

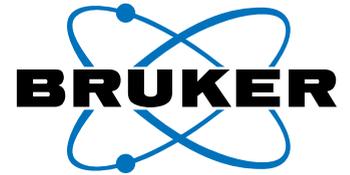
# CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

**SECYTA**

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
CROMATOGRAFÍA  
Y TÉCNICAS AFINES

BOLETÍN DE LA SECYTA  
VOLUMEN 38 NÚM. 1 (2017)  
WWW.SECYTA.ORG

**38**

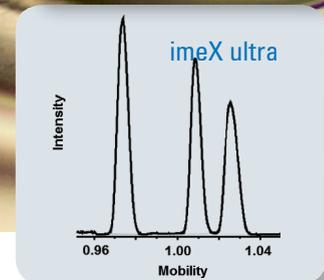
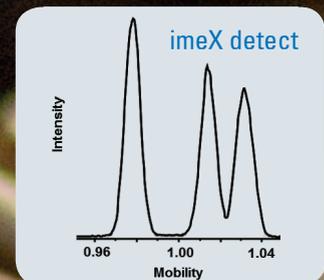
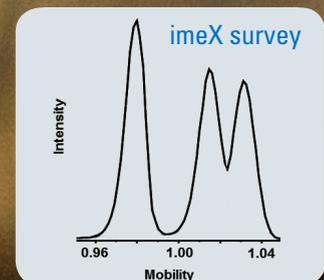


# Bruker timsTOF™

Flexibilidad para realizar sus ideas



La tecnología imeX™ exclusiva ofrece alta resolución en movilidad iónica totalmente ajustable. Permite resolver picos solapados, focalizarse en picos de interés, o analizar con precisión CCS.



La movilidad iónica es una técnica de separación eficaz complementaria a la espectrometría de masas que resuelve la estructura tridimensional de un ion. Incrementa la capacidad analítica del sistema, así como la confianza en la caracterización del compuesto.

## **timsTOF, Bruker presenta la nueva generación de la espectrometría de masas con movilidad iónica.**

Bruker ha diseñado el espectrómetro de masas timsTOF como una plataforma abierta, que pueda satisfacer su experiencia y curiosidad.

Para más información, visite [www.timstof.com](http://www.timstof.com)

Innovation with Integrity

TIMS-QTOF MS

Solo para investigación. No para uso diagnóstico.

# CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

Madrid, 2017 Vol. 38, núm. 1

ISSN 1132-1369

Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (<http://www.secyta.org>)

## ÍNDICE

### 2 EDITORIAL

#### ARTÍCULO

- 3 Electroforesis Capilar Zonal y Cromatografía Electrocinética Micelar acopladas a Espectrometría de Masas para la determinación de benzimidazoles en muestras alimentarias y biológicas.

*C. Tejada-Casado, D. Moreno-González, F.J. Lara, M. Olmo-Iruela, A.M. García-Campaña*

#### NOTICIAS DE LA SECyTA

- 19 15<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental (JAI).

- 22 Nuevos socios

#### INFORMACIONES

- 23 Congresos celebrados

- 27 Calendario de actividades

- 28 Nuevas Tesis Doctorales

#### INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

- 30 Artículos de interés

#### DE NUESTRAS EMPRESAS COLABORADORAS

- 34 Notas técnicas

- 46 Novedad técnica

-----

**Redacción:** María Luz Sanz ([mlsanz@iqog.csic.es](mailto:mlsanz@iqog.csic.es))  
Ana Cristina Soria Monzón ([acsoria@iqog.csic.es](mailto:acsoria@iqog.csic.es))  
Mario Fernández ([mario@iqog.csic.es](mailto:mario@iqog.csic.es))  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel.91-562 29 00  
Fco. Javier Moreno ([javier.moreno@csic.es](mailto:javier.moreno@csic.es))  
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CSIC-UAM)  
Nicolás Cabrera 8, 28049 Madrid. Tel. 91-0017900

**Publicidad:** Mario Fernández ([mario@iqog.csic.es](mailto:mario@iqog.csic.es))  
Instituto de Química Orgánica General (CSIC).  
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid. Tel. 91 562 29 00

**Colaboradores:** M. De Frutos

**Depósito legal:** M-1902-1975

**Diseño, preimpresión e impresión:** VIRTUALYMAS • Duque de Sevilla 16 • 28002 Madrid • Tel. 91 768 49 50

**Diseño de portada:** Pau de Riba

Los autores son responsables del contenido de sus artículos.

# EDITORIAL

Queridos socios de la SECyTA,

Una vez finalizada la XVI Reunión Científica de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines que tuvo lugar del 2 al 4 de noviembre de 2016 en Sevilla, este año nuestros esfuerzos se han centrado en la organización de las 15<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, que se celebrarán en Barcelona dentro del marco de Expoquimia del 3 al 5 de Octubre de este mismo año, en donde se celebrará nuestra XVII Reunión Científica. Como ya os comenté en la última Asamblea General de la SECyTA, la propuesta económica para la organización de las JAI ofrecida hasta aquel momento a la SEQA por los responsables de Expoquimia se encontraba muy alejada de las condiciones económicas de ediciones anteriores, por lo que era lógico pensar que en el año 2017 no se celebrarían las JAI, después de más de 42 años de vida. Con esta premisa, la Junta de Gobierno de la SECyTA acordó empezar a preparar la organización de la XVII Reunión Científica de la SECyTA. Sin embargo, a principios de año recibimos la propuesta de organizar las 15<sup>as</sup> JAI por parte de la directora de Expoquimia, la Sra. Pilar Navarro, manteniendo las mismas condiciones económicas y de gestión que en la edición de 2014. He de confesaros que la decisión de aceptar la propuesta no fue nada fácil, pero la necesidad de dar continuidad a estas Jornadas por el interés que creemos aún mantiene entre los miembros de las diferentes sociedades participantes nos hizo tomar esta decisión. Por tanto, en febrero de este año se inició la organización de las JAI junto con la Sociedad Española de Espectrometría de Masas (SEEM), la Sociedad de Espectroscopia Aplicada (SEA) y la Sociedad Española de Proteómica, a quien quiero agradecer su inestimable colaboración. Desgraciadamente, en esta ocasión no podremos contar con la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA).

Como en ediciones anteriores, las JAI cubrirán una amplia variedad de temáticas como la calidad y seguridad alimentaria, medio ambiente, análisis clínico y de productos farmacéuticos, técnicas ómicas, nuevos desarrollos en instrumentación analítica y en preparación de muestra, automatización y miniaturización, análisis de procesos y productos industriales, especiación, sensores y biosensores, así como contribuciones teóricas y quimiometría. En estos momentos contamos con conferenciantes invitados de primera línea como Bruno Le Bizec, Stuard Harrad, Govert Somsen, Jorge Pisonero, Rosa M<sup>a</sup> Marcé y Rosa Ventura, que nos presentarán los últimos avances en el análisis medioambiental y alimentario, bioanálisis y caracterización de biomoléculas, instrumentación analítica, tratamiento de muestra y análisis antidopaje. Esperamos poder preparar con ayuda de los conferenciantes invitados y vuestras comunicaciones un programa científico atractivo y de calidad a la altura de vuestras expectativas, todo ello potenciado con una amplia exposición comercial dedicada a la instrumentación analítica.

No querría finalizar esta editorial sin destacar los esfuerzos que desde la Junta de Gobierno estamos haciendo para potenciar la política de becas para que nuestros jóvenes investigadores puedan asistir a nuestras reuniones y a los congresos internacionales y patrocinados relacionados con las técnicas de separación. En este sentido, me gustaría destacar el patrocinio, de gran interés entre nuestros asociados, de la asistencia a la *VIII Reunión de la Sociedad Española de Espectrometría de Masas y V Reunión Nacional de Dioxinas, Furanos y compuestos orgánicos persistentes relacionados* (Barcelona, del 12 al 16 Junio 2017), el *19<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies (ExTech)* (Santiago de Compostela, del 27 al 30 Junio 2017) y el *28<sup>th</sup> Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference (PBA 2017)* (Madrid, del 2 al 5 Julio 2017).

Por último, me gustaría animaros a participar en las 15<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental, donde se celebrará la 17<sup>a</sup> Asamblea General de la SECyTA, con vuestras comunicaciones. Podéis encontrar más información, así como los formularios para el envío de resúmenes y de inscripción correspondiente, en la dirección web: <http://jai2017.com>. Recordad que los estudiantes pueden solicitar becas de asistencia y ayuda de viaje. Os esperamos a todos en Barcelona.

**Francisco Javier Santos Vicente**  
Presidente de la SECyTA

## ARTÍCULO

# Electroforesis capilar zonal y cromatografía electrocinética micelar acopladas a espectrometría de masas para la determinación de benzimidazoles en muestras alimentarias y biológicas

Carmen Tejada-Casado, David Moreno-González, Francisco J. Lara, Monsalud del Olmo-Iruela, Ana M. García-Campaña\*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Av. Fuente Nueva s/n, E-18071 Granada, España. e-mail: amgarcia@ugr.es. Teléfono: 958242385

## RESUMEN

En este estudio se comparan dos modos de electroforesis capilar (CE), como son la electroforesis capilar zonal (CZE) y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), acoplados a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para la determinación de residuos de benzimidazoles (BZs) en muestras de diversa naturaleza. Todos los parámetros que afectan a la separación electroforética, así como a la detección MS/MS, han sido optimizados con el objetivo de mejorar la sensibilidad, la resolución y la precisión. Con el método CZE se han determinado 12 BZs en muestras de carne con un tiempo de análisis de 32 min, mientras que con el método MEKC se han conseguido determinar 13 BZs en muestras de orina animal en 20 min. Se caracterizaron ambos métodos en las matrices seleccionadas, en términos de linealidad, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), repetibilidad, precisión intermedia y veracidad por medio de estudios de recuperación, obteniendo excelentes resultados, lo que pone de manifiesto la relevancia de la CE-MS/MS como alternativa a las técnicas cromatográficas en el ámbito de la calidad y seguridad alimentaria o la monitorización terapéutica de fármacos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los benzimidazoles (BZs) son fármacos de uso veterinario ampliamente utilizados en la prevención y el tratamiento de infecciones parasitarias en ganadería (bovinos, ovinos, caprinos, porcinos), avicultura y acuicultura (Danaher y col., 2007). Algunos BZs también han encontrado aplicaciones como fungicidas pre o post-cosecha para el control de una amplia gama de hongos que afectan principalmente a los cultivos extensivos, especialmente cuando las frutas y verduras recogidas son almacenadas.

Hoy en día están aumentando las alertas debido a un uso indebido de los BZs. Sus residuos pueden causar efectos negativos tanto en la salud humana como en la animal, ya sean malformaciones congénitas, teratogé-

sis, diarrea, anemia o edemas pulmonares entre otros (Loyacano y col., 2002). Es por ello que la Unión Europea (EU) ha establecido unos límites máximos de residuo (MRL) para los BZs y sus metabolitos en productos de origen animal (Reglamento (UE) 37/2010, 2010). En el caso de muestras de carne (músculo de pollo y de cerdo), estos MRLs están comprendidos entre 50 y 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dependiendo del BZ, de modo que resulta necesario su control analítico para un consumo seguro del alimento. La determinación de estos compuestos también es de interés en muestras biológicas de animales, como la orina, ya que la monitorización terapéutica de medicamentos veterinarios en esta matriz es útil para evaluar y ajustar la dosis administrada. Considerando la complejidad que presentan las matrices de origen animal, como la carne o la orina, y las concentraciones a las que se encuentran estos compuestos, es necesario el desarrollo de métodos de análisis selectivos y sensibles para determinar estos residuos con fines alimentarios o clínicos.

Durante los últimos años se han desarrollado métodos para la determinación de BZs en muestras ambientales, clínicas y alimentarias. Tradicionalmente, se ha empleado la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a diferentes sistemas de detección tales como absorción ultravioleta (UV) (Rummel y col., 2011; Santaladchayakit y Srijaranai, 2014; Boontongto y col., 2014), fluorescencia (Rummel y col., 2011; López Monzón y col., 2007) y espectrometría de masas (MS) (Xia y col., 2010; Martínez-Villalba y col., 2013). En menor extensión se han empleado otras metodologías como la cromatografía de gases acoplada a MS (Anastassiades y Schwack, 1998; Marti y col., 1990). Una alternativa muy prometedora para la determinación de estos compuestos es la electroforesis capilar (CE). Esta técnica presenta algunas ventajas en comparación con HPLC tales como cortos tiempos de análisis, altas eficacias de pico, bajo volumen de muestra, bajo consumo de reactivos y por lo tanto un bajo impacto medioambiental, siendo considerada una técnica verde. CE-UV en sus diferentes modalidades, CZE (Hu y col., 2012) o MEKC

(Soliman y Donkor, 2014; Shen y col., 2009) ha sido la metodología más empleada para la determinación de estos antihelmínticos. Sin embargo, el principal problema de estos métodos radica en la baja sensibilidad debida al bajo volumen de muestra inyectado y al pequeño paso óptico de la ventana de detección. Otro punto a tener en cuenta es que estos métodos no cumplen los criterios de selectividad exigidos por la UE para poder confirmar inequívocamente estos residuos (Decisión 2002/657/CE, 2002). A este respecto, la UE ha establecido criterios de funcionamiento y requisitos para los métodos analíticos, proponiendo la MS como una técnica de detección para poder cumplir dichos criterios. Aunque existe un estudio previo en bibliografía sobre la determinación de BZs empleando CZE-MS (Domínguez-Álvarez y col., 2013), el método propuesto no permite una identificación inequívoca de estos compuestos ya que no se llevaron a cabo experimentos de fragmentación (MS/MS). En el presente artículo se estudia la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) como sistema de detección acoplado tanto a CZE como a MEKC para la determinación de residuos de BZs. Además, han sido evaluadas diferentes estrategias de preconcentración en línea: el modo de apilamiento normal o *normal stacking mode* (NSM) (Takeda y col., 2004) en CZE y el barrido o *sweeping* (Breadmore y col., 2015) en MEKC con el objetivo de mejorar la sensibilidad en CE.

Otro punto crítico en el establecimiento de metodologías analíticas para el control de residuos en muestras biológicas o de alimentos es la adecuada selección del tratamiento de muestra. La determinación de BZs no es una tarea fácil en el caso de muestras complejas, ya que puede resultar muy complicado separar los analitos de interés del resto de componentes de la muestra. En el caso del método de CZE-MS/MS aplicado a la determinación de BZs en muestras de carne de pollo y cerdo, como etapa de limpieza se ha empleado la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), después de una extracción sólido-líquido menos selectiva. Las principales ventajas de esta metodología de tratamiento de muestra han sido ampliamente descritas con anterioridad (Ahmad y col., 2015). Por otro lado, para el método MEKC-MS/MS aplicado en orina, sólo hubo que diluir las muestras. Esta metodología permite la eliminación de la etapa de limpieza con la consiguiente reducción de trabajo experimental, reactivos, consumibles y tiempo de análisis (Deventer y col., 2014).

Teniendo en cuenta estas consideraciones se ha llevado a cabo una comparación de los dos métodos CE-MS/MS propuestos para la determinación de BZs en muestras alimentarias y biológicas. Han sido estudiadas todas las variables que afectan a la separación electroforética y la detección por MS. Finalmente, las principales

características de ambos métodos fueron comparadas, evaluando ambas metodologías con objeto de permitir la elección de una de ellas en función de la aplicación requerida.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y los disolventes fueron de grado HPLC. Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), acetonitrilo (MeCN), metanol (MeOH) e isopropanol (IPA) fueron suministrados por VWR (Rador, PA, E.E.U.U.). Los ácidos perfluorooctanoico (PFOA) (96%), fórmico y acético se obtuvieron de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, E.E.U.U.). Amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) (30%) e hidróxido sódico (NaOH) se compraron a Panreac-Química (Madrid, España). Merck (Darmstadt, Alemania) fue el proveedor de etanol (EtOH). Durante todo el trabajo se utilizó agua ultra-pura obtenida mediante un sistema Milli-Q plus (Millipore, Bedford, MA, E.E.U.U.).

Los patrones analíticos de albendazol (ABZ), sulfona de albendazol (ABZ-SO<sub>2</sub>), sulfóxido de albendazol (ABZ-SO), carbendazima (CBZ), benomilo (BEN), fenbendazol (FBZ), sulfona de fenbendazol (FBZ-SO<sub>2</sub>), sulfóxido de fenbendazol (FBZ-SO), amino mebendazol (MBZ-NH<sub>2</sub>), mebendazol (MBZ), oxibendazol (OXI), tiabendazol (TBZ) y 5-hidroxi mebendazol (MBZ-OH) fueron suministrados por Sigma Aldrich.

Las disoluciones patrón de cada BZ fueron preparadas en MeOH a diferentes concentraciones: 1000 mg L<sup>-1</sup> para ABZ-SO, FBZ-SO, MBZ-NH<sub>2</sub>, TBZ, 500 mg L<sup>-1</sup> para ABZ, ABZ-SO<sub>2</sub>, BEN, MBZ-OH y 250 mg L<sup>-1</sup> para FBZ, FBZ-SO<sub>2</sub>, MBZ, OXI y CBZ. Estas disoluciones se guardaron a -20°C y en condiciones de oscuridad, siendo estables al menos 6 meses. Las disoluciones intermedias de trabajo que contenían 100 mg L<sup>-1</sup> de cada BZ se prepararon en agua y se almacenaron en frascos color topacio a 4°C. Los filtros de nailon de 0,2 µm x 13 mm usados para filtrar las muestras antes de inyectarlas en el sistema de CE fueron suministrados por Bonna-Agela Technologies Inc, (Wilmington, E.E.U.U.).

La disolución de perfluorooctanoato de amonio (APFO) 50 mM a pH 9,0 se preparó a partir de PFOA, disolviendo la cantidad necesaria de este ácido en agua y ajustando el pH con una disolución de amoníaco 5 M.

### 2.2 Instrumentación

Las separaciones electroforéticas se llevaron a cabo en un equipo HP<sup>3D</sup> CE (Agilent Technologies, Waldbronn,

Alemania), usando capilares de sílice fundida (1 m de longitud, 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 370  $\mu\text{m}$  de diámetro externo), obtenidos de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EE.UU.). Se empleó el nebulizador coaxial de líquido adicional (Agilent Technologies) para el acoplamiento CZE-MS y MEKC-MS. La detección por MS se realizó utilizando un espectrómetro de masas Agilent 1100 Series LC/MSD SL (Agilent Technologies,) equipado con un analizador de trampa de iones. El líquido adicional se introdujo con una bomba de infusión KD Scientific 100 series (KD Scientific Inc., Holliston, MA, EE.UU.). El espectrómetro de masas estaba controlado mediante el programa Esquire 4.1 de Bruker Daltonics (Bremen, Alemania).

También se utilizó un pH-metro (Crison modelo pH 2000, Barcelona, España), un evaporador con corriente de nitrógeno (Sistema EVA-E de VLM GmbH, Bielefeld, Alemania), una centrífuga (Universal modelo 320 de Hettich, Leipzig, Alemania) y un agitador vórtex (modelo Genie 2 de Scientific Industries, Bohemia, NY, EE.UU.).

### 2.3 Condiciones CZE y MEKC

Los capilares nuevos se acondicionaron con NaOH 1M durante 10 min, seguidamente con agua desionizada durante 10 min y después con el tampón de separación durante 20 min. Al principio de cada día, el capilar se acondicionaba con  $\text{NH}_3$  5 M durante 3 min, agua desionizada durante 3 min y finalmente con el tampón de separación durante 20 min. Con el fin de obtener una buena repetibilidad, antes de cada análisis el capilar se acondicionaba con  $\text{NH}_3$  1 M durante 2,5 min, seguido de agua desionizada durante 1 min y con tampón de separación durante 5 min. Al final de cada análisis, el capilar se enjuagaba con agua durante 5 min y finalmente se secaba durante 5 min. En todo momento se empleó  $\text{N}_2$  a 1 bar de

presión. En ambos métodos se aplicó una temperatura de 25°C durante la separación electroforética y el voltaje de separación se mantuvo constante a 25 kV. Para el método CZE el tampón de separación fue una disolución 500 mM de ácido fórmico a pH 2,2, originando una corriente de 21  $\mu\text{A}$ . Por otro lado, para la separación en modo MEKC el tampón de separación fue una disolución 50 mM de APFO a pH 9, obteniendo una corriente de 17  $\mu\text{A}$ . El disolvente de muestra en el caso de la separación mediante CZE fue una mezcla de 30:70 MeCN/agua (v/v), mientras que para la separación en MEKC fue agua. En ambos casos la muestra fue inyectada hidrodinámicamente durante 75 s a 50 milibar.

### 2.4 Condiciones MS y MS/MS

El espectrómetro de masas operó en modo positivo. La ionización de los compuestos se realizó utilizando ionización por electrospray (ESI+) a un voltaje de -4500 V. El líquido adicional consistió en una mezcla de EtOH/agua/ácido fórmico (50:49,5:0,5 (v/v/v)) introducido a un flujo de 0,1  $\text{mL h}^{-1}$ . Otros parámetros del ESI fueron los siguientes: temperatura del gas de secado de 250°C, presión de nebulización de 6 psi y flujo de gas de secado de 8  $\text{L min}^{-1}$ . El barrido se llevó a cabo entre 180 y 350  $m/z$ . En los experimentos de MS los parámetros de la trampa de iones se seleccionaron con el modo de control de carga activado utilizando un objetivo de 100.000 y un tiempo de 250 ms. Se hicieron 4 medidas por experimento. En los experimentos de MS/MS se seleccionó un tiempo de acumulación de 100 ms con un objetivo de 50 000 y 2 medidas por experimento. La fragmentación se llevó a cabo por medio de disociaciones inducidas por colisión (CID) con el helio presente en la trampa durante 40 ms en el modo de monitorización de reacción múltiple (MRM). Los parámetros en MS/MS se recogen en la Tabla 1 para el método CZE-MS/MS y en la Tabla 2 para el método MEKC-MS/MS.

**Tabla 1.** Parámetros principales del método CZE-MS/MS.

|                                       | Segmentos (min) |         |             |            |            |            |            |                   |            |                     |                     |
|---------------------------------------|-----------------|---------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------------|------------|---------------------|---------------------|
|                                       | 0-22,5 min      |         | 22,5-32 min |            |            |            |            |                   |            |                     |                     |
|                                       | TBZ             | CBZ+BEN | OXI         | ABZ        | FBZ        | MBZ-OH     | MBZ        | ABZ-SO            | FBZ-SO     | ABZ-SO <sub>2</sub> | FBZ-SO <sub>2</sub> |
| Ancho ( $m/z$ )                       | 1               | 1       | 1           | 1          | 1          | 1          | 1          | 1                 | 1          | 1                   | 1                   |
| Corte ( $m/z$ )                       | 55              | 52      | 68          | 72         | 81         | 80         | 80         | 76                | 85         | 81                  | 90                  |
| Amplitud de fragmentación (V)         | 0,5             | 0,35    | 0,4         | 0,5        | 0,6        | 0,4        | 0,7        | 0,45              | 0,33       | 0,5                 | 0,6                 |
| Ion precursor $[\text{M}+\text{H}]^+$ | 202             | 192     | 250         | 266        | 300        | 298        | 296        | 282               | 316        | 298                 | 332                 |
| Iones producto                        | 175<br>159      | 160     | 218<br>176  | 234<br>192 | 268<br>190 | 266<br>160 | 264<br>105 | 240<br>222<br>191 | 284<br>191 | 266<br>224          | 300<br>159          |

Tabla 2. Parámetros principales del método MEKC-MS/MS.

|                               | Segmentos (min) |     |           |     |           |        |     |                     |                     |     |           |                     |
|-------------------------------|-----------------|-----|-----------|-----|-----------|--------|-----|---------------------|---------------------|-----|-----------|---------------------|
|                               | 0-11 min        |     | 11-14 min |     | 14-17 min |        |     |                     |                     |     | 17-20 min |                     |
|                               | CBZ+BEN         | TBZ | MBZ-OH    | OXI | ABZ       | ABZ-SO | FBZ | ABZ-SO <sub>2</sub> | MBZ-NH <sub>2</sub> | MBZ | FBZ-SO    | FBZ-SO <sub>2</sub> |
| Ancho (m/z)                   | 2               | 2   | 1         | 1   | 1         | 1      | 1   | 1                   | 1                   | 1   | 1         | 1                   |
| Corte (m/z)                   | 52              | 52  | 80        | 68  | 72        | 76     | 81  | 81                  | 64                  | 80  | 85        | 90                  |
| Amplitud de fragmentación (V) | 0,2             | 0,2 | 0,5       | 0,4 | 0,5       | 0,45   | 0,6 | 0,4                 | 0,5                 | 0,7 | 0,33      | 0,6                 |
| Ion precursor                 |                 |     |           |     |           |        |     |                     |                     |     |           |                     |
| [M+H] <sup>+</sup>            | 192             | 202 | 298       | 250 | 266       | 282    | 300 | 298                 | 238                 | 296 | 316       | 332                 |
| Iones producto                | 160             | 175 | 266       | 218 | 234       | 240    | 268 | 266                 | 105                 | 264 | 284       | 300                 |
|                               |                 | 159 | 160       | 176 | 192       | 222    | 190 | 224                 | 77                  | 105 | 191       | 159                 |
|                               |                 |     |           |     |           | 191    |     |                     |                     |     |           |                     |

## 2.5 Preparación de muestra

El tratamiento de muestra utilizado para la determinación de BZs en carne mediante CZE-MS/MS consistió en una extracción sólido-líquido asistida por sales y una DLLME. Se aplicó a muestras de músculo de pollo y de cerdo compradas en un supermercado local (Granada, España). En primer lugar, las muestras se trituraron y se homogenizaron. A continuación, una porción de 1 g se colocó en un tubo cónico de 15 mL y se añadió 1 mL de agua desionizada, agitando en vórtex hasta conseguir una homogenización adecuada. Posteriormente, se añadieron 2 mL de MeCN y se agitó de nuevo mecánicamente durante 30 s. Para inducir la separación entre la fase orgánica y la acuosa se añadieron 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> y 0,1 g de NaCl. Seguidamente, las muestras se volvieron a agitar mecánicamente durante 5 min. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 9000 rpm y se transfirieron 1700 µL de la fase superior (disolvente dispersante, MeCN) a un vial de 4 mL que contenía 950 µL de CHCl<sub>3</sub> (disolvente extractante). Posteriormente se inyectó esta mezcla en 5 mL de agua desionizada para llevar a cabo la DLLME. El sistema ternario formado se agitó manualmente durante 60 s formándose una solución turbia estable. Con el fin de producir la separación de fases, la mezcla se centrifugó durante 2 min a 5000 rpm. La fase de CHCl<sub>3</sub> se recogió y se secó bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, se reconstituyó el residuo en 250 µL de MeCN/agua 30:70 (v/v) y se filtró con un filtro de nailon (0,2 µm x 13 mm) antes de su inyección en el sistema electroforético. Teniendo en cuenta todos los pasos involucrados, se podrían procesar aproximadamente 12 muestras por hora.

