

# DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TOXINAS ACUÁTICAS DE ORIGEN NATURAL

Uso de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Save) para tratamiento de muestra en el análisis de toxinas amnésicas

Jorge Giráldez Fernández

e- mail:jorgiraldez@alumnos.uvigo.es

## Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutores:

- Ana Gago Martínez

Departamento de Química

Analítica y Alimentaria.

Facultad de Química

Universidad de Vigo.

En el presente trabajo se describe la aplicación de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) para la extracción y purificación del ácido domoico (AD) en matrices biológicas complejas previo al análisis mediante HPLC-UV. Los resultados obtenidos muestran recuperaciones del 80 al 100%. La precisión del protocolo analítico fue expresada en términos de RSD (Robust standard deviation), estando entre 0 y 10%. Se compararon los resultados obtenidos tras la utilización de QuEChERS y el método oficial de extracción de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists).

## INTRODUCCIÓN

Las toxinas amnésicas o ASP (*amnesic shellfish poisoning*), constituyen un importante grupo dentro de las toxinas marinas. El principal responsable de la toxicidad amnésica es el ácido domoico (AD) (Figura 1), un aminoácido neurotóxico. Es producido por diatomeas pertenecientes, en su mayoría, al género *Pseudonitzschia*, también se ha identificado en especies de rodófitas (*Chondria armata*, *Chondria baileyana* y *Alsidium corallinum*).

La primera crisis a la que se enfrentó la industria productora de marisco relacionada con el ácido domoico, se produjo en 1987, en la isla del Príncipe Eduardo (Canadá). La toxina se encontró en cultivos de mejillones (*Mytilus edulis*). Desde esto, el evento tóxico en la Isla del Príncipe Eduardo se ha repetido constantemente cada año, pero sin riesgo para la salud pública. Como consecuencia de ello, se implementó un programa de monitoreo más amplio (Wright 1995).

Desde entonces se han producidos numerosos episodios tóxicos en diferentes partes del mundo. En las costas gallegas el primer episodio se produjo en 1994.

Se demostró que el ácido domoico, además de ser el causante de la toxicidad del incidente de Canadá de 1987, estaba en concentraciones de hasta 1000mg/kg en los tejidos de mejillones. Esta concentración era fácilmente detectada por el bioensayo en ratones para la intoxicación paralizante (PSP) (AOAC 2000a), con unos síntomas claramente distintos a los producidos por toxinas paralizantes. Una vez se estableció el límite normativo en 20mg/kg, se hizo evidente que el bioensayo con ratones, con un límite de detección del ácido domoico de 40mg/kg, no se podía usar como método de seguimiento rutinario.

El primer método analítico por vía química que se utilizó fue la cromatografía líquida de alta eficacia con detección por ultravioleta (HPLC-UV) y sigue siendo el método más común y oficial para el análisis de esta toxina. Este método también fue validado por el Programa de Métodos Oficiales de la AOAC

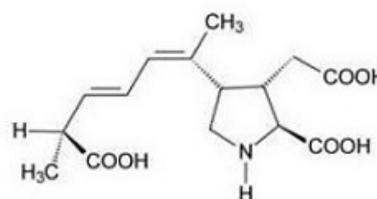


Figura 1: Estructura del ácido domoico (Ohfuné y Tomita 1982).

International (AOAC 2000b). No obstante, también se ha estudiado la utilización de otras técnicas analíticas, como la cromatografía en capa fina, la electroforesis capilar y la cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas.

La preparación de la muestra es un punto clave en el análisis químico, de ella dependerá la eficacia y fiabilidad del mismo. La complejidad de esta etapa está influida por el tipo de matriz. Cuando esta es orgánica, la presencia de componentes endógenos con propiedades químicas análogas al analito a estudiar puede afectar a la interpretación de los resultados, pues podrían actuar como sustancias interferentes. Por esta razón, en el protocolo de preparación de muestra, se introducen etapas de extracción y purificación, para permitir el aislamiento de dichas sustancias interferentes.

El protocolo de preparación de muestra habitual para el ácido domoico y otros analitos incluye una etapa de purificación mediante extracción en fase sólida.

La extracción en fase sólida tiene entre sus objetivos prioritarios los siguientes:

- Purificación del extracto de la muestra. En la purificación, se puede retener el analito de interés y lavar las interferencias, o bien, retener las interferencias y eluir el analito. De este modo, se evita que una o varias sustancias interferentes puedan enmascarar al analito de interés, al coeluir con este durante el análisis cromatográfico.
- Eliminar la matriz de la muestra. La extracción en fase sólida permite separar la matriz de la muestra.
- La concentración del analito. Para ello hacemos pasar un largo volumen de nuestra muestra a través de la fase sólida que retendrá todos los compuestos de interés. Y a continuación estos compuestos de interés serán eluidos en un volumen más pequeño de disolvente, pudiendo ser de fácil concentración (como un disolvente orgánico volátil). Las etapas de la fase sólida se describen más adelante.

