

CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

SECYTA

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE
CROMATOGRAFÍA
Y TÉCNICAS AFINES

BOLETIN DE LA SECYTA
VOLUMEN 26 NÚM. 1 (2005)
WWW.SECYTA.ORG

26

Cromatografía iónica sin reactivos



EL FUTURO DE LA CROMATOGRFÍA IÓNICA



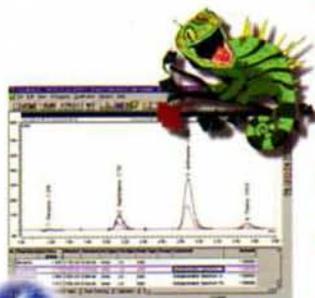
UTILICE SÓLO AGUA DESIONIZADA PARA LA
GENERACIÓN AUTOMÁTICA DE ELUYENTES

TECNOLOGÍA REAGENT-FREE IC

NUEVOS MODELOS DIONEX HPLC • SUMMIT



- ✓ Ahorro de tiempo, trabajo y coste.
- ✓ Mejora de la reproducibilidad.
- ✓ Rango más amplio.
- ✓ Mayor sensibilidad.
- ✓ Gradientes de forma fácil y de rutina.



CHROMELEON® 6



www.vertex.es

CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES

Madrid, junio de 2004 Vol. 26, núm. 1

ISSN 1132-1369

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

INDICE

2 Editorial

ARTÍCULOS

- 3 Current Methodological Advances in the Discovery of Protein and Peptide Disease Markers *por Péter Horvatovich, Natalia Govorukhina y Rainer Bischoff*
- 12 Microextracción en fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas *por Javier Hernández Borges, Miguel Ángel Rodríguez Delgado y Francisco J. García Montelongo*
- 28 Determinación de aspártico, glutámico y glicina procedentes de muestras biológicas mediante RP-HPLC, utilizando como derivatizante el carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo *por M. Teresa Oreiro García, M. Dolores Vázquez Illanes, Germán Sierra Paredes y Germán Sierra Marcuño*

NOTICIAS DE LA SECyTA

- 34 La 5ª Reunión Científica de la SECyTA
- 37 Nuevos socios

INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA

- 38 Reseña de libros
- 39 Artículos de interés

DE NUESTRAS EMPRESAS COLABORADORAS

- 41 Novedades técnicas

Redacción: Elena Ibáñez (elena@ifi.csic.es), Alejandro Cifuentes (acifuentes@ifi.csic.es)
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Isabel Martínez Castro (iqomc16@iqog.csic.es), Lourdes Ramos (lramos@iqog.csic.es)
Instituto de Química Orgánica General (CSIC)
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid Tel. 91-562 29 00

Publicidad: José Luis Andréu
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid Tel. 91-562 29 00, ext 355

Comité Editorial: A. Cifuentes, M. de Frutos, E. Ibáñez, M.L. Marina, I. Martínez Castro, L. Ramos

Depósito legal: M-1902-1975

Diseño, preimpresión e impresión: Helios, S.L. • 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.

DIVIDE Y VENCERÁS, LA AGUJA EN EL PAJAR Y LA FUERZA BRUTA.

En un reciente editorial de la revista *Lab on a Chip*^[1], Andreas Manz y Harp Minhas consideraban el paralelismo entre la teoría de la información y la química analítica, o la todavía más compleja química bioanalítica. La finalidad última de la química (bio)analítica es la identificación y cuantificación de todos los componentes de una muestra, en función del tiempo y en función del espacio. Cuanto más simple sea la muestra, más fácil es cumplir este objetivo. Por eso, en química analítica siempre se ha aplicado la máxima de *divide y vencerás*: las marchas analíticas, que los menos jóvenes aprendimos durante nuestros años en la Facultad, se basaban en separar las mezclas complejas de aniones y cationes en grupos más simples que tenían una o varias propiedades en común.

En el caso de los análisis bioquímicos las mezclas pueden ser extraordinariamente complejas. Basten un par de botones de muestra: en el plasma humano hay más de 100 proteínas mayoritarias y un número indefinido de minoritarias, en una orina se determinan más de 75 especies químicas (algunas de ellas valoradas globalmente, como el N total, que engloba todos los aminoácidos de la muestra). La cuantificación exacta de estos parámetros analíticos puede ser importante para un correcto diagnóstico (y a veces, pronóstico) de la enfermedad. Sin embargo, la estrategia de *divide y vencerás* para este tipo de análisis no siempre es aplicable y, menos, en tiempos de análisis tan cortos como los que requieren actualmente los laboratorios clínicos, los métodos de cribado (*screening*) de alto rendimiento, el control antidoping, etc. Para este tipo de problemas analíticos se están empezando a perfilar nuevas estrategias.

Una de ellas es la búsqueda de la *aguja en el pajar*. En lugar de vaciar cuidadosamente el pajar para tratar de encontrar la aguja, podemos usar un "imán" que nos ayude a localizarla. Los métodos que emplean reconocimiento molecular como los "arrays" de genes o de proteínas, las técnicas de inmunoblotting o inmuno histoquímica, o las partículas inmunomagnéticas, se basan en este principio.

La otra aproximación al problema de las muestras complejas es la que podríamos denominar de *fuerza bruta*. Cuando se trata de analizar el proteoma humano completo, -el conocimiento de todas las proteínas que una determinada célula o grupo de células (tejido, órgano) expresan en un momento determinado en un ser vivo-, la cosa empieza a complicarse más. Si admitimos que el genoma humano tiene 30.000 genes y que debido a procesos tales como *gene splicing*, glicosidación, fosforilación, etc., cada gen tiene potencialidad para producir 10 proteínas, el proteoma humano tendría unas 300.000 proteínas. Afortunadamente no todos los genes se expresan al mismo tiempo, algunos están durmientes. Aún así, el problema de separar mezclas con 10^3 - 10^5 componentes es un reto que parece inalcanzable y para el que quizá sea necesario volver al *divide y vencerás* de la química analítica de los años 50 fraccionando el proteoma en subproteomas^[2]. En estos casos son necesarias técnicas de separación muy potentes para separar una a una las proteínas de un (sub)proteoma. En este sentido, la utilización de técnicas de separaciones unidimensionales viene limitada por su modesta capacidad de picos. La ecuación clásica que da esta magnitud^[3] nos dice que las técnicas cromatográficas o electroforéticas pueden permitirnos separar en el mejor de los casos entre 500 y 1000 componentes^[4] con una resolución unidad. Si queremos aumentar esta capacidad en 2 órdenes de magnitud hay que recurrir a técnicas *bi(multi)dimensionales*. Si las técnicas que se acoplan basan su separación en propiedades muy diferentes de los analitos (columnas de distinta polaridad, separación por carga en una dimensión y peso molecular en la otra, etc.) y si la transferencia de una dimensión a otra se hace sin perder eficacia, la capacidad de picos en la técnica *bi(multi)dimensional* será el producto de las capacidades de las dos (o las varias) dimensiones acopladas. Es decir, en teoría se podría esperar entre 250.000 y un millón de componente en un acoplamiento *bidimensional*. En la práctica nunca el acoplamiento es perfecto y la capacidad de picos suele ser dos o tres órdenes de magnitud más bajos, como se constata en electroforesis bi-dimensional en geles de SDS, el caballo de batalla de la proteómica actual^[5].

Afortunadamente los químicos analíticos se encuentran con herramientas cada vez "más potentes" para poder aplicar esta aproximación de *fuerza bruta*. Los acoplamientos bidimensionales tanto en Cromatografía de Gases^[6], como de líquidos^[7], como en electroforesis capilar^[8] empiezan a aparecer.

Por otra parte, en técnicas de separación desde principios de los 70 hemos tenido, y ahora más a nuestro alcance que nunca, la espectrometría de masas (MS) como otra dimensión. Los acoplamientos GC-MS, HPLC-MS y CE-MS van ganando en popularidad. Por tanto, es concebible acoplamientos tridimensionales, tales como GC-GC-MS, HPLC-HPLC-MS o CE-CE-MS. Si aplicamos a estos sistemas tridimensionales los criterios de capacidad de picos antes establecidos se podrían obtener teóricamente capacidades entre 125.000 y ¡¡ 1.000 millones de picos!! Aunque las eficacias reales obtenidas son menores, todavía tenemos "fuerza" para resolver problemas complejos.

Aunque la instrumentación para este tipo de acoplamientos, en los casos en que es comercial, es todavía cara, ¡soñar no cuesta dinero!

