varianza (ANOVA) para comparar las pendientes concluyó que no se apreciaron diferencias significativas, al nivel de confianza del 95%, para las pendientes de adiciones estándar a aguas y vegetales con respecto a las obtenidas frente a patrones acuosos, confirmando que la cuantificación de estas muestras puede llevarse a cabo frente a estándares externos. Sin embargo, sí se detectaron diferencias significativas, al mismo nivel de confianza, para las pendientes de adiciones estándar a los suelos, concluyendo que la calibración deberá llevarse a cabo por el método de adiciones estándar para compensar el efecto matriz de estas muestras.

**Tabla V.4**

Pendientes<sup>a</sup> de calibración para las muestras analizadas mediante IP-LLME con LC-MS/MS (mL ng<sup>-1</sup>)

Muestra	GLY	GLU	AMPA
Estándares acuosos	767 ± 19	1517 ± 52	2479 ± 55
Agua 1	752 ± 22	1589 ± 48	2421 ± 59
Agua 2	782 ± 31	1498 ± 63	2388 ± 75
Lechuga iceberg	749 ± 32	1612 ± 89	2354 ± 102
Espinacas	795 ± 41	1475 ± 91	2368 ± 94
Suelo 1	1266 ± 85	2295 ± 107	2061 ± 94
Suelo 2	2325 ± 108	3158 ± 95	3110 ± 87

<sup>a</sup> Valor medio ± desviación estándar (n=5).

Se obtuvieron los LOQs siguiendo la guía SANTE (SANTE/12682/2019) [40] para aguas (0,5 ng mL<sup>-1</sup>), y considerando la masa usada para vegetales (2 g) y para suelos (3

g), los valores de LOQ fueron 2,5 y 1,6 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. En materia de seguridad alimentaria, se confirma que la sensibilidad del método IP-LLME con LC-MS/MS propuesto, permite su aplicación en análisis de rutina de vegetales para velar por el cumplimiento de los límites máximos de residuos (MRLs) establecidos por la Comisión Europea, que corresponden a 0,1 mg kg<sup>-1</sup> para todos los vegetales frescos y congelados a excepción de patata (0,5 mg kg<sup>-1</sup>), maíz dulce (0,3 mg kg<sup>-1</sup>) y setas silvestres (50 mg kg<sup>-1</sup>) [6].

La Tabla V.5 muestra una comparación entre el método desarrollado y otros propuestos por otros autores para la determinación de GLI, GLU y AMPA en aguas, vegetales y suelos mediante LC-MS/MS.

**Tabla V.5**  
Comparación del método propuesto con otros previamente desarrollados basados en LC-MS/MS

Análitos	Muestra (Cantidad)	Tratamiento de la muestra	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Ref.
GLI/GLU/AMPA	Agua (80 mL)	Derivatización con FMOC y preconcentración por SPE	0,7; 2,3 y 0,8 ng L <sup>-1</sup>	19
GLI/AMPA	Agua (2 mL)	Sin derivatización, ajuste pH	0,5	31
GLI/GLU/AMPA	Agua (20 mL)	Sin derivatización, ajuste pH y MSPE	0,03-0,09	29
GLI/GLU/AMPA	Agua (2,5 mL)	Derivatización con FMOC y DLLME con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	28
GLI/AMPA	Frutas y vegetales (25 g)	SLE con agua. Sin derivatización	50 ng g <sup>-1</sup>	23
GLI/AMPA	Cereales (1 g)	SLE con H <sub>2</sub> O/MeOH, LLE con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Evaporación del extracto y derivatización con FMOC	20 ng g <sup>-1</sup>	20
GLI/GLU/AMPA	Frutas y vegetales (5 g)	SLE con H <sub>2</sub> O/MeOH acidificado. Sin derivatización	20 ng g <sup>-1</sup>	33
GLI/GLU	Maíz y arroz (5 g)	SLE con H <sub>2</sub> O/MeOH acidificado. Sin derivatización	10 ng g <sup>-1</sup>	32
GLI/AMPA	Frutas y vegetales (5 g)	SLE con MeOH acidificado. Sin derivatización	3 ng g <sup>-1</sup>	30
GLI/AMPA	Agua (5 mL) Vegetación (5 g) Suelos (5 g)	Agua: acidificación. Vegetación: SLE con agua y acidificación. Suelos: SLE con ácido fosfórico. Preconcentración por SPE. Sin derivatización.	10, 17 167, 267 ng g <sup>-1</sup> 1233, 2033 ng g <sup>-1</sup>	24
GLI/AMPA	Suelos (2 g)	Suelos: SLE con KOH, limpieza por SPE y derivatización con FMOC	50; 30 ng g <sup>-1</sup>	21
GLI/GLU/AMPA	Agua (10 mL) Vegetales (2 g) Suelos (3 g)	UAE para vegetales y suelos. IP-LLME con MIBK y derivatización con FMOC	0,5 2,5 ng g <sup>-1</sup> 1,6 ng g <sup>-1</sup>	Este trabajo

La sensibilidad alcanzada mediante IP-LLME para el análisis de aguas es similar a la encontrada por Pan y colaboradores [29] con la aplicación de MSPE usando absorbentes de estructura metal-orgánica, cuya síntesis resulta muy laboriosa. La aplicación de una etapa de preconcentración basada en el método convencional de SPE y usando 80 mL permitió al grupo de investigación de Hanke [19] obtener LODs del orden de las partes por trillón.