En el presente trabajo se ha usado como método de preparación de muestra control la SPE-SAX (*Solid Phase Extraction-Strong Anion Exchange*) (Quilliam 1995). En este procedimiento se utiliza una columna de intercambio aniónico como fase estacionaria en la extracción en fase sólida. Esta fase estacionaria SAX es una resina intercambiadora fuerte de aniones, el grupo funcional es el trimetilpropilamonio. Es el intercambiador de aniones más fuerte del que se dispone. Debido a que su grupo funcional es una sal de amonio cuaternaria, el adsorbente está siempre cargado. Es un buen adsorbente para la retención de aniones débilmente básicos como es el caso de los ácidos carboxílicos.

Sin embargo en los últimos años se están investigando alternativas a la SPE, alternativas que podrían ser útiles en la preparación de muestras en matrices complejas. La búsqueda de alternativas modernas tiene como objetivo principal el reducir la tediosidad y el tiempo de preparación de muestra, así como los errores inherentes a la misma como resultado de una menos manipulación por parte del operador, por el hecho de simplificar los protocolos de preparación de muestra.

La alternativa mediante la utilización de QuEChERS surgió con el objetivo anteriormente citado y fue inicialmente desarrollado para el análisis de pesticidas en matrices vegetales. Este método de preparación de muestra se compone generalmente de dos partes, una extracción de la matriz y una extracción en fase sólida dispersiva (dSPE). La extracción de la matriz se lleva a cabo usando acetonitrilo como extractante, un desecante ( $MgSO_4$ ) y una sal (NaCl), con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. Una vez se obtiene la fase orgánica (el acetonitrilo), se realiza la dSPE, esta vez añadiendo, además de NaCl, un sorvente, pudiendo ser, C18, PSA (amina primaria secundaria), GCB (carbón grafitado), o una combinación de varios (Shi *et al.* 2012; Zhao y Stevens 2012).

En base a lo descrito anteriormente sobre la necesidad de la implementación de los protocolos de preparación de muestra, el objetivo de este trabajo se centró en el desarrollo de un protocolo de preparación de muestra alternativo para la determinación de toxinas amnésicas en alimentos de origen marino.

El desarrollo de este método alternativo permitirá reducir la tediosidad y tiempo de preparación de muestra, así como la reducción de errores asociados a la misma tal y como se describió anteriormente.

Para llevar a cabo nuestro objetivo, se aplicó la metodología mediante QuEChERS en base a las características antes definidas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Estándares

Se utilizaron disoluciones estándar preparadas a partir de una disolución de ácido domoico de referencia NRC-CRM-DA-f, con una concentración de 101,8µg/mL. Las disoluciones se prepararon utilizando como disolvente MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) v/v.

### Muestras

Muestras naturalmente contaminadas cedidas por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas:

- EURLMB/14/A/01, HOMOGENEIZADO DE MEJILLÓN, valor asignado en ejercicio intercomparativo 20.4 mg AD+AE/kg (límite legal). RSD (n=38): 2.5 mg/kg.
- EURLMB/14/A/02, HOMOGENEIZADO DE VIEIRA, valor asignado en ejercicio intercomparativo 10.8 mg AD+AE/kg (1/2 límite legal). RSD (n=37): 1.3 mg/kg.

Material de referencia NRC-CRM-ASP-Mus-d, lot. 2011 12, unit. 455 49±3 mg AD+AE/kg.

- El CRM-ASP-Mus-d es un homogeneizado esterilizado térmicamente de tejido de mejillón (*Mytilus edulis*) contaminado con ácido domoico (DA) y algunos de sus isómeros, que posee un valor certificado del analito objeto de estudio.

Muestras no contaminadas (blanco) procedentes de distintos mercados de Vigo. Se comprueba que no hay ácido domoico en las muestras.

- Blanco mejillón (*Mytilus galloprovincialis* Lamark, 1819).
- Blanco vieira (*Pecten maximus* (Linneo, 1758)).

### Columna para SPE

Columnas Supelco: Supelclean LC-SAX; 3 mL tubes; reorder no. 57017; lot no. 1595601.

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Para la detección y cuantificación de la toxina, se usará como técnica la HPLC-UV. Se usa una longitud de onda de 242 nm, donde el ácido domoico presenta su máximo de absorción. Se usan fases móviles con pH ácido para evitar la ionización de los grupos carboxilo y fases estacionarias octadecilsilíce (C18) (Quilliam *et al* 1989), de modo que se consigue una separación eficaz del ácido domoico y sus isómeros (Tabla 1).

