

METODO PRELIMINAR PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE FLUÍDOS SUPERCRITICOS EN JUGO DE FRUTAS

Salvatierra Stamp V^a, Zea Velázquez F^{a,*}, González Nieves A^a, Ceballos Magaña S^b,
González-González Jorge ^a, Muñiz Valencia R^a.

^a Universidad de Colima, Facultad de Ciencias Químicas, Campus Coquimatlán,
Kilómetro 9 carretera Colima-Coquimatlán, C.P. 28400, Coquimatlán, Colima, México. *
fzea@ucol.mx.

^b Universidad de Colima, Facultad de Ciencias, Bernal Díaz del Castillo N. 340, Col. Villas
San Sebastián, C.P. 28045, Colima, Colima, México.

RESUMEN

Se desarrolló, optimizó y validó un método analítico rápido y sensible, aplicando la cromatografía de fluidos supercríticos acoplado a un detector de arreglo de diodos (SFC-DAD), para la determinación de diferentes tipos de contaminantes emergentes (CE): 2 productos farmacéuticos (carbamazepina y gliburida); 3 disruptores endocrinos (17 α -etinilestradiol, bisphenol A, y 17 β -estradiol); 1 bactericida (irgasán); y 1 pesticida (diurón) en agua, para aplicarlo en jugo de frutas como sandía y melón. La optimización de la separación cromatográfica se realizó con una columna Viridis BEH 2-EP, lográndose separar los compuestos en 9.34 minutos con resolución mínima de pico de 2.32. El método involucró una pre-concentración y limpieza mediante la extracción en fase sólida (SPE), logrando el 96% de recuperación con el cartucho C18/OH, con un factor de concentración de 55.5 veces la inicial. La validación del método se realizó evaluando la selectividad, especificidad y linealidad, alcanzando un límite de detección (LD) desde 0.015 ppm para el bisfenol A hasta 0.097 ppm para gliburida; y límite de cuantificación (LC) desde 0.028 ppm para bisfenol A y hasta 0.213 ppm para gliburida.

ABSTRACT

A fast and sensitive supercritical fluid chromatography coupled with diode array detector (SFC-DAD) analytical method was developed, optimized and validated for the determination of different types of emerging contaminants: 2 pharmaceuticals (carbamazepine and glyburide); 3 endocrine disruptors (17 α -etinilestradiol, bisphenol A, and 17 β -estradiol); 1 bactericide (irgasan); and 1 pesticide (diuron) in water, to apply in fruit juices such as watermelon and melon. The chromatography separation was optimized in order to achieve a maximum retention time of 9.34 minutes, and a minimum resolution of 2.32, on a Viridis BEH 2-EP column. The method involved preconcentration and clean-up by solid-phase extraction (SPE) achieving with the C18/OH SPE-cartridge higher recoveries of 96%. The concentration factor in the SPE was of 55.5 times the initial concentration. Validation assessment lists it as a selective, linear and specific method, achieving limits of detection (LOD) from 0.015 ppm to bisphenol A, to 0.097 ppm to glyburide, and limits of quantification (LOQ) from 0.028 ppm to bisphenol A, to 0.213 ppm to glyburide.

Palabras clave: Frutos con alto contenido en agua, cromatografía de fluidos supercríticos, contaminantes emergentes.

Área: Frutas y hortalizas

INTRODUCCIÓN

El análisis de los alimentos es de gran importancia en la química analítica (Farré and Barceló, 2013), ya que existe un gran número de compuestos que pueden ser encontrados, entre ellos algunos contaminantes, a muy bajas concentraciones

(Polder et al., 2010). Su presencia puede deberse a las diversas etapas en el proceso de producción, prácticas agrícolas e incluso por la contaminación ambiental ya existente (Pal et al., 2010; Crossley, 2014). El impacto negativo provocado en la calidad de los alimentos es innegable, considerando además que implica un riesgo en la salud del consumidor (Shao et al., 2014).

El análisis a concentraciones de ppm y ppb de éstos CE es muy importante, porque son compuestos que recientemente se pueden detectar y que son de uso frecuente ya sea por consumo humano o por uso agrícola (Jimenez, 2011). En la actualidad se hace uso de diversas técnicas cromatográficas para el análisis de alimentos como la cromatografía de gases y líquidos para compuestos volátiles y no volátiles, respectivamente; aplicándolo para determinar compuestos inherentes a los alimentos, así como para saber si están contaminados con plaguicidas. Sin embargo, hay muy poca información sobre la presencia de CE en alimentos, sobre todo empleando la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC).