Con respecto al análisis de vegetales, IP-LLME proporcionó sensibilidades del mismo orden que otros métodos que implican mayor consumo de muestra [32] e incluso sistemas MS más sofisticados como el Orbitrap de alta resolución [30]. En el análisis de suelos, es de destacar la notable mejora de sensibilidad aquí alcanzada con respecto a otros métodos previamente publicados [17,22,24]. La aplicación de la etapa UAE en el tratamiento de suelos propuesto en este procedimiento usando una sonda de ultrasonidos en vez de un baño, como en el procedimiento de Sun y colaboradores [17], redujo la duración de esta etapa desde 30 hasta 5 min.

#### **V.3.4. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS Y ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN**

Se analizaron cinco muestras de agua de riego, cuatro de vegetales y tres de suelos agrícolas mediante el método propuesto IP-LLME combinado con LC-MS/MS, no encontrándose los compuestos de interés en ninguna de las muestras.

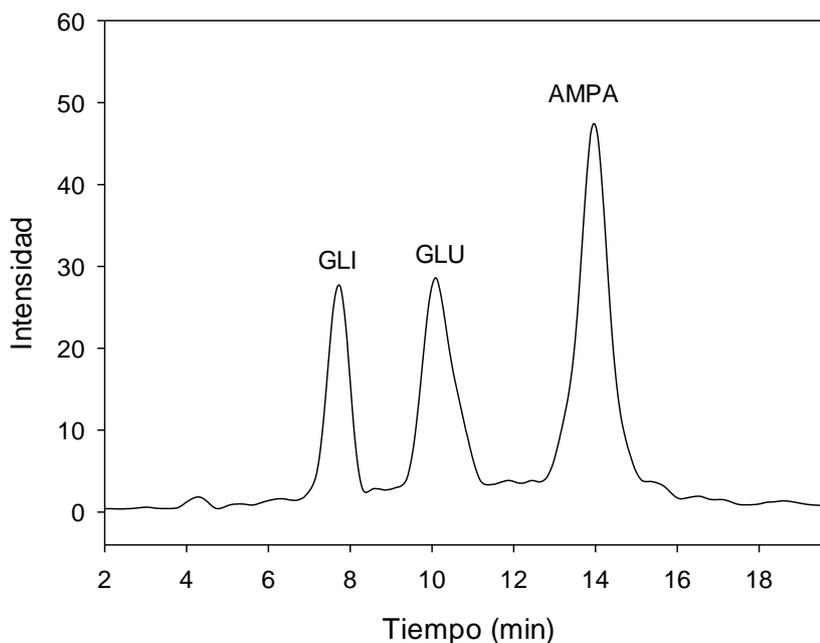
Para estudiar la exactitud del método desarrollado, se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando dos muestras diferentes de cada una de las matrices estudiadas a dos niveles de concentración (Tabla V.6). Las recuperaciones de los herbicidas GLI y GLU, así como del metabolito AMPA variaron entre 86 y 111%, dependiendo del compuesto y de la muestra.

Tabla V.6

Porcentajes de recuperación<sup>a</sup> obtenidos para las muestras estudiadas

Análitos	Nivel de fortificación (ng mL <sup>-1</sup> )		Agua 1		Agua 2	Nivel de fortificación (ng g <sup>-1</sup> )		Lechuga iceberg	Espinacas	Nivel de fortificación (ng g <sup>-1</sup> )		Suelo 1	Suelo 2
	1	5	91 ± 5	96 ± 4	102 ± 5	5	10	88 ± 9	107 ± 8	2	5	101 ± 9	111 ± 10
GLI	1	5	91 ± 5	96 ± 4	102 ± 5	5	10	88 ± 9	107 ± 8	2	5	101 ± 9	111 ± 10
	1	5	89 ± 7	105 ± 5	104 ± 7	5	10	90 ± 7	94 ± 9	2	5	95 ± 6	103 ± 7
GLU	1	5	89 ± 7	105 ± 5	104 ± 7	5	10	109 ± 7	105 ± 6	2	5	89 ± 7	102 ± 7
	1	5	103 ± 5	94 ± 6	92 ± 5	5	10	89 ± 8	98 ± 7	2	5	105 ± 5	88 ± 6
AMPA	1	5	103 ± 5	94 ± 6	92 ± 5	5	10	106 ± 5	110 ± 6	2	5	103 ± 5	86 ± 9
	1	5	94 ± 6	97 ± 7	97 ± 7	10	10	96 ± 8	98 ± 7	2	5	94 ± 6	95 ± 7

<sup>a</sup> Valores medios ± desviación estándar (n = 3).