**Tabla 1.** Condiciones Cromatográficas del HPLC-UV aplicadas en el análisis del ácido domoico.

Equipo HPLC	PU-980 Jasco
Columna	Fase inversa C18 Phenomenex Luna 100 A, 5 µm, 250 x 4,6 mm
Fase móvil	Acetonitrilo/agua 12%(v/v) con 0,2%(v/v) de ácido fórmico
Flujo	1 mL/min
Detección UV	Jasco UV-1575 (λ=242nm)

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

### Estudios de calibrado

La calibración se ha llevado a cabo mediante el análisis de estándares de concentraciones diferentes, siendo la menos concentrada de 0.1 µg/mL y la más concentrada de 5 µg/mL. Por lo que las muestras que se analicen, deberán estar dentro de este rango de concentraciones, donde se sabe que la relación señal-concentración es lineal.

## Procedimiento de extracción para el AD

### Extracción en medio ácido

Este método de extracción ha sido propuesto por Lawrence (Lawrence *et al.* 1989; Lawrence *et al.* 1991) y aceptado como oficial por la AOAC, fue una adaptación del procedimiento de extracción estandarizado para el bioensayo con ratón de toxinas PSP, que surgió a raíz del primer episodio de toxicidad amnésica que tuvo lugar en Canadá.

En este procedimiento de extracción se propone el uso del HCl 0,1M como disolvente.

### Extracción en medio metanol acuoso

Este procedimiento de extracción se basa en una extracción en frío, utilizando como disolvente MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). Dicho procedimiento fue propuesto por Quilliam *et al.* (1991).

Este es el procedimiento de extracción usado en el presente trabajo. Pues se observó que, en términos de porcentaje de recuperación, dicho procedimiento es más eficaz y presenta una menor degradación con respecto a la extracción en medio ácido.

Se parte de un gramo de tejido homogeneizado al que se le añaden 4mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). Esta mezcla es homogeneizada y centrifugada. El sobrenadante obtenido se decanta y se filtra. Si el extracto va a pasar por una etapa de purificación, este podrá filtrarse después.

### Extracción en fase sólida

Etapas de la extracción en fase sólida:

En este caso se usará el procedimiento de purificación descrito por Quilliam (1995).

Una vez se obtiene un extracto como se ha descrito anteriormente, se llevará a cabo la etapa de clean-up (purificación) usando una columna de intercambio aniónico (SAX). Etapas del clean-up:

Acondicionamiento: Se hacen pasar a través de la columna 6mL de MeOH seguidos de 3mL de H<sub>2</sub>O y finalmente 3 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). Esto se hace para preparar la columna para su uso.

Carga: se hacen pasar 5mL del extracto a estudiar.

Lavado: se lava la columna con 3 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1). Con esto se consigue eluir los compuestos que no han sido retenidos por la columna de purificación, el ácido domoico estará retenido en la columna.

Elución: se recoge el eluato con 5 mL de HCOOH 0,1 M. Puesto que el ácido domoico queda retenido por el sorbente SAX, será necesario el uso de un compuesto afín al analito para poder eluirlo y que sea posible llevar a cabo su análisis.

Todo lo que se inyecte en el HPLC (eluciones, cargas, lavados, extractos, etc.) ha de ser debidamente filtrado (0,45 µm).

### QuEChERS

Se han usado dos métodos de extracción QuEChERS, basados en dos protocolos ya descritos: un protocolo para azaspirácidos descrito por Han *et al.* (2013) y otro para toxinas lipofílicas descrito por Rúbies *et al.* (2015).

Protocolo descrito por Han *et al.* (2013)

Para hacer la extracción, se parte de 2 g de muestra homogeneizada a los que se les añade 5mL AcN acuoso al 85%, 1g de MgSO<sub>4</sub> anhidro y 0.4 g NaCl en un tubo falcon. Esta mezcla se homogeniza y se centrifuga. Se recoge el sobrenadante obtenido en un matraz de 5 mL y se reserva.

Añadimos 2.5 mL de AcN acuoso al 85% al residuo de la centrifugación. Se homogeniza y se centrifuga. Y se enrasa el matraz que contiene el primer sobrenadante con el obtenido.

El extracto se filtra con filtros de 0.45 µm de diámetro de poro. A partir de 3 mL de extracto filtrado se realizará la purificación, añadiendo 0.15 g de lichoprep RP-18 y 0.3 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro. Esta mezcla se agitará y centrifugará. Por último se toma una alícuota de 1.5 mL de sobrenadante para evaporar en rotavapor y seguidamente redissolver en 0.3 mL de AcN acuoso al 80%.

Antes de analizar las muestras, estas serán debidamente filtradas.

Protocolo descrito por Rúbies *et al.* (2015)

Para realizar la extracción se parte de 1 g de muestra homogeneizada a los que se les añade 1 mL de  $K_2HPO_4$  1M, se mezcla con vórtex y se deja reposar durante 20 min. Seguidamente se añaden 5 mL de AcN y se vuelve a mezclar con vortex durante 30 s. Se añaden 0.1g de NaCl y 0.5 g de  $MgSO_4$  anhidro, se agita con intelli-mixer durante 10 min, se centrifuga y se recoge el sobrenadante en un tubo falcon.