J.C. Díez-Masa
Presidente de la SECyTA

Bibliografía:

- [1] A. Manz, H. Minhas, *Right into a "Bio" world* *Lab Chip* 4 (2004) 1N.
- [2] S. A. Jhonson, T. Hunter, *Kinomics: Methods for Deciphering the Kinome*, *Nat. Methods* 2 (2005) 17-25.
- [3] J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, Wiley-Interscience, New-York, 1991, pag 133-135.
- [4] Estimación hecha considerando un valor de 50 para la relación entre el volumen de elución del último pico y el del primero y 10^3 - 10^6 platos para la eficacia.
- [5] <http://www.expasy.org/ch2d/>
- [6] P.J. Marriot, P.D. Morrison, R.A. Shellie, M.S. Dunn, E. Sari, D. Ryan *Multidimensional and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography*, LC-GC International, Diciembre 2003.
- [7] H.J. Cortes, en *Multidimensional Chromatography: Technique and Applications*. Ed. H.J. Cortes, Dekker, New York, 1990.
- [8] T.F. Hooker, D.J. Jefferey, J.W. Jorgenson, en *High Performance Capillary Electrophoresis. Theory, Techniques, and Applications*. Ed. M. Khaledi, Wiley-Interscience, New-York, 1998, Cap. 17.

ARTICULOS

Current Methodological Advances in the Discovery of Protein and Peptide Disease Markers.

Péter Horvátovich, Natalia Govorukhina, Rainer Bischoff*

Department of Analytical Biochemistry, Centre for Pharmacy, University of Groningen, Ant. Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands

*corresponding author: r.p.h.bischoff@rug.nl

INTRODUCTION

Most diseases result in significant changes of human physiology, which alter processes at the molecular level in the human body. These changes may be measurable and serve as diagnostic indicators. For clinical practice it is advantageous to study these changes in easily accessible biological samples mainly derived from blood. Many terms are used to describe biochemical changes related to disease and treatment effects, such as biological markers, biomarkers, surrogate markers, surrogate or intermediate endpoints, and other terms that have overlapping meanings. The Biomarkers Definitions Working Group of the National Institutes of Health Director's Initiative on Biomarkers and Surrogate Endpoints gave the following definition of biomarkers⁽¹⁾: "Biological marker (biomarker): A characteristic that is objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to a therapeutic intervention."

Based on this definition, a biomarker may be a biological molecule (e.g. a protein) but also a cytological test or the non-invasive imaging of a diseased organ. In our review we will focus on the analysis of proteins and peptides as potential biomarkers. There are two major approaches for biomarker discovery. The hypothesis-driven approach is used, when the molecular mechanism of the disease is well understood, and it is possible to select potential candidate markers to follow the disease state⁽²⁻⁴⁾. However, in most cases the mechanistic knowledge is insufficient for a directed approach imposing comparative profiling of samples⁽⁵⁻⁶⁾. Profiling relies heavily on the stringent classification of patient groups and preferentially their follow up over extended time periods (longitudinal studies). A comparative profiling approach may, however, allow to improve the differentiation or classification of patients based on biomarkers or biomarker patterns. Another major challenge in profiling biological fluids is the relatively large natural variation of protein, peptide or metabolite concentrations between individuals, and the diversity and

complexity of these samples. These intra-individual differences may result from widely varying nutritional habits, the effect of natural cycles (e.g. day/night), environmental and social aspects (e.g. water and air pollutants, smoking), and genetic differences between individuals (e.g. CYP450 profiles)

A critical point for the validation of new, more predictive biomarkers or multiple correlated biomarkers (marker patterns) is to assess the natural concentration range of the candidate compounds and the variation within a given group of individuals. For this reason the discovery and validation procedure is lengthy and requires often large-scale studies. Furthermore it necessitates good communication and an understanding of the problems between all participating parties. Biomarker discovery research relies on an integrated approach combining medical sciences, analytical sciences and data sciences (Figure 1.) This procedure is first of all based on well characterized patient groups, which is the primary responsibility of Medical Sciences. Next samples need to be taken and handled in a reproducible manner so as not to affect the biomolecules of interest. The ensuing analytical procedure should be carefully developed to lower variability introduced by the sample preparation and analysis method. The statistical evaluation of the obtained data has to assess the variability of the individual elements involved in the profiling process (e.g. patient background, sampling procedure, sample preparation and analysis steps) and give information on statistically significant correlations between analytical data and the clinical aspects of the disease. In the case that correlations can be established, these biomarker candidates need to be further validated in larger clinical studies. This often requires a different analytical platform, notably based on high-throughput immunoassays. Ultimately, a threshold value needs to be defined based on large data sets and this threshold needs to be readjusted based on newly incoming data. Defining a threshold should reduce the number of false negatives (patients with disease that remain undiagnosed) and false positives (healthy individuals diagnosed as diseased) (Figure 2).

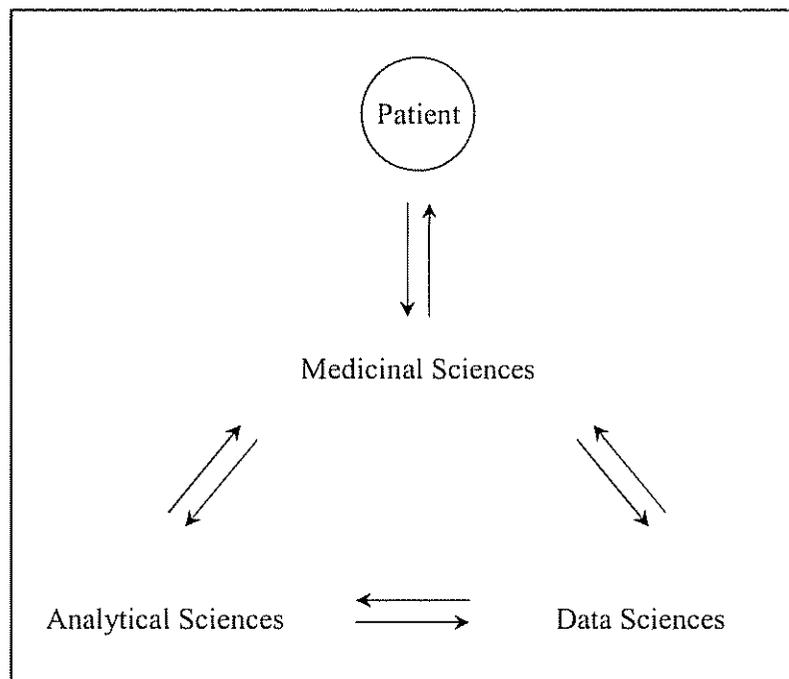


Figure 1. Schematic representation of the working environment for biomarker discovery research. Based on the classification of patients by Medical Sciences, Analytical Sciences generates data from relevant biological samples that are processed and statistically analyzed by Data Sciences. Information generated after data analysis will be fed back into the project team to advance the understanding of the disease and possibly to prioritize new biomarker candidates.

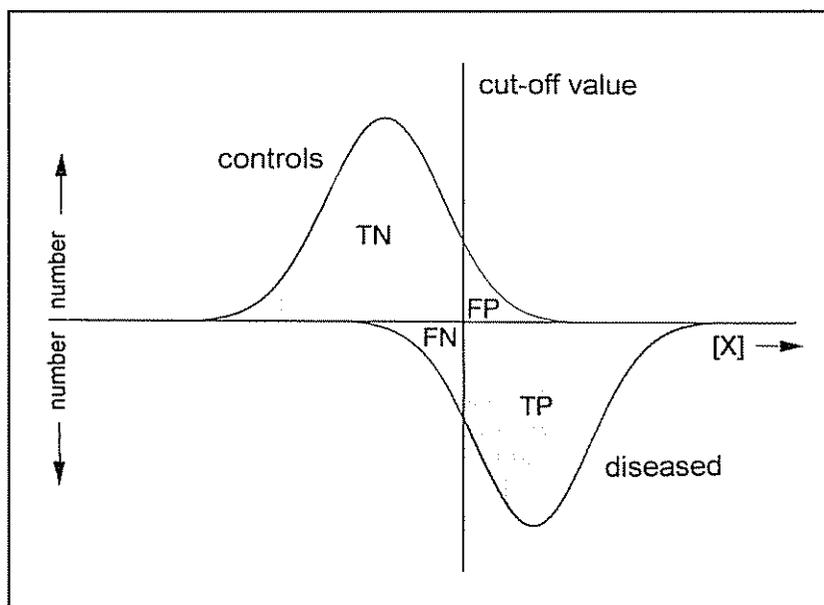


Figure 2. Schematic diagram of the effect of defining a threshold (cut-off) value for a given biomarker on the number of false negatives (FN: patients with disease that remained undiagnosed) and false positives (FP: healthy individuals diagnosed as diseased). This scheme also highlights that it is generally not possible to have a 100% discrimination and that improved biomarkers should reduce the number of FN and FP.