**Figura V.6.** Cromatograma de iones totales de una muestra de agua de riego fortificada con GLI, GLU y AMPA a una concentración de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$ .

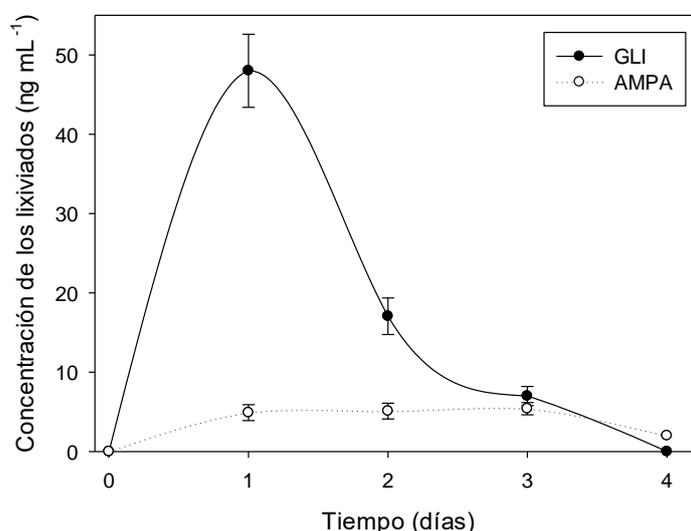
En la Figura V.6 se muestra el cromatograma de iones totales obtenido del análisis de una muestra de agua de riego, fortificada al nivel de  $5 \text{ ng mL}^{-1}$  para los tres analitos, mediante IP-LLME con LC-MS/MS.

La identidad de GLI, GLU y AMPA en las muestras fortificadas se confirmó comparando los tiempos de retención, sus transiciones y las relaciones de intensidad entre el ion principal y los secundarios, con los valores obtenidos usando disoluciones estándar, admitiéndose un 20% de variabilidad. La ausencia de picos interferentes a los tiempos de elución de GLI, GLU y AMPA para muestras blanco de agua, suelo y vegetales confirmó la selectividad del método.

### V.3.5. ESTUDIO DE DISIPACIÓN

Los resultados obtenidos para el estudio de disipación de GLI a través de agua de riego se muestran en la Figura V.7, donde la concentración media hallada en el agua de las tres macetas se representó en función del tiempo. Considerando que la planta se roció con 5 mL del preparado comercial previamente diluido, cada maceta recibió aproximadamente 50 mg de GLI.

El análisis del agua de riego recogida de cada maceta mostró una concentración máxima del herbicida 24 horas después de su aplicación, disminuyendo para tiempos más largos hasta 4 días tras la aplicación, cuando GLI ya no fue detectado.



**Figura V.7.** Resultados obtenidos en el análisis de los lixiviados recolectados de plantas tratadas con GLI. Las barras verticales corresponden a la desviación estándar para  $n=3$ .

Las concentraciones de GLI y AMPA detectadas 24 h después de la aplicación del formulado comercial permitieron concluir que una muy pequeña proporción del herbicida aplicado fue transportado por el agua de riego durante el primer día.

Por otro lado, el metabolito de GLI pudo ser cuantificado a partir de las 24 h de la aplicación, a una concentración que correspondía a la décima parte del contenido de GLI en el agua lixiviada. Esta concentración de AMPA se mantuvo prácticamente constante durante los dos días siguientes, disminuyendo para tiempos más largos. No se detectó AMPA después de 5 días de la aplicación de GLI.

## V.4. CONCLUSIONES

Comprobada la eficacia del método de microextracción IP-LLME desarrollado en el capítulo anterior para la preconcentración de GLI y AMPA, se amplió el abanico de aplicación para análisis de aguas, vegetales y suelos, incluyendo además a GLU como analito. El uso de MS/MS con analizador QqQ acoplado a LC permitió mejorar la sensibilidad del método, conduciendo a la inequívoca identificación de los analitos.