Se añaden 0.15 g de  $MgSO_4$  anhidro y 0.025 g de licoprep RP-18 al sobrenadante recogido para realizar la purificación. Se agita con vortex durante 30 segundos y con intelli-mixer durante 6 minutos. Se centrifuga y se recoge el sobrenadante en un matraz de 5 mL.

Se añaden 2 mL de AcN al residuo de la centrifugación anterior, se agita con vórtex e intelli-mixer y se centrifuga. Se enrasa el matraz que contiene el primer sobrenadante con el obtenido.

Se toma una alícuota de 1 mL para llevar a sequedad con corriente de nitrógeno y se reconstituye con MeOH al 100 %. De modo que se obtienen dos alícuotas para analizar, una en MeOH y otra en AcN.

Antes de analizar las muestras, estas serán debidamente filtradas.

#### Estudio de extracciones

Se comparan, usando el material de referencia, distintas extracciones en AcN/ $H_2O$  con el fin de encontrar una extracción eficiente compatible con el QuEChERS.

El protocolo usado es similar al descrito anteriormente en el apartado "Extracción en medio metanol acuoso". Se cambia el extractante y en un caso la proporción masa de tejido/volumen de extractante usado en el protocolo descrito en el apartado mencionado.

Se comparan los siguientes extractantes: AcN/ $H_2O$  10 %, AcN/ $H_2O$  20 %, AcN/ $H_2O$  50 %, AcN/ $H_2O$  50 % (proporción: 1 g tejido/8 mL extractante).

Se comprueba también si se pueden apreciar fases entre el acetonitrilo y el agua, mezclando NaCl con el extractante a evaluar y seguidamente centrifugando.

Protocolo para ácido domoico basado en el descrito por Han *et al.* (2013)

Para hacer la extracción se parte de 1 g de muestra homogeneizada a los que se les añade 8 mL AcN acuoso al 50 %, 0.64 g NaCl en un tubo falcon. Esta mezcla se homogeniza con vórtex y ultraturrax y se centrifuga. Se obtendrá un sobrenadante donde se observan dos fases, una acuosa (la inferior), y una de acetonitrilo (la superior). Se recogen los dos sobrenadantes, el sobrenadante acuoso se recoge en un matraz de 5 mL. Estos dos sobrenadantes, serán analizados para evaluar el funcionamiento del protocolo analítico, donde el extracto de acetonitrilo será un control negativo y el extracto acuoso será cuantificable.

El extracto acuoso se filtra con filtros de  $0.45\mu m$  de diámetro de poro. A partir de 3mL de este extracto filtrado se realizará la purificación, añadiendo 0.15g de lichoprep RP-18. Esta mezcla se agitará y centrifugará.

Antes de analizar las muestras, estas serán debidamente filtradas.

#### Estudios de recuperación

Para poder hallar los porcentajes de recuperación de cada matriz, es necesario realizar una adición estándar: contaminar, con una concentración conocida de toxina, muestras blanco (sin AD). De modo que, una vez se haya completado su análisis, dispondremos de un valor teórico y un valor experimental con el que calcular el porcentaje de recuperación de una matriz dada.

Las muestras blanco, una vez comprobado que no hay presencia de ácido domoico, se procederá a su contaminación del siguiente modo:

- Se pesa la masa que interese en un vaso de precipitados y seguidamente se añade el volumen necesario de estándar de AD. Se homogeniza con un homogeneizador magnético durante una hora.
- Durante los últimos 5 minutos se añaden 5mL de disolvente (MeOH/ $H_2O$  (1:1) o AcN/ $H_2O$  (1:1)). Posteriormente se pasa a un tubo cónico lavando con el disolvente hasta llegar al volumen necesario según la masa de muestra pesada (se cuenta con los 5mL anteriores).
- Se homogeniza con un ultra-turrax, se centrifuga durante 15 minutos y se recoge el sobrenadante.

Este será enrasado en un matraz llevándolo al volumen de disolvente necesitado para la extracción.

Las muestras blanco usadas, han sido contaminadas con una concentración de AD final de 0,125µg/mL, resultando ser la concentración teórica en el tejido de 0,5mg/kg o 1mg/kg dependiendo del tipo de extracción.