Recently most of biomarker research has focused on various forms of cancer. Cancer refers to a range of diseases characterized by uncontrolled cell division. Cancers can be classified based on their localization, origin or on the molecular mechanism of growth. Early detection improves treatment options significantly for most cancers driving the present biomarker discovery efforts. Biomarkers may also serve to classify patients better to give them the most appropriate treatment and monitor therapeutic efficacy of the treatment. Biomarker discovery in cancer is based on the assumption that cancer cells themselves produce a different spectrum of biomolecules and that they influence their environment to alter its composition (e.g. breakdown of extracellular matrix proteins, secretion of growth factors). It is these changes that scientists are trying to pick up in readily available body fluids amongst a vast amount of unaffected proteins, peptides or metabolites that may, however, change as a result of unrelated phenomena (e.g. nutrition). Indeed it is the great challenge of biomarker research not only to find physiological differences between healthy and diseased people but to make sure that these changes have a correlation with the specific disease in question. Only then can biomarker research be translated into better diagnosis and eventually better treatment options for the patient.

The most important characteristics of a suitable biomarker for cancer can be considered as follow:

- early diagnosis: for risk assessment, to support disease prevention or to allow timely therapeutic intervention and cure.
- reliability: minimal rates of false positive and false negative results.
- follow-up: effectiveness of therapy and reliable detection of disease recurrence.
- improved tumor classification: to allow a more targeted and personalized therapy.

We will focus on different recently developed analytical techniques for biomarker research with special emphasis on chromatography and mass spectrometry.

METHODOLOGY

Most clinical assays are performed in blood or one of its derivatives (plasma or serum). These body fluids contain in high diversity and concentration range (up to twelve orders of magnitude) peptides, proteins and metabolites of different functionality. To lower the variability of the profiling procedure, it is of main importance to perform the sample collection in a well-

controlled and characterized manner in view of the stability of the analytes of interest (e.g. proteins). In this respect the effect of coagulation on the serum proteome has attracted some attention as has the stability of plasma over time^[7]. Next to well-controlled sampling and sample handling, randomization of samples is an essential part of the procedure to avoid confounding effects like electrospray stability and ionization efficiency, shifting of instrument electronics, variations in room temperature etc. These may result in systematic errors that appear like trends, if for example, all controls are measured first followed by all patient samples. The key factor for designing the analytical procedure is minimization of the variability occurring during the analysis, by e.g. keeping the procedure simple, choosing robust sample preparation and analysis steps and the use of internal standards.

Most often chromatographic separation coupled to mass spectrometric detection is used, a technique with a linear dynamic measurement range of about four orders of magnitude, enabling thus only the investigation of the more concentrated part of the serum proteome. Human Serum Albumin (HSA) and Immunoglobulins (IgG) represent about 60-80% of the total serum protein content^[8] and this reduces largely the dynamic range of the analytical methods for serum proteomics. To overcome this limitation affinity columns containing specific antibodies or dye ligands have been used to remove high abundance serum proteins. A variety of depletion columns is currently on the market. Some of them bind only HSA and/or IgG, others deplete other proteins like Transferrin and α_1 -Antitrypsin^[9-14]. Even depleted serum contains a wide range of proteins not taking into account that post-translational modifications contribute significantly to the overall complexity.

Liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS)

The proteins present in depleted serum samples can be analyzed directly by high resolution mass spectrometry or can be separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). 2-DE was the first separation technology that was applied to the discovery of biomarkers in plasma and serum^[15]. The application of this technique is, however, very work-intensive and has thus been complemented by methods that can be more easily automated like SELDI-TOF-MS (see later) or LC-MS. Different high resolution multidimensional HPLC systems have been used recently to analyse depleted, trypsin digested serum or plasma. The most adapted HPLC system for mass spectrometric analysis uses C18

reverse phase (RP) stationary phases as their final dimension, which allows adequate separation of peptides obtained after tryptic digestion. For proteomics micro- (1 mm ID) or, if a low detection limit is required, nano-columns (100-25 μm ID) are used. The digestion of one protein gives rise to ~ 50 proteolytic fragments, thus increasing sample complexity considerably, which makes the use of multi-dimensional, high resolution separation systems compulsory^[16-21]. The most popular systems use strong cation or anion exchange as the first and C18 RP chromatography in the second dimension, which is coupled directly to the ionization interface of a mass spectrometer^[22]. Such systems present an improved dynamic range and an extended separation efficiency (e.g. by the MudPIT approach 1484 proteins were identified in the yeast proteome^[23]) and thus allows the detection of low abundance proteins^[24]. Even though automation of LC-LC-MS reduces the need for intensive user intervention, it remains time consuming, since a single run often takes about 2h and some 24 fractions may have to be analyzed per sample. While this may still be acceptable for biomarker discovery, it is not suitable for large clinical validation studies requiring analysis of thousands of samples. For such validation studies biomarker candidates have to be selected and the methodological platform has to be changed to one of higher throughput, like an immunoassay.

Relevant biomarkers may also be discovered in the low molecular weight fraction of the proteome, also termed the "peptidome"^[24]. In order to enrich the peptidome, it is necessary to perform a prefractionation of the sample (e.g. serum), based on molecular size. An elegant way of combining size exclusion of large proteins and chromatographic enrichment of the peptidome is based on the use of restricted access material (RAM) chromatography. This column combines the separation method of size exclusion with reverse phase (RP) or cation-exchange chromatography^[25]. Only proteins and peptides below a certain size have access to the inner pore surface of the silica based stationary phase and are thus retained, while the larger proteins encounter only the hydrophilic, non-adsorptive outer surface and are found in the flow-through. The application of an in-line coupled multidimensional chromatographic system containing RAM, cation-exchange and RP dimensions, applied to the hemofiltrate of patients from a nephrological centre allowed to reach a peak capacity of about 5000^[26].

New chromatographic stationary phases using smaller diameter size packing materials have been recently introduced to produce separations with better resolution in less time^[26] with promising results for

shotgun proteomics and peptidomics^[27-28]. However the smaller diameter of the particles increases the working pressure of the system to about 10000 psi, and necessitates the use of special HPLC equipment. Monolithic reverse phase columns based on silica or organic polymer materials have also shown potential to enhance separation efficiency and to reduce analysis time. These columns contain a continuous, single piece of a polymeric network of highly interconnected pores forming larger and smaller open flow-through channels which allow the mobile phase to pass easily through the column. Moreover, the enhanced permeability of monolithic vs. particulate columns results in a much lower pressure and faster mass transfer, allowing the use of higher flow rates thus shortening the analysis time^[29-36].

Quantification

For comparative studies it is critical that the variability of the analytical method itself is kept to a minimum. Especially LC-MS is prone to variations due to the effect of sample components on ionization efficiency and the many tuning parameters of the mass spectrometer (interface, ion optics, detector). This is why normalization of the data based on internal standards is customary. The added internal standards should resemble the analytes of interest in their physico-chemical properties as much as possible. This is why proteins or peptides are used as standards in proteomics or peptidomics applications. In order to discriminate the internal standards from the analytes themselves, they must, however, differ somewhat to result in a slightly shifted retention time and/or a different molecular mass. The presence of internal standards should also not lead to ion suppression effects on particular analytes thus their added amount should be on the same order as the analytes of interest.

Most quantitative LC-MS studies use stable isotope-labeling chemistries for quantitative comparison of samples of different origins. The common feature of these techniques is the incorporation of stable isotopes into proteins or peptides before or after tryptic digestion thus generating an internal, global standard for every protein or peptide in the mixture. The principle of relative quantification using stable-isotope labeling is that one sample is labeled with the light isotope (e.g. ^1H) while the other samples is treated identically but with the heavy isotope (e.g. ^2D). After the labeling procedure the samples are mixed at even protein amounts, separated and the ratio of light to heavy peptides determined by MS or MS/MS. The chromatographic analysis and all analytical steps after labeling present negligible isotope discrimination,

which leads to a significant decrease of errors caused by the analytical method in the final quantitative data. It needs to be kept in mind that unless a defined set of standards is added in well known amounts for calibration, this method gives only a comparative quantification between the differentially labeled samples and no absolute concentration values.