## V.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. Raina-Fulton, A review of methods for the analysis of orphan and difficult pesticides: glyphosate, glufosinate, quaternary ammonium and phenoxy acid herbicides, and dithiocarbamate and phthalimide fungicides, *Journal of AOAC International*, 9 (2014) 965- 977.
- [2] J.P.K. Gill, N. Sethi, A. Mohan, Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents, *Environmental Chemistry Letters*, 15 (2017) 85-100.
- [3] J. Struger, D. Thompson, B. Staznik, P. Martin, T. McDaniel, C. Marvin, Occurrence of glyphosate in surface waters of southern Ontario, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80 (2008) 378-384.
- [4] A.L. Valle, F.C.C. Mello, R.P. Alves-Balvedi, L.P. Rodrigues, L.R. Goulart, Glyphosate detection: methods, needs and challenges, *Environmental Chemistry Letter*, 17 (2019) 291-317.
- [5] A.H.C. Van Bruggen, M.M. He, K. Shin, V. Mai, K.C. Jeong, M.R., Finckh, J.G. Jr. Morris, Environmental and health effects of the herbicide glyphosate, *Science of the Total Environment*, 616-617 (2018) 255-268.
- [6] European Commission Pesticide database. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public>. Último acceso en marzo de 2020.
- [7] T. Arkan, I. Molnár-Perl, The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography, *Microchemical Journal*, 121 (2015) 99-106.
- [8] S.-H. Tseng, Y.-W. Lo, P.-C. Chang, S.-S. Chou, H.-Min Chang, Simultaneous quantification of glyphosate, glufosinate, and their major metabolites in rice and soybean sprouts by gas chromatography with pulsed flame photometric detector, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 4057-4063
- [9] T. Arkan, A. Csámpai, I. Molnár-Perl, Alkylsilyl derivatization of glyphosate and aminomethylphosphonic acid followed by gas chromatography mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 125 (2016) 219-223.
- [10] W. Zhang, Y. Feng, L. Ma, J. An, H. Zhang, M. Cao, H. Zhu, W. Kang, K. Lian, A method for determining glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid

- by gas chromatography-flame photometric detection, *Journal of Chromatography A*, 1589 (2019) 116-121.
- [11] M. Corbera, M. Hidalgo, V. Salvadó, Extraction and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA using anion-exchange solid phases. *Microchimica Acta*, 153 (2006) 203-209.
- [12] M. Piriyaipittaya, S. Jayanta, S. Mitra, N. Leepipatpiboon, Micro-scale membrane extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water followed by high-performance liquid chromatography and post-column derivatization with fluorescence detector, *Journal of Chromatography A*, 1189 (2008) 483–492.
- [13] M. Küsters, M. Gerhartz. Enrichment and low-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and gluosinate in drinking water after cleanup by cation exchange resin, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 1139-1146.
- [14] Y. Zhang, Y. Zhang, Q. Qu, G. Wang, C. Wang, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labelling reagent, *Analytical Methods*, 5 (2013) 6465.
- [15] M.E. Báez, E. Fuentes, M.J. Espina, J. Espinoza, Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in aqueous soil matrices: A critical analysis of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivatization reaction and application to adsorption studies, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 3125-33132.
- [16] C.E. Ramirez, S. Bellmund, P.R. Gardinali, A simple method for routine monitoring of glyphosate and its main metabolite in surface waters using lyophilization and LC-FLD + MS/MS. Case of study: canals with influence on Biscayne National Park, *Science of the Total Environment*, 496 (2014) 389-401.
- [17] L. Sun, D. Kong, W. Gu, X. Guo, W. Tao, Z. Shan, Y. Wang, N. Wang, Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1502 (2017) 8-13.
- [18] M. Ibáñez, O.J. Pozo, J.V. Sacho, F.J. López, F. Hernández, Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1081 (2005) 145-155.
- [19] I. Hanke, H. Singer, J. Hollender. Ultratrace-level determination of glyphosate, aminomethylphosphonic acid and glufosinate in natural waters by solid-phase

- extraction followed by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry: performance tuning of derivatization, enrichment and detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391 (2008) 2265-2276.
- [20] S. Goscinnny, H. Unterluggauer, J. Aldrian, V. Hanot, S. Masselter, Determination of glyphosate and its metabolite AMPA (aminomethylphosphonic acid) in cereals after derivatization by isotope dilution and UPLC-MS/MS, *Food Analytical Methods*, 5 (2012) 1177-1185.
- [21] A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, Direct liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean, *Journal of Chromatography A*, 1313 (2013) 157-165.
- [22] A.M. Botero-Coy, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, Improvements in the analytical methodology for the residue determination of the herbicide glyphosate in soils by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1292 (2013) 132-141.
- [23] M.-., Chen, Z.-Y. Cao, Y. Jiang, Z.-W. Zhu, Direct determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1272 (2013), 90-99.
- [24] L.J. Marek, W.C. Koskinen, Simplified analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water, vegetation and soil by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Pest Management Science*, 70 (2014) 1158-1164.
- [25] S. Adams, J. Guest, M. Dickinson, R.J. Fussell, J. Beck, F. Schoutsen, Development and validation of ion chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the multiresidue determination of polar ionic pesticides in food, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (2017) 7294-7304.
- [26] Y. Liao, J.M. Berthion, I. Colet, M. Merlo, A. Nougadere, R.W. Hu. Validation and application of analytical method for glyphosate and glufosinate in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1549 (2018) 31-38.