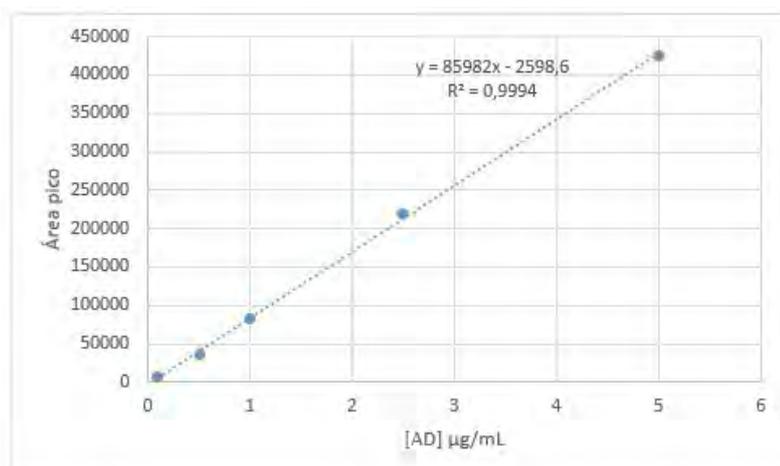
**Filtrado de muestras**

Tanto los filtros de 0.22µm como los de 0.45µm de diámetro de poro, ya sean Millex-HV o Ultrafree-MC (dependiendo del volumen de muestra), se usan para hacer compatibles los extractos a analizar en general, con los equipos. Sin embargo, los Amicon Ultra son utilizados para filtrar proteínas y sales de los extractos que se obtienen con el protocolo de QuEChERS desarrollado en el presente trabajo, haciendo compatibles también estos extractos con el equipo. El uso de estos filtros no excluye el uso de los anteriormente citados.

**RESULTADOS Y DISCURSIÓN**

**Estudios de calibración.**

Para evaluar la linealidad se preparan disoluciones estándar de concentración 0,1; 0,5; 1; 2,5 y 5 µg/mL, tal y como se describió anteriormente (Figura 2).



**Figura 2.** Recta de calibrado del HPLC-UV usado en el estudio. "Área pico" se refiere al área que se integra a partir de la señal que nos aporta el equipo, y "[AD] µg/mL" se refiere a la concentración de ácido domoico de los estándares usados en la calibración. También se aporta la ecuación de la recta y su coeficiente de determinación (R²).

**Determinación de los límites de detección y cuantificación**

El límite de detección (LOD) se define como la concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco o del ruido de fondo. Para hallar dicho límite, se establece una relación señal/ruido de 3 S/R (Tabla 2).

El límite de cuantificación (LOQ) se define como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. Para hallar dicho límite, se establece una relación señal/ruido de 10 S/R (Tabla 2).

**Tabla 2:** Límites de Detección y Cuantificación para la técnica usada.

LOD (µg AD/mL) [20 µL inyectados]	0.027
LOQ (µg AD/mL) [20 µL inyectados]	0.09

**SPE-SAX**

Valores de recuperación (%) obtenidos en las diferentes matrices

Para el cálculo de los siguientes porcentajes de recuperación, se realizó una adición estándar, tanto en mejillón como en vieira, de 0.5 µg/g. Recuperación en mejillón (Tabla 3) y recuperación en vieira (Tabla 4).

**Tabla 3.** Recuperaciones (%) halladas para la matriz de mejillón.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	91,04	6,8
Con purificación	84,77	4,4

Recuperación en vieira:

**Tabla 4.** Recuperaciones (%) halladas para la matriz de vieira.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	90,80	2,3
Con purificación	82,03	2,8

Concentraciones obtenidas en las diferentes matrices

Muestra EURLMB/14/A/01, HOMOGENEIZADO DE MEJILLÓN, valor asignado en ejercicio intercomparativo 20.4 mg AD+AE/kg (límite legal), RSD (n=38): 2,5 mg/kg (Tabla 5).

**Tabla 5.** Concentraciones de AD (µg/g) obtenidas al analizar mediante SPE-SAX la muestra EURLMB/14/A/01, aplicando los porcentajes de recuperación de la matriz correspondiente).

	[AD] µg/g	RSD (%) N=3
Extracto sin purificación	22,636	9,6
Extracto con purificación	22,486	1,6

Muestra EURLMB/14/A/02, HOMOGENEIZADO DE VIEIRA, valor asignado en ejercicio intercomparativo 10.8 mg AD+AE/kg (1/2 límite legal), RSD (n=37): 1,3 mg/kg (Tabla6)

**Tabla 6:** Concentraciones de AD (µg/g) obtenidas al analizar mediante SPE-SAX la muestra EURLMB/14/A/02, aplicando los porcentajes de recuperación de la matriz correspondiente.

	[AD] µg/g	RSD (%) N=3
Extracto sin purificación	9,924	1,4
Extracto con purificación	9,054	3,5

Material de referencia NRC-CRM-ASP-Mus-d

Material de referencia NRC-CRM-ASP-Mus-d, lot. 2011 12, unit. 455 49±3 mg AD+AE/kg (Tabla 7).

**Tabla 7:** Recuperaciones (%) halladas para el material de referencia.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	95,40	2,5
Con purificación	84,46	2,4

De acuerdo a los valores de recuperación obtenidos y reflejados en la tabla 7, se puede concluir que dichos valores son adecuados y se corresponden con los obtenidos para el material de referencia.