Stable isotopes can be incorporated in proteomics samples by metabolic labeling, chemical labeling or enzymatic labeling^[37]. Proteins in cells grown in culture can be metabolically labeled with stable isotope-labeled

amino acids like arginine^[38], lysine^[39], tyrosine^[40], or leucine^[41]. This approach requires that cells grow in culture to incorporate heavy isotope (e.g. ^{13}C , ^{15}N) labeled nutrients (Figure 3)^[42]. While labeling can be achieved even in multicellular organisms^[43], it is not possible to apply it to samples like biopsies or body fluids often encountered in clinical research. The Isotope Coded Affinity Tag (ICAT) quantitative labeling strategy^[44-46], which is part of the chemical labelling set of methods^[47], is perhaps the best-characterized method for relative protein quantification using MS. The ICAT technology uses a binary set of reagents reacting with free thiol

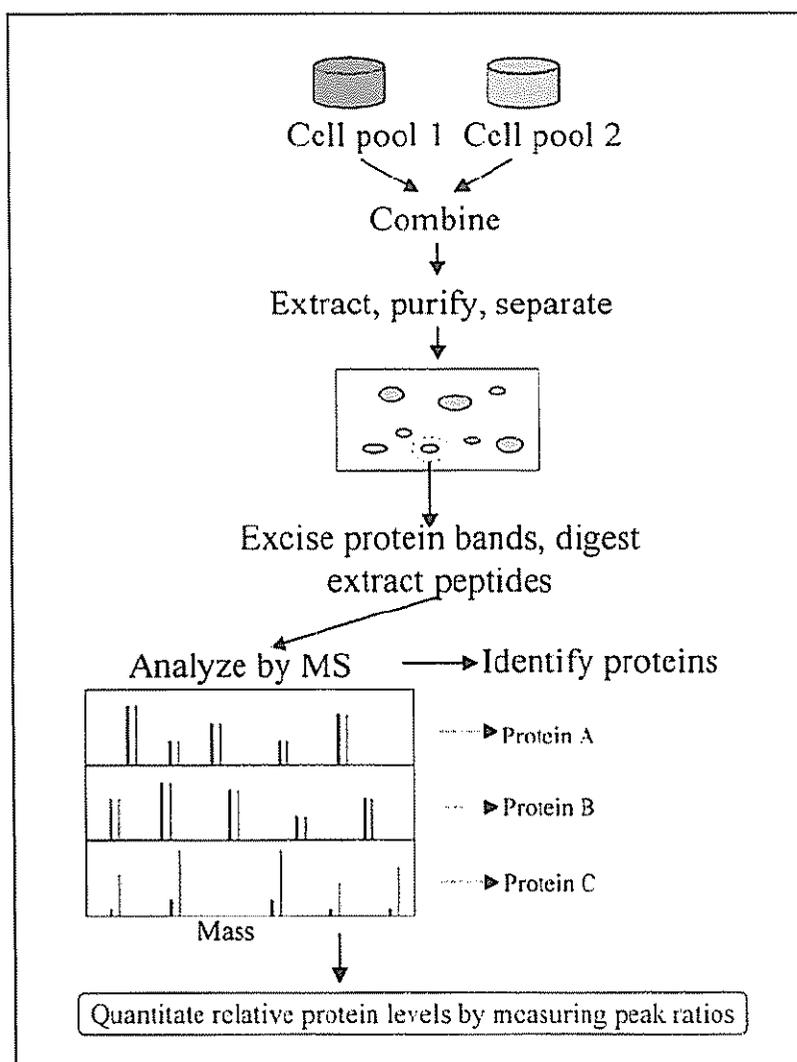


Figure 3. Main steps of quantifying differential protein expression in cell culture using metabolic stable isotope labelling. Two samples of interest are labelled with a light and heavy isotope of the same element (e.g. ^{12}C and ^{13}C) mixed and submitted to the analytical and data analysis procedure. The obtained mass spectra give 2 peaks (light and heavy) for each peptide representative of the different amounts in the two original samples (reprinted from Y. Oda *et al.* In Proc. Natl. Acad. Sci., 96 (1999) 6591-6596. Copyright 1999 National Academy of Science, USA)

groups in cysteine and containing either ^{12}C or ^{13}C atoms, since the originally designed deuterated ICAT reagents resulted in a slight chromatographic retention time shift¹⁴⁵⁻⁴⁸⁻⁴⁹¹. The reagent contains also a biotin group, which allows rapid affinity isolation of tagged cysteine-containing peptides. A further advantage of the technology is that generally several peptides of the same protein can be measured (depending on the number of free cysteines in the protein), and the statistical precision of the relative protein quantification is enhanced by averaging the individual peptide ratios. The use of mass-difference labels augments the complexity of mass spectra, and this problem increases with the number of multiplexed sets of samples. Finally, the cysteine-selective affinity strategy for reduction of sample complexity is not amenable to identification of post-translationally modified peptides, as the majority of peptides containing post-translational modifications are discarded at the affinity isolation step¹⁵⁰. While the ICAT methodology was the first to open the field of chemical, stable isotope labelling in proteomics, there have been many more reactions adapted to this task. The reader is referred to recent reviews for further information¹⁴⁷⁻⁵¹¹.

Further improvement of the label design uses a multiplexed set of reagents attaching isobaric mass labels (iTRAQ) at the N-terminus and lysine side chains of

peptides in a mixture of digested proteins. These reagents are differentially isotopically labeled such that all derivatized peptides are isobaric (they have the same molecular mass) and chromatographically indistinguishable, but yield signature or reporter ions of different m/z values in the low mass range upon collision-induced dissociation (CID).¹⁵⁰ The "reporter group" of the reagent contains different numbers of ^{13}C and ^{15}N isotopes while the "balance group" serves to adjust the overall mass of the label to be isobaric. The "balance group" is lost during MS/MS (neutral loss). Using this strategy 4 mass differentiated labels can be employed to compare 4 samples in one LC-MS run. The reagents contain an N-hydroxysuccinimide activated ester, which reacts with primary aliphatic amines at the N-terminus or the side chain of lysine (Figure 4). MS/MS of peptides labeled with the iTRAQ reagent gives unique fragment ions of 114, 115, 116 or 117 atomic mass units (amu). It should be noted that relative quantification requires that CID produces the reporter fragment ions in a quantitatively reproducible manner proportional to their amounts and that there is no overlap with other ions at the specified m/z values. An advantage of this method is further that CID spectra of labeled peptides, shown to be up- or down-regulated, can be obtained at higher collision energies for subsequent identification by database searching¹⁵⁰.

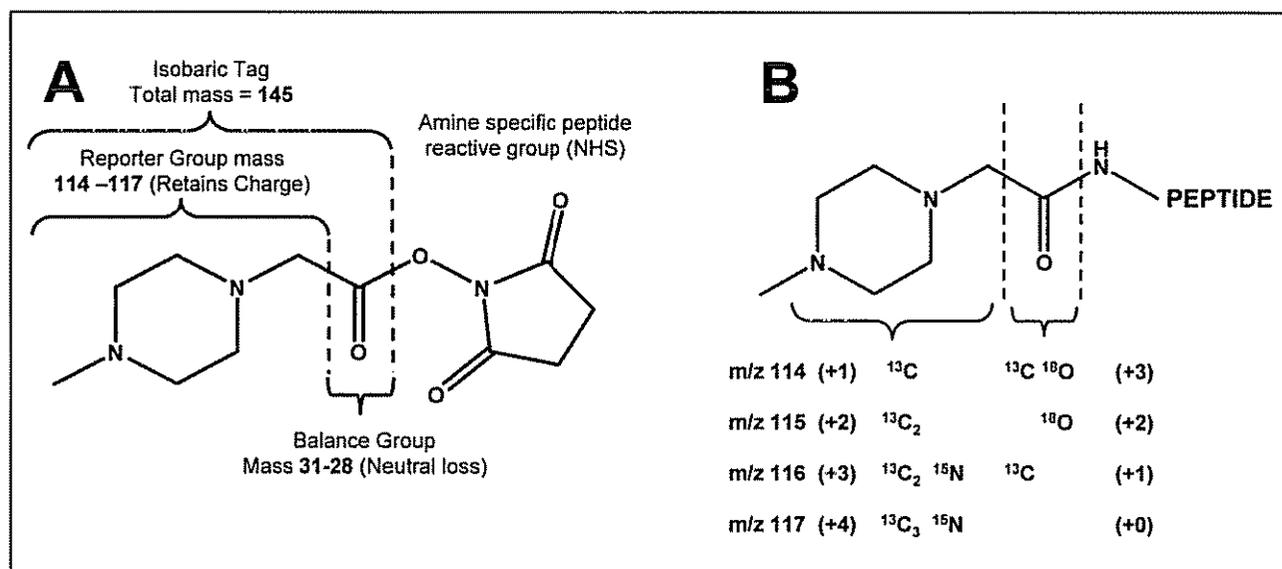


Figure 4. Composition of multiplexed isobaric tagging iTRAQ[®] reagents (A) Shows the main parts of the compound, which contains an *N*-methylpiperazine reporter a neutral carbonyl balance group and an *N*-hydroxysuccinimide ester reactive towards primary amines. (B) Shows the charged reporter and the neutral balance groups that contain different isotopes of ^{12}C , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{16}O , ^{18}O such that the combined mass remains constant (145.1 Da) but produce fragments of different mass upon collision-induced dissociation (reprinted from P. L. Ross *et al.*, *Mol. Cell. Proteomics* 3 (12) (2004) 1154-1169. Copyright 2004 The American Society for Biochemistry and Molecular Biology)