Para la determinación de estos compuestos en muestras de orina animal de vaca, cabra y oveja, obtenidas de una granja local (Jaén, España), mediante MEKC-MS/MS, el tratamiento fue el siguiente: las muestras de orina se diluyeron 10 veces con agua desionizada para así

poder disminuir la fuerza iónica y conseguir una buena separación y detección. Después, las muestras se filtraron con un filtro de nailon (0,2 µm x 13 mm) antes de su inyección en el sistema electroforético.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Optimización de la separación electroforética

Se optimizaron las principales variables que afectan a la separación electroforética para la determinación de BZs mediante CZE y MEKC. Para acoplar un método electroforético al espectrómetro de masas han de tenerse en cuenta una serie de consideraciones previas. Se requiere el uso de un tampón de baja conductividad (corriente eléctrica inferior a 50 µA) y que éste sea volátil, tanto para evitar problemas eléctricos entre la cámara de spray y el espectrómetro de masas, como para obtener un spray estable.

Primero, se llevó a cabo la optimización de la separación electroforética mediante CZE. Se evaluó cómo afectaba el pH de la disolución tampón en la separación. Los BZs tienen dos pKa, pKa<sub>1</sub>: 3,4-6,6 y pKa<sub>2</sub>: 11,1-13,9 (ver Tabla 3), debido a que los dos grupos amino que poseen pueden estar protonados o desprotonados bajo diferentes condiciones (Danaher y col., 2007).

Tabla 3. Valores de pKa para los analitos estudiados.

| Analito             | pKa <sub>1</sub> | pKa <sub>2</sub> |
|---------------------|------------------|------------------|
| TBZ                 | 5,22             | 12,83            |
| CBZ                 | 5,52             | 13,09            |
| BEN                 | 3,50             | 11,70            |
| MBZ-NH <sub>2</sub> | 6,61             | 13,89            |
| ABZ                 | 5,54             | 13,11            |
| FBZ                 | 5,12             | 12,72            |
| 5-OH-MBZ            | 5,60             | 13,16            |
| MBZ                 | 4,13             | 11,79            |

| Analito             | pKa <sub>1</sub> | pKa <sub>2</sub> |
|---------------------|------------------|------------------|
| ABZ-SO              | 5,69             | 13,25            |
| FBZ-SO              | 4,13             | 11,79            |
| FBZ-SO <sub>2</sub> | 3,41             | 11,12            |
| ABZ-SO <sub>2</sub> | 3,50             | 11,20            |
| OXI                 | 6,26             | 13,78            |

Así pues, las mayores diferencias en las movilidades electroforéticas se producen cuando el pH es ligeramente menor al pKa<sub>1</sub> o ligeramente superior al pKa<sub>2</sub>. Desde un punto de vista experimental, el uso de condiciones ácidas es más compatible con la ionización positiva y, además, las condiciones básicas requeridas podrían ser demasiado extremas para un tampón como el amoniaco. Por todo ello, el efecto del pH se estudió entre 2,0 y 4,0 (Figura 1). Como el pKa<sub>1</sub> de los BZs estudiados está entre 3,4 y 6,6 se seleccionó el ácido fórmico (pKa= 3,75) para este estudio. En estas condiciones ácidas los BZs están protonados y pueden separarse mediante CZE. Como se puede observar en la Figura 1a, cuando el pH es superior a 3 la forma de pico y la resolución no son adecuadas para algunos compuestos, como, por ejemplo, ABZ-SO<sub>2</sub> y FBZ-SO<sub>2</sub>, lo que puede deberse a que los BZs se vuelven neutros (pKa<sub>1</sub>=3,50 para ABZ-SO<sub>2</sub> y pKa<sub>1</sub>=3,41 para FBZ-SO<sub>2</sub>). A pH 2,2 se obtuvieron los mejores resultados en términos de tiempo de análisis y eficiencia de la separación (Figura 1c) comparado con los obtenidos a pH más altos (Figuras 1a y 1b). Después, se estudió el efecto de la concentración de ácido fórmico entre 300 y 1000 mM a pH 2,2. Esta optimización se incluye en la Figura 1 (d-f). Con concentraciones de tampón menores de 500 mM la separación no fue satisfactoria debido a la pobre resolución entre picos, tal y como se puede observar en la Figura 1d. Una concentración de ácido fórmico de 500 mM fue suficiente para conseguir la separación completa de todos los BZs (Figura 1e). Como se puede observar en la Figura 1f, con concentraciones superiores a 500 mM no mejoró la resolución entre picos y además aumentó el tiempo de análisis. Finalmente el voltaje de separación y la temperatura del capilar fueron optimizados. Los valores óptimos han sido indicados en la sección 2.3.

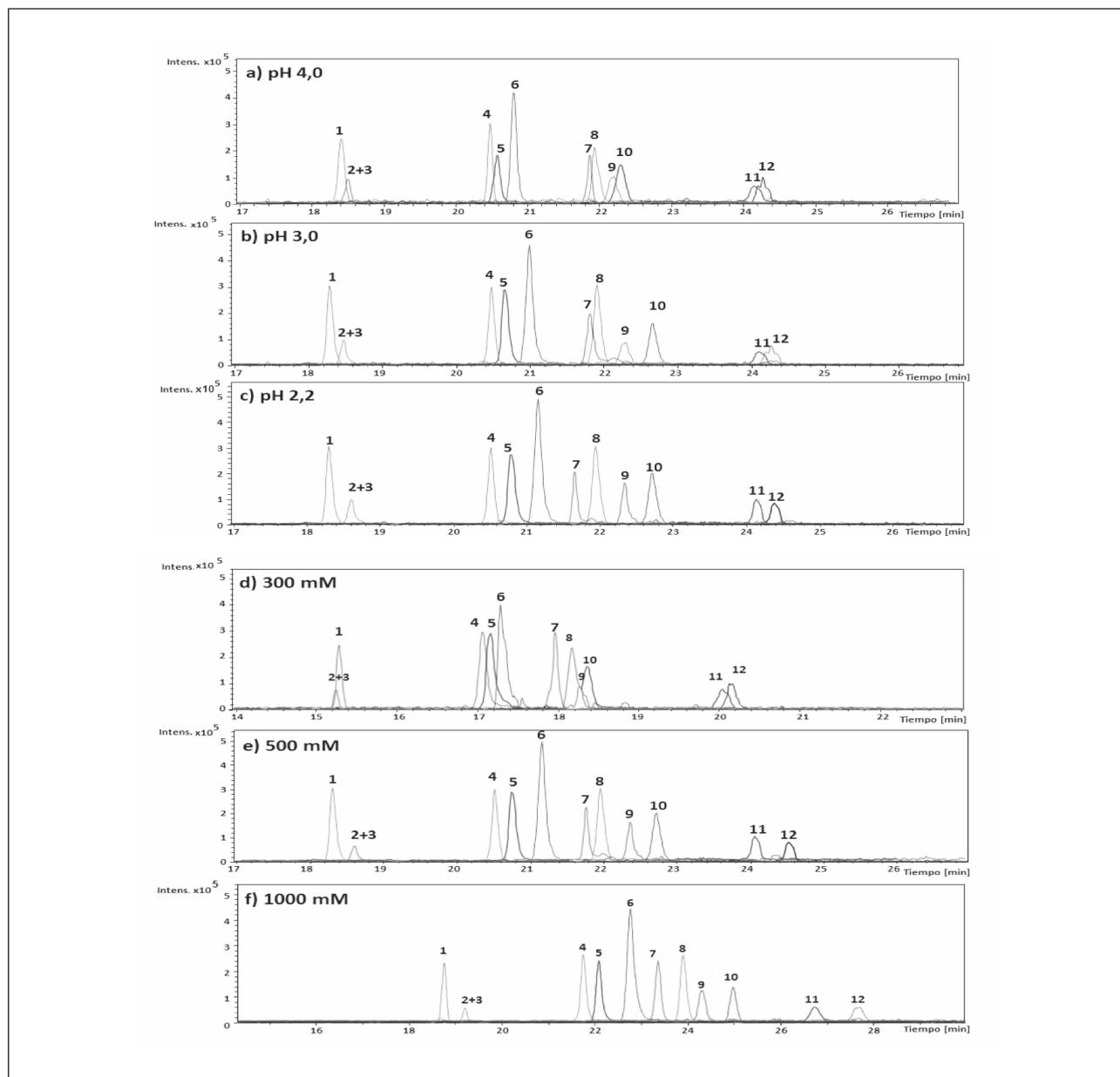
Con el fin de mejorar el tiempo de análisis, el uso de condiciones básicas podría ser una alternativa, ya que la movilidad de los analitos se puede ver incrementada por el flujo electroosmótico (EOF). Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, los BZs son neutros en condiciones básicas a valores de pH inferiores al pKa<sub>2</sub>, por lo que, dada su semejanza en tamaño no sería posible separarlos mediante CZE. Una solución para la separación de compuestos neutros es la MEKC. En condiciones básicas el surfactante más comúnmente empleado en este modo de CE es el dodecilsulfato sódico (SDS). Sin embargo, este surfactante no es volátil haciendo que sea incompati-

ble el acoplamiento directo MEKC con MS. Para superar este problema, varios trabajos han puesto de manifiesto la aplicabilidad de APFO como surfactante volátil (Brensinger y col., 2016; Akamatsu y Mitsuhashi, 2014) capaz de producir un medio micelar para la separación de analitos neutros, usando MS como sistema de detección. Por lo tanto, se decidió estudiar la separación empleando APFO. En primer lugar, se estudió el efecto del pH. Para que se produzca una adecuada separación mediante MEKC utilizando una fase pseudoestacionaria aniónica, se consideraron valores de pH superiores a 7 con el fin de inducir un EOF fuerte. Además, el APFO a estos valores está completamente disociado (PFOA pKa= 2,8 (Goss, 2008)). Así pues, el efecto del pH fue estudiado entre 8 y 10, rango de pH en el que se garantiza que todos los BZs se encuentran en estado neutro (pKa<sub>1</sub> ~3,5-6,6 y pKa<sub>2</sub> ~11,1-13,9) (Danaher y col., 2007) y pueden ser separados mediante MEKC. Como se puede observar en la Figura 2c, a pH 10 se obtuvo una insuficiente resolución y pobre forma de pico para la mayoría de los analitos. A pH 8, las formas de pico no fueron adecuadas para el MBZ-OH y FBZ (Figura 2a), mientras que, a pH 9 se obtuvieron los mejores resultados en términos de resolución de pico y eficacia de separación (Figura 2b). Después se optimizó la concentración de APFO a pH 9, en el rango entre 25 y 100 mM. Como puede observarse en la Figura 2d, la mayoría de los compuestos se solaparon cuando se empleó una concentración de 25 mM, ya que a este valor no se consigue superar la concentración micelar crítica del APFO (Wang y col., 2010). Una concentración 50 mM de APFO fue suficiente para conseguir la separación completa de los BZs (Figura 2e). Como se puede observar en la Figura 2f, con una concentración mayor de 50 mM la resolución entre picos no mejoró y el tiempo de análisis aumentó. Es por ello que se seleccionó la concentración de 50 mM como óptima. Finalmente, se evaluó la influencia de la temperatura del capilar y el voltaje de separación. Los valores optimizados fueron iguales a los obtenidos en el modo CZE y se han indicado en la sección 2.3.

Como se puede observar en el caso del CBZ y del BEN no pudieron ser separados mediante MEKC o CZE. Esto se debe al hecho de que BEN se transforma fácilmente en CBZ tan pronto como éste se disuelve en agua (Mallat y col., 1997). Por esta razón ambos compuestos fueron cuantificados conjuntamente.

Para aumentar la sensibilidad en los métodos de CE, el uso de metodologías de preconcentración en línea puede ser una buena opción. Para el método CZE se empleó el llamado NSM, consistente en inyectar la muestra en un medio de conductividad inferior a la del tampón electroforético consiguiendo un efecto de "apilamiento"

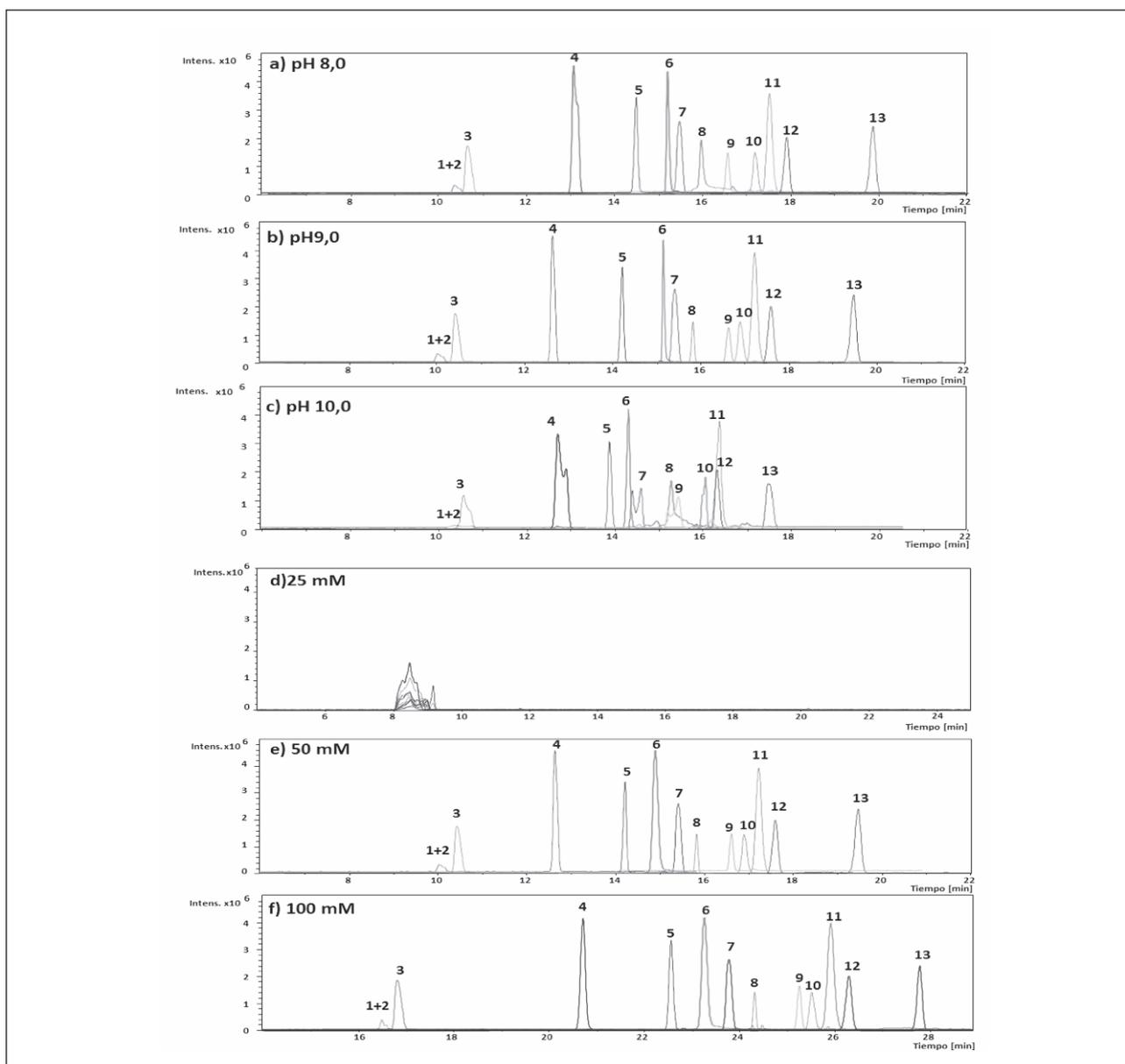
**Figura 1.** Optimización del pH del tampón de separación a una concentración de 500 mM. a) pH 4,0; b) pH 3,0; c) pH 2,2. Optimización de la concentración del tampón de separación a pH de 2,2. d) 300 mM; e) 500 mM; f) 1000 mM. Condiciones: Temperatura del capilar, 25°C; voltaje de separación, 25 kV; inyección de la muestra, 75 s a 50 mbar; disolvente de muestra, agua. Identificación de picos: 1, TBZ; 2+3, CBZ+BEN; 4, OXI; 5, ABZ; 6, FBZ; 7, MBZ-OH; 8, MBZ; 9, ABZ-SO; 10, FBZ-SO; 11, ABZ-SO<sub>2</sub>; 12, FBZ-SO<sub>2</sub>. Concentración de BZs, 500 µg L<sup>-1</sup>.



de los analitos en la interfase muestra-tampón. Se evaluaron diferentes medios de inyección como agua y combinaciones de una mezcla de MeCN/agua (15:85; 20:80; 30:70 y 40:60) (v/v). El mayor aumento de sensibilidad, en términos de señal/ruido, se obtuvo con una mezcla 30:70 MeCN/agua (v/v). En el caso de la separación mediante MEKC se empleó el “sweeping” como modo de

preconcentración, que consiste en inyectar la muestra disuelta en un disolvente en ausencia de micelas para conseguir un efecto de “barrido de los analitos” y preconcentración en el interior del capilar. Se evaluó como medio de inyección agua y combinaciones de una mezcla de MeCN/agua (15:85; 20:80; 30:70 y 40:60) (v/v) y se observó que cuando se aumentaba la proporción del

**Figura 2.** Optimización del pH del tampón de separación a una concentración 50 mM de APFO. a) pH 8,0; b) pH 9,0; c) pH 10,0. Optimización de la concentración del tampón de separación a un pH de 9,0. d) 25 mM e) 50 mM f) 100 mM. Condiciones: Temperatura del capilar, 25°C; voltaje de separación, 25 kV; inyección de la muestra, 75 s a 50 mbar; disolvente de muestra, agua. Identificación de picos: 1+2, CBZ+BEN; 3, TBZ; 4, MBZ-OH; 5, OXI; 6, ABZ; 7, ABZ-SO; 8, FBZ; 9, ABZ-SO<sub>2</sub>; 10, MBZ-NH<sub>2</sub>; 11, MBZ; 12, FBZ-SO; 13, FBZ-SO<sub>2</sub>. Concentración de BZs, 500 µg L<sup>-1</sup> para (CBZ+BEN, TBZ and MBZ-OH), 1000 µg L<sup>-1</sup> para (OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, MBZ, FBZ-SO) y 2000 µg L<sup>-1</sup> para (ABZ-SO<sub>2</sub>, MBZ-NH<sub>2</sub>, FBZ-SO<sub>2</sub>).



disolvente orgánico en la mezcla se producía un deterioro en la forma de pico de los analitos estudiados. Este hecho puede ser debido a que la adición al medio de inyección acuoso de pequeñas cantidades de disolvente orgánico puede afectar a la formación de las micelas en el electrolito-

to de fondo. Así pues, se eligió el agua como disolvente para la muestra. Posteriormente se estudió el tiempo de inyección hidrodinámica entre 10 y 100 s, a 50 mbar. Tiempos de inyección superiores a 75 s produjeron ensanchamiento de los picos, obteniéndose la máxima

sensibilidad con un tiempo de 75 s a 50 mbar, tanto para CZE como para MEKC. Este tiempo de inyección corresponde aproximadamente a un volumen de inyección de 57,5 nL (3 % del volumen total del capilar). Los factores de incremento de la sensibilidad ( $FES_{\text{altura}}$ ) estuvieron comprendidos entre 75 y 317 para el método CZE-MS/MS y entre 50 y 181 para el método MEKC-MS/MS, dependiendo del BZ en estudio. Las condiciones de referencia sin preconcentración fueron una presión de 50 mbar durante 5 s y como disolvente de muestra se empleó el tampón electroforético. El FES se calcula mediante la siguiente expresión:

$$FES_{\text{altura}} = \frac{\text{altura de pico con preconcentración/concentración del analito con preconcentración}}{\text{altura de pico sin preconcentración/concentración de analito sin preconcentración}}$$

### 3.2 Optimización del electrospray en CZE-MS/MS y MEKC-MS/MS

La optimización de los parámetros del ESI juega un papel muy importante en los métodos CE-MS/MS, ya que afectan a la precisión y sensibilidad del método. Es por ello que la composición del líquido adicional y los parámetros del ESI (flujo del gas de secado, flujo del

líquido adicional, presión de nebulización, temperatura del gas de secado y voltaje) fueron optimizados tanto para CZE como para MEKC. En todos los casos la relación señal/ruido para cada compuesto se utilizó como variable respuesta.

La Tabla 4 muestra un resumen de los parámetros del líquido adicional que se han estudiado, el rango de estudio y el valor óptimo para CZE y MEKC:

A su vez, la Tabla 5 muestra el estudio de todas las variables que afectan al ESI para CZE y MEKC. Es importante destacar que los valores óptimos tanto para la composición del líquido adicional como para los parámetros del ESI en ambos modos (MEKC y CZE) fueron los mismos.

Las figuras 3 y 4 muestran el estudio de la composición del líquido adicional y del ESI más significativos (flujo del líquido adicional y presión de nebulización), en función de la relación señal/ruido, tanto para CZE como MEKC.

A modo de resumen, de la optimización de estos parámetros que afectan de manera considerable al líquido adicional, así como a los parámetros del ESI, podemos con-

**Tabla 4.** Parámetros del líquido adicional para CZE y MEKC

| VARIABLE                    | RANGO ESTUDIADO               | VALOR ÓPTIMO  |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------|
| Tipo de ácido               | Ácido acético o ácido fórmico | Ácido fórmico |
| Tipo de disolvente orgánico | IPA, MeCN, EtOH, MeOH         | EtOH          |
| EtOH %                      | 40-90 %                       | 50 %          |
| Ácido fórmico %             | 0-1 %                         | 0,5 %         |

cluir que en ambos métodos el uso de MeOH y EtOH en el líquido adicional permitía obtener una mayor S/N, en comparación con el empleo de otros disolventes orgánicos, como MeCN. Se seleccionó EtOH por tener menor impacto medioambiental. Un aumento en el flujo de líquido adicional producía una disminución de la señal y aunque con un flujo de 0,05 mL h<sup>-1</sup> se obtuvieron los mejores resultados en términos de S/N para todos los analitos, éste fue descartado ya que producía una disminución en la estabilidad del spray, seleccionándose finalmente un flujo de 0,1 mL h<sup>-1</sup>. Este hecho está relacionado

con la dilución del analito en la punta del nebulizador. Una presión de nebulización elevada producía una disminución del número de platos teóricos para la mayoría de los analitos, por lo que para obtener gotas de pequeño tamaño que favorezcan un spray estable, la presión debía ser de 6 psi en ambos modos de separación.