Las concentraciones de ácido domoico obtenidas para las distintas matrices contaminadas (tablas 5 y 6) concuerdan también con sus valores asignados.

### QuEChERS

Valores de recuperación (%) obtenidos en los protocolos descritos por Han *et al.* (2013) y Rúbies *et al.* (2015)

Se usa vieira como matriz con una adición estándar de [AD] = 4,581 µg/g, para la realización de los siguientes dos protocolos de QuEChERS.

Protocolo usado: Han *et al.* (2013) (Tabla 8):

**Tabla 8:** Resultados obtenidos para el protocolo QuEChERS desarrollado a partir del protocolo propuesto por Han *et al.* (2013).

[AD] µg/g	% Recuperación
ND	ND*

Protocolo utilizado: Rúbies *et al.* (2015)(Tabla 9):

**Tabla 9:** Resultados obtenidos para el protocolo QuEChERS desarrollado a partir del protocolo propuesto por Rúbies *et al.* (2015).

	[AD] µg/g	% Recuperación
AcN	ND*	ND*
MeOH	NC**	NC**

La ausencia de recuperación en los dos casos puede deberse a la solubilidad del AD, puesto que este es más hidrofílico que lipofílico (Falk *et al.*, 1991). Esto afecta al primer punto crítico del protocolo, el disolvente usado en la extracción, el AcN. Otro factor que afectaría a la recuperación del AD, sería el uso del MgSO<sub>4</sub> anhidro, puesto que este se utiliza como desecante.

### Estudio de extracciones

**Tabla 10:** Resultados obtenidos para los distintos extractantes. Proporción: 1g tejido/8 mL extractante

Extractante:	Recuperación (%)	Separación de fases
AcN/H <sub>2</sub> O 10%	91,59	No
AcN/H <sub>2</sub> O 20%	93,26	No
AcN/H <sub>2</sub> O 50%	86,50	Si
AcN/H <sub>2</sub> O 50%*	110,70	Si

Como se puede observar en la tabla 10, de los extractantes evaluados solo se podría usar el AcN/H<sub>2</sub>O 50%, ya sean 4 mL u 8mL para cada gramo de tejido, puesto que hay separación de fases entre el agua y el AcN. Es en el segundo caso donde se obtiene una mejor recuperación, por lo que se usará esta proporción de 8 mL de extractante por cada g de tejido.

Valores de recuperación (%) obtenidos en las diferentes matrices en el protocolo para ácido domoico basado en el descrito por Han *et al.* (2013)

Para el cálculo de los siguientes porcentajes de recuperación, se realizó una adición estándar, tanto en mejillón como en vieira, de 1 µg/g.

Porcentaje de recuperación en mejillones:

**Tabla 11:** Recuperaciones (%) halladas para la matriz de mejillón.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	678,56	1,9
Con purificación	90,72	4,7

Porcentaje de recuperación en vieiras:

**Tabla 12:** Recuperaciones (%) halladas para la matriz de vieira.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	192,56	0,1
Con purificación	91,72	2,2

En las tablas 11 y 12 se observa que, para los extractos sin purificación, los porcentajes de recuperación obtenidos son muy elevados, sin embargo una vez el extracto es purificado (se completa todo el protocolo), estos porcentajes de recuperación pasan a tener unos valores aceptables (100±20 %). Esto puede significar, que con el cambio de extractante, se extraigan compuestos que con una extracción metanólica no se extraían. El disolvente ahora es agua, por lo que habrá compuestos hidrofílicos que en un disolvente parcialmente orgánico (MeOH/H<sub>2</sub>O 50 %) podrían no aparecer y eluir en la columna cromatográfica en unos tiempos de retención similares a los del ácido domoico.

Sin embargo, después de una etapa de purificación con C18, un sorbente apolar, esta coelución de compuestos desconocidos se elimina, por lo que cabría pensar que dichos compuestos no son polares. Para poder aclarar esta cuestión, sería necesario una confirmación que se llevaría a cabo mediante espectrofotometría de masas realizando un escáner de las masas objeto de estudio.

Concentraciones obtenidas en las diferentes matrices en el protocolo para ácido domoico basado en el descrito por Han *et al.* (2013)

Muestra EURLMB/14/A/01, homogeneizado de mejillón, valor asignado en ejercicio intercomparativo 20.4 mg AD+AE/kg (límite legal), RSD (n=38): 2.5 mg/kg:

**Tabla 13:** Concentraciones de AD (µg/g) obtenidas al analizar mediante QuEChERS la muestra de referencia EURLMB/14/A/01, sin aplicar los porcentajes de recuperación de la matriz correspondiente.