Surface enhanced laser desorption ionization-time of flight (SELDI-TOF) mass spectrometry

The SELDI-TOF approach has found widespread use for biomarker discovery, since it is simple to realize and enables fast screening of large numbers of samples. SELDI-TOF combines sample preparation on protein chips with mass spectrometric analysis. The core of the method is a chip containing different surfaces able to retain different subsets of proteins from complex biological samples. Sample preparation consists of spotting the sample on the chip and subsequent washing to remove non-absorbed proteins and peptides. Subsequently the chip is placed directly in the mass spectrometer and analyzed by laser desorption ionization. The SELDI interface can be adapted to other kinds of mass spectrometers than TOF-MS to allow MS/MS (e.g. MALDI-TOF/TOF), MALDI-Q/TOF or MALDI/Q/FT). A change in signal intensity of a given peak indicates that the amount of a certain protein or peptide has changed and the nature of that protein may be determined by using the knowledge of the nature of the chip surface and performing an analogous "large-scale" purification. For comparisons between samples it is pivotal that the batch-to-batch reproducibility of the chip surface is very high, since slight differences can affect the relative ionization efficiency of the deposited proteins and peptides. SELDI-TOF has found widespread application in clinical studies related to the early detection of ovarian cancer, prostate cancer, breast cancer and astrocytoma¹⁵²⁻⁵⁵¹ but has recently been criticized for lack of reproducibility¹⁵⁶⁻⁵⁷¹.

Data analysis

The aim of data processing and statistical analysis is to find the best discrimination between the effects that are intended to be monitored by the biomarkers, for example, patients at different stages of disease and healthy controls. Data analysis aids also in development and validation of the entire analytical procedure in terms of reproducibility and evaluates the capability to detect differences.

The crude data obtained by comprehensive profiling proteomics approaches (e.g. LC-ESI-MS, LC-MALDI-TOF-MS) contain large amounts of data points which can attain several hundred megabytes per analysis depending on the resolution and scan speed of the mass spectrometer used for acquisition, thus containing several hundred thousand or millions of data points. Generally interesting features (e.g. isotopic mass, peak intensities and area) related to potential biomarkers are often small and well hidden in this large dataset. These features cannot be recognised by visual inspection and require robust and

reliable automated approaches to assist analytical chemists in detecting statistically significant patterns. Significant reduction in complexity of this large dataset is also essential, since the number of data points (variables) describing each sample is much higher than the total number of analyzed samples¹⁵⁶¹. This so-called high dimension, low sample size problem presents a major challenge for proper data analysis. To obtain reliable results from the statistical analysis, the parameters of the analytical method should ideally be evaluated by factorial experimental design and the analyzed samples should be randomized at each step of the analytical procedure.

The first task of data analysis is data preprocessing in order to remove or correct all artefacts present within the dataset. These artefacts can be manifested by extreme data points or outliers like negative and positive spikes, noise and missing or shifted data points (e.g. caused by the centroid sampling mode of mass spectra). Comparison of multiple samples by regular statistical techniques often require the alignment of the dataset of the individual samples. Reduction of the number of data points along the m/z axis by binning is also helpful to overcome small variations and to reduce the number of data points. In an LC-MS dataset especially the retention times and mass intensities are prone to variation caused by experimental parameters. In this case retention time alignment (Correlation Optimized Warping¹⁵⁹⁻⁶⁰¹, Dynamic Time Warping¹⁶⁰⁻⁶¹¹, Parametric Time Warping¹⁶²¹) and normalisation are a prerequisite. The visualisation of aligned datasets by image plots, overlaid Total Ion Current (TIC) or Base Peak Chromatogram (BPC) chromatograms can give essential information on their quality and help in further evaluation. Considering the high resolution of most modern mass analyzers and the fact that ElectroSpray Ionization (ESI) generates multiply-charged ions from the same analyte, deisotoping and charge state reduction should be part of data preprocessing. These operations also help to reduce the complexity of the datasets. Some authors use ranking algorithms like the Component Detection Algorithms (CODA) and derivatives thereof to evaluate the information quality of each m/z trace and to further reduce the size of the datasets. CODA ranks m/z selected chromatograms based on a calculated difference between the raw data and its smoothed counterpart¹⁶³¹. However, this type of algorithms works best for high- and medium-abundant components but may gloss over minor compounds unless a very low threshold is specified at the risk of carrying spurious m/z traces into the statistical analysis. Data preprocessing usually generates a peak list containing information about retention time, peak intensity and peak area. An often encountered difficulty is

to define an optimal threshold for peak detection in order to select only the most important information related to real compounds present in the analyzed samples.

The obtained peak list is submitted to multivariate data analysis to discriminate the different groups of datasets. The most often used multivariate data analysis to evaluate LC-MS datasets are pattern recognition (e.g. principal component analysis, clustering methods), predictive modelling approaches (e.g. principal component regression, neural network), classification or variable selection methods (e.g. principal component discriminant analysis, partial least squares discriminant analysis)^{15-64, 65}. The resulting statistical model should be evaluated by estimating the generalization error by cross-validation, permutation tests or other resampling-based methods¹⁶⁶⁻⁶⁷.

Biomarkers or biomarker patterns that result from such analyses require further validation as to their biological and clinical relevance. To do so, it is often better to move from a rather complex discovery analytical platform to an easily automated high-throughput method like an immunoassay to analyze sufficiently large numbers of samples to improve the statistical confidence and to define and adjust threshold concentrations.

Final remarks

Biomarker discovery requires the combined efforts of medical, analytical and data sciences. In this review we have tried to highlight recent advances in analytical sciences and the relevance of powerful data mining tools for the comprehensive comparative analysis of body fluids like serum. Next to the importance of improving each step in the complex chain from patient sample to data, significant efforts need to be made to arrive at an optimal design of the whole procedure. Arguably, there is still no method able to explore the entire set of proteins and peptides in terms of diversity and concentration range. The actual systems perform well to detect differences for high- and medium-abundant components but future research has to focus to improve performance for lower abundant components, which likely contain the disease-specific biomarkers.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Dr. Theo Reijmers (Groningen Bioinformatics Institute) for helpful discussions and suggestions concerning the data analysis section. The Department of Analytical Biochemistry is part of the Netherlands Proteomics Centre. The presented work is partially funded by the Dutch Cancer Society (KWF).

REFERENCES

- (1) Biomarkers Definition Working Group, *Clin. Pharmacol. Ther.* 69 (2001) 89-95.
- (2) E. Stein, *Am. J. Cardiol.* 87(Suppl.) (2001) 21A-26A.
- (3) V. Murthy, A. Karmen, *J. Clin. Lab. Anal.* 11(3) (1997) 125-128.
- (4) Y. Imafuku, G. S. Omenn, S. Hanash, *Dis. Markers* 20 (2004) 149-153.
- (5) M. C. Wiener, J. R. Sachs, E. G. Deyanova, N. A. Yates, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6085-6096.
- (6) S. M. Roy, M. Anderle, H. Lin, Ch H. Becker, *Int. J. of Mass Spec.* 238 (2004) 163-171.
- (7) G. S. Omenn, *Proteomics* 4(5) (2004) 1235-1240.
- (8) N. L. Anderson, N. G. Anderson, *Moll. Cell. Proteomics* 1 (2002) 845-867.
- (9) N. I. Govorukhina, A. Keizer-Gunnink, A. G. J. van der Zee, S. de Jong, H. W. A. de Bruijn, R. Bischoff, *J. Chromatogr. A* 1009 (2003) 171-178.
- (10) H. M. Georgiou, G. E. Rice, M. S. Baker, *Proteomics* 1 (2001) 1503-1506.
- (11) A. Kassab, H. Yavuz, M. Odabasi, A. Denizli, *J. Chromatogr. B* 746 (2000) 123-132.
- (12) K. Nakamura, T. Suzuki, T. Kamichika, M. Hasegawa, Y. Kato, H. Sasaki, K. Inouye *J. Chromatogr. A* 972 (2002) 21-25.
- (13) Y. Y. Wang, P. C. Cheng, D. W. Chan, *Proteomics* 3 (2003) 243-248.
- (14) K. Björhall, T. Miliotis, P. Davidsson, *Proteomics* 5 (2005) 307-317.
- (15) Celis, J. E. and P. Gromov, *Curr Opin Biotechnol.* 10(1) (1999) 16-21.
- (16) R. Bischoff, T. M. Luider, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 27-40.
- (17) H. Liu, D. Lin, J. R. Yates, *Biotechniques* 32(4) (2002) 898, 900, 902.
- (18) E. Machtejevas, H. John, K. Wagner, L. Standker, G. Marko-Varga, W. G. Forssmann, R. Bischoff, K. K. Unger, *J. Chromatogr. B* 803 (2004) 121-130.
- (19) W. H. McDonald, J. R. Yates, *Dis. Markers* 18 (2002) 99-105.
- (20) K. Wagner, T. Miliotis, G. Marko-Varga, R. Bischoff, K. K. Unger, *Anal. Chem.* 74 (2002) 809-820.
- (21) D. A. Wolters, M. P. Washburn, J. R. Yates, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5683-5690.
- (22) H. J. Issaq, K. C. Chan, G. M. Janini, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 35-47.
- (23) M. P. Washburn, D. Wolters, J. R. Yates, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 242-247.
- (24) P. Schulz-Knappe, H. D. Zucht, G. Heine, M. Jurgens, R. Hess, M. Schrader, *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* 4(2) (2001) 207-217.