### 3.3 Optimización del tratamiento de muestra

Como se comentó en la introducción, para la determinación de BZs en carne mediante el método de CZE-

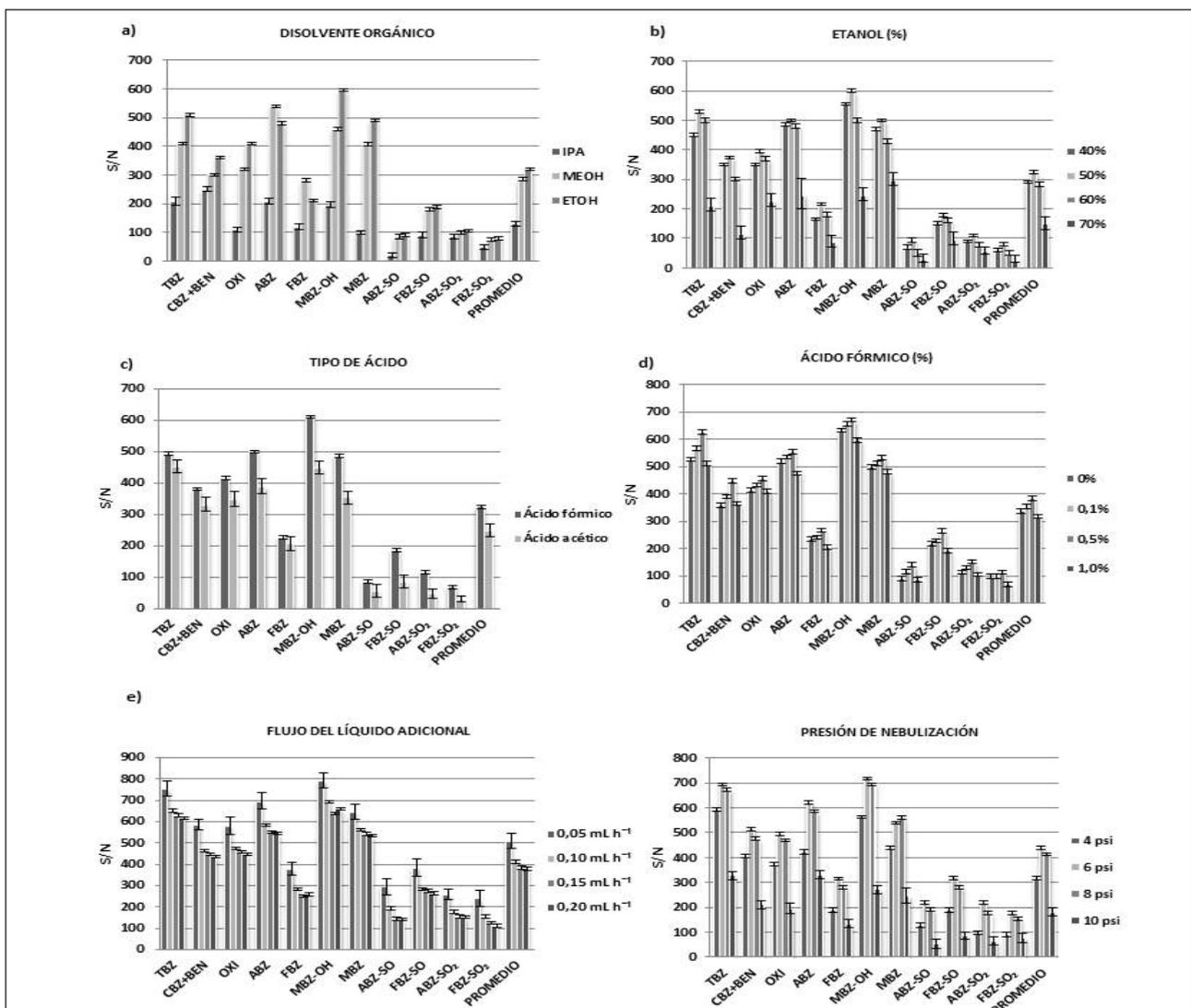
**Tabla 5.** Parámetros del ESI.

| VARIABLE                      | RANGO ESTUDIADO             | VALOR ÓPTIMO           |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Flujo del gas de secado       | 4-10 L min <sup>-1</sup>    | 8 L min <sup>-1</sup>  |
| Flujo del líquido adicional   | 0,05-0,2 mL h <sup>-1</sup> | 0,1 mL h <sup>-1</sup> |
| Presión de nebulización       | 4-10 psi                    | 6 psi                  |
| Temperatura del gas de secado | 100-300 °C                  | 250 °C                 |
| Voltaje                       | 4000-4500 V                 | 4500 V                 |

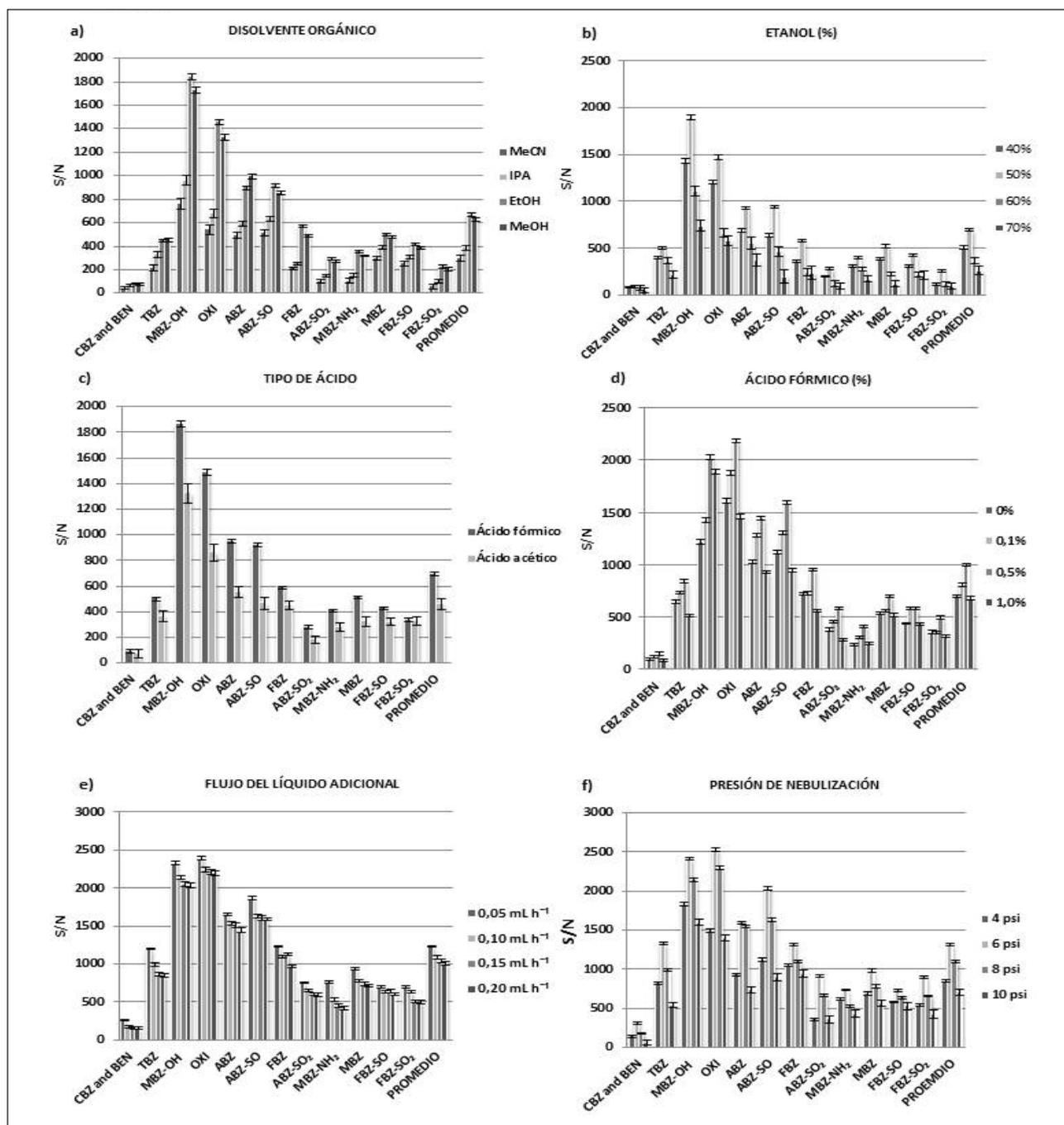
MS/MS, la DLLME se ha utilizado como etapa de limpieza después de la extracción de los analitos de las muestras con MeCN en presencia de sales. Las condiciones de la DLLME se obtuvieron de un trabajo previo que se desarrolló en nuestro grupo de investigación para la determinación de 7 BZs (CBZ, MBZ, OXI, ABZ, FBZ, febantel (FBT) y parbendazol (PBZ)) en muestras de agua (Tejada-Casado y col., 2016). La eficacia de la extracción DLLME quedó demostrada al obtenerse recuperaciones superiores al 80 % para la nueva mezcla de BZs. Como estos valores fueron similares a los obtenidos en el trabajo previo, no fue necesario reoptimizar el procedimiento de nuevo.

Sin embargo, sí fue necesario evaluar los pasos previos a la DLLME. La optimización se llevó a cabo utilizando 1 g de músculo de pollo libre de BZs, que fue dopado con  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de cada BZ. La extracción de los BZs se llevó a cabo empleando MeCN, el cual también actuó como disolvente dispersante para la DLLME. Se añadió en primer lugar un volumen de 1 mL de agua a la muestra de carne para conseguir una mejor homogenización. Como la adición de sal al sistema mejoró significativamente la eficacia de la extracción debido al efecto salino ("salting out"), se investigó la influencia de la fuerza iónica mediante la adición de diferentes cantidades de NaCl (0,05, 0,1 y 0,2 g) y  $\text{MgSO}_4$  (0,1, 0,5, 1,0 g). Una mezcla de 0,1 g de NaCl y 0,5

**Figura 3.** Efecto de la composición del líquido adicional y de las condiciones del electroespray en la relación señal/ruido para el método CZE-MS/MS. a) Tipo de disolvente orgánico; b) Etanol (%); c) Tipo de ácido; d) Ácido fórmico (%); e) Flujo del líquido adicional y f) Presión de nebulización. Condiciones: 500 mM de ácido fórmico (pH 2,2) como tampón de separación. Concentración de los BZs:  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ; Temperatura del capilar,  $25^\circ\text{C}$ ; Voltaje de separación, 25 kV; Disolvente de inyección, 30:70 MeCN: Agua (v:v); Inyección de la muestra 50 mbar durante 75 s. Las barras representan el error estándar (n=3)



**Figura 4.** Efecto de la composición del líquido adicional y efecto de las condiciones del electroespray en la relación señal/ruido para el método MEKC-MS/MS. a) Tipo de disolvente orgánico; b) Etanol (%); c) Tipo de ácido; d) Ácido fórmico (%); e) Flujo del líquido adicional y f) Presión de nebulización. Condiciones: 50 mM de ácido APFO (pH 9,0) como tampón de separación; Concentración de los BZs: 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  para (CBZ+ BEN, TBZ y MBZ-OH), 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  para (OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, MBZ, FBZ-SO) y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para (ABZ-SO<sub>2</sub>, MBZ-NH<sub>2</sub>, FBZ-SO<sub>2</sub>); Temperatura del capilar, 25°C; Voltaje de separación, 25 kV; Disolvente de inyección, agua; Inyección de la muestra 50 mbar durante 75 s. Las barras representan el error estándar (n=3)



g de  $\text{MgSO}_4$  fue suficiente para obtener una adecuada separación de fases y altas recuperaciones. Finalmente, el efecto del volumen de reconstitución fue estudiado desde 250 a 1000  $\mu\text{L}$ . Se seleccionó un volumen de 250  $\mu\text{L}$  de una mezcla de 30:70 MeCN/agua (v/v) que fue suficiente para disolver los analitos y obtener altos factores de enriquecimiento para todos los BZs.

Cuando se empleó MEKC-MS/MS para determinar los BZs en orina de animales, se llevó a cabo una simple dilución de las muestras con agua, probando diferentes factores de dilución (1:10, 1:15, 1:20 y 1:50 (v/v)). Los mejores resultados en términos de sensibilidad y estabilidad de la corriente se obtuvieron con una dilución 1:10 (v/v). Para eliminar cualquier partícula en suspensión, fue necesario filtrar las muestras antes de la inyección en el sistema electroforético con objeto de impedir el bloqueo del capilar y de evitar una corriente electroforética inestable.

Teniendo en cuenta los rangos de concentración en los cuales se pueden encontrar los BZs en muestras alimentarias, tal y como se ha descrito en la introducción, se hizo necesaria incluir una etapa de preconcentración en el método para el análisis de carnes con objeto de obtener límites de detección por debajo de los MLRs legislados, mientras que para las muestras de orina animal fue posible la dilución teniendo en cuenta que las concentraciones de estos compuestos en este tipo de muestras está en el rango de los  $\text{mg/L}^{-1}$  (Hurtado y col., 2010).

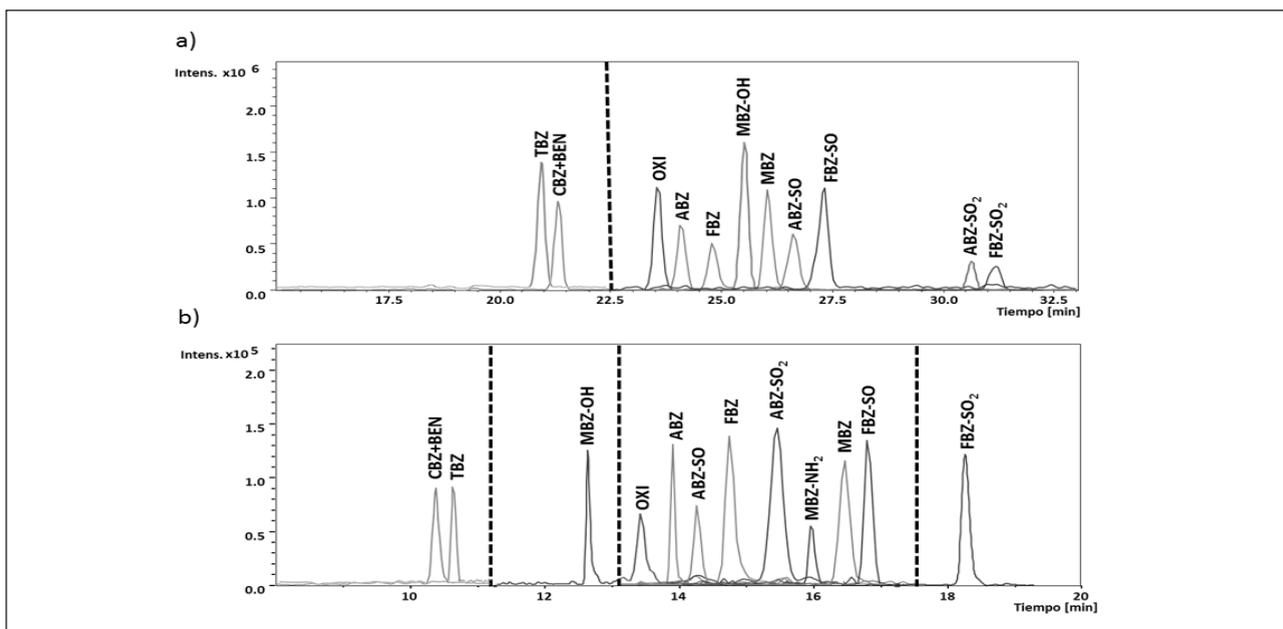
### 3.4 Validación de los métodos de CZE-MS/MS y MEKC-MS/MS

Ambos métodos analíticos fueron validados para las matrices seleccionadas en términos de linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), efecto matriz, repetibilidad, precisión intermedia y veracidad.

**Tabla 6.** Parámetros de calidad y efecto matriz para el método CZE-MS/MS en músculo de pollo y para el método MEKC-MS/MS en orina de oveja para la determinación de BZs.

| Analito                             | MRL ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | LOD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | Rango dinámico lineal | R <sup>2</sup> | ME (%) |
|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|-----------------------|----------------|--------|
| <b>CZE-MS/MS (músculo de pollo)</b> |                               |                               |  |                       |                |        |
| TBZ                                 | 100                           | 1                             | 4  | 4-125                 | 0,9987         | -12    |
| CBZ+BEN                             | No legislado                  | 1                             | 4  | 4-125                 | 0,9971         | -14    |
| OXI                                 | 100                           | 2                             | 6  | 6-250                 | 0,9982         | -16    |
| ABZ                                 | 100                           | 2                             | 8  | 8-250                 | 0,9917         | -27    |
| FBZ                                 | 50                            | 2                             | 6  | 6-250                 | 0,9941         | -28    |
| MBZ-OH                              | 60                            | 2                             | 5  | 5-500                 | 0,9963         | -23    |
| MBZ                                 | 60                            | 1                             | 4  | 4-250                 | 0,9960         | -33    |
| ABZ-SO                              | 100                           | 3                             | 9  | 9-500                 | 0,9914         | -1     |
| FBZ-SO                              | 50                            | 2                             | 6  | 6-250                 | 0,9928         | -27    |
| ABZ-SO <sub>2</sub>                 | 100                           | 5                             | 16   | 16-250                | 0,9959         | -10    |
| FBZ-SO <sub>2</sub>                 | 50                            | 4                             | 11   | 11-500                | 0,9981         | -29    |
| <b>MEKC-MS/MS (orina de oveja)</b>  |                               |                               |  |                       |                |        |
| CBZ + BEN                           |                               | 15                            | 49,8   | 49,8-1000             | 0,9973         | -2,4   |
| TBZ                                 |                               | 14                            | 46,2   | 46,2-1000             | 0,9987         | 2,0    |
| MBZ-OH                              |                               | 25                            | 82,2   | 82,2-2000             | 0,9971         | -2,2   |
| OXI                                 |                               | 30                            | 99,1   | 99,1-2000             | 0,9970         | -3,9   |
| ABZ                                 |                               | 25                            | 84,3   | 84,3-2000             | 0,9997         | -4,9   |
| ABZ-SO                              |                               | 26                            | 86,2   | 86,2-2000             | 0,9988         | -7,6   |
| FBZ                                 |                               | 27                            | 89,7   | 89,7-2000             | 0,9996         | 1,2    |
| ABZ-SO <sub>2</sub>                 |                               | 61                            | 204,0  | 204,0-4000            | 0,9936         | 1,9    |
| MBZ-NH <sub>2</sub>                 |                               | 69                            | 231,2  | 231,2-4000            | 0,9991         | -3,9   |
| MBZ                                 |                               | 31                            | 104,2  | 104,2-2000            | 0,9995         | -0,3   |
| FBZ-SO                              |                               | 31                            | 105,8  | 105,8-2000            | 0,9979         | 6,8    |
| FBZ-SO <sub>2</sub>                 |                               | 59                            | 195,8  | 195,8-4000            | 0,9930         | -5,7   |

**Figura 5.** a) Electroferograma obtenido aplicando el método propuesto DLLME-CZE-MS/MS a el músculo de pollo fortificado con:  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$  (TBZ, CBZ+BEN),  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (OXI, ABZ, FBZ, MBZ, FBZ-SO, ABZ-SO<sub>2</sub>) y  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  (MBZ-OH, ABZ-SO, FBZ-SO<sub>2</sub>); b) Electroferograma obtenido aplicando el método propuesto MEKC-MS/MS a orina de oveja fortificada con:  $125 \mu\text{g L}^{-1}$  (CBZ+BEN, TBZ and MBZ-OH),  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  (OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, MBZ, FBZ-SO) y  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  (MBZ-NH<sub>2</sub>, ABZ-SO<sub>2</sub>, FBZ-SO<sub>2</sub>).



### 3.4.1 Rectas de calibrado y parámetros de calidad de los métodos de CZE-MS/MS y MEKC-MS/MS

Para el método de CZE-MS/MS, se construyeron las correspondientes rectas de calibrado en presencia de matriz, usando músculo de pollo libre de BZs. Las rectas de calibrado para los analitos seleccionados se obtuvieron mediante fortificación de las muestras antes del tratamiento con concentraciones crecientes de los analitos en estudio. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de 7 niveles: 5, 10, 25, 50, 75, 100,  $125 \mu\text{g kg}^{-1}$  para TBZ y CBZ+BEN; 10, 20, 50, 100, 150, 200,  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$  para OXI, ABZ, FBZ, MBZ, FBZ-SO y ABZ-SO<sub>2</sub> y 20, 40, 100, 200, 300, 400,  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  para ABZ-SO, MBZ-OH y FBZ-SO<sub>2</sub>. Se prepararon 2 réplicas a cada nivel de concentración y fueron inyectadas dos veces. Para el método de MEKC-MS/MS se llevó a cabo el mismo procedimiento, pero construyendo el calibrado en presencia de matriz con orina de oveja. La linealidad de la respuesta se estableció a partir de 5 niveles: 62,5, 125, 250, 500 y  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  para TBZ, MBZ-OH y CBZ+BEN; 125, 250, 500, 1000 y  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  para OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, MBZ y FBZ-SO; 250, 500, 1000, 2000 y  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$  para ABZ-SO<sub>2</sub>, MBZ-NH<sub>2</sub> y FBZ-SO<sub>2</sub>. También se prepararon 2 réplicas a cada nivel de concentración y fueron inyectadas

dos veces. En ambos métodos se consideró como señal analítica la suma de las áreas de pico de todos los iones producto e iones precursores (ver Tabla 1 y Tabla 2).

Los LODs fueron calculados como la mínima concentración de analito que producía una relación S/N igual a tres y los LOQs fueron estimados como la concentración más baja de analito que producía una señal 10 veces mayor que el ruido. En la Tabla 6 aparecen recogidos los parámetros de calidad de ambos métodos. En el método CZE-MS/MS los LOQs son menores de  $16 \mu\text{g kg}^{-1}$ , siendo considerablemente más bajos que sus correspondientes MRLs. Para el método MEKC-MS/MS los LOQs fueron menores de  $231 \mu\text{g L}^{-1}$  estimados en muestras de orina de oveja antes de la dilución. Observando estos resultados se puede concluir que ambos métodos son adecuados para la determinación de estos analitos en las matrices seleccionadas.

La figura 5a muestra un electroferograma a diferentes concentraciones correspondiente a la separación de BZs en muestras de músculo de pollo para el método CZE-MS/MS y la figura 5b representa un electroferograma a diferentes concentraciones correspondiente a la separación de BZs en muestras de orina de oveja para el método MEKC-MS/MS.

### 3.4.2 Efecto matriz

El efecto matriz se evaluó para cada BZ, tanto para las muestras de músculo de pollo (método CZE-MS/MS) como para las muestras de orina de oveja (método MEKC-MS/MS). Éste se estimó comparando las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas de blancos de muestra dopada después de la extracción y las pendientes de las curvas de calibrado con patrones a los mismos niveles de concentración. El efecto matriz para cada BZ aparece recogido en la Tabla 6. En valor absoluto, para el método CZE-MS/MS el efecto matriz fue inferior al 33% y para el método MEKC-MS/MS fue inferior al 7,6% en todos los casos.

$$ME (\%) = \left( \frac{\text{pendiente del calibrado en presencia de matriz}}{\text{pendiente del calibrado externo}} - 1 \right) \times 100$$

### 3.4.3 Estudio de la precisión

La precisión de ambos métodos se evaluó en términos de repetibilidad y precisión intermedia. Para el método CZE-MS/MS, las muestras de carne se doparon a dos niveles diferentes para cada BZ: 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para TBZ y CBZ+BEN; 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para OXI, ABZ, FBZ, MBZ, FBZ-SO, MBZ-OH y ABZ-SO<sub>2</sub> y 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para ABZ-SO y FBZ-SO<sub>2</sub>. Con respecto al método MEKC-MS/MS, las muestras de orina de oveja se doparon a dos niveles de concentración para

cada BZ: 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para TBZ, MBZ-OH y CBZ+BEN; 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, MBZ y FBZ-SO y 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$  para ABZ-SO<sub>2</sub>, MBZ-NH<sub>2</sub> y FBZ-SO<sub>2</sub>. Para ambas metodologías, la repetibilidad fue evaluada el mismo día sobre dos muestras preparadas e inyectadas por duplicado bajo las mismas condiciones.

La precisión intermedia se evaluó a dos niveles de concentración, analizando dos muestras dopadas e inyectadas por duplicado por nivel y por día, durante tres días consecutivos. Los resultados expresados como desviaciones estándar relativas (DER) de las áreas de pico se muestran en la Tabla 7. Como se puede observar, las DERs fueron menores del 16,1% para la metodología CZE-MS/MS y del 7,6% para la metodología MEKC-MS/MS, siendo satisfactoria en todos los casos.

### 3.4.4 Evaluación de la veracidad: ensayos de recuperación

Para comprobar la veracidad del método propuesto se llevaron a cabo estudios de recuperación en muestras de carne (pollo y cerdo) para la metodología CZE-MS/MS, y en muestras de orina animal (oveja, vaca y cabra) para el método MEKC-MS/MS, dopando las muestras a dos niveles de concentración (iguales a los del estudio de precisión). Los valores de recuperación se calcularon para cada BZ mediante interpolación de las áreas obtenidas de

**Tabla 7.** Estudio de precisión para CZE-MS/MS en carne de pollo y MEKC-MS/MS en orina de oveja

| CZE-MS/MS                          | TBZ <sup>a</sup>     | CBZ+BEN <sup>a</sup> | OXI <sup>b</sup>    | ABZ <sup>b</sup> | FBZ <sup>b</sup> | MBZ-OH <sup>c</sup> | MBZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>c</sup>              | FBZ-SO <sup>b</sup>              | ABZ-SO <sub>2</sub> <sup>b</sup> | FBZ-SO <sub>2</sub> <sup>c</sup> |                                  |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Repetibilidad DER (%) (n=4)        |                      |                      |                     |                  |                  |                     |                  |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Nivel 1                            | 6,2                  | 10,8                 | 9,1                 | 9,3              | 9,7              | 13,2                | 12,3             | 10,0                             | 10,9                             | 11,1                             | 8,7                              |                                  |
| Nivel 2                            | 2,8                  | 2,8                  | 6,6                 | 7,1              | 6,4              | 6,5                 | 11,4             | 7,7                              | 8,8                              | 8,5                              | 7,8                              |                                  |
| Precisión intermedia DER (%) (n=6) |                      |                      |                     |                  |                  |                     |                  |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Nivel 1                            | 12,2                 | 15,0                 | 10,6                | 13,5             | 12,2             | 15,5                | 15,6             | 16,1                             | 11,0                             | 15,9                             | 14,1                             |                                  |
| Nivel 2                            | 11,3                 | 8,4                  | 8,8                 | 9,4              | 9,3              | 14,1                | 13,5             | 13,6                             | 10,2                             | 12,5                             | 10,3                             |                                  |
| MEKC-MS/MS                         | CBZ+BEN <sup>a</sup> | TBZ <sup>a</sup>     | MBZ-OH <sup>a</sup> | OXI <sup>b</sup> | ABZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>b</sup> | FBZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sub>2</sub> <sup>c</sup> | MBZ-NH <sub>2</sub> <sup>c</sup> | MBZ <sup>b</sup>                 | FBZ-SO <sup>b</sup>              | FBZ-SO <sub>2</sub> <sup>c</sup> |
| Repetibilidad DER (%) (n=4)        |                      |                      |                     |                  |                  |                     |                  |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Nivel 1                            | 2,1                  | 4,0                  | 3,4                 | 3,3              | 2,4              | 2,5                 | 4,2              | 5,9                              | 4,1                              | 3,2                              | 2,5                              | 3,8                              |
| Nivel 2                            | 1,5                  | 3,2                  | 2,6                 | 2,5              | 2,0              | 2,3                 | 3,5              | 2,8                              | 2,2                              | 2,1                              | 2,0                              | 2,2                              |
| Precisión intermedia DER (%) (n=6) |                      |                      |                     |                  |                  |                     |                  |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Nivel 1                            | 7,6                  | 5,9                  | 4,6                 | 4,4              | 5,4              | 4,5                 | 6,8              | 7,3                              | 7,1                              | 5,2                              | 6,9                              | 7,4                              |
| Nivel 2                            | 4,1                  | 3,4                  | 3,7                 | 4,0              | 4,9              | 3,6                 | 4,5              | 4,4                              | 4,8                              | 3,7                              | 4,8                              | 4,2                              |

CZE-MS/MS

<sup>a</sup>Nivel 1: 10  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y Nivel 2: 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>b</sup>Nivel 1: 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y Nivel 2: 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$

<sup>c</sup>Nivel 1: 40  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y Nivel 2: 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$

MEKC-MS/MS

<sup>a</sup>Nivel 1: 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  y Nivel 2: 500  $\mu\text{g L}^{-1}$

<sup>b</sup>Nivel 1: 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  y Nivel 2: 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$

<sup>c</sup>Nivel 1: 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  y Nivel 2: 2000  $\mu\text{g L}^{-1}$

estas muestras dopadas, en las curvas de calibrado en presencia de matriz. En todos los casos se analizó una muestra libre de analitos, con el fin de comprobar la ausencia de BZs, sin encontrarse ningún interferente. Para el método CZE-MS/MS las recuperaciones fueron superiores al 70,1 % en todos los casos con DER menores del 13,6 % mientras que para el método MEKC-MS/MS las recuperaciones fueron superiores al 75,2 % en todos los casos con DER menores del 8,2 % (Tabla 8).

### 3.4.5 Conclusiones

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de dos métodos de CE-MS/MS (CZE-MS/MS y MEKC-MS/MS) para la determinación de residuos de BZs en muestras ali-

mentarias y biológicas. Se han desarrollado ambas metodologías con el fin de contribuir al desarrollo de nuevos métodos de control de calidad en alimentos y de monitorización terapéutica de fármacos en muestras biológicas, alternativos a los métodos cromatográficos existentes. Para ambos métodos se han propuesto metodologías de tratamiento de muestra compatibles con los modos de separación desarrollados y que permitan alcanzar la sensibilidad y la selectividad necesarias para el uso propuesto.