Esta técnica ha comenzado a despertar el interés por parte de los investigadores debido al uso de pocas cantidades de solventes orgánicos, ya que el dióxido de carbono (CO₂) empleado como fase móvil, es el fluido supercrítico más ampliamente usado, debido a que, como tal, tiene baja viscosidad y elevada difusión molecular, permitiendo una mejor eficiencia en los tiempos de análisis, y a la vez reduciendo el consumo de disolventes orgánicos (Taylor, 2009). Adicional a esto, el CO₂ permite la posibilidad de analizar compuestos termolábiles y polares, que no podrían ser analizados empleando la cromatografía de gases sin una previa derivatización (Bernal et al., 2013).

Al emplear una mezcla de diversos contaminantes permite potencializar las prestaciones del método, pudiéndose incrementar el número de contaminantes, aplicándolo en frutos con alto contenido de agua. Adicional a esto, al emplear SFC con DAD se logra un método de bajo costo, buena sensibilidad y selectividad, y además amigable con el medioambiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Estándares analíticos de carbamazepina, gliburida, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, bisphenol A (BPA), irgasán y diurón. Metanol (MeOH) y Acetonitrilo (AcN) ambos grado HPLC. Todos ellos con pureza >99%, y adquiridos de Sigma-Aldrich.

Equipos y materiales

Equipo de SFC Acquity UPC² marca Waters, con módulos de convergencia, de muestra, de columna; acoplado a un DAD modelo C2P. Equipo de SPE, Manifold de 24 puertos (sistema para SPE), marca Phenomenex. Bomba de vacío modelo EV-40, marca EVAR. Balanza analítica marca Citizen, modelo CX-220. Micropipetas de 2-20 μ L, 20-200 μ L, y de 100-1000 μ L marca Accumex, y puntillas apropiadas a los tipos de Micropipetas. Papel de filtro Whatman 1 y 5; filtros de membrana Millipore de 0.45 μ m; filtros de jeringa de 0.45 μ m, marca Phenex. Material de vidrio variado clase A, marca Pyrex.

Procedimiento experimental

La metodología consistió en 3 etapas: 1. Elección de la columna cromatográfica y optimización de la separación; 2. Elección del cartucho para la preparación de muestra y optimización; y 3. Validación del método.

Etapa 1. Para la selección de la columna y la optimización de la separación cromatográfica se preparó una mezcla con los 7 compuestos a 100 ppm. Se evaluaron 6 columnas diferentes: UPC² BEH, UPC²-BEH-2-EP, HPLC-ES-CN, UPLC-BEH-Shiel RP18, UPLC BEH Phenyl y la C18-Core Shell. Se inyectó la mezcla empleándose como fase móvil- en gradiente- la mezcla AcN/CO₂. Una vez elegida la columna se inyectaron los estándares por separado a una concentración de 100 ppm, y así identificar cada uno de los picos del cromatograma. Para la optimización de la separación cromatográfica se evaluó el efecto de la presión de CO₂ (1500 y 2000 psi), el flujo de la fase móvil (1.2 y 1.4 mL/min), y la temperatura (35 y 40°C). En todos los casos se evaluó la resolución del pico cromatográfico.

Etapa 2. Para la selección del cartucho de SPE se evaluaron 6 tipos: HF-C18, DISC-C18, C18/OH, Super HLB, Oasis HLB y Envi-Carb. La SPE constó de 4 procedimientos: acondicionamiento, aplicación de la muestra acuosa, lavado (opcional) y elución de los analitos. Para definir el cartucho a utilizar, se siguió el siguiente procedimiento: Primero se lo conectó al sistema de vacío de SPE. El acondicionamiento se realizó con 3 mL de metanol, con el fin de lavar interferencias o residuos de síntesis, así como para activar el sorbente empacado en el cartucho. Se lavó dos veces con 3 mL de agua destilada, y manteniendo el flujo a través del sorbente en 4mL/min, se aplicó una muestra acuosa de 150, adicionada de la mezcla a una concentración de 100 ppm. Al finalizar el paso de la muestra se eluyeron los analitos retenidos en el sorbente con 2 volúmenes de 3 mL de metanol. Posteriormente se inyectaron estas muestras en el equipo de SFC con los parámetros previamente optimizados de la columna BEH-2-EP. Después de la elección del cartucho se evaluaron 4 variables para la optimización de la preparación de muestra: flujo de la muestra (4, 6 y 8 mL/min), el porcentaje de alcohol agregado para eliminación de interferencias (0, 5 y 15%), volumen de elución (1, 2 y 3 mL de metanol), y el pH de la muestra (4, 5.3 y 7).