- [27] L.D. Demonte, N. Michlig, M. Gaggiotti, C.G. Adam, H.R. Beldoménico, M.R. Repetti. Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method, *Science of the Total Environment*, 645 (2018) 34-43.
- [28] E. Pinto, A. Gomes Soares, I.M.P.L.V.O. Ferreira, Quantitative analysis of glyphosate, glufosinate and AMPA in irrigation water by in situ derivatization – dispersive liquid-liquid microextraction combined with UPLC-MS/MS, *Analytical Methods*, 10 (2018) 554-561.
- [29] S. Pan, X. Chen, X. Li, M. Jin, Non-derivatization method for determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their main metabolites in environmental waters based on magnetic metal-organic framework pretreatment, *Journal of Separation Science*, 42 (2019) 1045-1050
- [30] S. Savini, B. Mirella, A. Sannino, An improved, rapid, and sensitive ultra-high-performance liquid chromatography-high-resolution orbitrap mass spectrometry analysis for the determination of highly polar pesticides and contaminants in processed fruits and vegetables, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67 (2019) 2716-2722.
- [31] E. Okada, T. Coggan, T. Anumol, B. Clarke, G. Allison, A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411 (2019) 715-724.
- [32] A. Santilio, C. Pompili, A. Giambenedetti, Determination of glyphosate residue in maize and rice using a fast and easy method involving liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS/MS), *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, (2019) 1-6.
- [33] S. Herrera López, J. Scholten, B. Kiedrowska, A. de Kok, Method validation and application of a selective multiresidue analysis of highly polar pesticides in food matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatography A*, 1594 (2019) 93-99.
- [34] K. da Mata, M. Zanetti Corazza, F. Midori de Oliveira, A.L. de Toffoli, C.R. Teixeira Tarley, A.B. Moreira, Synthesis and characterization of cross-linked molecularly imprinted polyacrylamide for the extraction/preconcentration of glyphosate and aminomethylphosphonic acid from water samples, *Reactive & Functional Polymers*, 83 (2014) 76-83.

- [35] Y.-W. Liou, S.-H. Wang, C.-H. Hsu, Y.-T. Hsu, C.-H. Chen, C.-C. Chen, C.-H. Lin, Rapid on-line microextraction method for the analysis of glyphosate in soy and pepper based on fiber-spray/mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, 430 (2018) 104-109.
- [36] D.J. Padilla-Alonso, M. Garza-Tapia, A. Chávez-Montes, A. González-Horta, N.H. Waksman de Torres, R. Castro-Ríos, A new temperature-assisted ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid water samples, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 40 (2017) 147-155.
- [37] E. Çetin, S. Şahan, A. Ülgen, U. Şahin, DLLME-spectrophotometric determination of glyphosate residue in legumes, *Food Chemistry*, 230 (2017) 567-571.
- [38] C.-C. Hsu, C.-W. Wang, Microscale solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and guava fruit extract using alumina-coated iron nanoparticles followed by capillary electrophoresis and electrochemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 8575-8580.
- [39] Y.L. Dong, D.Q. Guo, H. Cui, X.J. Li, Y.J. He, Magnetic solid phase extraction of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in river water using  $Ti^{4+}$ -immobilized  $Fe_3O_4$  nanoparticles by capillary electrophoresis, *Analytical Methods*, 7 (2015) 5862-5868.
- [40] European Commission, EU Reference Laboratories. SANTE/12682/2019. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. <https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public>. Último acceso en marzo de 2020.

# **Conclusiones**



Los resultados obtenidos en el acoplamiento de distintas técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) a la cromatografía líquida (LC) con detección fluorimétrica (FLD) y por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) permiten establecer como conclusión general de esta Memoria de Tesis Doctoral que dicho acoplamiento se presenta como una plataforma de análisis de gran versatilidad, ofreciendo diferentes posibilidades para la resolución de problemas en diversos ámbitos.

La etapa de preparación de muestra se ha centrado en procedimientos basados en los principios de la Química Analítica Verde, con mínima generación de residuos peligrosos y que pueden catalogarse como seguros y respetuosos con el medio ambiente. En este sentido, se ha aplicado extracción asistida por ultrasonidos (UAE), microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME), extracción en punto de nube (CPE) y microextracción líquido-líquido con pares iónicos (IP-LLME). Así, el método analítico se ha adaptado al problema planteado usando la técnica LPME más adecuada para cada aplicación, siendo los extractos obtenidos analizados mediante LC combinada con FLD o MS/MS, dependiendo de la naturaleza de los compuestos a analizar.