Las conclusiones que se han obtenido tras el empleo de ambos métodos han sido las siguientes:

- Con el método de CZE-MS/MS se han conseguido separar 12 BZs y sus metabolitos en 32 min, mientras

**Tabla 8.** Recuperaciones obtenidas para el método de CZE-MS/MS en músculo de pollo y cerdo, y recuperaciones obtenidas para el método MEKC-MS/MS en orina de oveja, cabra y vaca.

| CZE-MS/MS        |         | TBZ <sup>a</sup> | CBZ+BEN <sup>a</sup> | OXI <sup>b</sup>    | ABZ <sup>b</sup> | FBZ <sup>b</sup> | MBZ-OH <sup>c</sup> | MBZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>c</sup> | FBZ-SO <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>b</sup> | FBZ-SO <sup>c</sup> |                     |      |
|------------------|---------|------------------|----------------------|---------------------|------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| Músculo de pollo | Nivel 1 | R (%)            | 87,7                 | 70,4                | 70,6             | 83,3             | 71,1                | 72,6             | 79,3                | 76,0                | 76,7                | 83,4                | 84,0                |      |
|                  |         | DER (%)          | 6,2                  | 10,8                | 9,1              | 9,3              | 9,7                 | 13,2             | 12,3                | 10,0                | 10,9                | 11,1                | 8,7                 |      |
|                  | Nivel 2 | R (%)            | 84,0                 | 72,7                | 90,2             | 83,5             | 83,8                | 74,5             | 80,5                | 73,3                | 97,3                | 92,1                | 78,0                |      |
|                  |         | DER (%)          | 2,8                  | 2,8                 | 6,6              | 7,1              | 6,4                 | 6,5              | 11,4                | 7,7                 | 8,8                 | 8,5                 | 7,8                 |      |
| Músculo de cerdo | Nivel 1 | R (%)            | 76,7                 | 70,8                | 71,8             | 77,0             | 77,0                | 72,6             | 80,2                | 70,1                | 78,3                | 87,1                | 73,4                |      |
|                  |         | DER (%)          | 8,5                  | 8,2                 | 12,1             | 7,8              | 13,6                | 10,2             | 13,0                | 8,4                 | 12,1                | 12,5                | 12,7                |      |
|                  | Nivel 2 | R (%)            | 80,8                 | 73,3                | 87,1             | 78,1             | 79,4                | 84,1             | 93,0                | 72,9                | 81,6                | 95,5                | 90,5                |      |
|                  |         | DER (%)          | 5,7                  | 2,7                 | 6,0              | 4,3              | 12,0                | 4,8              | 11,7                | 6,7                 | 10,2                | 40,8                | 8,4                 |      |
| MEKC-MS/MS       |         | CBZ <sup>a</sup> | TBZ <sup>a</sup>     | MBZ-OH <sup>a</sup> | OXI <sup>b</sup> | ABZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>b</sup> | FBZ <sup>b</sup> | ABZ-SO <sup>c</sup> | MBZ-NH <sup>c</sup> | MBZ <sup>b</sup>    | FBZ-SO <sup>b</sup> | FBZ-SO <sup>c</sup> |      |
| Orina de oveja   | Nivel 1 | R (%)            | 97,6                 | 91,3                | 99,3             | 94,6             | 94,6                | 95,9             | 93,5                | 96,9                | 97,6                | 95,4                | 93,2                | 87,6 |
|                  |         | DER (%)          | 2,4                  | 7,8                 | 3,8              | 5,4              | 6,8                 | 4,1              | 6,8                 | 6,4                 | 7,3                 | 4,6                 | 2,9                 | 4,6  |
|                  | Nivel 2 | R (%)            | 95,6                 | 96,7                | 93,5             | 94,7             | 92,1                | 99,8             | 92,3                | 91,3                | 97,7                | 93,2                | 90,9                | 90,9 |
|                  |         | DER (%)          | 1,6                  | 3,9                 | 2,6              | 2,9              | 2,1                 | 2,7              | 4,0                 | 2,5                 | 3,0                 | 2,4                 | 2,0                 | 2,3  |
| Orina de vaca    | Nivel 1 | R (%)            | 89,1                 | 85,6                | 94,2             | 94,1             | 98,8                | 97,0             | 85,03               | 96,4                | 87,03               | 88,4                | 95,6                | 75,2 |
|                  |         | DER (%)          | 4,8                  | 8,1                 | 4,3              | 7,1              | 7,5                 | 6,6              | 7,5                 | 8,2                 | 8,2                 | 8,0                 | 5,6                 | 5,0  |
|                  | Nivel 2 | R (%)            | 89,6                 | 89,9                | 95,4             | 93,0             | 87,5                | 99,8             | 84,6                | 86,9                | 97,4                | 83,7                | 87,4                | 85,9 |
|                  |         | DER (%)          | 3,2                  | 4,7                 | 3,9              | 5,5              | 2,3                 | 3,9              | 4,0                 | 1,9                 | 3,3                 | 3,5                 | 2,3                 | 4,5  |
| Orina de cabra   | Nivel 1 | R (%)            | 93,5                 | 97,3                | 95,8             | 92,6             | 98,1                | 90,7             | 84,09               | 97,1                | 90,0                | 87,4                | 93,4                | 83,8 |
|                  |         | DER (%)          | 4,8                  | 7,3                 | 4,6              | 5,8              | 3,3                 | 4,6              | 7,5                 | 7,2                 | 6,8                 | 6,7                 | 7,8                 | 3,2  |
|                  | Nivel 2 | R (%)            | 94,2                 | 95,9                | 96,8             | 88,2             | 95,5                | 98,9             | 91,98               | 93,5                | 94,5                | 87,9                | 89,1                | 97,9 |
|                  |         | DER (%)          | 3,7                  | 2,9                 | 2,5              | 3,5              | 2,2                 | 2,4              | 3,3                 | 2,1                 | 2,2                 | 3,3                 | 3,5                 | 4,0  |

CZE-MS/MS

<sup>a</sup>Nivel 1: 10 µg kg<sup>-1</sup> y Nivel 2: 25 µg kg<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Nivel 1: 20 µg kg<sup>-1</sup> y Nivel 2: 50 µg kg<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>Nivel 1: 40 µg kg<sup>-1</sup> y Nivel 2: 100 µg kg<sup>-1</sup>

MEKC-MS/MS

<sup>a</sup>Nivel 1: 125 µg L<sup>-1</sup> y Nivel 2: 500 µg L<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Nivel 1: 250 µg L<sup>-1</sup> y Nivel 2: 1000 µg L<sup>-1</sup>

<sup>c</sup>Nivel 1: 500 µg L<sup>-1</sup> y Nivel 2: 2000 µg L<sup>-1</sup>

Tabla 9. Resumen de ambos métodos desarrollados

| Analitos   | Matriz                       | Tratamiento de muestra                         | Técnica instrumental                                | Tiempo de análisis (min) | LODs   |
|--|------------------------------|--|---|--------------------------|--|
| TBZ, CBZ+BEN, OXI, ABZ, FBZ, MBZ-OH, MBZ, ABZ-SO, FBZ-SO, ABZ-SO <sub>2</sub> y FBZ-SO <sub>2</sub>                    | Músculo de pollo y cerdo     | Extracción asistida con sales seguida de DLLME | NSM-CZE-MS/MS<br>BGE: 500 mM ácido fórmico (pH 2,2) | 32                       | 1-5 $\mu\text{g kg}^{-1}$<br>para músculo de pollo |
| CBZ, TBZ, MBZ-OH, OXI, ABZ, ABZ-SO, FBZ, ABZ-SO <sub>2</sub> , MBZ-NH <sub>2</sub> , MBZ, FBZ-SO y FBZ-SO <sub>2</sub> | Orina de oveja, vaca y cabra | Dilución 1:10 (v:v)                            | Sweeping-MEKC-MS/MS<br>BGE: 50 mM APFO (pH 9,0)     | 20                       | 15-69 $\mu\text{g L}^{-1}$<br>en orina de oveja    |

que con el método de MEKC-MS/MS se han conseguido separar 13 BZs y sus metabolitos en 20 min, por lo que el tiempo de análisis mejora considerablemente en el método de MEKC-MS/M,S probablemente debido a la presencia de flujo electroosmótico durante la separación al trabajar a un pH mayor.

- Con ambos métodos se han llevado a cabo estrategias de preconcentración on-line. Para el método CZE-MS/MS se ha empleado el NSM, usando como disolvente de muestra una mezcla 30:70 MeCN/agua (v/v) y obteniendo un factor de aumento de sensibilidad entre 75 y 317, dependiendo del BZ. Este factor para el método MEKC-MS/MS, en el que se empleó un efecto de "sweeping" estuvo comprendido entre 20 y 181, dependiendo del BZ.
- Con respecto a los tratamientos de muestra empleados, para el método CZE-MS/MS se llevó a cabo una extracción de los analitos en muestras de carne de pollo y cerdo con MeCN en presencia de sales, seguida de la DLLME con objeto de conseguir una limpieza del extracto y una preconcentración que permita obtener bajos LODs, inferiores a los MRLs legislados. Por otro lado, para la determinación de BZs mediante MEKC-MS/MS en muestra de orina animal, se empleó una simple dilución, lo cual fue posible dados los niveles de concentración que es posible encontrar en este tipo de matrices, resultando un procedimiento simple y rápido
- Ambos métodos se validaron en términos de linealidad, LODs, LOQs, efecto matriz, repetibilidad, precisión intermedia y veracidad, por medio de estudios de recuperación. Para el método CZE-MS/MS aplicado a muestra de carne, las recuperaciones fueron superiores al 70,1 % con DER inferiores al 16 % y con límites de detección menores a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . El método MEKC-MS/MS aplicado a orina animal mostró recuperaciones superiores al 75,2 % con DER inferiores al 8% y

límites de detección menores de 69  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Todo ello demuestra la aplicabilidad de ambos métodos en las matrices seleccionadas.

- Finalmente, ambas metodologías podrían sustituir a otros métodos más comúnmente empleados como HPLC-MS/MS para la monitorización de los BZs y sus metabolitos en muestras alimentarias y clínicas.
- A modo de resumen, en la Tabla 9 se indican las principales características de ambos métodos.

#### Agradecimientos

Esta investigación está financiada por el proyecto de excelencia concedido por la Junta de Andalucía (Ref: P12-AGR-1647) al que está adscrito el contrato predoctoral de Carmen Tejada. Francisco J. Lara agradece al Plan Propio de la UGR la concesión de un contrato posdoctoral.

#### Referencias

- 1) Ahmad, W., Al-Sibaai, A.A., Bashammakh, A.S., Alwael, H., El-Shahawi, M.S., TrAC - Trends Anal. Chem. 2015 (72) 181–192.
- 2) Akamatsu, S., Mitsunashi, T., J. Sep. Sci. 2014 (37) 304–307.
- 3) Anastassiades, M., Schwack, W., J. Chromatogr. A 1998 (825) 45–54.
- 4) Boontongto, T., Santaladchayakit, Y., Burakham, R., Chromatographia 2014 (77) 1557–1562.
- 5) Breadmore, M.C., Tubason, R.M., Shallan, A.I., Phung, S.C., Abdul Keyon, A.S., Gstoettenmayr, D., Prapatpong, P., Alhusban, A.A., Ranjbar, L., See, H.H., Dawod, M., Quirino, J.P., Electrophoresis 2015 (36) 36–61.
- 6) Brensinger, K., Rollman, C., Copper, C., Genzman, A., Rine, J., Lurie, I., et al., Forensic Sci. Int. 2016 (258) 74–79.

- 7) Danaher, M., De Ruyck, H., Crooks, S.R.H., Dowling, G., O'Keeffe, M., J. Chromatogr. B, 2007 (845) 1–37.
- 8) Decisión (2002/657/CE) de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 17.8.2002, L221/8 – L221/36.
- 9) Deventer, K., Pozo, O.J., Verstraete, A.G., Van Eenoo, P., TrAC - Trends Anal. Chem. 2014 (55) 1–13.
- 10) Domínguez-Álvarez, J., Mateos-Vivas, M., García-Gómez, D., Rodríguez-Gonzalo, E., Carabias-Martínez, J. Chromatogr. A 2013 (1278) 166–174.
- 11) Goss, K.U., Environ. Sci. Technol. 2008 (42) 456–458.
- 12) Hu, X.Z., Chen, M.L., Gao, Q., Yu, Q.W., Feng, Y.Q., Talanta 2012 (89) 335–341.
- 13) Hurtado, M., Correa, T., Soria, Olivia., Lozada, C., Medina, J.R., Domínguez, A.M., Revista Mexicana de Ciencia Farmacéuticas, 2010 (41) 30-36.
- 14) López Monzón, A., Vega Moreno, D., Torrès Padrón, M.E., Sosa Ferrera, Z., Santana Rodríguez, J.J., Anal. Bioanal. Chem. 2007 (387) 1957–1963.
- 15) Loyacano, A., Williams, J., Gurie, J., DeRosa, A., Vet. Parasitol. 2002 (107) 227–234.
- 16) Mallat, E., Barceló, D., Tauler, R., Chromatographia 1997 (46) 342–350.
- 17) Marti, A.M., Mooser, A.E., Koch, H., J. Chromatogr. 1990 (8) 145–157.
- 18) Martínez-Villalba, A., Moyano, E., Galcerán, M.T., J. Chromatogr. A (2013) 119–131.
- 19) Reglamento (UE) No 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea. L15/1-L15/72.
- 20) Rummel, N., Chung, I., Shaikh, B., J. Liq. Chromatogr. R. T. 2011 (34) 2211-2223.
- 21) Santaladchaiyakit, Y., Srijaranai, S., J. Sep. Sci. 2014 (37) 3354–3361.
- 22) Shen, J., Tong, J., Jiang, H., Rao, Q., Li, N., Guo, L., S. Ding, J. AOAC Int. 2009 (92) 1009–1015.
- 23) Soliman, L.C., Donkor, K.K., J. Environ. Sci. Heal. Part B 2014 (49) 153–158.
- 24) Takeda, S., Fukushi, K., Chayama, K., Nakayama, Y., Tanaka, Y., Wakida, S.I., J. Chromatogr. A 2004 (1051) 297–301.
- 25) Tejada-Casado, C., Hernández-Mesa, M., Del Olmo-Iruela, M., García-Campaña, A.M., Talanta 2016 (161) 8-14.
- 26) Wang, C., Yan, P., Xing, H., Jin, C., Xiao, J. Engineering 2010 (55) 1994–1999.
- 27) Xia, X., Dong, Y., Luo, P., Wang, X., Li, X., Ding, S., Shen, J., J. Chromatogr. B 2010 (878) 3174–3180.

# NOTICIAS DE LA SECyTA

## 15<sup>as</sup> JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Las 15<sup>as</sup> Jornadas de Análisis Instrumental (JAI) ofrecen una oportunidad única para conocer las últimas investigaciones en el campo de la Química Analítica y el Análisis Instrumental, tanto desde un punto de vista de investigación fundamental como aplicada, a la resolución de los problemas de la sociedad. Con un programa científico atractivo, competitivo y sugerente, las JAI, una edición más, se presentan como un punto de encuentro imprescindible para todos los profesionales implicados en este sector.

La celebración de las JAI dentro del marco de **Expoquimia** favorece la interacción entre los diferentes actores relacionados con el Análisis Instrumental (científicos, empresas, estudiantes, administración, etc.), potenciando las colaboraciones entre ellos para mejorar tanto el sector científico como el tecnológico.

Esta edición, organizada por la **Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA)** en colaboración con el resto de Sociedades colaboradoras, prestará especial atención a los jóvenes investigadores potenciando su inscripción mediante becas y favoreciendo su participación en todas las actividades.

Estas Jornadas tienen el objetivo de dar a conocer el impacto que la innovación y el desarrollo del conocimiento tanto de la Química Analítica como del Análisis Instrumental tienen en la resolución de los problemas actuales de la sociedad.

### Programa científico: novedades en el análisis instrumental

El contenido científico de las **15<sup>as</sup> JAI** planteará y recogerá los avances, retos y fronteras en la instrumentación analítica. Para ello, se está articulando un programa científico con conferencias plenarios de elevada calidad, con ponentes de relevancia internacional que presentarán las últimas novedades sobre los diferentes aspectos de la Química Analítica y el Análisis Instrumental.

Asimismo, habrá presentaciones científicas en forma de comunicaciones orales, “keynotes”, “flash-presenta-

tions” y sesiones dedicadas a los carteles. Se hará un esfuerzo especial para fomentar y favorecer la participación de jóvenes investigadores en el programa científico.

### Conferenciantes invitados

- Dr. Stuart Harrad. Environmental Health Science School of Geography, Earth and Environmental Sciences. University of Birmingham (UK).
- Dr. Bruno Le Bizec. Laboratoire d'Etude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA). École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation. Nantes Atlantique (France).
- Dr. Govert W. Somsen. Editor of Journal of Chromatography B. Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences. Faculty of Sciences, Vrije Universiteit, Amsterdam (NL).
- Dr. Jorge Pisonero. Department of Physics, Faculty of Science, University of Oviedo (Spain).
- Dra. Rosa Maria Marcé. Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry. Faculty of Chemistry, University Rovira i Virgili (Tarragona, Spain).
- Dra. Rosa Ventura. Barcelona Anti-Doping Laboratory. Doping Control Research Group, IMIM Foundation. Hospital del Mar Medical Research Institute (Barcelona, Spain).

### Secretaría Técnica del Congreso

TORRES PARDO

Nàpols, 187, 2<sup>o</sup>.

08013 Barcelona (España)

Tel. +34 93 246 35 66. Fax + 34 93 231 79 72

e-mail: secretariat.expoquimia@firabarcelona.com

### Fechas Clave

- 31/07/2017: Comunicación de trabajos aceptados.
- 08/09/2017: Fecha límite de envío de resúmenes para su presentación como carteles de última hora.
- 15/08/2017. Fecha límite de cuota reducida.
- 15/08/2017. Fecha límite de solicitud de beca.
- 03/10/2017. Inauguración de las 15<sup>as</sup> JAI.
- 05/10/2017. Clausura de las 15<sup>as</sup> JAI.

| <b>Cuotas de Inscripción (21% IVA incluido)</b>              |                             |                                   |
|--|-----------------------------|-----------------------------------|
|  | <b>Hasta<br/>15/08/2017</b> | <b>A partir de<br/>16/08/2017</b> |
| <b>General</b>   | 525 €                       | 600 €                             |
| <b>Socios de Sociedades<br/>y expositores<br/>Expoquimia</b> | 395 €                       | 475 €                             |
| <b>Estudiantes<br/>(tarifa reducida*)</b>                    | 180 €                       | 196 €                             |

\*La cuota reducida está dirigida a estudiantes de tercer ciclo y jóvenes investigadores. Para poder acogerse a esta cuota deberán ser miembros de alguna de las Sociedades organizadoras.

La cuota de inscripción incluye:

- Derecho a presentar 2 comunicaciones por inscripción (previa aceptación por el Comité Científico).
- Acceso a las sesiones (conferencias, comunicaciones, carteles).
- Comidas.
- Cafés.
- Portafolios conteniendo programa científico y resúmenes de las contribuciones científicas.
- Libre acceso a EXPOQUIMIA, EQUIPLAST y EUROSURFAS.

La inscripción debe realizarse a través del formulario *online* disponible en la web de las Jornadas ([www.jai2017.com](http://www.jai2017.com)).

#### **Publicación de las comunicaciones**

El libro de resúmenes (o equivalente) se publicará y distribuirá entre los participantes junto con el programa científico. Como en ediciones anteriores, las comunicaciones se podrán publicar en la revista especializada *Journal of Chromatography A*. En todos los casos deberán superar el proceso de revisión de la revista.

#### **Comités**

##### **Comité organizador**

**Presidente** Francisco Javier Santos Vicente  
(*Universidad de Barcelona*)

**Vicepresidente** Joan Grimalt Obrador  
(*IDAEA-CSIC. Barcelona*)

**Secretario** Juan Vicente Sancho Llopis  
(*Universidad Jaume I, Castellón*)

**Tesorero** Jordi Díaz Ferrero  
(*IQS-Universidad Ramón Llull, Barcelona*)

**Vocales** Ángel García Alonso  
(*Universidad de Santiago de Compostela*)

Belén Gómara Moreno

(*IQOG-CSIC, Madrid*)

M<sup>a</sup> Cruz Moreno Bondí

(*Universidad Complutense de Madrid*)

Encarnación Moyano Morcillo  
(*Universidad de Barcelona*)

##### **Comité científico**

**Presidente** Francisco Javier Santos Vicente  
(*Universidad de Barcelona*)

**Vicepresidente** Joan Grimalt Obrador  
(*IDAEA-CSIC. Barcelona*)

**Secretario** Juan Vicente Sancho Llopis  
(*Universidad Jaume I, Castellón*)

**Vocales** Esteban Abad Holgado  
(*IDAEA-CSIC, Barcelona*)

Montserrat Carrascal

(*IIBM-CSIC/UAB, Barcelona*)

José Manuel Costa

(*Universidad de Oviedo*)

Jordi Díaz Ferrero

(*IQS-Universidad Ramón Llull, BCN*)

M<sup>a</sup> Teresa Galcerán Huguet

(*Universidad de Barcelona*)

Ángel García Alonso

(*Universidad de Santiago de Compostela*)

Ana María García-Campaña

(*Universidad de Granada*)

Belén Gómara Moreno  
(IQOG-CSIC, Madrid)

María José González Carlos  
(IQOG-CSIC, Madrid)

Elena Ibáñez Ezequiel  
(CIAL-CSIC, Madrid)

Begoña Jiménez Luque  
(IQOG-CSIC, Madrid)

Marta Lores Aguin  
(Universidad de Santiago de Compostela)

Francisco Javier Moreno Andújar  
(CIAL-CSIC, Madrid)

Encarnación Moyano Morcillo  
(Universidad de Barcelona)

M<sup>a</sup> Cruz Moreno Bondi  
(Universidad Complutense de Madrid)

Eliandre de Oliveira  
(Parc Científic de Barcelona-UB, Barcelona)

Sandra Pérez Solsona  
(IDAEA-CSIC, Barcelona)

Yolanda Picó García  
(Universidad de Valencia)

Pablo Rodríguez González  
(Universidad de Oviedo)

José Miguel Vadillo  
(Universidad de Málaga)

## PREMIOS

El Comité Científico, en colaboración con las Sociedades participantes y con las casas comerciales, otorgará premios a las mejores contribuciones en distintos temas. Las normas para optar a los mismos se facilitarán en próximas circulares y se podrán encontrar en esta web ([www.jai2017.com](http://www.jai2017.com)).

## BECAS

Con el fin de promover la participación de jóvenes investigadores, **EXPOQUIMIA** otorgará 50 becas. Las Sociedades organizadoras concederán becas para facilitar la asistencia a las JAI de los jóvenes socios interesados de acuerdo con los siguientes requisitos generales:

- Estar inscritos en las JAI
- Ser miembro de alguna de las Sociedades Participantes (SECyTA, SEEM, SEA, SEProt)
- Haber presentado una comunicación aceptada por el Comité Científico
- Cumplir con los requisitos particulares que establezcan las Sociedades Participantes

La solicitud de la beca se debe realizar directamente a la Secretaría de la Sociedad a la que pertenece. En el caso de que el solicitante sea socio de varias de las Sociedades colaboradoras, la solicitud debe enviarse únicamente a una de las Sociedades a las que pertenece.



## 15<sup>as</sup> JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

RECINTO GRAN VIA. 3 - 5 OCTUBRE 2017

[www.jai2017.com](http://www.jai2017.com)



## NUEVOS SOCIOS DE LA SECyTA

1837  
Sandra González Gracia  
LACER, SA  
Boters, 5  
08920 Cerdanyola del Vallès (Barcelona)

1838  
Fina Driéguez García  
Lluís Sagnier, 26-28 Pral 2ª  
08032 Barcelona

1839  
Adriana Port Casamitjana  
Blasco de Garay, 74, 4-2  
08202 Sabadell (Barcelona)

1840  
José Luis Fernández Iglesias  
Alcalde Manuel Portela, 16-Bajo E  
27003 Lugo

1841  
Raúl José Olivero David  
San Marcelo, 22  
28017 Madrid

1842  
Cristina Grande Vicente  
Instituto de Salud Carlos III.  
Centro Nacional de Sanidad Ambiental  
Área de Toxicología Ambiental  
Carretera de Majadahonda-Pozuelo, Km 2.2  
28220 Majadahonda (Madrid)

1843  
Juan José Ramos Rodríguez  
Balandro, 26 3ªC  
28042 Madrid

1844  
Beatriz Arce López  
San Juan Bosco, 18bis, 5ºD  
31007 Pamplona (Navarra)

1845  
Eva María Herrera Hernández  
Travessera de les Corts, 180  
08028 Barcelona

1848  
Jose María de la Rosa Arranz  
Colombia, 15, 4º B  
41013 Sevilla

1849  
Rodrigo Álvarez Ruiz  
Mestre Medina Ferrer, 2 puerta 4  
46970 Alaquàs (València)

1851  
Javier Giménez López  
General Manso, 21 3º 2A  
08980 Sant Feliu de Llobregat (Barcelona)

1852  
Enric Pellicer Castell  
Cervantes, 80  
46680 Algemesí (València)

1853  
Miriam Hidalgo Serrano  
Del Gas, 16  
08800 Vilanova i La Geltrú (Barcelona)

1855  
Carolina Nebot García  
Rúa Alfonso X o Sabio, 7 1ºC  
27002 Lugo

1856  
Ainhoa Oller Ruiz  
Príncipe de Asturias, 7  
04800 Albox (Almería)

1857  
Said Toro Uribe  
de la Cruz, 13 4ºD  
28012 Madrid

1858  
Pau Calatayud Vernich  
Rector Monzó, 6  
46740 Carcaixent (València)

1859  
Anna Domènech Tarrat  
Esteve Terradas, 43 4º  
08023 Barcelona

1860  
Adal Mena García  
Princesa, 9 2º derecha  
28008 Madrid

1861  
Anna Ventayol Soler  
Santa Caterina, 19-23 Atico 2º  
08014 Barcelona



## CONGRESOS CELEBRADOS

**14<sup>TH</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON  
HIGH PERFORMANCE LIQUID PHASE  
SEPARATION AND RELATED TECHNIQUES  
(HPLC 2017)**

This edition of the HPLC Symposium took place in Prague and was accommodated in the Prague Congress Centre, one of the most prestigious buildings in the city with a wonderful view of the city. It is one of the most important congress centers in Europe and, thanks to its capacity, can hold up to 9,300 people in more than 50 rooms and lounges. The Congress took place from the 19<sup>th</sup> to the 22<sup>nd</sup> June 2017.