Etapa 3. Se evaluó la especificidad, selectividad, linealidad, y los límites de detección (LD) y cuantificación (LC). Se siguieron diversas guías de validación: de la ONU, EPA y la ICH de la FDA. La evaluación de la especificidad se realizó inyectando la mezcla de estándares y la de muestra añadida, ambas a 0.7 ppm. La selectividad se evaluó calculando la resolución entre dos analitos adyacentes. Para la linealidad se realizó una curva de calibrado para estándares y muestra añadida a 8 concentraciones (0.7, 1, 2, 5, 10, 20, 30 y 100 ppm), sometidos a extracción con el cartucho elegido e inyectados en el equipo de SFC-DAD. Mientras que para los límites de detección y cuantificación se inyectaron 10 blancos de muestra y 10 veces la concentración más baja leída. Se aplicó la relación: $LD = (\hat{Y}_B + 3.29 SD_B)C_{EST} / \hat{Y}_{EST}$, en donde \hat{Y}_B y SD_B corresponde a la señal promedio y la desviación estándar de cada analito en el blanco; mientras que C_{EST} y \hat{Y}_{EST} es la concentración más baja leída y la señal promedio a esta concentración.

Con respecto a la aplicación en muestras de melón y sandía que serán sometidas al procedimiento, se deberá separar la cáscara y la pulpa. A esta última se le prensará hasta obtener 10 mL de jugo, que luego será filtrado a través de una

membrana 0.45 μm . Finalmente se diluirá hasta 150 mL y se le fortificará con los 7 compuestos a analizar. Posteriormente se le someterá al procedimiento descrito anteriormente como Etapas 2 y 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar la elección de la columna se obtuvo que la BEH-2-EP fue la única que logró separar adecuadamente los 7 compuestos. Esto se debe a que todos ellos son moderadamente polares y afines a la columna. Al inyectar los estándares por separado se observó que el primer pico correspondió al irgasán, seguido del diurón, 17α -etinilestradiol, BPA, 17β -estradiol, carbamazepina y finalmente la gliburida. Al evaluar el efecto de la presión de CO_2 , el flujo de la fase móvil y la temperatura del horno de la columna, se obtuvo que las condiciones óptimas para realizar la separación fue de 1.4 mL/min de flujo, con una presión de 2000 psi y 40°C de temperatura en el horno de la columna. Se empleó como fase móvil una mezcla de CO_2/AcN en una gradiente segmentada de 0, 5 y 12 minutos; 5, 30 y 44% de AcN, lográndose un tiempo máximo de 9.34 minutos, con una resolución mínima de pico de 2.32.

Para elegir el cartucho adecuado se graficó la señal obtenida en la inyección (Área bajo cada pico) contra el sorbente. A mayor sea la señal mayor es la recuperación del analito. El cartucho C18/OH es el que mejor recupera a los 7 compuestos. Se debe tomar en cuenta que los cartuchos Super HLB, Oasis HLB y Envi-Carb necesitaron de la 2da elución (en total 6 mL de MeOH) para poder eluir totalmente los analitos absorbidos. El hecho de que necesitaran una segunda elución implicó una disminución en la concentración y por lo tanto, una disminución en la señal. El cartucho con sorbente Disc-C18 no retuvo al estradiol. Al optimizar la preparación de muestra, habiendo elegido el cartucho con sorbente C18/OH, la señal obtenida determina que las condiciones óptimas de la preparación de muestra son: 8 mL/min de flujo, con un pH de 5.3, eluyendo con 3 mL y sin usar metanol, ya que las interferencias no ocasionan disminución de la señal.

En cuanto a la validación del método, la evaluación de la especificidad determinó que es un método específico para los 7 CEs evaluados, ya que la muestra añadida no contiene compuestos que interfieran con ninguno de los analitos, tal como se muestra en la Figura 1.