- (25) K S Boos, C H Grimm, *Trends Anal Chem*. 18(3) (1999) 175-180
- (26) J S Mellois, J W Jorgenson, *Anal. Chem*. 76(18) (2004) 5441-5450
- (27) Y. Shen, R. Zhao, M. E. Belov, T. P. Conrads, G. A. Anderson, K. Tang, L. Pa_a-Toli_, T. D. Veenstra, M. S. Lipton, H. R. Udseth, R. D. Smith, *Anal. Chem* 73 (2001) 1766-1775
- (28) L. Tolley, J W Jorgenson, M. A. Moseley, *Anal Chem*. 73 (2001) 2985-2991.
- (29) B Barros, D. Lubda, R. Bischoff, *J Prot Res*. 2 (2003) 633-642.
- (30) F. C. Leinweber, D. G. Schmid, D. Lubda, K. H. Wiesmüller, G. Jung, U. Tallarek, *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 17 (2003) 1180-1188
- (31) F. C. Leinweber, Dietmar G. Schmid, D. Lubda, B. Sontheimer, G. Jung, U. Tallarek, *Mass Spectrom*. 39 (2004) 223-225.
- (32) H. Kimura, T. Tanigawa, H. Morisaka, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, M. Ueda, K. Cabrera, N. Tanaka, *J Sep. Sci* 27 (2004) 897-904.
- (33) S. Wienkoop, M. Glinski, N. Tanaka, V. Tolstikov, O. Fiehn, W. Weckwerth, *Rapid Commun. Mass Spectrom* 18 (2004) 643-650.
- (34) W. Walcher, H. Toll, A. Ingendoh, C. G. Huber, *J. Chromatog A* 1053(1-2) (2004) 107-117
- (35) A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A. M. Timperio, L. Zolla, J. P. Chervet, N. Cavusoglu, A. van Dorselaer, C. G. Huber, *Anal Chem*. 73(11) (2001) 2390-2396.
- (36) T. P. Hennessy, R. I. Boysen, M. I. Huber, K. K. Unger, M. T. Hearn, *J Chromatog A* 1009(1-2) (2003) 15-28.
- (37) M. Heller, H. Mattou, C. Menzel, X. Yao, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 14(7) (2003) 704-718.
- (38) S. E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *J Proteome Res*. 2 (2003) 173-181.
- (39) S. Martinovic, T. D. Veenstra, G. A. Anderson, L. Pasa-Tolic, R. D. Smith, *J Mass Spectrom*. 37 (2002) 99-107.
- (40) N. Ibarrola, H. Molina, A. Iwahori, A. Pandey, *J Biol Chem*. 279 (2004) 15805-15813.
- (41) S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol Cell Proteomics* 1 (2002) 376-386.
- (42) Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, B. T. Chait, *Proc. Nat. Acad. Sci*. 96 (1999) 6591-6596.
- (43) J. Krijgsveld, R. F. Ketting, T. Mahmoudi, J. Johansen, M. Artal-Sanz, C. P. Verrijzer, R. H. Plasterk, A. J. Heck, *Nat. Biotechnol* 21(8) (2003) 927-931.
- (44) S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol*. 17 (1999) 994-999.
- (45) D. K. Han, J. Eng, H. Zhou, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol*. 19 (2001) 946-951
- (46) K. C. Hansen, G. Schmitt-Ulms, R. J. Chalkley, H. Hirsch, M. A. Baldwin, A. L. Burlingame, *Mol Cell Proteomics* 2 (2003) 299-314
- (47) A. Leitner, W. Lindner, *J. Chromatogr B* 813(1-2) (2004) 1-26.
- (48) E. M. Tam, C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack, C. M. Overall, *PNAS* 101 (2004) 6917-6922.
- (49) R. Zhang, F. E. Regnier, *J. Proteome Res*. 1(2) (2002) 139-147
- (50) P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin, *Mol. Cell Proteomics* 3(12) (2004) 1154-1169.
- (51) M. Heller, H. Mattou, C. Menzel, X. Yao, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 14 (2003) 704-718.
- (52) A. M. Ardekani, L. A. Liotta, E. F. Petricoin, III, *Expert Rev Mol Diagn* 2 (2002) 312-320
- (53) D. Carter, J. F. Douglass, C. D. Cornellison, M. W. Retter, J. C. Johnson, A. A. Bennington, T. P. Fleming, S. G. Reed, R. L. Houghton, D. L. Diamond, T. S. Vedvick, *Biochemistry* 41 (2002) 6714-6722.
- (54) A. Wellmann, V. Wollscheid, H. Lu, Z. L. Ma, P. Albers, K. Schutze, V. Rohde, P. Behrens, S. Dreschers, Y. Ko, N. Wernert, *Int. J Mol Med* 9 (2002) 341-347.
- (55) E. F. Petricoin, A. M. Ardekani, B. A. Hitt, P. J. Levine, V. A. Fusaro, S. M. Steinberg, G. B. Mills, C. Simone, D. A. Fishman, E. C. Kohn, L. A. Liotta, *Lancet* 359 (2002) 572-577.
- (56) E. P. Diamandis, *Expert Rev Mol Diagn*. 4 (2004) 575-577.
- (57) E. P. Diamandis, *Nature* 430 (2004) 611.
- (58) M. Hilario, A. Kalousis, J. Prados, P. A. Binz, *Biosilico* 2 (2004) 214-222.
- (59) N. P. V. Nielsen, J. M. Carstensen, J. Smedsgaard, *J. Chromatogr. A* 805 (1998) 17-35.
- (60) V. Pravdova, B. Walczak, D. L. Massart, *Anal Chim Acta* 456 (2002) 77-92
- (61) A. Kassidas, J. F. MacGregor, P. A. Taylor, *AIChE J*. 44 (1998) 864-875.
- (62) P. H. C. Eilers, *Anal. Chem*. 76 (2004) 404-411.
- (63) W. Windig, J. M. Phalp, A. W. Payne, *Anal. Chem*. 68 (1996) 3602-3606.
- (64) W. S. Liggett, P. E. Barker, O. J. Semmes, L. H. Cazares, *Disease Markers* 20 (2004) 295-307.
- (65) J. Listgarten, A. Emili, *Mol. Cell. Proteomics* 4 (2005) 435-440
- (66) L. Li, H. Tang, Z. Wu, J. Gong, M. Gruidl, J. Zou, M. Tockman, R. A. Clark, *Artif. Intell. Med*. 32(2) (2004) 71-83.
- (67) J. Ludbrook, *Aust N.-Z. J. Surg* 65(11) (1995) 812-819.

Microextracción en fase sólida: Aplicación al análisis de pesticidas

Javier Hernández Borges, Miguel Ángel Rodríguez Delgado, Francisco J. García Montelongo
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Universidad de La Laguna, 38071, La Laguna, Tenerife
Trabajo aceptado el 10 de Diciembre de 2004