This symposium was created in 1973 in Interlaken, Switzerland. Advances in the field of liquid-phase separation are highlighted at each meeting. Conferences alternate between Europe and the United States, and odd year's Europe meetings are accompanied by another meeting in Asia/Australia.

The International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations is an international forum for the scientific discussion of methods of high performance liquid chromatography (LC) in its various forms, along with the complementary separation techniques such as electrophoresis, electrochromatography, field/flow fractionation, supercritical fluid chromatography and hyphenated techniques, such as LC/MS, CE/MS and SFC/MS.

The conference started with an opening plenary session and the welcome of the chairmen Michal Holcapek, Frantisek Foret, Pavel Jandera, Peter J. Schoenmakers and Gerard Hopfgartner. After that, there were four plenary lectures: the first one given by Prof. Gert Desmet (University of Brussels, Belgium) talking about 'Current state and future directions in liquid chromatography' followed by Prof. Zoltán Takáts (Imperial College of London, UK) regarding 'Ambient and LCMS lipidomic profiling of clinical samples - New era in cancer diagnostics'. The third one was given by Dr. Pat Sandra (Research Institute for Chromatography, Kortrijk, Belgium) talking about 'The LC toolbox for protein biopharmaceutical characterization' and the last one was given by Dr. Peter A. Willis (California Institute of Technology, Pasadena, USA) regarding

'Searching for life on ocean words with liquid phase separation systems'.

The next day four parallel sessions were run in different halls with the following topics: (i) Fundamentals, where the speakers talked about characterization of HPLC stationary phases, multidimensional separations, mechanisms of mass transport phenomena and stationary phases based on inorganic supports; (ii) HPLC applications, where the themes were based on forensics, doping and toxicology, proteomics, sample preparation, automation and metabolomics; (iii) young sessions and tutorials with different issues such as 2D-LC, separation mechanisms, proteomics and sample preparation and (iv) hyphenations talking about ion mobility in LC-MS, ion suppression and matrix effects, separation-high resolution MS and multidimensional chromatography and MS coupling. To finish the day, a great Czech beer party took place where we could taste the typical food and drink from this city.

Program schedule was similar for the following days. It is worth to point out that on the second day, supercritical fluid chromatography, novel high-efficient separation media, electromigration techniques, chiral separations, affinity separation, lipidomics, glycomic and glycoproteomics, metabolomics, chiral and achiral stationary phases, ultrahigh-resolution mass spectrometry, electrodriven separation and nanofluidic and microfluidic separation were the main topic treated. A marvelous organ concert in the Basilica of St. Peter and St. Paul were celebrated at the final of the second day.

The talks of the third day were focused on separation mechanisms and structural effects, organic polymer monolithic and particular materials, thermodynamics and separation mechanisms in LC, advances in stationary phases, recent advances in (bio)pharmaceuticals, food analysis, natural products, monolithic columns, among others. The Gala dinner was celebrated at the end of the day in the Zofin Palace a Neo-Renaissance building in Prague used as a cultural centre and a venue for concerts, conferences and exhibitions, situated on Slavic Island, an island in the river Vltava.

Thursday was the last day and the topics treated were data analysis, validation and chemometrics, ultra-high resolution separation, clinical analysis, environmental analysis, ultra-high performance liquid chromatography, MS applications from inorganics to pharmaceuticals and high-throughput, and data processing and bioinformatics.

Moreover, every day during lunch time we had the opportunity to attend to the poster session, vendor seminars and technical exhibition where companies active in the field presented their last developments in instrumentation and applications in this field.

The closing plenary session consisted in the medal ceremony of University of Pardubice and three seminars given by Alberto Cavazzini, Norman Dovichi and Doo Soo Chung, talking about ultrafast chiral

separations on modern chiral stationary phases, capillary electrophoresis as a tool for bottom-up proteomics and sample preconcentration techniques in-line coupled with capillary electrophoresis-mass spectrometry, respectively. Finally, all of us were invited to the three following conferences: HPLC 2017 in Jeju. HPLC 2018 in Washington and HPLC 2019 in Milan.

To summarize, during the 5 days, 7 plenary lectures, 182 oral communications, 773 posters, 14 vendor seminars and the 1000 participants from many different countries made possible this exceptional congress.

**Andrea Martín Ortiz** (*IQOG, CSIC*)

**María Jesús García Sarrió** (*IQOG, CSIC*)

**María Eugenia Guerra Vilar** (*Universidad de Santiago de Compostela*).

## THE 16<sup>TH</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON CHEMISTRY AND THE ENVIRONMENT

The 16<sup>th</sup> International Conference on Chemistry and the Environment (ICCE) was held in Oslo (Norway) from 18<sup>th</sup> to 22<sup>nd</sup> June 2017. This edition of ICCE took place at the University of Oslo (Blindern Campus). The preparation of the ICCE Congress was organised in seven dedicated satellite events as pre- and post-conference events on Sunday, 18<sup>th</sup> June and Thursday, 22<sup>th</sup> June. These events aimed at highlighting specific priority aspects associated with applying chemical strategies in environmental research and development. The other three days, the ICCE 2017 program consisted of both plenary presentations and contributions that were presented in four parallel sessions to provide an appropriate frame for all relevant aspects in chemistry and environment. In total, the oral program included 213 presentations and 196 posters were displayed during the entire conference period.

The first day started with the first satellite events in four parallel sessions during the morning and, in the afternoon, the Norwegian Academy of Music opened the welcome ceremony playing different pieces of Norwegian music. Roland Kallenborn (Norwegian University of Life Sciences, Norway), Øivind Mikkelsen (President of the Norwegian Chemical Society (NKS), Morten Dæhlen (Dean of Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo, Norway) and Santiago V. Luis Lafuente

(University Jaume I, Castelló de la Plana, Spain) welcomed all the assistants. After that, a plenary lecture entitled “Chemistry in the service of society” was given by Leiv K. Sydnes (University of Bergen, Norway). Finally, an ice breaker reception took place in the Georg Sverdrups building hall in the evening.

On Monday, the day began with a conference given by Sören Jensen (Stockholm University, Sweden), who in 1966 discovered polychlorinated biphenyl compounds (PCBs) in the environment while he was analysing the DDT pesticide levels among the Swedish population. During all day, different oral sessions took place in parallel. The topics of these sessions were: microplastics, atmospheric aerosols and pollutants, persistent inorganic pollutants, bioactive substances and biotoxins, nanomaterials, challenges in environment chemistry, and regulation of chemicals. After the last session, the Major of Oslo invited all participants to an official welcome reception at the Oslo City Hall. Canapés and drinks were served and assistants had the opportunity to join an exclusive guided tour of the City Hall.

To conclude the day, a conference dinner was celebrated at Tjuvholmen restaurant in Tjuvholmen Sjømagasin, which is one of the most modern neighbourhoods of Oslo.

On Tuesday morning, Lars-Otto Reiersen (Arctic Monitoring and Assessment Programme-AMAP,

Secretary General, Oslo) gave the plenary lecture of the day about Arctic pollution issues. During the coffee break more than one hundred posters were presented in the first poster session and were exhibited until Wednesday. After that, ten different parallel sessions were running all day long, except for two lunch breaks. To end up the day, all participants were invited to join a Panel Discussion: “Microplastics-What is the problem?”, and also a Scientist Quiz and pizza were hosted by the chemistry society “Proton” (Science Library, Blindern Campus) for young scientists.

On Wednesday, there was a plenary session about sustainable development of chemicals given by Rupert Simon (European Chemical Agency, Helsinki, Finland). Then, different parallel sessions were carried out during the day including topics from Poly- and

Perfluoroalkyl substances (PFASs) to Marine Toxicology and Chemistry. After this intense conference day, the ICCE 2017 ended with the closure ceremony, where the Young Scientist Awards (poster and oral) were delivered, and also with the announcement of the future ICCE 2019 in Thessaloniki, Greece.

Finally, on Thursday there was the last satellite event focused on Suspect and Non-Target screening by NORMAN community.

Overall, one of the most exciting topics was related to suspect and non-target analysis which are being of great interest in the scientific community. Several oral presentations were focused on these subjects and gave to the audience some useful and new information.

**Laura Trabalón Escoda** (Universitat Rovira i Virgili)

### SETAC EUROPE 27<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING “ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH TRANSDISCIPLINARY COLLABORATION”

The SETAC Europe 27<sup>th</sup> Annual Meeting was held from 7<sup>th</sup> to 11<sup>th</sup> May 2017 at the SQUARE conference center, located close to the “Mont-des-Arts” in the city of Brussels (Belgium). Almost 30% of the attendees were students, so special occasions were set up for them, including the Mentorship Programme, a lunch seminar, a night party and a job event consisting of a speed dating platform, where students and companies could meet each other to discuss career opportunities. The 27<sup>th</sup> SETAC Europe started on Sunday with 5 parallel short courses and the Opening Ceremony where Professor Lora Fleming, from the University of Exeter (UK), gave an interesting plenary lecture entitled ‘Seas, Oceans, and Public Health in Europe’.

On Monday, the congress started with the first Morning Platform Session including 10 parallel presentations with different general topics such as wastewater effluents, nanoparticles, metals in the environment, environmental risk assessment and the effect of different stressors in the environment. At the same time, one Special Session called ‘Linking Oceans and Human Health: a new trans-disciplinary research challenge’ by Collin Janssen, Lora Fleming and Jan Mees began. Also, there were parallel Poster presentations and Poster corners in the Exhibition Hall up to the end of the day. After the Coffee Break, the second Morning

Session started together with other 10 themes like environmental stressors, wildlife ecotoxicology or nanomaterials and toxicity. At this time, two other Special Sessions started: ‘The role of ecotoxicology in fisheries science and aquaculture’ by Marc Berntssen, Ketil Hylland and Craig Robinson; and ‘Toxicology and ecotoxicology: bridging the gaps’ by Dries Knapen, Dominique Lison, Bruno Campos and Maurice Whelan. Later on, there was the Student Mentor Lunch sponsored by Smithers Viscient. Following the break, 10 more presentations within the last Platform Session were done. After that, there was the moment for the Speaker of the day keynote, Geert Dancet, Executive Director of European Chemicals Agency (Finland), to talk about ‘10 years of REACH: Achievements, Scientific Challenges and Research Needs’. At the end, there was the Reddit online ‘Ask Me Anything’ in SETAC Square where people from the Congress could help answer questions to anyone curious about the science.

On Tuesday morning, the congress started with ten parallel sessions including special sessions. The student lunch seminar was conducted by Dr. Iain Davies, from Personal Care Products Council in the USA and was focused on the dissemination of environmental science to the general public. The afternoon presentations started with some new sessions and the continuation of others, including a special and think-outside-the-box sessions. After the coffee break, the Science Slam was celebrated, where three

researchers or groups presented their projects in a fun and entertaining way.

Wednesday began with 10 sessions in parallel. The most prominent sessions were on plastics monitoring, endocrine disruptors and OMICS. Regarding the first of these sessions, aimed to highlight challenges in microplastic (MP) monitoring and predicting MP abundance and distribution, and to share and evaluate (new) methods for addressing observed challenges. We welcome contributions presenting studies focused on method optimization, contributions presenting a critical view on methods employed in particular studies, as well as contributions suggesting possible solutions to overcome identified obstacles. While problems related to ocean plastic litter pollution have been recognized since the early 1970's, microplastic (MP) pollution of marine areas has been subjected to renewed focus in recent years. A number of recent publications have pinpointed that freshwater systems may also be at risk from MPs, mainly due to the release of particles and fibers from waste-water treatment plants (WWTP). Although certain types of MPs may originate from focal points such as WWTP, plastics tend to travel large distances in the aquatic environment and many sources of plastic pollution are inherently more diffuse. This session highlighted 'Current methodologies for the isolation of microplastic pollution cannot account for all domestic microplastics' and followed of "The use of reference materials in microplastic research: general aspects" by Anne-Kathrin Barthel. Another presentation of this session was 'Associations of nanoplastic with freshwater algae traced using a novel fluorescence assay' presented by Corin Liddle (Heriot Watt University, UK). Another interesting presentation on 'Nano-sized polystyrene impact on individual and embryo of fish and trophic transfer in freshwater food chain' was given by Yooeun Chae, Konkuk University (South Korea).

On Thursday, the last day of the congress, a decrease in the number of attendees was observed in

the different parallel sessions. The most interesting sessions were 'Analytics organic micro pollutants' and 'Increase relevance of toxicity assessment'. Among the different presentations on these topics, we would like to emphasize two: 'Breaking new ground in high-throughput analysis: MALDI-TOF MS for the quantitation of explosives in contaminated soil' by Sascha Kober (TUAS Wildau, Germany) and 'Screening for pharmaceuticals in wastewater and receiving seawater in Nuuk, Greenland' by Leendert Vergeynst (Aarhus University, Arctic Research Centre, Denmark). In the first presentation, the contaminants of explosives were analyzed in the soil using the MALDI-TOF technique and data were corroborated by LC-MS. The second one was about pharmaceuticals. Although these micropollutants have received increasing attention over the last 15 years, little information on the pollution levels of pharmaceuticals in arctic and sub-arctic environments is available. In Nuuk, the capital and largest city of Greenland, all industrial and domestic wastewater is discharged untreated in the surrounding sea. In this study, a broad screening for 205 pharmaceuticals in four wastewaters, including a hospital wastewater, a landfill percolate and their receiving seawaters in Nuuk was performed using a recently developed suspect screening method based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) and Orbitrap high-resolution mass spectrometry (HRMS).

The SETAC Europe 27<sup>th</sup> annual meeting in Brussels was a great success. There was a total of 2,079 attendees belonging to different sectors as academia, business and government, from more than 60 different countries around the world. The meeting congregated a total of 81 parallel sessions, 564 platform presentations, 54 exhibitors and 1,188 poster presentations.

**María Lorenzo Martínez** (CIDE-Universitat de València)

**Alejandro Margareto Mato** (IDAEA-CSIC)

**Daniel Rivas Becerra** (IDAEA-CSIC)

## CALENDARIO DE ACTIVIDADES

1. **PBA2017: 28<sup>th</sup> Pharmaceutical and Biomedical Analysis Conference**  
2-5 Julio de 2017. Madrid (España)  
  
Chair: **Coral Barbas**  
Secretary: Francisco Javier Rupérez  
pba2017@ceu.es  
<http://www.regonline.com/pba2017>
2. **PREP 2017: 30<sup>th</sup> International Symposium on Preparative and Process Chromatography**  
16-19 Julio de 2017. Filadelfia, PA (EE.UU.)  
  
Chair: **Giorgio Carta**  
Secretary: Ms. Janet Cunningham  
janet@barrconferences.com  
<http://www.prepsymposium.org/>
3. **ISSS 2017: 23<sup>rd</sup> International Symposium on Separation Sciences**  
19-22 Agosto de 2017. Viena (Austria)  
  
Chair: **Erwin Rosember**  
Conference secretariat: Ms. Anna Satzinger y Sarah Maschler  
info@iss2017.at  
<http://www.iss2017.at/symposium/welcome/>
4. **Dioxin 2017: 37<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)**  
20-25 Agosto de 2017. Vancouver (Canadá)  
  
Co-Chairs: **Mehran Alaei y Eric Reiner**  
Secretaría: registration@dioxin2017.org  
<http://www.dioxin2017.org/>
5. **Euroanalysis 2017: 19<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry**  
28 Agosto-1 Septiembre 2017. Estocolmo (Suecia)  
  
Contacto: [ulrika.orn@kemisamfundet.se](mailto:ulrika.orn@kemisamfundet.se)  
<http://euroanalysis2017.se/>
6. **ITP 2017: 24<sup>th</sup> International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques**  
10-13 Septiembre de 2017. Sopot (Polonia)  
  
Chairmen: **Michal Markuszewski y Roman Kaliszan**  
symposium@itp2017.com  
<http://itp2017.com>
7. **15<sup>th</sup> Jornadas de Análisis Instrumental**  
3-5 Octubre de 2017. Barcelona (España)  
  
Presidente comité organizador: **Francisco Javier Santos**  
Secretaría técnica: Torres Pardo  
secretariat.expoquimia@firabarcelona.com  
<http://jai2017.com/>
8. **μTAS 2017: 21<sup>st</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences**  
22-26 Octubre de 2017. Savannah, Georgia (EE.UU.)  
  
Conference Chairs: **Abraham Lee y Don DeVoe**  
info@microtas2017.org  
<http://www.microtas2017.org/>
9. **HPLC 2017: 46<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**  
5-9 Noviembre de 2017. Jeju (Corea del Sur)  
  
Chair: **Doo Soo Chung**  
Secretaría: [hplc2017@gmail.com](mailto:hplc2017@gmail.com)  
<http://www.hplc2017-jeju.org>
10. **RAFA 2017: 8<sup>th</sup> Recent Advances in Food Analysis**  
7-10 Noviembre de 2017. Praga (República Checa)  
  
Co-chairs: **Jana Hajslova and Michel Nielen**  
<http://www.rafa2017.eu/>
11. **15<sup>th</sup> International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology**  
24-26 Enero de 2018. Cardiff (Reino Unido)  
  
Chair: **Professor John Langley**  
<https://www.ilmexhibitions.com/htc/>
12. **SETAC Europe 2018: 28<sup>th</sup> Annual Meeting**  
13-17 Mayo de 2018. Roma (Italia)  
  
[setaceu@setac.org](mailto:setaceu@setac.org)  
<https://rome.setac.org/>
13. **BIOSENSORS 2018: 28<sup>th</sup> Anniversary World Congress on Biosensors**  
12-15 Junio de 2018. Miami, Florida (EE.UU.)  
  
Chairmen: **Anthony P. F. Turner y Frances Ligler**  
<https://www.elsevier.com/events/conferences/world-congress-on-biosensors/about>
14. **HPLC 2018: 47<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques**  
29 Julio-2 Agosto de 2018. Washington D.C. (EE.UU.)  
  
Chair: **Norman Dovichi**  
Secretaría: Ms. Janet Cunningham  
janetbarr@barrconferences.com  
<http://www.hplc2018.org/>
15. **ISC 2018: 32<sup>nd</sup> International Symposium on Chromatography**  
23-27 Septiembre de 2018. Cannes-Mandelieu (Francia)  
  
Chairpersons: **D. Thiébaud, V. Pichon, J. L. Veuthey**  
  
[info@isc2018.fr](mailto:info@isc2018.fr)  
<http://isc2018.fr>
16. **XIX<sup>th</sup> EuroFoodChem Conference**  
4-6 Octubre de 2017. Budapest (Hungria)  
  
Chair: **Livia Simon Sarkadi**  
[eurofoodchem2017@mke.org.hu](mailto:eurofoodchem2017@mke.org.hu)  
<http://www.eurofoodchem2017.mke.org.hu/welcome.html>



# NUEVAS TESIS DOCTORALES



“Strategies to improve the determination of polar compounds in environmental waters”

Autora: **Daniela Salas Acosta**

Directores: Rosa María Marcé y Nuria Fontanals

Grupo de Cromatografía y Aplicaciones Medioambientales, Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Universitat Rovira i Virgili

07 de Febrero 2017

## Resumen:

Un gran número de los contaminantes presentes en aguas ambientales tienen carácter polar, propiedad por la cual estos analitos suelen presentar problemas durante su separación cromatográfica y tratamiento de muestra. La presente Tesis Doctoral se enfocó en la aplicación de técnicas recientes, concebidas para mejorar la determinación de compuestos polares, para el desarrollo de nuevos métodos analíticos aplicados a aguas ambientales. En particular, las técnicas estudiadas en esta Tesis incluyen la cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) y el uso de sorbentes para extracción en fase sólida (SPE) poliméricos de modo mixto de intercambio iónico.

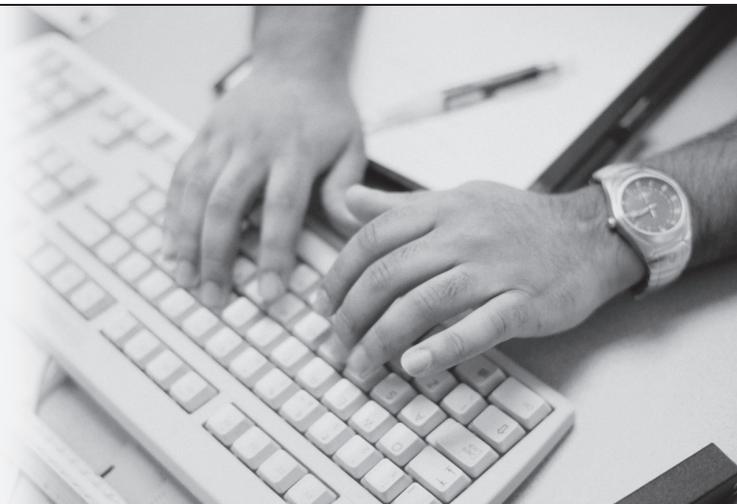
En la sección dedicada a HILIC, se estudió la separación de dos grupos de contaminantes (medios yodados de contraste de rayos X y edulcorantes artificiales) poco analizados por esta técnica. En especial, se estudió el efecto que tienen los parámetros cromatográficos sobre la retención, así como también, los mecanismos de retención involucrados, intentando identificar el mecanismo predominante durante la separación de los analitos. También, se evaluó el acoplamiento HILIC-HRMS para el desarrollo de nuevos métodos en muestras de río y aguas residuales.

En la sección enfocada a evaluar los sorbentes de modo mixto, éstos fueron aplicados usando estrategias alternativas a las comúnmente empleadas. Así pues, en un primer estudio, se utilizaron estos materiales para la extracción iónica y selectiva de un grupo de compuestos (benzotriazoles y benzotiazoles) neutros con deslocalización de carga. En otro estudio, estos sorbentes fueron combinados para obtener cargas positivas y negativas en un mismo cartucho, con el propósito de ser aplicados para la extracción simultánea y selectiva de un grupo de analitos, elegidos como compuestos modelos, con diferentes propiedades ácidas y básicas.

La última parte de la Tesis describe la síntesis y evaluación de diferentes sorbentes poliméricos modificados con grupos funcionales de propiedades zwitteriónicas, proponiendo una nueva estrategia para la extracción simultánea y selectiva de compuestos con propiedades ácidas y básicas.

## NOTA DE LA REDACCIÓN

*Desde el Comité Editorial os animamos a que nos enviéis toda aquella información que consideréis de interés (premios, jubilaciones, etc.) para su difusión entre los lectores del boletín.*



# Perfect Balance to Elevate Your Lab's Performance

Made just for you, the X500R QTOF system is the first robust, high performance high resolution MS system designed for routine use.

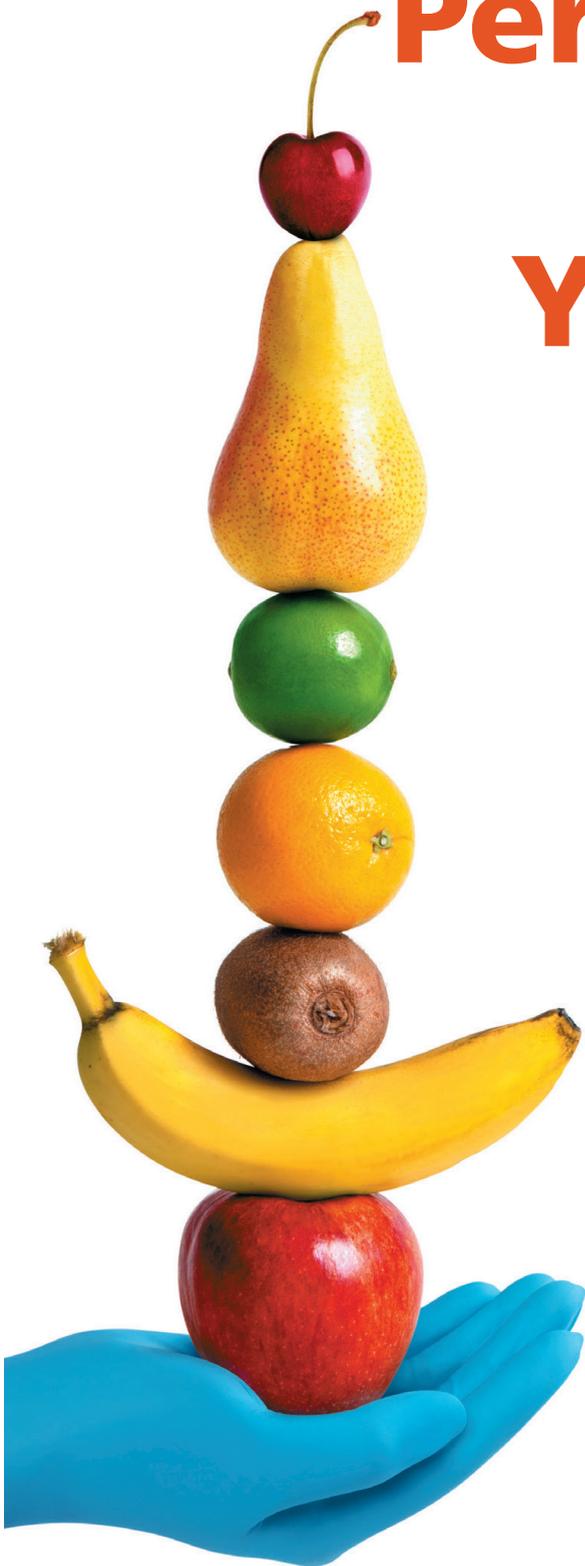
Simple workflows that deliver reliable results, it's the solution that's ready to meet your challenges today and for the future, from the trusted LC-MS/MS industry leader.

Designed exclusively from user input with the perfect balance so it's easy to operate, easy to maintain, and easy to grow.

## The X500R QTOF from SCIEX.

You designed it, we engineered it. In perfect balance to elevate your lab's performance.