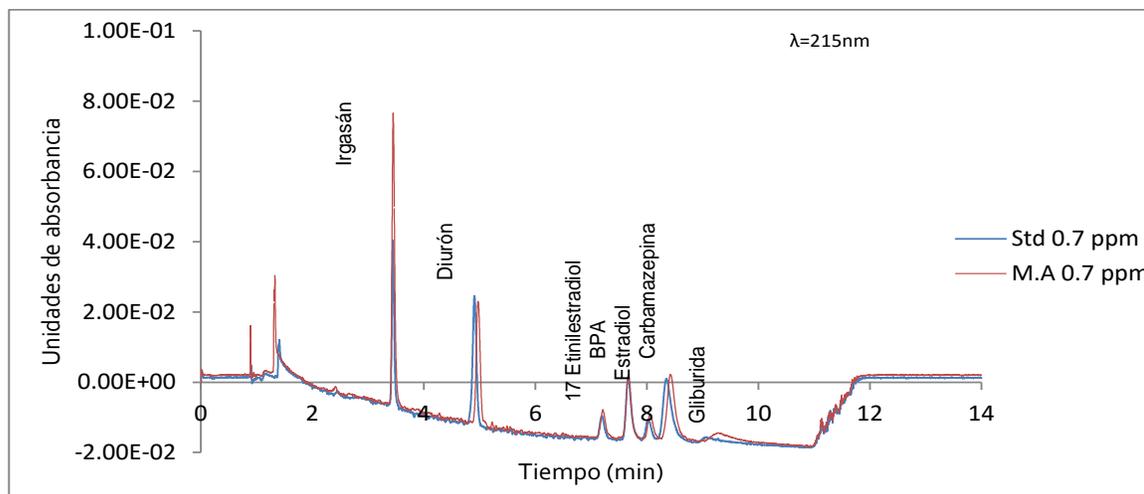


Figura 1. Evaluación de especificidad entre la mezcla de estándar (línea azul) y la muestra añadida (línea roja) ambas a 0.7 ppm.

La evaluación de la selectividad se realizó calculando la resolución de los picos. De aquí se desprende que el rango de resolución se encuentra entre 2.32 y 15.11, lo cual determina que el método es selectivo con respecto a la resolución de los picos cromatográficos. Con respecto a la linealidad, al evaluar las curvas de calibración para los estándares y muestra añadida dan un coeficiente de correlación superior a 0.99, con lo cual se está cumpliendo con el criterio de aceptación establecido para este parámetro, el cual especifica que deberá ser mayor o igual 0.99. Al analizar los LD y LC, empleando la inyección de 10 blancos y 10 muestras añadidas a 0.7 ppm, que es la señal más baja leída, se observa que, como se muestra en la Tabla 1, se puede detectar el bisfenol A desde 0.015 ppm, siendo la gliburida el compuesto con mayor LD, mientras que el LC para el bisfenol A se encuentra en 0.028 y para la gliburida 0.213 ppm. La relación empleada para hallar ambos límites se fundamentan en una hipótesis probabilística de que existan falsos positivos y falsos negativos, con una probabilidad del 5% para ambos casos. Este es el valor que se emplea como 3.29, que al multiplicar por la desviación estándar del blanco determina que el ruido de fondo no interfiere en la medida del límite de detección. Por lo cual se puede afirmar que los límites de cuantificación y detección para esta técnica desarrollada se encuentra al nivel de ppb (partes por billón = ng/mL), indicando además que es una técnica muy sensible.

Tabla 1. Limite de detección y cuantificación para los 7CEs

Analito	LD (ppb)	LC (ppb)
Irgasán	23	37
Diurón	20	39
17 α Etilestradiol	69	143
BPA	15	28
17 β Estradiol	38	65
Carbamazepina	14	30
Gliburida	97	213

CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado y validado es sensible, específico para los 7 compuestos, lineal; y con LD y LC en un rango de ppb. La aplicabilidad en jugos de frutas como sandía y melón se deberá desarrollar empleando una columna Viridis BEH 2-EP para la separación cromatográfica y cartuchos de SPE con sorbente C18/OH.

BIBLIOGRAFÍA

- Bernal JL, Martín MT, Toribio L. 2013. Supercritical fluid chromatography in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 1313:24-36.
- Crossley SJ. 2014. Public Health Measures: Monitoring of contaminants. In: *Encyclopedia of Food Safety*, Motarjemi(ed). Elsevier Inc., pp. 55-61.
- EPA (2005). Validation and Peer Review of U.S. Environmental Protection Agency Chemical Methods of Analysis.
- Farré M, Barceló D. 2013. Analysis of emerging contaminants in food. *Trends in Analytical Chemistry*. 43:240-253.
- FDA (1996). ICH-Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration.
- Pal A, Yew-Hoong Gin K, Yu-Chen Lin A, Reinhard. 2010. Impacts of emerging contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408:6062-6069.
- Polder A, Savinova TN, Tkachev A, Loken KB, Odland JO, Skaare JU. 2010. Levels and patterns of Persistent Organic Pollutants (POPS) in selected food items from Northwest Russia (1998-2002) and implications for dietary exposure. *Science of The Total Environment*. 15:5352-5361.
- Shao Y, Wang J, Chen X, Wu Y. 2014. The consolidation of food contaminants standards in China. *Food Control*. 43:213-216.