	[AD] µg/g	RSD (%) N=3
Extracto sin purificación	15,898	2,9
Extracto con purificación	17,500	1,3

Muestra EURLMB/14/A/02, HOMOGENEIZADO DE VIEIRA, valor asignado en ejercicio intercomparativo 10.8 mg AD+AE/kg (1/2 límite legal), RSD (n=37): 1,3 mg/kg:

**Tabla 14:** Concentraciones de AD (µg/g) obtenidas al analizar mediante QuEChERS la muestra de referencia EURLMB/14/A/02, sin aplicar los porcentajes de recuperación de la matriz correspondiente.

	[AD] µg/g	RSD (%) N=3
Extracto sin purificación	9,262	4,4
Extracto con purificación	7,669	3,7

Valores para las muestras naturalmente contaminadas, EURLMB/14/A/01 y EURLMB/14/A/02, aplicando las recuperaciones obtenidas (extractos con purificación).

**Tabla 15:** Concentraciones de AD ( $\mu\text{g/g}$ ) obtenidas después de llevar a cabo todo el protocolo de QuEChERS a las muestras de referencia EURLMB/14/A/01 y EURLMB/14/A/02, aplicando los porcentajes de recuperación de la matriz correspondiente.

	[AD] $\mu\text{g/g}$
EURLMB/14/A/01	19,290
EURLMB/14/A/02	8,361

Si analizamos los resultados obtenidos aplicando el protocolo íntegro de QuEChERS para AD desarrollado en el presente trabajo, se observa que, aplicando los debidos porcentajes de recuperación, los valores obtenidos para las matrices de mejillón y vieira naturalmente contaminadas (tabla 15), contrastan con los valores asignados para las muestras del EURLMB.

Valores de recuperación (%) obtenidos en el material de referencia NRC-CRM-ASP-Mus-d

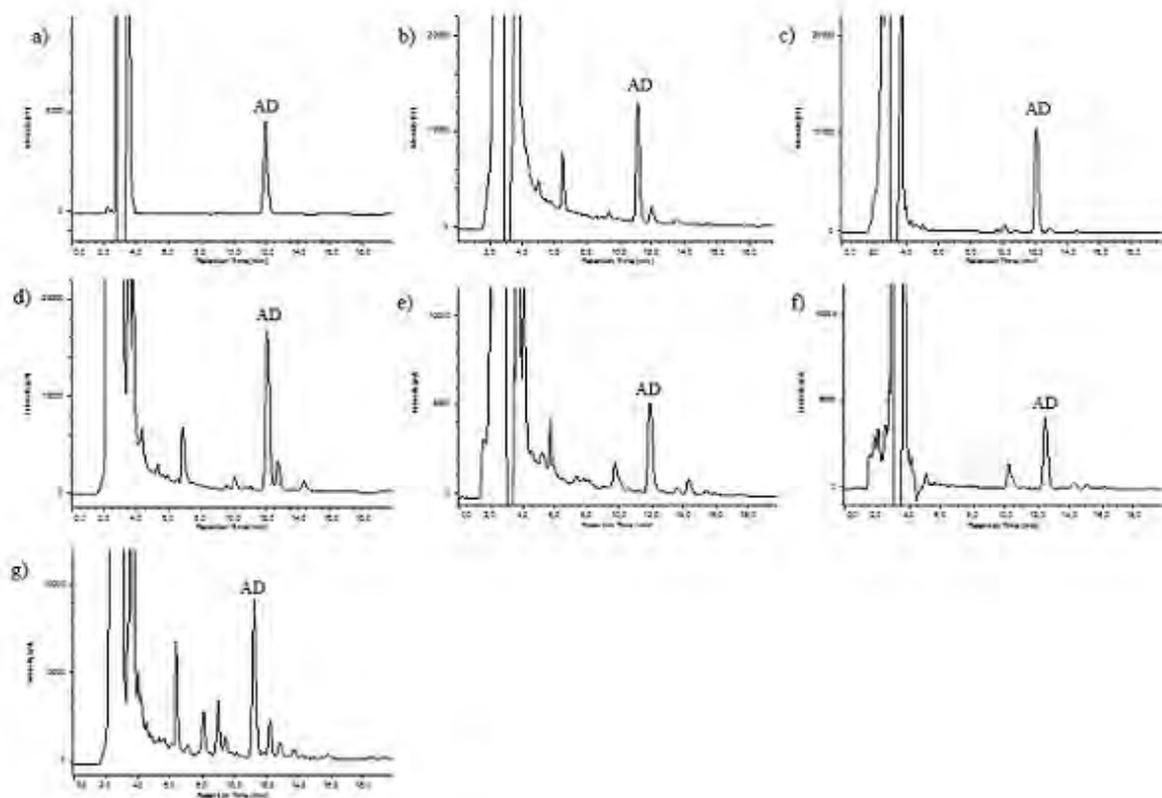
**Tabla 16:** Recuperaciones (%) halladas para el material de referencia.