[sciex.com/X500R-INFO](http://sciex.com/X500R-INFO)



AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2015 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-13-2990-A 11/2015



## ARTÍCULOS DE INTERÉS

### UTILIZACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE INTERACCIÓN HIDROFÍLICA (HILIC) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PECTINAS Y PECTO-OLIGOSACÁRIDOS

En la actualidad, existen numerosos estudios acerca de las propiedades potencialmente beneficiosas de distintos polisacáridos y oligosacáridos para la salud humana. Los oligosacáridos de grado alimentario son mezclas complejas que contienen compuestos de distinto grado de polimerización (GP) y su estructura influye altamente en su actividad biológica. Por tanto, cada vez es mayor el interés en encontrar nuevas fuentes de oligosacáridos con diferentes estructuras y propiedades funcionales mejoradas. Una de estas fuentes son los subproductos vegetales, de los que se pueden extraer polisacáridos de la pared celular, como las pectinas.

Las pectinas son una de las familias de polisacáridos más complejas que existen en la naturaleza, siendo común su uso como ingredientes alimentarios. Están compuestas principalmente por cadenas lineales de ácido galacturónico (AGal) unidas mediante enlace  $\alpha$ -(1,4), que suponen aproximadamente el 70% de su estructura. Además, poseen otros dominios ramificados denominados ramnogalacturonano I (RG I), formado por secuencias de AGal unido a ramnosa mediante enlace  $\alpha$ -(1,2), y ramnogalacturonano II (RG II), un dominio más complejo que contiene hasta 12 tipos de azúcares con más de 20 enlaces distintos. Las propiedades de la pectina dependen de numerosos factores relativos a su estructura tales como composición monomérica, presencia y distribución de cadenas laterales, grado de metilación y acetilación, masa molecular y distribución de cargas.

A partir de las pectinas es posible obtener pecto-oligosacáridos (POS) mediante despolimerización siguiendo métodos químicos, enzimáticos o combinados. Cuando en la despolimerización de la pectina se utilizan enzimas purificadas que presentan alta especificidad, el análisis exhaustivo de los POS obtenidos, aunque son mezclas muy complejas de oligosacáridos derivados del AGal, arabinosa, xilosa, galactosa o ramnosa, como monosacáridos principales, puede ayudar a la caracterización de la pectina, recurriéndose a la utilización de diversas técnicas cromatográficas tanto de gases como de líquidos, acopladas a detectores espectrométricos.

La cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) emplea fases estacionarias fuertemente polares (amino, ciano, hidroxilamida o diol entre otras) y fases móviles constituidas por mezclas acuosas orgánicas, siendo el acetonitrilo el solvente más utilizado. Por tanto, resulta apropiada para la separación de sustancias polares como los POS, que presentan una baja retención en la cromatografía de fase reversa. El mecanismo de separación se basa en la partición del analito entre una fase acuosa inmobilizada parcialmente en la fase estacionaria y el eluyente orgánico, a diferencia de la cromatografía en fase normal que se basa en un mecanismo de adsorción superficial. La retención en HILIC aumenta con la hidrofiliidad de los analitos y de la fase estacionaria. Esta retención se puede alterar variando las proporciones de solvente orgánico y de agua en la fase móvil. Los oligosacáridos generalmente eluyen por orden creciente de grado de polimerización (GP). Además, oligosacáridos con el mismo GP pueden presentar polaridades distintas en función de su composición monomérica, distribución de cargas y enlaces glicosídicos. Así, las cetosas eluyen antes que las aldosas y los azúcares no-reducidos antes que los reducidos.

Uno de los detectores utilizados para este tipo de cromatografía es el evaporativo de dispersión de luz (ELSD), que se utiliza ampliamente en la cuantificación de compuestos que carecen de grupos cromóforos. Por otra parte, la espectrometría de masas (MS) permite profundizar en el estudio de estos oligosacáridos, determinando algunas características estructurales como la presencia de distintos monosacáridos y de grupos metilos o acetilos en el caso de los POS.

A continuación, se reseñan tres trabajos recientes donde se muestran las aplicaciones de HILIC acoplada a espectrometría de masas para lograr una caracterización más completa de pectinas a través del análisis de los POS obtenidos con enzimas específicas.

#### “Two-step enzymatic fingerprinting of sugar beet pectin”

Connie Remoroza, Suzanne Broxterman, Harry Gruppen, Henk A. Schols  
Carbohydrate Polymers, 2014, 108, 338–347

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método enzimático, en dos etapas, para la caracterización estructural de pectinas procedentes de remolacha azucarera que poseían un grado de metil-esterificación y acetilación de 62 y 30%, respectivamente. Con este fin, se utilizaron enzimas purificadas muy específicas y se estudiaron los POS liberados. En el primer paso, se empleó una mezcla de enzimas ramnogalacturonasas (RG), endopoligalacturonasa II (E-PG) y pectin liasa (PL). Los fragmentos resistentes a esta hidrólisis se aislaron y se sometieron a una segunda digestión con una mezcla de pectin metil esterases (PME) y E-PG. Cabe destacar que la acción de estas enzimas depende de los diferentes patrones de esterificación presentes, que se reflejan en los distintos tipos de oligómeros liberados. Estas peculiaridades ayudan a la caracterización estructural de la pectina. Así, la E-PG requiere secuencias de 2 a 3 unidades de AGal sin esterificar y su actividad es muy baja sobre las cadenas parcialmente metilesterificadas mientras que la PL rompe el homogalacturonano (HG) entre dos AGal metilados, por  $\beta$ -eliminación, dando lugar a POS insaturados en su extremo reductor.

Los POS obtenidos se analizaron mediante HILIC-MS/ELSD, pudiéndose describir los patrones de metil- y acetilesterificación a lo largo de la estructura de la pectina. De esta manera, se determinó que durante la primera hidrólisis se liberó el 42% de los residuos de AGal en forma de mono- di- y trímeros no esterificados, saturados, sensibles a la EPG y oligómeros con GP entre 3 y 8, insaturados, parcialmente metilados (1-3 grupos) o acetilados (1 grupo), liberados por la acción de la PL. Durante la segunda digestión la fracción resistente a estas enzimas fue desesterificada por acción de la PME e hidrolizada por la EPG, liberándose el 36% de los residuos de AGal en forma de monómeros y oligómeros mayoritariamente saturados, con patrón de esterificación semejante al de la primera digestión y GP hasta 9.

Este proceso de hidrólisis enzimática en dos etapas permitió liberar el 78% de los residuos de AGal en forma de monómeros y oligómeros y aportó una mayor información acerca de la distribución de los AGal esterificados, compuestos muy importante a la hora de caracterizar pectinas que poseen los mismos grados de metilación y acetilación pero con distinta distribución. Esta información estructural es importante para comprender mejor la relación entre estructura y funcionalidad.

**“Isolation and structure elucidation of pectic polysaccharide from rosehip fruits (*Rosa canina L.*)”**

*Manol Ognyanov, Connie Remoroza, Henk A. Schols, Yordan Georgiev, Maria Kratchanova, Christo Kratchanov*

*Carbohydrate Polymers, 2016, 151, 803–811*

Los autores de este trabajo aislaron y caracterizaron una pectina procedente de escaramujo, previamente extraída con una solución de ácido cítrico. Este polisacárido estaba compuesto principalmente por AGal (45,5%), galactosa (5,5%) y arabinosa (4,7%) y poseía un grado relativamente alto de metil-esterificación (62%) y acetilación (10%). Con el fin de obtener más información acerca de su estructura, este producto se hidrolizó mediante la combinación de enzimas descrita en el anterior trabajo en la primera etapa de hidrólisis (EPG y PL). Posteriormente, los hidrolizados se analizaron mediante SEC-RID, HPAEC-PAD Y HILIC-MS/ELSD, poniéndose de manifiesto las ventajas y limitaciones de cada una de estas técnicas y su complementariedad.

En el análisis por SEC-RID se observaron fracciones con una masa molecular comprendida entre 10 y 100 kDa pero no fue posible identificar productos individuales ni sus estructuras. El análisis por HPAEC-PAD permitió separar e identificar oligómeros de baja masa molecular, fundamentalmente cadenas de AGal con un GP de 3 a 10. Sin embargo, no se obtuvo información exacta acerca del contenido en grupos metil y acetyl-éster. Por este motivo, se realizó un último análisis por HILIC-MS/ELSD donde se observó que los digeridos contenían mezclas de POS parcialmente esterificados con diferente GP.

Las especies liberadas por la EPG fueron dímeros y trímeros saturados, trímeros con un único grupo metilo y moléculas con GPs de 5 a 7 con hasta 3 grupos metilo. Además, no se detectaron oligómeros de AGal que estuviesen acetilados pero no metilados. En cuanto a la acción del enzima PL, la mayoría de los oligómeros insaturados liberados fueron tri-, tetra- y pentámeros con dos, tres y cuatro grupos metil-éster, respectivamente. La digestión con estas dos enzimas liberó compuestos de AGal que supusieron el 38% de los residuos totales de este ácido presentes en la pectina, lo que pone de manifiesto la conveniencia de la hidrólisis en dos etapas vista en el artículo anterior.

**“Identification of novel isomeric pectic oligosaccharides using hydrophilic interaction chromatography coupled to traveling-wave ion mobility mass spectrometry”**

Antonius G. M. Leijdekkers, Jie-Hong Huang, Edwin J. Bakx, Harry Gruppen, Henk A. Schols  
*Carbohydrate Research*, 2015, 404, 1–8

Una de las ventajas que presenta el análisis de POS por HILIC-MS es que permite determinar grupos metilos y acetilos en comparación con otras técnicas como HPAEC-PAD a pH elevado o GC que rompen los enlaces éster. Sin embargo, no permite separar oligosacáridos isoméricos que presenten diferencias en la estereoquímica de sus moléculas o en la posición de los enlaces y/o ramificaciones, limitando la información aportada por esta técnica. No obstante, la espectrometría de masas de movilidad iónica (IMS) separa los iones en función de su estructura tridimensional por lo que distingue entre iones con valores *m/z* idénticos pero distinta configuración espacial. El desarrollo del detector de masas *traveling-wave ion mobility* (TWIMMS) ha mejorado la velocidad y la sensibilidad de la IMS tradicional. Por otra parte, si se utilizan marcadores como la 3-aminoquinolina (3-AQ), que aumentan la eficiencia de la ionización y reducen la complejidad de los espectros de fragmentación, es posible trabajar con detectores de fluorometría e identificar la distribución exacta de los grupos metilos o acetilos diferenciando los distintos isómeros. En base a estas ventajas, en este trabajo se desarrolló un método de separación y caracterización de isómeros de POS basado en el acoplamiento de la cromatografía HILIC a TWIMMS.

En este estudio se utilizaron dos sustratos, en primer lugar se hidrolizó, con la enzima EPG, una pectina de cítricos, con un grado de metil-esterificación del 30%, y, posteriormente, la mezcla de reacción se

marcó con 3-AQ. El marcaje disminuyó la polaridad de los POS y, por tanto, su tiempo de retención en la columna de HILIC, aunque no alteró el orden de elución ni hubo pérdidas significativas de resolución. Otro beneficio de utilizar HILIC en el análisis por MS de los POS marcados es que no se necesita eliminar el exceso de sales y 3-AQ, ya que eluyen rápidamente y pueden desecharse como residuos evitando la contaminación de la fuente de ionización. El empleo de HILIC-TWIMMS resultó ser muy apropiado para determinar las estructuras de los isómeros de POS a pesar de que las diferencias en las *collisional cross sections* (CCS) de algunos de ellos eran demasiado pequeñas como para separar todos los POS isoméricos metilados.

El otro sustrato analizado fue una mezcla de fragmentos derivados de RG-I de remolacha azucarera, que fueron hidrolizados intensamente por un enzima de *Aspergillus aculeatus* y otra de *A. niger*. Los POS obtenidos presentaban un contenido relativamente elevado en ácido glucurónico (AGlu, 4,9%). Los resultados revelaron que estas mezclas estaban compuestas fundamentalmente por RG-oligosacáridos parcialmente acetilados y/o sustituidos con AGlu, lo que daba lugar a posibles isómeros. De esta manera, se observaron por primera vez nuevas estructuras en los POS, como la presencia de AGlu unido a las posiciones O-2 y O-3 de los residuos de AGal, o la capacidad de un residuo de una única molécula de AGal para contener tanto un grupo acetilo como un sustituyente de AGlu. El método descrito permite una identificación mucho más precisa y podría ser aplicado a otro tipo de muestras complejas que contengan oligosacáridos isoméricos.

**Carlos Sabater Sánchez**

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM)



# EMPRESAS colaboradoras

## PROTECTORAS

- **AGILENT TECHNOLOGIES SPAIN, S.L.**  
Parque Empresarial Alvia  
José Echegaray, 8. Edif. 3, Planta 1ª  
28232 LAS ROZAS (Madrid)
- **BRUKER ESPAÑOLA, S.A.**  
Avda. Marie Curie, 5, Edificio Alfa - Pta. Baja  
Parque Empresarial Rivas Futura  
28529 RIVAS-VACIAMADRID  
(Madrid)
- **MERCK CHEMICALS AND LIFE SCIENCE S.A.U.**  
Avenida de Burgos, 114  
28050 Madrid)
- **PERKIN ELMER ESPAÑA, S.L.**  
Avda. de los Encuartes, 19  
28760 TRES CANTOS  
(Madrid)
- **SCIEX SPAIN, S.L.**  
Valgrande, 8. Edificio Thanworth II, Nave B1A  
28108 ALCOBENDAS (Madrid)
- **TEKNOKROMA ANALÍTICA, S.A.**  
Camí de Can Calders, 14  
08173 SANT CUGAT DEL VALLÉS  
(Barcelona)
- **THERMO FISHER SCIENTIFIC**  
Avda. de la Vega, 1  
Edificio 1 Planta 4  
28108 ALCOBENDAS (Madrid)
- **WATERS CROMATOGRAFÍA, S.A.**  
Ronda Can Fatjó, 7-A  
Parc Tecnologic del Vallés  
08290 CERDANYOLA DEL VALLES  
(Barcelona)

## ASOCIADAS

- **INGENIERÍA ANALÍTICA, S.L.**  
Avenida Cerdanyola, 73  
08172 SANT CUGAT DEL VALLÉS  
(Barcelona)
- **IZASA SCIENTIFIC, S.L.U.**  
Plaza de Europa, 21-23  
08908 L'HOSPITALET DE LLOBREGAT  
(Barcelona)
- **LECO INSTRUMENTOS, S.L.**  
Avda. de la Industria, 43  
28760 TRES CANTOS (Madrid)
- **SCHARLAB, S.L.**  
Gato Pérez, 33  
Polígono Industrial Mas D'en Cisa  
08181 SENTMENAT (Barcelona)
- **SERVICIO Y MANTENIMIENTO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS, S.A.L. (SYMTA, S.A.L.)**  
San Máximo, 31  
28041 MADRID
- **S. E. DE CARBUROS METÁLICOS S.A.**  
Avda. de la Fama, 1  
08940 CORNELLÀ DE LLOBREGAT  
(Barcelona)  
oferta@carburos.com
- **SUGELABOR**  
Sicilia, 36  
28038 MADRID

# NOTAS TÉCNICAS



## UN BALANCE PERFECTO PARA AUMENTAR EL RENDIMIENTO DE SU LABORATORIO

André Schreiber<sup>1</sup>, April Quinn-Paquet<sup>2</sup>, and Jianru Stahl-Zeng<sup>3</sup>

<sup>1</sup>SCIEX Concord, Ontario (Canada),

<sup>2</sup>SCIEX Framingham, Massachusetts (USA),

<sup>3</sup>SCIEX Darmstadt (Germany)

### Resumen

Se presentan los resultados obtenidos con un nuevo método de identificación y cuantificación de residuos de pesticidas en alimentos utilizando el sistema SCIEX X500R QTOF. Las muestras fueron extraídas utilizando el método de QuEChERS y analizadas mediante LC-HR-MS/MS. Se consiguen límites de cuantificación de 10 µg/kg para cada compuesto después de diluir 10 veces el extracto para minimizar el posible efecto matriz.

Los compuestos fueron identificados automáticamente por coincidencia de tiempo de retención, masa exacta y perfil isotópico del ion molecular y búsqueda en librería del espectro MS/MS usando el software SCIEX OS. En el mismo procesado, se cuantifican compuestos y para muestras desconocidas se marcan aquellas que superan un determinado umbral.

### Introducción

Los avances recientes en LC-MS/MS, incluyendo sistemas híbridos del tipo cuadrupolo-cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF), ahora permiten poder realizar análisis dirigidos y no dirigidos.

El Sistema SCIEX X500R QTOF ha sido diseñado para su uso en rutina, es robusto y de alto rendimiento como sistema de alta resolución proporcionando:

- Sensibilidad para detectar compuestos a los niveles máximos de residuos.
- Resolución suficiente para eliminar las interferencias en matrices alimentarias complejas
- Linealidad para cuantificar con más de 3 órdenes de magnitud
- Exactitud de masa para identificar compuestos siguiendo la reglamentación actual

- Identificación utilizando espectros MS/MS y ion ratios
- Robustez líder en la industria con la fuente Turbo V™ y la interfase de Curtain Gas™

Los cromatogramas en full scan son ricos en información y fácilmente contienen miles de iones de cualquier residuo presente en la muestra, incluyendo la matriz. Se requiere un software potente para explorar todos los espectros generados de MS/MS de alta resolución para obtener las respuestas y resultados de estos datos complejos.

El software SCIEX OS es de plataforma sencilla para control MS, procesado e informe y proporciona:

- Workflows sencillos con resultados fiables
- Identificación y cuantificación simultánea y sencilla
- Revisión rápida de datos e informes personalizados con alertas y filtrado de resultados

### Experimental

#### Patrones

Se ha usado una mezcla de patrones de 200 pesticidas para preparar diluciones para el análisis cuantitativo.

#### Preparación de muestra

Las muestras de alimentos adquiridos en el supermercado y del EU proficiency test se extraen usando un procedimiento QuEChERS según la guía EN 15662/2007. Los extractos de muestra se diluyeron 10 veces para minimizar un posible efecto matriz.

#### Separación LC

La separación se consigue utilizando un sistema SCIEX ExionLC™ AC con una columna Phenomenex Kinetex Biphenyl 2,6 µm (50 x 2,1 mm) y un gradiente rápido de agua y metanol con 5 mM de formiato amónico a un flujo de 0,5 mL/min (ver Tabla 1) para el perfil de gradiente. Volumen de inyección de 5 µL.

#### Detección MS/MS

Se ha usado el sistema SCIEX X500R QTOF con fuente Turbo V™ y ionización por electrospray (ESI). Se consigue la calibración de masas utilizando el Sistema de calibración integrada (CDS) con sonda TwinSprayer (aguja dual ESI). CDS: Calibrant Delivery System.

Los datos en alta resolución se adquieren utilizando un método IDA con un survey TOF-MS (100-1.000 Da en 100 msec) y hasta 20 MS/MS scans dependientes (50-1.000 Da en 35 msec). La fragmentación MS/MS se consigue con un CE de 35 V y un CES de ±15 V.

Para una mayor cobertura de MS/MS se activa el Dynamic Background Subtraction (DBS) y también se usa una lista de exclusión que permite una identificación retrospectiva de desconocidos sin necesidad de una segunda inyección.

#### Adquisición y procesamiento de datos

Todos los datos han sido adquiridos y procesados utilizando la versión 1.0 del software SCIEX OS, con una interfaz de usuario diseñada para un rápido aprendizaje, proporcionando una mejora en el rendimiento del laboratorio

### Resultados y Discusión

#### Características de comportamiento del X500R

Una resolución  $> 20.000$  (a FWHH) y una exactitud de masa  $< 5$  ppm son suficientes para separar los analitos de interés de las interferencias de la matriz y, a la vez, ser identificadas según un conjunto de requisitos demandado por diferentes guías<sup>1,2</sup>.

El sistema X500R QTOF utiliza un diseño en N-optics para maximizar la resolución manteniendo el dise-

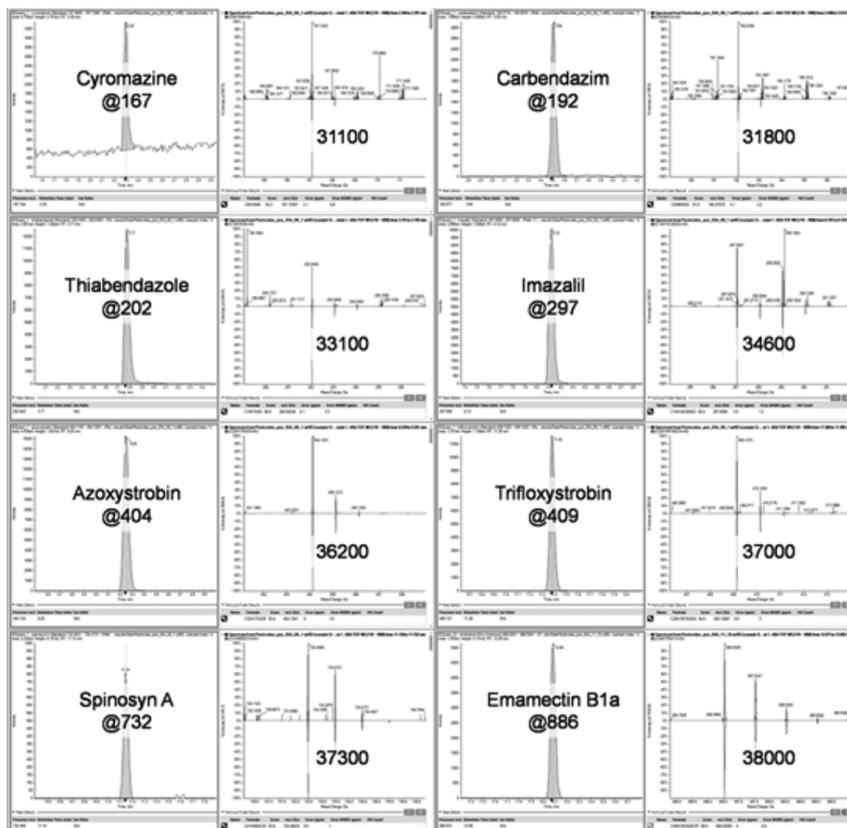
ño de sobremesa y un tamaño reducido. Su poder de resolución proporciona valores de 30.000 a 40.000 para los rangos de peso de las moléculas típicas de pesticidas.

El orificio de entrada al acelerador del TOF, de 4 mm, da una gran resolución sin compromiso en la sensibilidad. Dicha sensibilidad en el X500R QTOF es comparable a la de un sistema 5500 SCIEX QTRAP® operando en modo MRM, permitiendo una dilución del extracto para minimizar la supresión iónica y detectando fácilmente niveles de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Figura 1).

Además, la exactitud de masa del X500R QTOF está ayudada por el Dynamic Transmission Control y por la Dynamic Background Calibration, introducida en 2010 con los sistemas TripleTOF® y optimizada con el tiempo.

El Sistema X500R QTOF proporciona una exactitud de masa estable de menos de 2 ppm mediante la calefacción del TOF, con 6 drones calefactores a lo largo del tubo de TOF que mantienen la exactitud de masa y la robustez. Además, el CDS integrado con la sonda TwinSprayer proporciona un suministro independiente para la autoca-

**Figura 1.** Sensibilidad y resolución de diferentes pesticidas. *Izquierda:* XIC del ion molecular de cada compuesto  $\pm 5$  mDa a 1 ng/mL. *Derecha:* TOF-MS con valor de resolución (media de 7 sistemas QTOF).



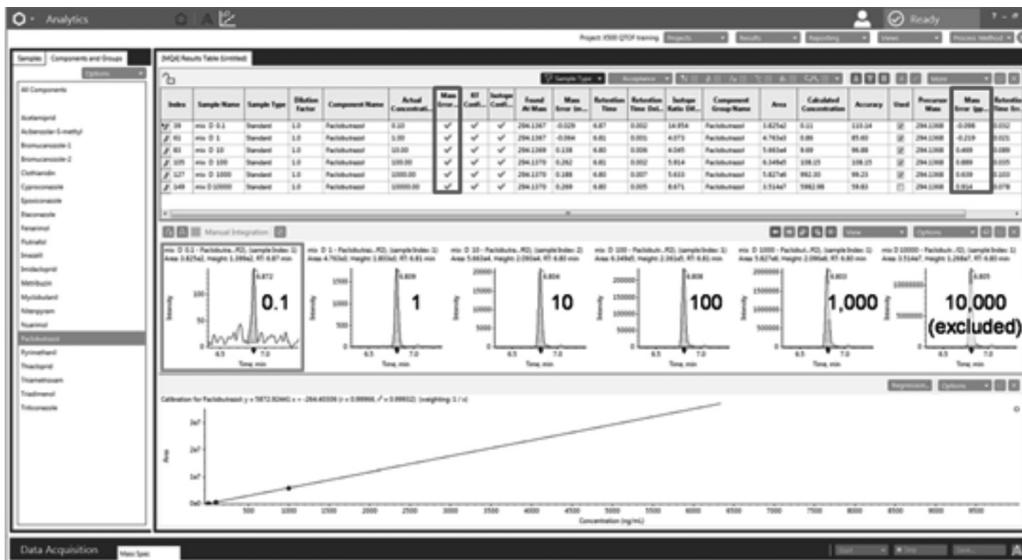
# NOTAS TÉCNICAS

libración. El CDS mantiene la exactitud de masa a lo largo de dilatados periodos de tiempo calibrando en modo batch (se recomienda realizar una autocalibración cada 1-2 horas).

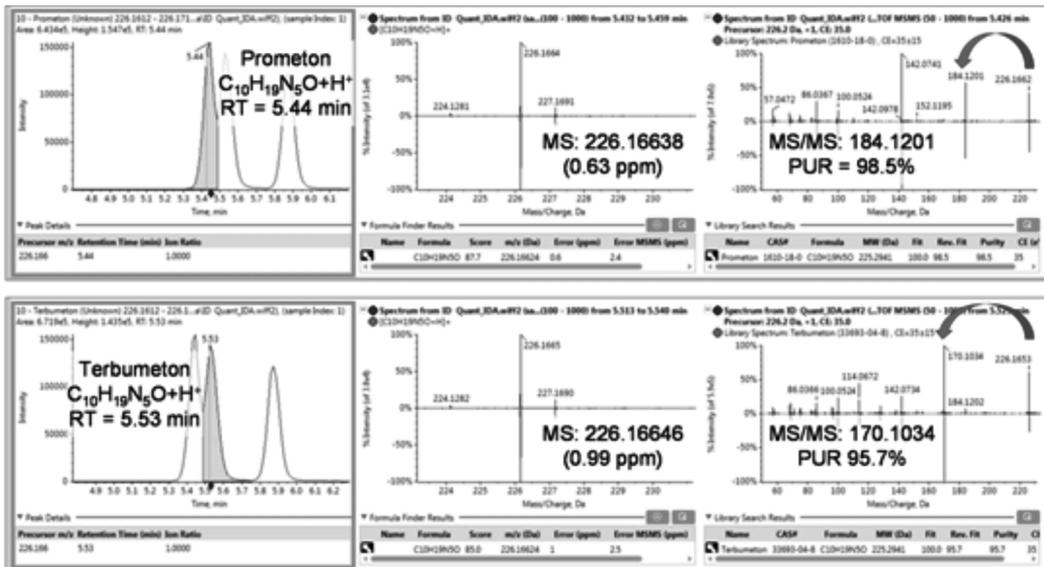
La Figura 2 muestra un ejemplo de exactitud de masa para un pesticida concreto detectado a lo largo de un gran rango de concentraciones.