Desde su desarrollo a comienzos de los años 90, la microextracción en fase sólida (*solid phase microextraction, SPME*) ha sido cada vez más utilizada para el análisis de multitud de compuestos en diferentes matrices, dado que representa un valioso avance en uno de los pasos fundamentales del proceso analítico como es la preparación de muestras. Variantes de la técnica como la denominada extracción sobre barra agitadora (*stir bar sorptive extraction, SBSE*) o extracción dinámica en fase sólida (*solid phase dynamic extraction, SPDE*) han mejorado su aplicación a distintos tipos de muestras. En lo que al análisis de pesticidas se refiere, la necesidad de desarrollar metodologías analíticas cada vez más rápidas y compatibles con el medio ambiente ha hecho de la SPME una técnica cada vez más utilizada, sobre todo acoplada a cromatografía de gases (GC), técnica analítica con la que más se utiliza actualmente. Sin embargo, el desarrollo de variantes como la *in-tube* SPME ha permitido además su acoplamiento *on-line* con los cromatógrafos de líquidos. También se ha acoplado a la electroforesis capilar, aunque dicho acoplamiento es todavía una asignatura pendiente, al menos desde el punto de vista comercial. Sin embargo, esto no ha impedido el desarrollo de metodologías de análisis de pesticidas que combinan ambas técnicas y en las que la SPME se lleva a cabo en el modo *off-line*. El presente artículo pretende ser a la vez una introducción y una guía al uso de esta técnica en el análisis de pesticidas, mostrando algunos de los trabajos más relevantes recientemente publicados.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, cerca de 300.000 toneladas de pesticidas se utilizan cada año en Europa. Muchos de ellos presentan una alta toxicidad así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que les convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Han podido detectarse residuos de pesticidas en alimentos, aguas, suelos, fluidos biológicos, etc. y en lugares tan remotos como la Antártida o el Ártico. En la mayoría de las técnicas analíticas actuales, más del 80% del tiempo de análisis se invierte en la toma y pretratamiento de la muestra. Pretratamiento que, por otro lado, es imprescindible en la actualidad dado que son pocas las muestras que pueden

ser analizadas directamente. La SPME constituye una técnica de pretratamiento de muestras bastante utilizada en la actualidad. Desarrollada en 1990 por Pawliszyn^(1,2) para el análisis de compuestos orgánicos volátiles, se ha convertido en una técnica rutinaria en muchos laboratorios. Desde su aparición, la SPME ha jugado un papel importante en el análisis medioambiental y, dentro de éste, en el análisis de pesticidas. Las primeras aplicaciones de la SPME al análisis de estos compuestos fueron llevadas a cabo en 1994^(3,4). Desde entonces su uso se ha extendido a una gran variedad de matrices; prueba de ello es la gran cantidad de bibliografía existente al respecto⁽⁵⁻⁷⁾. La aplicación de la SPME al análisis de cualquier compuesto requiere conocer bien la técnica: los tipos de fibras, los distintos factores que afectan a la misma, así como su posible acoplamiento a los diferentes instrumentos de análisis existentes o automatización. Se ha utilizado en análisis clínico, forense, alimentario, medioambiental, biomédico, etc. con gran éxito, aunque su área de aplicación por excelencia sigue siendo el análisis medioambiental.

2. PRINCIPIO Y MODO DE TRABAJO

La SPME utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material sorbente, que es en general un recubrimiento polimérico, que se utiliza para la extracción de compuestos orgánicos y/o inorgánicos volátiles derivados del mercurio, arsénico, etc. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco, de tal forma que ésta puede retraerse y sacarse de su interior, quedando así expuesta a la muestra. Su uso implica dos etapas bien diferenciadas: por un lado la etapa de extracción, que puede llevarse a cabo sumergiendo directamente la fibra en el interior de una disolución (*direct immersion, DI-SPME*), o bien, manteniéndola en el espacio en cabeza que está en equilibrio con la disolución (*headspace-SPME, HS-SPME*); y, por otro lado, la etapa de desorción que se puede hacer térmicamente (en el inyector de un cromatógrafo de gases), o bien, utilizando disolventes orgánicos (bien sea acoplado con un cromatógrafo de líquidos, o bien se trate de una desorción manual con disolventes orgánicos *off-line*) en función de la afinidad que los analitos tengan por la fibra. Los analitos pueden, por lo tanto, extraerse tanto

de líquidos ⁽⁸⁾ como de gases ⁽¹⁰⁾. Además, también se ha descrito la extracción de compuestos volátiles de sólidos, mediante el modo HS-SPME ⁽¹¹⁾.

La SPME presenta diversas ventajas frente a técnicas más rutinarias como la extracción líquido-líquido (liquid-liquid extraction, LLE) o la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE). En primer lugar puede utilizarse como técnica de muestreo *in situ*, e integra extracción y preconcentración en un solo paso. Su aplicación es bastante sencilla, relativamente barata y permite utilizar menores cantidades de disolventes orgánicos que las utilizadas en técnicas como la LLE o la SPE convencionales, simplificando así la etapa de preparación de muestra. Dado que la muestra es preconcentrada en la propia fibra, los límites de detección pueden ser bastante bajos, aunque, en general, la SPE proporciona factores de preconcentración mayores.

3. TIPOS DE FIBRAS

Varios son los tipos de fibras actualmente comercializadas lo que hace que el campo de aplicación de la SPME sea amplio. Las primeras fibras comercializadas, creadas para trabajar con GC, fueron las de polidimetilsiloxano (PDMS) -adecuadas para analitos apolares- y las de poliacrilato (PA) -apropiadas para analitos polares-. Posteriormente surgieron las fibras que combinan divinilbenceno (DVB), carboxen (carbono activo), carbowax (polietilenglicol) y resina templada (TPR) como son las de PDMS/DVB, CW/TPR, CW/DVB, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS. La elección del tipo de fibra depende de la naturaleza físico-química del compuesto a extraer. Todas ellas se comercializan con distinto espesor, tal y como se indica en la Tabla 1 (en la que también aparecen algunas de las familias de pesticidas a las que se ha aplicado cada tipo de fibra). La gran mayoría de las fibras comercializadas puede utilizarse en combinación con GC (desorción térmica) y, en menor número, con HPLC (desorción con disolventes). En las fibras de PDMS y de PA, dado que el recubrimiento es un líquido muy viscoso, la extracción de los analitos se debe principalmente a un proceso de absorción, mientras que en las otras, en las que la fase estacionaria es un sólido poroso, la extracción se debe principalmente a un proceso de adsorción ⁽¹²⁾, aunque en la práctica compiten ambos efectos. A la hora de seleccionar la fibra, hay que tener en cuenta además que ciertos compuestos pueden ser retenidos irreversiblemente sobre la misma. Una descripción extensa de los equilibrios cinético y termodinámico en SPME puede encontrarse en ⁽²⁾.

En general, en GC, los compuestos volátiles requieren fibras con un recubrimiento de mayor espesor, mientras

para compuestos semivolátiles resulta efectivo el uso de fibras con un recubrimiento más delgado. Hay que tener en cuenta que cuanto mayor es el espesor de la fibra, mayor es el tiempo de extracción, aunque también es cierto que mayor es la cantidad de analito extraído, pero también el riesgo de retención irreversible de otros compuestos presentes en la matriz. La Figura 1 muestra las propiedades de algunas de las fibras actualmente comercializadas. Antes de utilizar estas fibras, es preciso acondicionarlas tal y como indican los suministradores. Si la desorción es térmica, la activación se realiza introduciendo la fibra en el inyector de cromatógrafo de gases siguiendo un programa de temperaturas adecuado que viene especificado para cada fibra por el propio fabricante. Si por el contrario se utilizan disolventes orgánicos (LC o desorción manual), el acondicionamiento puede hacerse sumergiendo la fibra en un disolvente orgánico apropiado (que suele ser el mismo disolvente de desorción) durante un cierto tiempo (entre 20-30 minutos).

Los fabricantes suelen indicar que las fibras utilizadas en HS-SPME-GC tienen una vida media de 50 extracciones, aunque en la práctica puede comprobarse que este número puede ser mayor (dependiendo de la naturaleza de la matriz de la muestra). Cuando se trabaja en el modo DI-SPME, la vida media de la fibra es menor y además los porcentajes de recuperación suelen ser menores, debido a la adsorción de componentes de la matriz sobre la fibra. Cuando se trata de muestras muy viscosas (incluso diluidas) los fabricantes recomiendan un lavado rápido del exterior de la fibra con agua para eliminar la muestra directamente adherida a la misma.

Un factor de gran importancia en las aplicaciones futuras de la SPME radica en el desarrollo de nuevos recubrimientos. Cuando se intentan desarrollar nuevos tipos de recubrimientos en SPME hay que tener en cuenta diversos aspectos. En primer lugar, la polaridad de los analitos que se quiere extraer y la del recubrimiento debe ser similar. Dicho recubrimiento debe ser además resistente a condiciones físicas y químicas extremas, como altas temperaturas, alto contenido en sales, presencia de disolventes orgánicos, pHs extremos, etc. (ver apartado 4) para asegurar que es suficientemente estable y que la reproducibilidad es suficientemente buena. Recientemente, Mullett y Pawliszyn ⁽¹³⁾ han recopilado los avances llevados a cabo hasta el momento en relación con el desarrollo de recubrimientos selectivos y biocompatibles para SPME. Estos nuevos recubrimientos incluyen fases del tipo alquil-diol-sílice (ADS) ⁽¹⁴⁾, polisilicona fullereno (C60) ⁽¹⁵⁾, fibras de sílice porosa (C18) ⁽¹⁶⁾, poli(3-metiltilfeno) ⁽¹⁷⁾, fibras combinación de grupos hexafluorobisfenol con oligo-PDMS, BSP3 ⁽¹⁸⁾, polímeros de huella mole-

cular (MIP)^(19,20), inmunoadsorbentes⁽²¹⁾, polímeros de polipirrol (PPY)⁽²²⁾, etc. aún no comercializados, que contribuyen a desarrollar aún más las posibles aplicaciones de la técnica⁽²³⁾. Hay que tener en cuenta que la variedad de fibras actualmente existente, junto con estos nuevos recubrimientos, pueden, en un determinado momento, dificultar la elección de la fibra.