	Recuperación de AD (%)	RSD (%) N=3
Sin purificación	64,89	0,8
Con purificación	75,20	1,8

Como se puede observar en la tabla 16, los porcentajes de recuperación obtenidos en el material de referencia certificado no se corresponden con los hallados en la adición estándar de mejillón. Esto puede deberse a una diferencia de compuestos endógenos del organismo y a la eficacia de la etapa de purificación. El C18 no elimina el triptófano y este aminoácido es una interferencia importante en el análisis de las toxinas amnésicas. Esto podría solucionarse optimizando esta etapa usando otros sorbentes o combinaciones de los mismos, pudiendo ser una opción el uso de la combinación entre el C18 y el SAX.

También se puede observar en las tablas 13 y 16, que la concentración de AD (en el primer caso) y el porcentaje de recuperación del mismo (en el segundo caso) aumentan una vez completada la etapa de purificación con respecto a la etapa de extracción sin purificación. Esto podría suponer que el protocolo de QuEChERS realizado disminuye el efecto matriz, evitando una infravaloración en la cuantificación del analito de interés en mejillón (*Mytilus galloprovincialis*, en el primer caso y *Mytilus edulis* en el segundo).

## 5.6 Ejemplos de cromatogramas obtenidos a lo largo del desarrollo experimental



**Figura 3:** Cromatogramas pertenecientes a: **a)** Estándar de AD de concentración 1 µg/mL; **b)** Extracción en medio metanol acuoso de tejido de mejillón; **c)** SPE-SAX de tejido de mejillón; **d)** QuEChERS de tejido de mejillón; **e)** Extracción en medio metanol acuoso de tejido de vieira; **f)** SPE-SAX de tejido de vieira; **g)** QuEChERS de tejido de vieira.

## CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un protocolo de preparación de muestra alternativo mediante QuEChERS para la determinación de toxinas amnésicas en alimentos de origen marino, que en principio ofrece buenos resultados pero que sería necesaria su optimización para aumentar la eficacia proporcionada por la citada metodología de QuEChERS y consecuentemente incrementar la eficacia y fiabilidad del análisis.

## BIBLIOGRAFÍA

- AOAC International (2000a). AOAC Official Method 959.08. Paralytic shellfish poison, biological method. In: W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- AOAC International (2000b). AOAC Official Method 991.26. Domoic acid in mussels, liquid chromatographic method. In: W. Horwitz (Ed.), Official Methods of Analysis of AOAC International. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Falk, M., Seto, P. F., Walter, JA. (1991). Solubility of domoic acid in water and in non-aqueous solvents. Can. J. Chem. 69: 1740-1744.
- Han, S., Wang, P., Liu, Y., Gu, J., Wang, J. (2013). Determination of azaspirazids in edible shellfish by a modified QuEChERS method coupled with ultra high performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. Chin. J. Chromatogr. 31: 939-945.

- Lawrence, J. F., Charbonneau, C. F., Ménard, C., Quilliam, M. A., Sim, P.G. (1989). Liquid chromatographic determination of domoic acid in shellfish products using the paralytic shellfish poison extraction procedure of the association of chemists. *J. Chromatogr.* 462: 349-356.
- Lawrence, J. F., Charbonneau, C. F., Ménard, C. (1991). Liquid chromatographic determination of domoic acid in mussels, using AOAC paralytic shellfish poison extraction procedure: collaborative study. *J. Assoc. Anal. Chem.* 74: 68-72.
- Ohfuné, Y., Tomita, M. (1982). Total synthesis of (-)-domoic acid. A revision of the original structure. *J. Am. Chem. Soc.* 104: 3511-3513.
- Quilliam, M. A. (1995). Seafood toxins. *J. AOAC Int.* 78: 144-148.
- Quilliam, M. A., Sim, P. G., McCulloch, A. W., McInnes, A. G. (1989). High-performance liquid chromatography of domoic acid, a marine neurotoxin, with application to shellfish and plankton. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 36: 139-154.
- Quilliam, M. A., Xie, M., Hardstaff, W. R. (1991). Rapid extraction and clean-up procedure for determination of domoic acid in tissue sample. Technical Report, No. 64, Institute of Marine Bioscience National Research Council Canada, Halifax, NS, Canada.
- Rúbies, A., Muñoz, A., Gibert, D., Cortés, N., Granados, M. (2015). New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach. *J. Chromatogr. A.* 1386: 62-73.
- Shi, X., Jin, F., Huang, Y., Du, X., Li, C., Wang, H., Shao, H., Jin, M., Wang, J. (2012). Simultaneous determination of five plant growth regulators in fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS) extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 60: 60-65.
- Wright, J.L.C. (1995). Dealing with seafood toxins: present approaches and future options. *Food Res. Int.* 28: 347-358.
- Zhao, L., Stevens, J. (2012). Determination of sulfonamide antibiotics in bovine liver using Agilent Bond Elut QuEChERS EN kits by LC/MS/MS. Agilent technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808.