A pesar de la alta selectividad en la detección de MS en alta resolución, existe el riesgo de encontrar falsos positivos debido a isómeros interferentes y señales de la matriz. Debido a esto, las guías alimentarias exigen la detección del ion molecular y, al menos un ion fragmento, y para un mayor grado de seguridad en la identificación, se debería añadir el espectro de full scan, perfil isotópico, iones aducto, iones fragmento adicionales<sup>2</sup>.

**Figura 2.** Paclobutrazol desde 0,1 a 10.000 ng/mL con errores de masa < 1 ppm incluso a altas concentraciones por encima del LOQ superior.



**Figura 3.** Identificación de los isómeros prometón y terbumeton usando los iones fragmento característicos y búsqueda en librería de MSMS.



El ejemplo mostrado en la figura 3 subraya la necesidad de la detección de iones fragmentos para diferenciar entre isómeros. Los pesticidas prometon y terbumeton con la misma fórmula empírica (C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>O) tienen el mismo perfil isotópico. La diferencia de tiempo de retención no es suficiente. Sin embargo, los dos componentes tienen iones fragmento únicos y característicos C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O<sup>+</sup> y C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>5</sub>O<sup>+</sup>.

*Flujo de trabajo de procesamiento para identificación de conocidos y cuantificación en SCIEX OS Software*

Se generan los cromatogramas (XIC) de todos los analitos conocidos en base a su fórmula y al tiempo de retención esperado. La información MS y MS/MS se evalúa al detectarse la señal en un XIC y los compuestos se identifican por tiempo de retención, masa exacta, perfil isotópico y búsqueda en librería MS/MS. Las reglas cua-

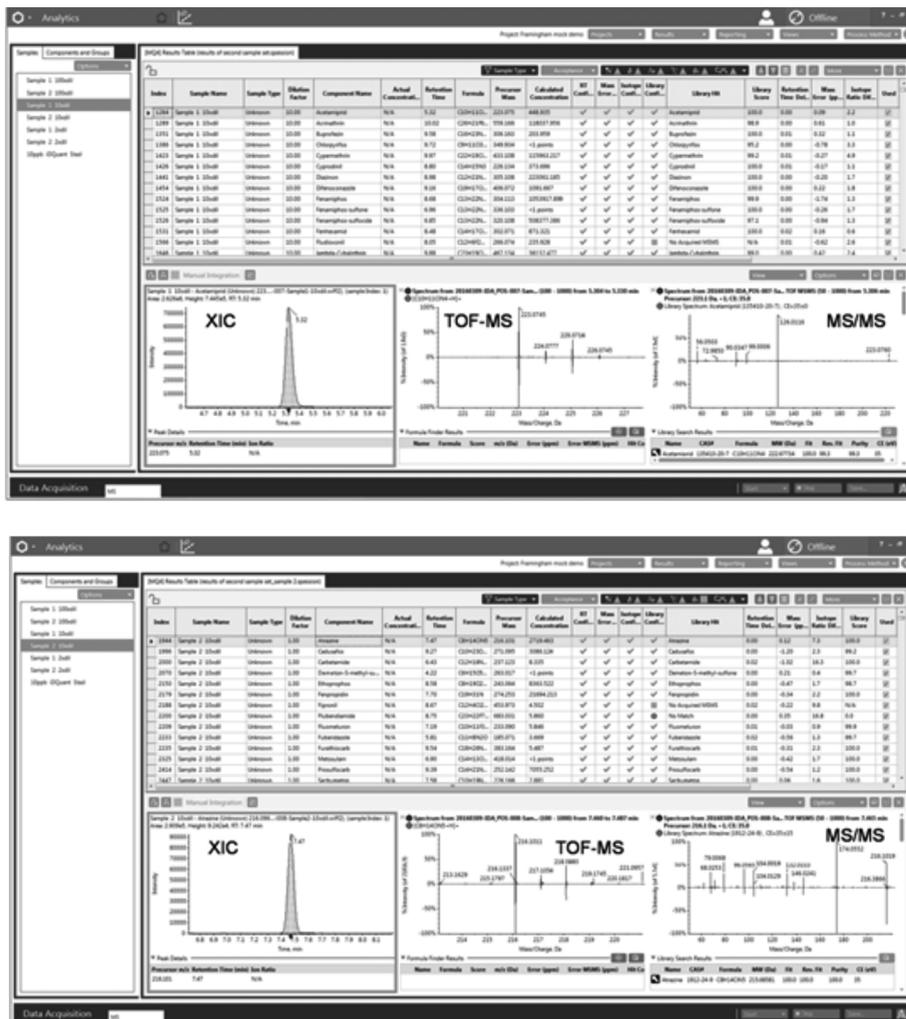
litativas se definen en el método de proceso y pueden ser usadas para mostrar y filtrar los resultados.

*Resultados de muestras EU Proficiency Test*

Se han extraído y analizado los pesticidas de dos muestras de frutas y vegetales de un test de EU proficiencia. En las muestra 1 de EU Proficiency se reportaron resultados positivos para los pesticidas acetamiprid, buprofezin, cyprodinil, difenoconazol, fenhexamide, fludioxonil, methoxyfenozide, pirimicarb, pyridaben, spinosyn A, spinosyn D y tetraconazole (Figura 4).

No se reportaron falsos positivos. Los datos de MS/MS diferencian e identifican isómeros estructurales. La flubendiamide no estaba presente en nuestra librería de MS/MS. Se usó el 'Fragments Tool' de SCIEX OS

**Figura 4.** Pesticidas identificados en (a) la muestra 1 (polaridad positiva) con tiempo de retención, masa exacta, perfil isotópico y librería de MS/MS (nota: fludioxonil se identificó en polaridad negativa) y (b) en la muestra 2 (polaridad positiva) (nota: fipronil y flubendiamide se identifican en polaridad negativa).



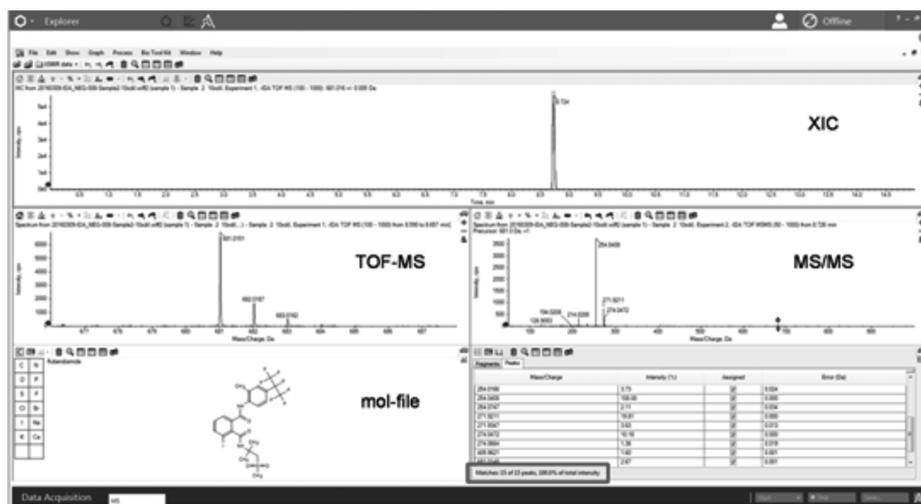
# NOTAS TÉCNICAS

para comparar la estructura del posible compuesto con el espectro MS/MS de alta resolución. Todos los iones fragmento son identificados como una parte de la molécula de flubendiamide (Figura 5).

## Resultados de muestras reales

Se obtuvieron y analizaron residuos de pesticidas en muestras de frutas y vegetales obtenidas en un supermercado. Los resultados, por encima de 10 µg/kg, se muestran en la Tabla 3.

**Figura 5.** Identificación tentativa de flubendiamide basada en comparación del espectro HR-MS/MS con el camino de fragmentación teórico



**Tabla 3.** Pesticidas identificados y cuantificados en frutas y vegetales de supermercado basados en búsqueda de tiempo de retención (RT), masa exacta, perfil isotópico y librería MS/MS

| Muestra/ Pesticida      | RT error (min) | Mass error (ppm) | Isotope ratio error | MS/MS FIT (%) | Conc. (µg/kg) |
|-------------------------|----------------|------------------|---------------------|---------------|---------------|
| <b>Plátano</b>          |                |                  |                     |               |               |
| <i>Buprofezin</i>       | 0,01           | 0,32             | 3,5                 | 100,0         | 341           |
| <i>Imazalil</i>         | 0,02           | 0,79             | 15,1                | 91,5          | 565           |
| <i>Thiabendazole</i>    | 0,01           | -1,51            | 13,9                | 97,6          | 444           |
| <b>Arándano</b>         |                |                  | n.d.                |               |               |
| <b>Zanahoria</b>        |                |                  | n.d.                |               |               |
| <b>Uva</b>              |                |                  |                     |               |               |
| <i>Boscalid</i>         | 0,01           | -0,80            | 8,8                 | 97,2          | 115           |
| <i>Buprofezin</i>       | 0,01           | 0,22             | 7,3                 | 99,6          | 17,3          |
| <i>Cyprodinil</i>       | 0,01           | -0,87            | 3,3                 | 94,8          | 412           |
| <i>Imidacloprid</i>     | 0,01           | -0,58            | 14,6                | 96,1          | 82,5          |
| <i>Pyraclostrobin</i>   | 0,00           | -1,31            | 4,8                 | 100,0         | 46,7          |
| <b>Limón</b>            |                |                  |                     |               |               |
| <i>Imazalil</i>         | 0,02           | 0,74             | 7,3                 | 94,7          | 1080          |
| <i>Pyrimethanil</i>     | 0,01           | -0,77            | 1,0                 | 99,2          | 164           |
| <i>Pyrifproxifen</i>    | 0,01           | 0,43             | 11,4                | 95,3          | 31,6          |
| <b>Plátano orgánico</b> |                |                  |                     |               |               |
| <i>Spinosyn D</i>       | 0,00           | 2,33             | 19,8                | 100,0         | 12,6          |
| <b>Fresa orgánica</b>   |                |                  |                     |               |               |
| <i>Spinosyn A</i>       | 0,01           | 0,55             | 9,1                 | 100,0         | 13,9          |
| <i>Spinosyn D</i>       | 0,01           | 1,63             | 6,0                 | 99,4          | 33,3          |
| <b>Espinacas</b>        |                |                  | n.d.                |               |               |
| <b>Fresa</b>            |                |                  |                     |               |               |
| <i>Acetamiprid</i>      | 0,08           | -0,35            | 6,5                 | 98,7          | 19,2          |

## Conclusiones

Se ha desarrollado un nuevo método para identificar y cuantificar residuos de pesticidas en muestras alimentarias utilizando el sistema SCIEX X500R QTOF. El procesamiento cualitativo y cuantitativo se realiza en SCIEX OS software.

Se aplicó con éxito el método a muestras de fruta y vegetales de EU proficiency test adquiridas en supermercado. Las muestras fueron extraídas por QuEChERS y analizadas por LC-HR-MS/MS. Se consiguen límites de cuantificación de 10 µg/kg para todos los compuestos después de diluir 10 veces los extractos para minimizar los posibles efectos matriz.

Los pesticidas fueron automáticamente identificados por tiempo de retención, masa exacta, perfil isotópico del ion molecular y librería MS/MS utilizando SCIEX OS. En el mismo procesamiento los compuestos fueron cuantificados y en las muestras desconocidas se marcan cuando se supera un nivel definido por el usuario.

## Referencias

- 1 EU Commission Decision 'concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results' #2002/657/EC
- 2 EU Commission Guidance Document: 'on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed' #SANTE/11945/2015
- 3 André Schreiber et al.: 'Using the X500R QTOF System and SCIEX OS Software to Quickly Identify Unknowns in Food Samples' Application Note SCIEX (2016) # RUO-MKT-02-3761-A



AB SCIEX Spain S.L.,  
Valgrande 8, Edificio Thanworth II,  
Nave B1A  
28108 Alcobendas (Madrid)  
[www.sciex.com](http://www.sciex.com)

# Thermo

## SCIENTIFIC

### LA ALTA RESOLUCIÓN DE MASA ES ESENCIAL PARA UNA IDENTIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE COMPUESTOS CON LA MÁXIMA CONFIANZA.

*D. Fco. Javier Rodríguez*

*Especialista de ventas en cromatografía, Thermo Fisher Scientific*

Los laboratorios, tanto de investigación como de análisis de rutina, se encuentran con una presión mayor cada día para producir resultados en menos tiempo, mientras se mantienen altos niveles de confianza en los resultados. La mayoría de los ensayos se basan en aproximaciones de cuantificación dirigida, empleando tanto cromatografía de gases (GC) como cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrometría de masas (MS) de triple cuadrupolo. Estas técnicas cubren el amplio rango de familias químicas que deben ser analizadas a los niveles solicitados de sensibilidad y selectividad. Sin embargo, están limitados a los compuestos que se encuentran en la lista de adquisición y requieren una cuidadosa optimización de los parámetros de adquisición para cada compuesto. La espectrometría de masas de alta resolución en modo full scan, empleando la tecnología Orbitrap, proporciona la solución a:

- La demanda de cuantificación e identificación de un número cada vez mayor de compuestos en un mismo análisis.
- El análisis retrospectivo de las muestras mucho tiempo después de su adquisición.
- La identificación y la elucidación de la composición química y la estructura de compuestos desconocidos.

Hasta ahora, la tecnología de espectrometría de masas de alta resolución Orbitrap sólo ha estado disponible con LC y ha demostrado ser una técnica de un alto valor analítico. La tecnología de espectrometría de masas Orbitrap ha sido ahora acoplada a GC en el nuevo sistema Q Exactive™GC, el cual es un híbrido de cuadrupolo con analizador Orbitrap. La nueva configuración de sobremesa de un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-

Orbitrap abre nuevas posibilidades para los compuestos que son analizables por GC. Los siguientes ejemplos resaltan los beneficios de la MS de alta resolución acoplada a GC.

### El impacto de la resolución de masa en la selectividad para análisis dirigidos

Los experimentos de masa exacta en alta resolución (HR/AM) típicamente comprenden el análisis en modo full scan de una muestra, y para el análisis de moléculas pequeñas el rango de barrido suele ser de 50 – 1.000 Da. La tecnología Orbitrap proporciona la selectividad necesaria para resolver los compuestos seleccionados de otros compuestos o de los iones de la matriz que tengan masa similar. Para el análisis dirigido de nuestros compuestos, la masa exacta del ión diagnóstico es extraída en una estrecha ventana de extracción (típicamente < 5 ppm). Esta ventana estrecha sólo es posible cuando el instrumento proporciona suficiente exactitud de masa, para lo cual un alto poder de resolución de masa es esencial.

Sin embargo, cuando dos perfiles de masa se superponen, el perfil de masa que se mide es la suma de los dos perfiles individuales. La superposición resulta en un asignamiento incorrecto de la masa del compuesto buscado. Vamos a poner unos ejemplos de análisis de pesticidas en extractos vegetales. El problema se muestra en la Figura 1, donde un extracto QuEChERS de puerro en acetonitrilo es analizado cuatro veces a un poder de resolución de 15K, 30K, 60K y 120K ( $m/z$  200).

El espectro de masas muestra el pesticida chlorpropham ( $m/z$  127.01833) y un ión de fondo de la matriz a una masa similar creando una interferencia. Se consigue una excelente exactitud de masa para el chlorpropham a 60K y a 120K, resolviendo el ión prácticamente hasta línea base. Sin embargo, a 15K y a 30K el chlorpropham no fue suficientemente resuelto de la interferencia, lo que resultó en una pobre asignación de la masa exacta. A 15K, la exactitud de masa estaba afectada de modo significativo con un valor de diferencia de masa de 15,92 ppm. Bajo el criterio típico de identificación en screening de compuestos de una diferencia de masa < 5 ppm, e incluso bajo una tolerancia amplia de 10 ppm, esta diferencia de masa habría resultado en un falso negativo (no detectado) para este pesticida. Este ejemplo claramente demuestra que un mínimo poder de resolución es necesario. Dicho poder de resolución depende de la complejidad de la muestra analizada y de la concentración de ambos: el analito y las interferencias.

### Manteniendo la sensibilidad en alta resolución

Con otros tipos de tecnologías GC-MS, el incremento de la resolución de masa resulta en una disminución de la transmisión de los iones por el analizador. Consecuentemente, la sensibilidad de las medidas puede verse afectada. Para una cuantificación y screening de compuestos a bajas concentraciones en matrices complejas, es esencial mantener la sensibilidad del instrumento mientras se trabaja a un alto poder de resolución. En la **Figura 1**, se demostró la necesidad de una alta resolución. Es esencial también mantener la sensibilidad a los modos de alta resolución de 60K y 120K. El sistema Q Exactive GC no pierde intensidad de señal al incrementar la resolución del modo que sí ocurre en otros tipos de espectrómetros de masas. En la **Figura 2** se muestra un ejemplo de tres pesticidas (chlorbenzilate, fipronil y pendimethalin) y las respuestas correspondientes a las áreas de pico a una concentración de 10 ng/g en extractos QuEChERS de zanahoria en acetonitrilo. Los extractos se analizaron en los modos de resolución 15, 60 y 120K en full scan. Las áreas absolutas de pico se mantuvieron en los distintos modos de resolución. Esta consistencia proporciona la resolución de masa superior necesaria para obtener una excelente exactitud de masa sin sacrificar la sensibilidad.

### Alta resolución para la identificación de compuestos desconocidos

Una de las ventajas de trabajar en modo full scan con exactitud de masa es que los datos pueden ser interrogados retrospectivamente y los picos potencialmente desconocidos pueden ser identificados. La exactitud de masa de un ión permite proponer una composición elemental basada en la medida de su masa exacta y en la distribución isotópica. El número de posibles fórmulas químicas que obtenemos está basado en los elementos que proponemos en el calculador de fórmulas y en la calidad de los datos espectrales. Las medidas en alta resolución con una exactitud sub 1 ppm aceleran el proceso de identificación, reduciendo el número de fórmulas propuestas a una cantidad manejable. Este proceso queda ilustrado en la **Figura 3**, donde un ión de masa 304,10058 es procesado con el calculador de fórmula elemental y los hits fueron calculados teniendo en cuenta los siguientes elementos: Carbono 1-50, Hidrógeno 1-50, Oxígeno 1-20, Nitrógeno 1-20, Fósforo 1-10 y Azufre 1-10.

Se emplearon diferentes tolerancias de masa desde 0,5 a 10 ppm para sugerir la posible fórmula. El número de hits aparece en la **Figura 3**. Como era de esperar, a mayor tolerancia, mayor es el número de posibles fórmulas propuestas. Por ejemplo, a 10 ppm, se proponen 60

posibles hits. Incluso a una tolerancia relativamente baja de 3 ppm, 20 fórmulas elementales se ajustan al criterio seleccionado.

Sin embargo, con la exactitud de masa sub-ppm esperada del sistema Q Exactive GC, el número queda limitado a dos fórmulas a 0,5 ppm. La primera fórmula sugerida para esta masa es  $C_{12}H_{21}O_3N_2PS$ , con un error de masa de 0,3 ppm, y cuando se busca esta fórmula en la base de datos on-line ChemSpider, el top hit coincide con el pesticida diazinon. Esta identificación puede confirmarse posteriormente con la investigación de los iones fragmento, comparando los datos con librerías espectrales de un modo sencillo, ya que los datos están adquiridos con una fuente de impacto electrónico (EI).

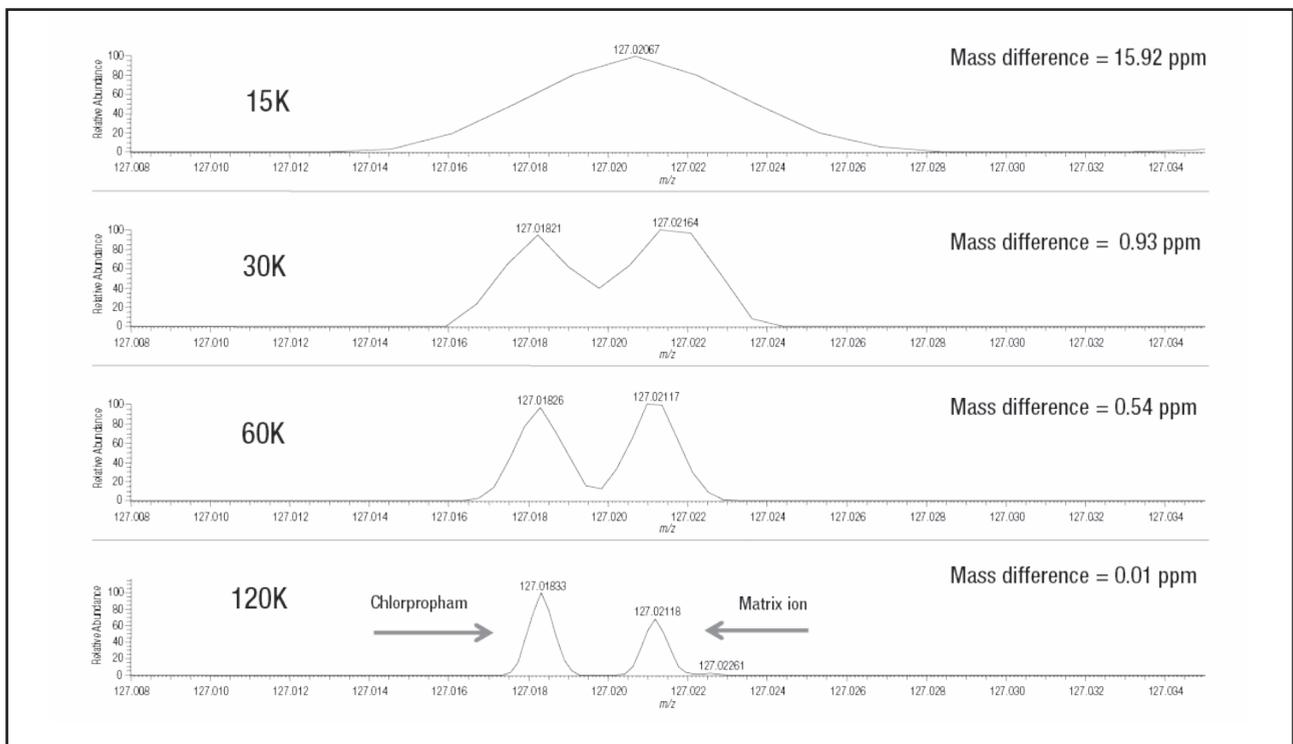
### Conclusiones

Con un ultra-alto poder de resolución en rutina y una consistente exactitud de masa sub-ppm, el espectrómetro de masas Q Exactive GC de Thermo Scientific es una herramienta de laboratorio única, de aplicación para descubrimiento de compuestos, screening, cuantificación, identificación de compuestos y para aplicaciones de elucidación estructural.

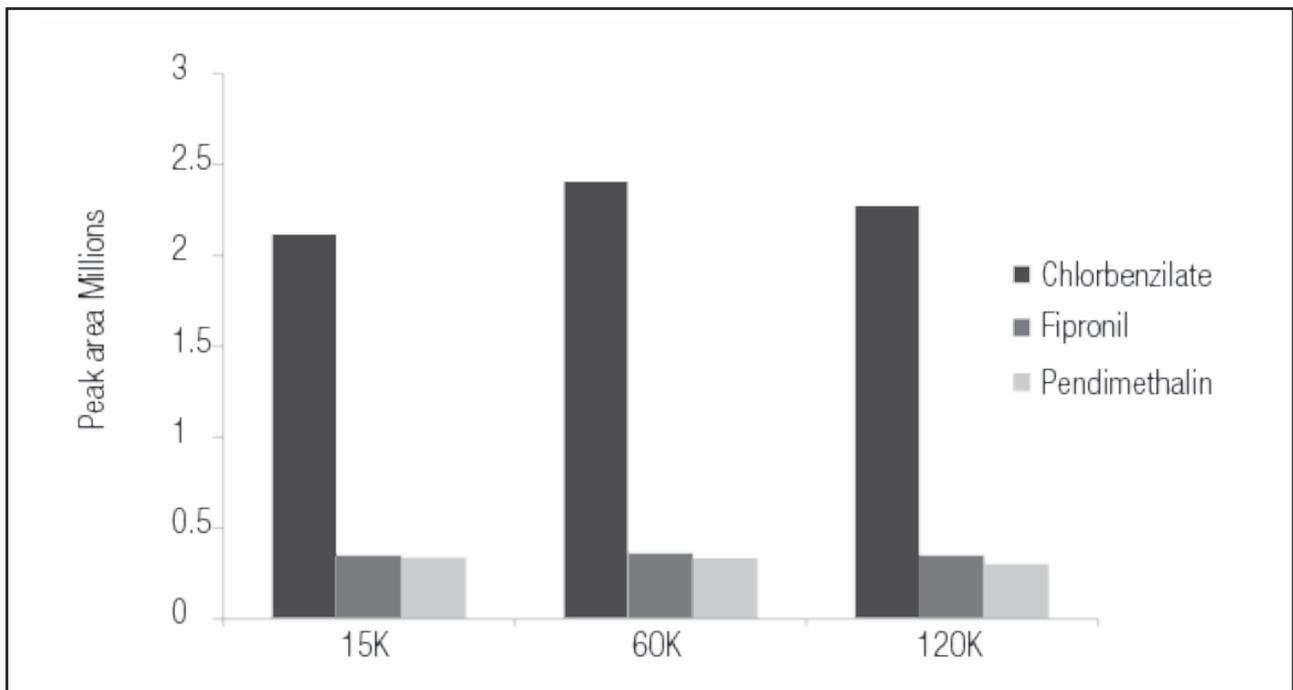
La resolución de masas de al menos 60.000 FWHM ( $m/z$  200) es necesaria de modo rutinario para resolver todos los compuestos de los iones interferentes de la matriz o de iones de masa similar. Esta resolución es esencial para la identificación con confianza de nuestros compuestos.