En esta Tesis Doctoral se presentan procedimientos para la identificación y cuantificación de diferentes compuestos químicos en distintas muestras, seleccionando tanto los compuestos de interés como las muestras objeto de análisis con el fin de aportar conocimiento y soluciones a problemas de interés social. En este sentido, se han desarrollado y validado métodos de análisis para la determinación de biomarcadores de ciertas enfermedades como la diabetes (glioxal y metilglioxal) en orina, inhibidores sintéticos de la enzima fosfodiesterasa-5 (sildenafil, tadalafil y vardenafil y N-desmetilsildenafil) en orina y aguas obtenidas de plantas de tratamiento de aguas residuales, distintas formas de la vitamina K (filoquinona, menaquinona y menadiona) en alimentos vegetales, así como los herbicidas glifosinato, glifosato y su principal metabolito en aguas de riego, vegetales y suelos.

Las conclusiones específicas que pueden resaltarse de esta Tesis Doctoral son:

1. Los procedimientos de microextracción desarrollados contribuyen al avance de la implantación de la miniaturización en los laboratorios analíticos, pues consiguen la preconcentración de los analitos de forma limpia, rápida, sencilla, eficaz, barata y con un consumo mínimo de disolventes orgánicos.
2. La elevada relación entre el volumen de muestra y el volumen de fase extractante, así como las condiciones experimentales que favorecen la afinidad de los analitos hacia la fase de extracción, han permitido alcanzar factores de preconcentración elevados en todos los casos.
3. En todas las técnicas LPME seleccionadas, DLLME, SA-DLLME, CPE e IP-LLME, el equilibrio de extracción se ha alcanzado en tiempos muy cortos, entre 20 y 60 segundos. Esta característica es una de las ventajas de las técnicas LPME frente a las basadas en microextracción en fase sólida.
4. Se ha aplicado DLLME usando 1-undecanol como extractante para la preconcentración de inhibidores de la fosfodiesterasa-5 y  $\alpha$ -oxoaldehídos. En este último caso, la presencia de surfactante en la mezcla ternaria de extracción demostró incrementar la eficiencia del proceso notablemente.
5. El surfactante no iónico Tritón X-45 permite preconcentrar tres formas de la vitamina K mediante CPE. La aplicación de energía de microondas a la mezcla de extracción provocó la rápida aparición de turbidez, consecuencia de la disgregación del extractante en microvolúmenes. Este efecto se traduce en un aumento sustancial de la superficie de contacto entre las fases dadora y aceptora y, por tanto, en una extracción casi instantánea.
6. La preconcentración de GLI, GLU y AMPA en metil isobutil cetona se llevó a cabo formando previamente un par iónico con CTAB y en ausencia de disolvente dispersante, proponiendo así el método IP-LLME.
7. La aplicación de las técnicas LPME a muestras sólidas requiere una etapa previa de extracción de los compuestos de interés hacia una fase líquida.

Para el aislamiento de los analitos desde las muestras sólidas, la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (UAE) aplicada por medio de una sonda directamente sumergida en la mezcla muestra-disolvente de extracción ha proporcionado excelentes porcentajes de extracción en tiempos muy cortos, concretamente entre 1 y 5 min.

8. En todos los procedimientos propuestos, las separaciones se han llevado a cabo mediante LC en fase reversa, teniendo en cuenta las características de los compuestos a analizar, bien en su forma química original o derivatizada, que favorecía la interacción con la fase estacionaria de carácter apolar. Se han empleado distintos disolventes como fases móviles, incluyendo agua, acetonitrilo, metanol y ácido fórmico, así como disoluciones reguladoras. Siempre que ha sido posible, los compuestos se han separado mediante elución isocrática, aunque en algunos casos se ha requerido la aplicación de elución por gradiente, acortando considerablemente el tiempo de separación.
9. Para la determinación de compuestos de fórmulas químicas muy sencillas, como los  $\alpha$ -oxoaldehídos y los herbicidas glufosinato, glifosato y su principal metabolito, fue necesaria la aplicación de una etapa de derivatización para su transformación en compuestos susceptibles de ser monitorizados mediante FLD, para mejorar su detección en MS/MS al incrementar su masa molecular, o simplemente para mejorar su afinidad hacia fases extractantes de carácter orgánico. Así, para la determinación de los  $\alpha$ -oxoaldehídos, su reacción con 2,4-diaminonaftaleno permitió la determinación mediante FLD, que también pudo aplicarse al derivatizar glifosato y AMPA con cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (FMOC). Los productos de derivatización glifosato, glufosinato y AMPA con FMOC fueron detectados mediante MS/MS.
10. El efecto matriz ha sido estudiado en todos los métodos desarrollados, considerando el impacto sobre la eficiencia de ionización en MS, así como el ruido del detector, que determina de forma directa los límites de detección y cuantificación, como resultado directo de la etapa de preparación de la muestra. Para el análisis cuantitativo de las muestras, se ha aplicado en cada caso la técnica de calibración más adecuada.
11. La optimización de los procedimientos ha implicado tanto métodos univariantes como multivariantes con diseños experimentales de matriz

ortogonal. La eficiencia de algunos procedimientos de extracción y preconcentración se ha estudiado usando el método Taguchi, de modo que las variables seleccionadas se consideran conjuntamente, teniéndose en cuenta sus interacciones y pudiendo así identificar las mejores condiciones de trabajo con un número limitado de experimentos.