El sistema Q Exactive GC proporciona alta sensibilidad en matrices complejas y, muy importante, la sensibilidad se mantiene en todos los modos de resolución empleados (15 – 120K).

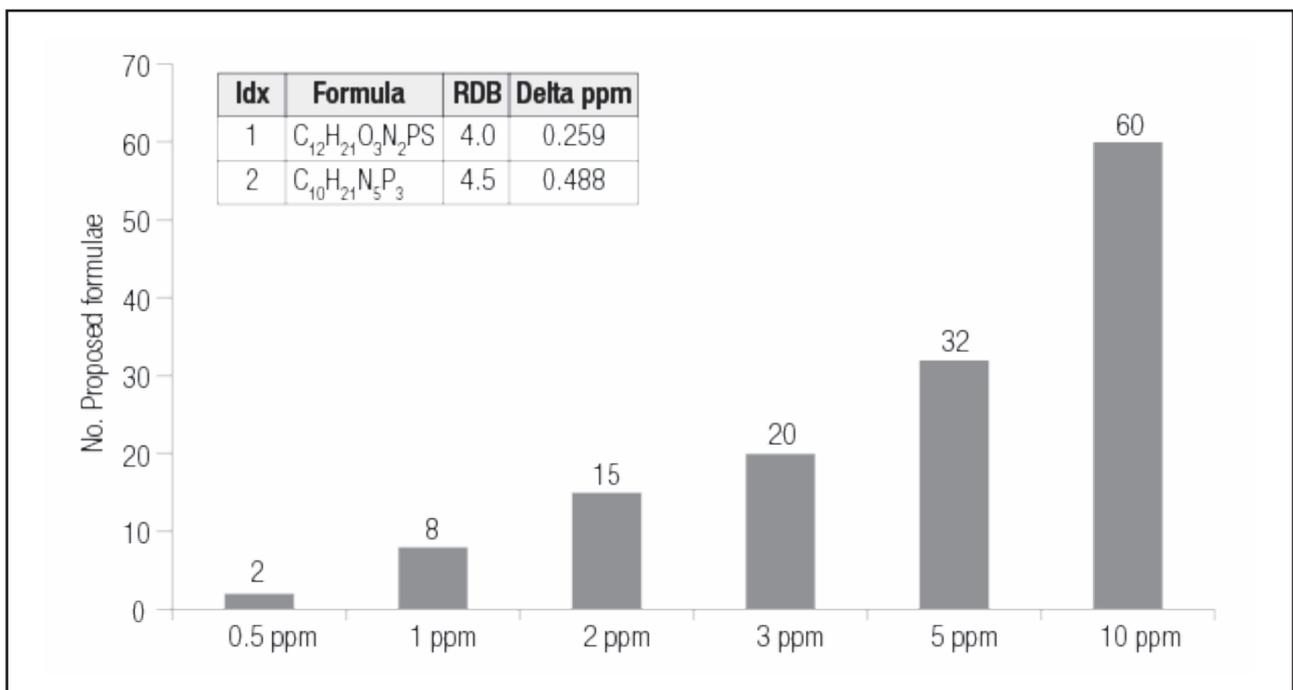
Una exactitud de masa excelente sub-ppm acelera la identificación de picos desconocidos, permitiendo el uso de tolerancias de masa muy estrechas.



**Figura 1.** Efecto del poder de resolución en la exactitud de masa de un analito en una matriz. Los perfiles de masa del chlorpropham a 10 ng/g en puerro son adquiridos a resolución 15K, 30K, 60K y 120K. La interferencia de matriz a 15K y a 30K produce una diferencia de masa más alta de la esperada. El chlorpropham se resuelve a 60K y 120K con una mejora en la exactitud de masa. Bajo el criterio normal de screening este pesticida no habría sido detectado (falso negativo).



**Figura 2.** Chlorbenzilate, fipronil y pendimethalin en un extracto QhEChERS de zanahoria a una concentración de 10 ng/g mostrando las respuestas de área de pico obtenidas a resolución 15, 60 y 120K FWHM ( $m/z$  200). La sensibilidad se mantiene a lo largo de los distintos modos de resolución, tanto para los compuestos que producen una alta como una baja respuesta. Un mínimo de 12 scans/pico se mantiene.



**Figura 3.** Número de composiciones elementales sugeridas para la  $m/z$  304.10058 con diferentes tolerancias de masa aplicadas. Arriba se muestra los dos hits obtenidos a 0,5 ppm.



A WerfenLife Company

## NUEVA CELDA DE FLUJO DE ALTA SENSIBILIDAD PARA DETECTOR DE UHPLC DE ARRAY DE DIODOS SHIMADZU SPD-M30A.

### Introducción

Shimadzu introdujo recientemente otra celda de flujo capilar de alta sensibilidad (HS) para su detector de Array de Diodos (SPD-M30A) con una paso óptico extra largo de 85 mm, en comparación con los 10 mm de una celda de flujo estándar. La sensibilidad se mejora en más de cinco veces. La celda HS ofrece una nueva opción para los usuarios de HPLC y UHPLC en el análisis a nivel de trazas de compuestos orgánicos como impurezas, residuos y contaminantes en productos farmacéuticos, alimentos y muestras ambientales.

### Condiciones Analíticas

El sistema utilizado en este estudio fue un UHPLC Nexera X2 con un detector SPD-M30A. Se usaron celdas estándar y de alta sensibilidad (HS) para comparar su sensibilidad y otros parámetros. Las muestras utilizadas en el estudio fueron antraceno y cafeína, que muestran una absorción UV muy fuerte a 250 nm y 272 nm, respectivamente. Las muestras se prepararon a partir de productos químicos de alta pureza utilizando fase móvil como disolvente. El análisis de UHPLC se llevó a cabo en modo isocrático, con el fin de evaluar y comparar la sensibilidad y la resolución de las diferentes celdas de flujo en exactamente las mismas condiciones sin efecto de gradiente.

**Table 1A:** System and experimental conditions

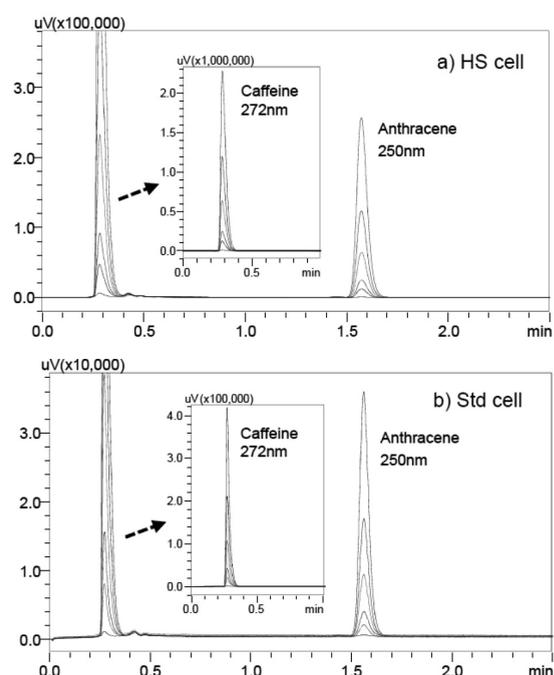
| System               | Nexera SR with SPD-M30A                  |
|----------------------|--|
| Mobile phase         | ACN/Water (70/30)                        |
| Column               | XR-ODSIII 50x2.0 mm, 1.6 $\mu$ m         |
| Flow Rate            | 0.4 mL/min                               |
| Detection wavelength | 250 nm (Anthracene)<br>272 nm (Caffeine) |
| Slit width           | 8 nm                                     |
| Cell temperature     | 40°C                                     |
| Injection volume     | 5 $\mu$ L                                |

**Table 1B:** SPD-M30A detector and flow cells

| Feature               | Standard Cell | HS Cell   |
|-----------------------|---------------|-----------|
| Optical path length   | 10 mm         | 85 mm     |
| Cell volume           | 1 $\mu$ L     | 9 $\mu$ L |
| Noise level (x105 AU) | 0.4           | 0.6       |

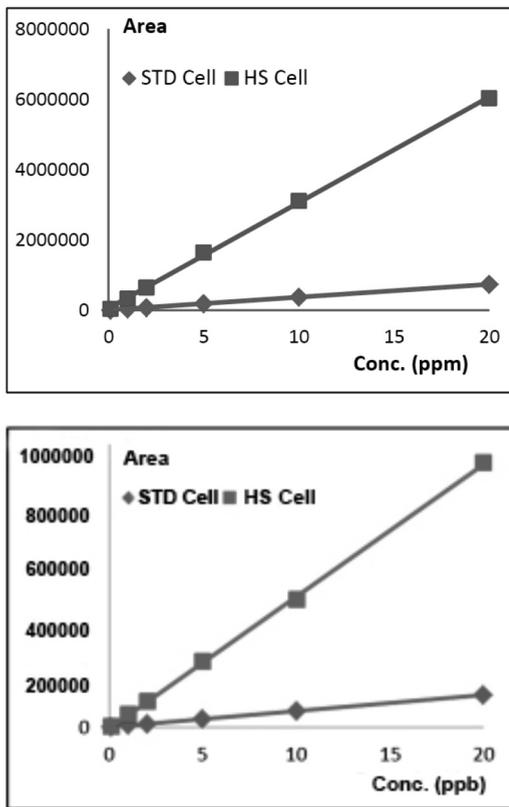
### Cromatogramas y curvas de calibración de cafeína y antraceno

La Figura 1 muestra los cromatogramas superpuestos de muestras estándar. Las concentraciones más bajas de cafeína y antraceno probadas fueron 100 ppb y 1 ppb, respectivamente. Las curvas de calibración del conjunto de muestras se muestran en la Figura 2.



**Figura 1.** Cromatogramas de muestras mixtas de antraceno y cafeína obtenidas con celda HS (a) y celda estándar (b). Concentración de cafeína: 0,1, 1, 2, 5, 10, 20 ppm ( $\mu$ g/mL); concentración de antraceno: 1, 10, 20, 50, 100 y 200 ppb (ng/mL).

La intensidad y el área de pico, tanto de la cafeína como del antraceno, usando la célula HS, son 6,8-9,3 veces mayores que las células estándar. Este aumento de la absorción UV se debió simplemente al aumento de la longitud de la trayectoria óptica de la célula HS. La pequeña discrepancia de la relación proporcional entre la intensidad y la longitud de la trayectoria de la luz se debió a la dispersión en un volumen mayor de la célula HS.



**Figura 2.** Curvas de calibración del área de pico de la cafeína (parte superior) y antraceno (parte inferior) con diferentes celdas de flujo del SPD-M30A. Las concentraciones son las mismas que en la Fig. 1.

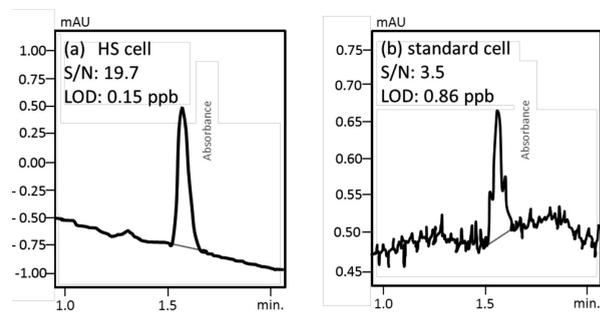
**Mejora de sensibilidad con la celda HS**

El aumento de la sensibilidad y el rendimiento general del SPD-M30A debido al uso de la celda HS se ilustran con los resultados de la muestra de concentración más baja. Como se muestra en la Tabla 2, el área del pico, la intensidad y la relación S/N obtenida con la celda HS fueron entre 4,8 y 9,3 veces mayores que la celda estándar. El pico de la celda HS era 20% más ancho que con la celda estándar para el antraceno. Esto se debió al efecto de dispersión del mayor volumen de la celda HS. La repetibilidad de la celda HS fue mejor que la celda estándar. Estos datos indican que la celda HS permite que el detector SPD-M30A gane aproximadamente cinco veces en sensibilidad (relación S/N).

**Tabla 2.** Comparaciones de celdas de flujo con una muestra mixta de 100 ppb de cafeína y 1 ppb de antraceno.

| Peak               | HS Cell |       | Standard Cell |       | Numerical ratio (HS/Std) |       |
|--------------------|---------|-------|---------------|-------|--------------------------|-------|
|                    | Caff    | Anthr | Caff          | Anthr | Caff                     | Anthr |
| Area               | 39931   | 4368  | 4291          | 583   | 9.3                      | 7.5   |
| Intensity (mAU)    | 13771   | 1214  | 2017          | 179   | 6.8                      | 6.8   |
| S/N                | 126.5   | 19.7  | 26.3          | 3.5   | 4.8                      | 5.6   |
| Width at 50% (sec) | 0.039   | 0.056 | 0.027         | 0.045 | 1.4                      | 1.2   |
| *RSD% (n=6)        | 0.16    | 0.10  | 0.37          | 0.38  | 0.43                     | 0.26  |

\*Repeatability test: 1000 ppb caffeine and 10 ppb anthracene.



**Figura 3.** Pico de antraceno de 1 ppb con celda HS (a) y celda estándar (b) con el detector SPD-M30A.

El antraceno es uno de los hidrocarburos poliaromáticos (HPAs), contaminantes tóxicos industriales, que se encuentran en el aire, el agua y los alimentos ahumados, etc. Los métodos EPA para el análisis cuantitativo de 16 HPAs se basaron en GC o HPLC (RF y UV) dependiendo del tipo de muestras. Los límites de detección requeridos son 1 ppb para antraceno y otros 11 HPAs usando HPLC con detección de fluorescencia y 10 ppb para 4 HPAs con detección UV. La alta sensibilidad (LOD: 0,15 ppb o 0,75 pg) de antraceno, como se muestra en la Figura 3, revela la posibilidad de utilizar la nueva generación de Detector de Array de Diodos SPD-M30A con celda HS capilar para el análisis de más HPAs.

**Resumen**

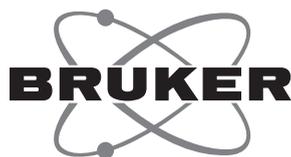
La nueva célula capilar HS aumenta la sensibilidad del detector SPD-M30A 4,8 y 5,7 veces para la cafeína y el antraceno, respectivamente. El LOD del antraceno, uno de los HPAs afectados, fue 0,15 ppb o 0,75 pg.

**Referencias**

- Application Data Sheet AD-0058, Shimadzu Asia Pacific
- US EPA Method 610: polinuclear aromatic hydrocarbons



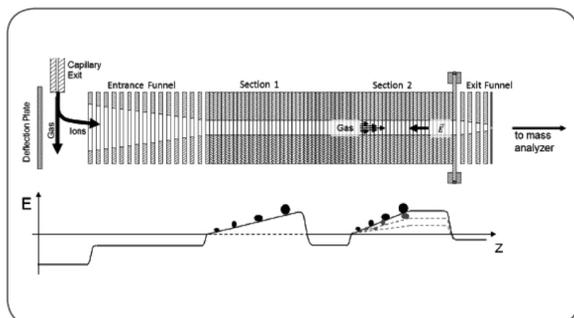
# NOVEDAD TÉCNICA



Bruker Chemical Analysis

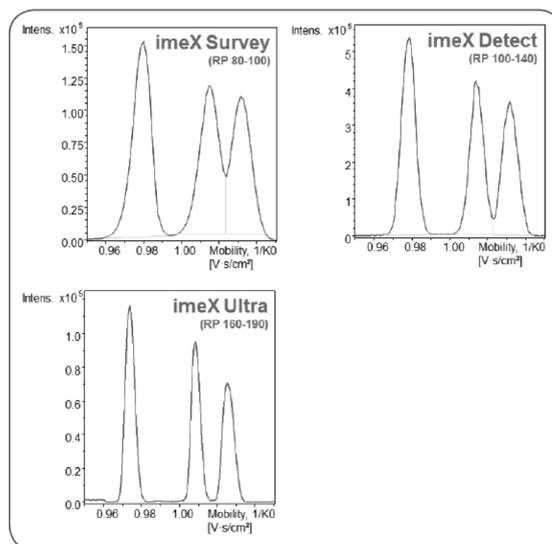
## NUEVAS APLICACIONES LC/MS QTOF CON MOVILIDAD IÓNICA INTEGRADA BRUKER TIMSTOF™.

Tras su exitoso lanzamiento, el nuevo sistema QTOF Bruker **timsTOF™** ha demostrado unas capacidades inigualables para la resolución de problemas de separación de isómeros y moléculas que no se pueden distinguir con otra tecnologías. Se han presentado nuevas aplicaciones de su tecnología innovadora. La característica única denominada **imeX™**, permite ajustar la resolución en modo movilidad iónica a las necesidades de la mezcla a separar, en función del modo de trabajo tanto combinando con HPLC como con infusión directa de la mezcla correspondiente.



Por ejemplo, en el caso de una mezcla de trisacáridos melezitosa, rafinosa y maltotriosa, que se ha utilizado en muchas ocasiones para la evaluación de dispositivos de separación y en especial de movilidad iónica, la tecnología **imeX**, exclusiva de Bruker, ajusta el poder de resolución a la separación necesaria. El modo “Survey” R.P. 80-100 permite visualizar rápidamente si hay varios componentes en la mezcla. El modo “Detect” ya realiza separaciones más complejas con R.P. hasta 140 (el límite de la mayoría de sistemas actuales) y el modo “Ultra” que ofrece el máximo poder de resolución (R.P.>200). Con estas capacidades, el cálculo de la sección transversal colisional (CCS) es extraordinariamente preciso y reproducible.

Los beneficios de esta separación, también se aplican a la hora de obtener espectros MS/MS mucho más limpios, libres de contribución de matriz o de otros isómeros



en la mezcla, lo que facilita la identificación de compuestos desconocidos, mediante su perfil isotópico libre de otras contribuciones.

Esto es únicamente un ejemplo de las nuevas posibilidades que abre esta nueva tecnología de trampa de movilidad iónica de alta resolución, que sin ninguna duda va a ampliar las fronteras conocidas hasta ahora de la movilidad iónica, y a su vez de la espectrometría e masas de alta resolución de la que es complemento indudable.

Si quiere explorar las fronteras de esta nueva tecnología no deje de ponerse en contacto con nosotros para estudiar sus necesidades.



[http://www.timstof.com/timsTOF overview](http://www.timstof.com/timsTOF%20overview)

## NUEVA PLATAFORMA DE ANÁLISIS METABOLÓMICO BRUKER METABOSCAPE 3.0

En la reciente conferencia ASMS 2017, Bruker ha presentado una nueva edición de su ya muy conocida plataforma de análisis metabolómico: **metaboScape 3.0**.

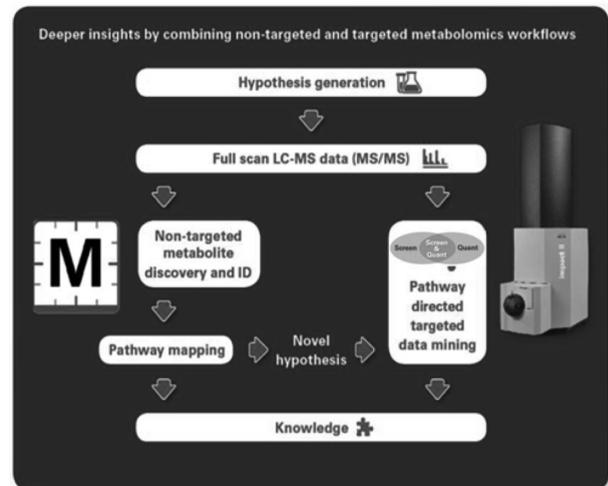
En esta nueva versión se ha progresado mucho en la integración de los distintos sistemas de alta resolución de Bruker, permitiendo unos niveles no conocidos hasta ahora de automatización en la extracción de información significativa de la combinación de cromatogramas y espectros de MS y MS/MS.



El nuevo algoritmo de extracción automática **T-REX™**, integra de forma automática la calibración de masas en función de los datos extraídos, selecciona las porciones relevantes de información de toda la adquisición en tiempos de retención, MS y MS/MS, y completa los datos de forma inteligente para evitar inconsistencias en el análisis estadístico. El algoritmo es capaz de reconocer y anotar los distintos iones procedentes de un mismo compuesto por formación de aductos, fragmentos o distintos estados de carga, relacionándolos y anotándolos automáticamente.

Asimismo, se integra la información procedente de distintas tecnologías como LC-QTOF MS y MS/MS, GC-APCI QTOFMS y la información procedente de MRMS (Magnetic Resonance Mass Spectrometry) obtenidos tanto con separación cromatográfica previa, como por infusión directa.

De igual manera, se integra totalmente en la nueva plataforma de cuantificación TASQ 1.4, permitiendo inmediatamente una evaluación cuantitativa de los potenciales candidatos a marcadores que se derivan del estudio estadístico. Esa confirmación, así como su relación con ciclos metabólicos descritos, que nos permiten encontrar otros marcadores relacionados en muestras complejas. El uso de Metaboscape 3.0 es muy intuitivo y la integración



de las distintas herramientas ofrece un nuevo puente entre los mundos de la espectrometría de masas y la biología, que sin duda se va a consolidar como una herramienta de primer nivel en el campo de la metabolómica.

#### **Bruker Española, S.A.**

Parque Empresarial Rivas Futura  
C/ Marie Curie, 5. Edificio Alfa  
28521 Rivas-Vaciamadrid  
Madrid - Spain  
Tel.: 91 4994634 / 4080  
Fax: 91 656 62 37  
[Info-bcad-spain@bruker.com](mailto:Info-bcad-spain@bruker.com)

Para obtener más información de Bruker, póngase en contacto con Bruker Daltonics en: [info-bcad-spain@bruker.com](mailto:info-bcad-spain@bruker.com), o en la web [www.bruker.com](http://www.bruker.com)

**Si desea hacerse socio de la SECyTA rellene y envíe el siguiente boletín de inscripción, acompañado de la correspondiente autorización bancaria a:**

Dr. Juan Vicente Sancho Llopis  
Instituto Universitario de Plaguicidas y Algas  
Departamento de Química Física y Analítica  
Universitat Jaume I. Edificio de Investigación 1. Campus del Riu Sec  
Avda. Vicente Sos Baynat, s/n  
12071 Castelló de La Plana (Spain)  
Tel. 91 964 387 363  
Fax: 91 964 387 368  
e-mail: secretaria.secyta@gmail.com

Cuota anual: 30 €

- Señale la casilla  correspondiente a la dirección en la que desea recibir la correspondencia.
- Puede efectuar el pago de la cuota del primer año mediante cheque bancario (adjuntándolo a esta solicitud) o mediante ingreso/transferencia a la Cuenta Corriente del Banco BBVA: ES13-0182-4162-2702-0153-0059 (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines). Debe figurar en el ingreso o transferencia: "ALTA SECYTA + nombre y primer apellido del Socio".
- ¿Autoriza a incluir su correo electrónico en la página Web de la SECyTA? SÍ NO  
(Tache lo que NO proceda)
- ¿Autoriza incluir sus datos de contacto en la sección "Nuevos Socios" del Boletín de la SECyTA? SÍ NO  
(Tache lo que NO proceda)

## SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

### HOJA DE INSCRIPCIÓN

Apellidos ..... Nombre .....

DNI .....

Domicilio particular:

Calle ..... Núm. ....

Municipio ..... Provincia.....

Código postal .....

Teléfono ..... Correo electrónico .....

Industria u organización .....

.....

Calle ..... Núm. ....

Municipio ..... Provincia.....

Código postal .....

Teléfono ..... FAX ..... Correo electrónico .....

### DATOS BANCARIOS

Banco/Caja de Ahorros .....

Sucursal .....

Dirección ..... Ciudad.....

D. ....

Con domicilio en .....

Y con IBAN ES \_ / \_ / \_ / \_ / \_ / \_

en esta Sucursal, ruego a usted se digne dar las órdenes oportunas para que con cargo a dicha cuenta sean abonados los recibos de mi cuota anual de socio que les serán presentados al cobro por la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines.

Atentamente le saluda,

En..... a..... de..... de 20

Firma:



# No tan Ágil como tu quieres ser?

Es tiempo de cambiar a Thermo  
Scientific cromatografía de gases

## Cambia a nuevo sistema GC.

Su inversión será mas rentable con  
las soluciones Thermo Scientific™ GC  
y GC-MS

Inversión de futuro con la modularidad dell  
instrumento combinada con potentes herra-  
mientas de software - garantía de personalización  
añadiendo selectividad, rendimiento y flexibilidad.

## Invierta ahora en una nueva Thermo Scientific solución.

Adquiera un GC independiente, un GC-MS o un  
sistema GC-MS/ MS y reciba:

- un software gratuito CDS de Thermo Scientific™ Chromeleon™  
Licencia y una garantía de segundo año
- 2 días adicionales de soporte gratuito de aplicaciones in situ  
cuando invierte en un nuevo sistema GC-MS/MS



Hable con un experto hoy sobre el GC,  
GC-MS y GC-MS/MS que necesite y  
conozco lo que Thermo Scientific GC  
puede hacer por usted.

Para mas información, visite:  
[thermofisher.com/time-to-switch](http://thermofisher.com/time-to-switch)

SUS MÉTODOS EXISTENTES.  
SUS FUTUROS OBJETIVOS.  
**PARTIENDO DE AQUÍ, LLEGUE  
DONDE USTED QUIERA.**



Acquity<sup>®</sup> Arc<sup>™</sup>

Presentamos una nueva y potente vía para construir el puente entre la HPLC y ACQUITY UPLC<sup>®</sup>. Imagine una compatibilidad de métodos “plug-and-play” real y un aumento de productividad que permitan a su laboratorio poder dar respuesta a las necesidades científicas, tecnológicas y económicas actuales y futuras. ¿Dónde le llevaría esta versatilidad LC sin compromisos? Elija su camino en [waters.com/arc](http://waters.com/arc)

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.<sup>®</sup>

INDUSTRIA FARMACÉUTICA ▪ CIENCIAS DE LA VIDA ▪ ALIMENTACIÓN ▪ MEDIO AMBIENTE ▪ ANÁLISIS QUÍMICO

©2015 Waters Corporation. Waters, The Science of What's Possible y ACQUITY UPLC son marcas registradas de Waters Corporation. Arc es una marca comercial de Waters Corporation.