La tabla siguiente resume las características más importantes de los métodos de análisis propuestos en esta Tesis Doctoral, atendiendo a las variables cromatográficas y de detección, al tipo de muestra y su tratamiento, así como a los niveles de sensibilidad alcanzados.

Características de los procedimientos desarrollados

Analitos	Columna	Fase móvil	Detector	Muestra	Preparación de la muestra			LOD <sup>a</sup>
					Extracción	Derivatización	Preconcentración	
$\alpha$ -Oxaldehídos: GO y MGO	Tracer Extrasil ODS2 (150x4,6 mm, 5 $\mu$ m)	MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40 Isocrático	FLD (267/503 nm)	Orina	DAN 0,8 mM (4 °C, 8 h)	SA-DLLME (Tritón X-114; 75 $\mu$ L 1- undecanol + 0,5 mL EtOH)	13; 16 ng L <sup>-1</sup>	
Inhibidores PDE-5: DSIL, TAD, VAR y SIL	Zorbax Eclipse XDB C-18 (50x4,6 mm, 1,8 $\mu$ m)	ACN:AcNH <sub>4</sub> (50 mM, pH 6,9) Gradiente	ESI-QqQ- MS/MS	Orina Agua	LLE con ACN. Sin extracción	DLLME (75 $\mu$ L 1- undecanol + 0,5 ó 1 mL ACN)	15-250 ng L <sup>-1</sup>	
Vitamina K: PK, MK y MD	Tracer Extrasil ODS2 (150x4,6 mm, 5 $\mu$ m)	AcNH <sub>4</sub> , 10 mM y HCOOH 0,1% en: Agua (A) o MeOH (B). Gradiente: A:B	ESI-QqQ- MS/MS	Vegetales	UAE con ACN	CPE (50 $\mu$ L Tritón X-45 (15% m/v))	0,8-16 ng g <sup>-1</sup>	
Herbicidas: GLI y AMPA	Discovery HS- PEG 5 (150x4,6 mm, 5 $\mu$ m)	ACN:AcNH <sub>4</sub> (50 mM, pH 4) 20:80 Isocrático	FLD (216/316 nm)	Aguas Vegetales	UAE y LLE con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> LLE (2x 2 mL AcEt)	IP-LLME (0,5 mL MIBK + 0,1 mL CTAB (25 mM))	0,2; 0,15 ng mL <sup>-1</sup> 1; 0,75 ng g <sup>-1</sup>	
Herbicidas: GLI, GLU y AMPA	Discovery HS- PEG 5 (15 cmx4,6 mm, 5 $\mu$ m)	ACN:AcNH <sub>4</sub> (50 mM) 15:85 Isocrático	ESI-QqQ- MS/MS	Agua Vegetales Suelos	UAE y LLE con CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> LLE (2x 2 mL AcEt)	IP-LLME (0,5 mL MIBK + 0,1 mL CTAB (25 mM))	0,05-0,09 ng mL <sup>-1</sup> 0,25-0,45 ng g <sup>-1</sup> 0,08-0,2 ng g <sup>-1</sup>	

<sup>a</sup> S/N = 3



# Anexo



La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se han presentado en Congresos Nacionales e Internacionales:

- **Glyoxal and methylglyoxal determination in urine by surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and LC.**

N. Campillo, P. Viñas, J. Marín, M. Hernández-Córdoba.

*Bioanalysis* 9, nº 4 (2017) 369-379.

DOI: 10.4155/bio-2016-0217

Presentado como comunicación oral en “II Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia”, Murcia (2016).

- **Determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors by LC-MS<sup>2</sup> in waters and human urine submitted to dispersive liquid-liquid microextraction.**

N. Campillo, J. Marín, M. Hernández-Córdoba, J. Fenoll, I. Garrido, I. López-García, P. Viñas.

*Talanta* 174 (2017) 638-644.

DOI: 10.1016/j.talanta.2017.06.076

Presentado como póster en “12<sup>th</sup> Annual LC/MS/MS Workshop on Environmental Applications and Food Safety”, Barcelona (2016)

- **Microwave assisted cloud point extraction for the determination of vitamin K homologues in vegetables by liquid chromatography with tandem mass spectrometry.**

N. Campillo, J. Marín, P. Viñas, I. Garrido, J. Fenoll, M. Hernández-Córdoba.

*Journal Agricultural and Food Chemistry* 67 (2019) 6658-6664.

DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01617.

Presentado como póster en “International Conference on Environmental & Food Monitoring”, Santiago de Compostela (2018).

- **Liquid-liquid microextraction of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid for the analysis of agricultural samples by liquid chromatography**

J. Marín, N. Campillo, M. Hernández-Córdoba, I. Garrido, J. Fenoll, P. Viñas.

*Analytical Methods* (2020).

DOI: 10.1039/d0ay00120a

Presentado como comunicación oral en “III Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia”, Murcia (2017).

# **Abreviaturas**



## ABREVIATURAS

ACN: acetonitrilo

AGEs: productos finales de glicación avanzada

AMPA: ácido aminometilfosfónico

ANOVA: análisis estadístico de la varianza

AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos

APCI: ionización química a presión atmosférica

API: ionización a presión atmosférica

APPI: fotoionización a presión atmosférica

ASE: extracción acelerada con disolventes

BSTFA: bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida

CAE: extracción coacervativa

CCD: diseño central compuesto

CE: electroforesis capilar

cGMP: monofosfato cíclico de guanosina

CI: ionización química

CID: disociación por colisión inducida

CMC: concentración micelar crítica

CPE: extracción en punto de nube

CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DAD: detector de díodos en serie

DAN: 2,3-diaminonaftaleno

DC: corriente continua

DES: disolvente eutéctico profundo

DI: inmersión directa

DLLME: microextracción dispersiva líquido-líquido

DMSO: dimetilsulfóxido

DSIL: N-desmetilsildenafil

DSPE: extracción en fase sólida dispersa

EF: factor de enriquecimiento

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EI: impacto electrónico

EIC: cromatograma de iones extraídos

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EPA: Agencia de Protección Ambiental

ER: recuperación de la extracción

ESI: ionización por electrospray

EU: Unión Europea

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FLD: detector de fluorescencia

FMOC: cloroformiato de 9-fluorenilmetilo

GC: cromatografía de gases

GLI: glifosato

GLU: glufosinato

GO: glioxal

HF: fibra hueca

HS: espacio de cabeza

HSSE: extracción por adsorción en espacio de cabeza

IL: líquido iónico

IP: pares iónicos

IS: estándar interno

ISO: Organización Internacional de Estandarización

IT: trampa de iones

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LC: cromatografía líquida

LLE: extracción líquido-líquido

LLLME: microextracción líquido-líquido-líquido

LLME: microextracción líquido-líquido

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

LPME: microextracción en fase líquida

MAE: extracción asistida por microondas

MD: menadiona o vitamina K<sub>3</sub>

MGO: metilglioxal

MIBK: metil isobutil cetona

MIP: polímero de impresión molecular

MK: menaquinona o vitamina K<sub>2</sub>

MNPs: nanopartículas magnéticas

MRL: nivel máximo de residuo

MRM: monitorización de reacciones múltiples

MS: espectrometría de masas

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

MSPD: dispersión de matriz en fase sólida

MSPE: extracción en fase sólida magnética

OAD: diseño experimental de matriz ortogonal

ODS: octadecilsilano

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPA: o-ftalaldehído

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PDE-5: fosfodiesterasa tipo-5

PEG: polietilenglicol

PK: filoquinona o vitamina K<sub>1</sub>

PLE: extracción líquida presurizada

PT: purga y trampa

Q: cuadrupolo simple

QAV: química analítica verde

QIT: trampa de iones cuadrupolar

QqQ: cuadrupolo triple

QTOF: cuadrupolo con tiempo de vuelo

RF: radiofrecuencia

RP: fase reversa

RSD: desviación estándar relativa

SA: asistido por surfactante

SBSE: extracción por adsorción sobre barras agitadoras

SD: desviación estándar

SDME: microextracción en gota simple

SDS: dodecilsulfato de sodio

SFDME: microextracción por solidificación de gota orgánica flotante

SFE: extracción en fluidos supercríticos

SFOD: solidificación de gota orgánica flotante

SIL: sildenafil

SIM: monitorización de iones seleccionados

SLE: extracción sólido-líquido

SLME: microextracción con membrana líquida

S/N: relación señal/ruido

SPE: extracción en fase sólida

SPME: microextracción en fase sólida

SPS: disolvente de polaridad conmutable

SRM: material estándar de referencia

SUPRAS: disolvente supramolecular

SWE: extracción en agua subcrítica

TAD: tadalafil

TBAC: cloruro de tetrabutilamonio

TIC: cromatograma de iones totales

TOF: tiempo de vuelo

TTAB: bromuro de tetradeciltrimetilamonio

UAE: extracción asistida por ultrasonidos

UPLC: cromatografía líquida de ultra-alta resolución

USAEME: microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos

UV-Vis: ultravioleta-visible

VAR: vardenafil

WWTP: planta de tratamiento de aguas residuales