Inmovilizar nuevos recubrimientos poliméricos sobre la fibra de sílice fundida a través de procedimientos convencionales es una tarea bastante complicada. Con este tipo de procedimientos, la estabilidad térmica de estos recubrimientos es menor, al igual que frente a un disolvente, lo que hace que en ambos casos la recuperación sea baja y que no sea factible su acoplamiento con GC o HPLC. Una de las deficiencias de las fibras inicialmente comercializadas, así como las de estos nuevos recubrimientos, era la baja reproducibilidad entre lotes que presentaban. Esta baja reproducibilidad estaba asociada al hecho de que las fibras estaban hechas a partir de polímeros lineales que presentaban un amplio rango de distribución de pesos moleculares, responsable de la variación de sus propiedades físicas⁽²⁴⁾. La tecnología sol-gel ha permitido solventar ambos problemas, permitiendo una adecuada y duradera incorporación de compuestos orgánicos a estructuras inorgánicas poliméricas. Esta tecnología se ha utilizado para obtener recubrimientos de polifenilmethylsiloxano (PPMS) y polimetilsiloxano (PMS)⁽²⁵⁾, polietilenglicol⁽²⁶⁾, PDMS⁽²⁷⁾, éteres corona⁽²⁸⁾ etc. Además, diversas publicaciones recientes han sustituido estos polímeros lineales por dendrímeros utilizando la tecnología sol-gel^(29,30). Los dendrímeros han sido anteriormente utilizados como fases pseudo-estacionarias en cromatografía electrocinética (*electrokinetic chromatography*, EKC)⁽³¹⁾, como fases estacionarias ancladas en electrocromatografía capilar (*capillary electrochromatography*, CEC)⁽³²⁾, como fases estacionarias en GC⁽³³⁾, etc. y su uso como recubrimientos de las fibras está empezando a dar resultados satisfactorios.

4. FACTORES EXPERIMENTALES IMPORTANTES EN SPME

Muchos son los factores que influyen en el proceso de extracción y desorción de esta técnica, tanto en el modo de inmersión directa como en el modo de espacio en cabeza. Su conocimiento es fundamental para cualquiera que haga uso de la misma.

Tiempo de extracción y de desorción

Los tiempos de extracción y de desorción son dos variables importantes que deben ser controlados de forma

rigurosa para que la reproducibilidad de la técnica sea buena. De manera general, tanto la eficacia de la extracción como de la desorción aumentan con el tiempo. En lo que a la extracción se refiere, llega un momento en el que ésta es máxima (tiempo de equilibrio) y no se extrae más analito (Figura 2). Estos tiempos de equilibrio pueden llegar a ser largos, sin embargo, no es necesario trabajar con tiempos tan largos siendo posible trabajar en condiciones de no equilibrio, en cuyo caso se debe controlar rigurosamente el tiempo de extracción, dado que pequeñas variaciones en el mismo pueden provocar variaciones importantes en el porcentaje de analito extraído. En la bibliografía se comprueba que normalmente los tiempos de extracción varían entre unos pocos minutos hasta varias horas⁽³⁴⁻³⁶⁾. Los de desorción son más cortos (en general, inferiores a 30 minutos). El tiempo de desorción es igualmente una variable crítica y debe seleccionarse de manera que se asegure que no quede analito alguno en la fibra.

Volumen de muestra

De manera general, la cantidad de analito retenido por la fibra aumenta al hacerlo el volumen de muestra, con el consiguiente aumento de sensibilidad. Ahora bien, la cantidad de analito extraída es solamente una fracción del total, que depende del coeficiente de reparto del analito entre la muestra y la fibra. Estos coeficientes deben tenerse en consideración a la hora de fijar el volumen de la muestra a extraer. Además, hay que tener en cuenta que el efecto matriz puede ser importante, sobre todo en el modo DI-SPME.

Espacio en cabeza

Cuando se opera en el modo HS-SPME, cuanto menor es dicho espacio mayor es la sensibilidad. En general se recomienda que esté comprendido entre un 30 y un 50% del vial, aunque dicho volumen puede ser mayor cuando se trata de muestras más concentradas. Es importante también mantener constante tanto el volumen de la muestra como el del espacio en cabeza, para garantizar una buena reproducibilidad. Además, y también con este fin, la fibra debe mantenerse siempre a la misma altura dentro del vial.

pH

El pH puede ser también una variable importante en SPME, influyendo tanto en la eficacia como en la selectividad de la extracción. Aunque para pesticidas neutros el pH no es una variable importante⁽³⁷⁾, para pesticidas ionizables, sobre todo para los ácidos⁽³⁸⁾ o los derivados de los clorofenoles⁽³⁹⁾, el pH debe ser ajustado antes de la

extracción. Así, con fibras en las que la extracción de los analitos se debe principalmente a un proceso de absorción (PDMS y PA) sólo la forma neutra será extraída. Es preciso prestar especial atención cuando se utilizan pHs extremos dado que estos pueden dañar la fibra. A modo de ejemplo, cabe mencionar que la fibra Carbowax-DVB no debe usarse a un pH superior a 9.

Fuerza iónica

Normalmente se añade a la muestra una sal con objeto de disminuir la solubilidad de los analitos en la misma y favorecer el paso de estos hacia la fibra. Este efecto de "salting-out", bien conocido en técnicas como la LLE, afecta a cada compuesto de forma específica. Las sales más utilizadas en SPME con este fin son el cloruro sódico, bicarbonato sódico, carbonato potásico y el sulfato amónico. Sin embargo, el uso de altos contenidos salinos es más recomendable para la HS-SPME dado que en DI-SPME una alta concentración de sales puede provocar la deposición de éstas sobre la fibra, dañándola y disminuyendo así la eficacia de la extracción con el tiempo.

Agitación

En general, la agitación acelera la transferencia de los analitos hacia la fibra, sobre todo en HS-SPME. Cuando se trata de matrices líquidas, compensa los bajos coeficientes de difusión propios de las mismas. El tiempo de equilibrio disminuye al aumentar la velocidad de agitación, pero una agitación muy rápida puede provocar falta de reproducibilidad y de precisión e incluso no permitir que los compuestos queden retenidos. Cuando se trabaja en el modo off-line, se suele utilizar una agitación magnética. Algunos autores han empleado también la agitación por ultrasonidos⁽³⁶⁾, pero en este caso hay que tener cuidado dado que el calentamiento producido podría degradar ciertos compuestos y además, si se sumerge directamente la fibra en la muestra sonicada podría desprenderse parte de la fase estacionaria (es preciso utilizar bajas frecuencias). Aparte de estos, también se han utilizado los movimientos de la fibra (sobre todo automatizada en GC)⁽⁴⁰⁾ o del vial como medios de agitación⁽¹³⁾.

Temperatura

La temperatura tiene efectos contrapuestos sobre la extracción. Por un lado, un aumento de la misma provoca un incremento de los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra, aumentando así la cantidad de analito extraído y disminuyendo el tiempo de extracción. Este efecto puede ser mayor cuando se opera en el modo HS-SPME puesto que al aumentar la temperatura aumenta la

cantidad de analito (volátil) presente en el espacio en cabeza. Hay que tener en cuenta además, que si la muestra es acuosa, un incremento de la temperatura aumenta la cantidad de agua presente en el espacio en cabeza, interfiriendo ésta en la extracción. Se ha podido comprobar que una humedad relativa del 90% puede reducir la extracción en torno a un 10%⁽⁴¹⁾. Por otro lado, un aumento de la temperatura favorece la desorción de los analitos, con lo que es preciso mantener una situación de compromiso y buscar un valor óptimo que minimice este último. En principio, es recomendable calentar ligeramente la muestra y estudiar la influencia de la temperatura⁽⁴²⁾.

Disolvente de desorción

Cuando se lleva a cabo la desorción utilizando un disolvente orgánico es preciso seleccionar el disolvente adecuado y la cantidad del mismo, que puede ser muy pequeña (100-200 µl). Dado que no todas las fibras son compatibles con los disolventes orgánicos (ver Tabla 1) este modo de operación no es aplicable en todos los casos.

Adición de disolventes o de medios micelares

Hasta ahora, la extracción por SPME de una muestra acuosa a la que se le ha añadido un disolvente orgánico no ha sido muy estudiada pero, en general, puede deducirse que la cantidad de analito extraído disminuye con la cantidad de disolvente añadida^(43,44). Sin embargo, en ciertos casos ha podido también apreciarse el efecto contrario^(45,46), sobre todo cuando se trata de muestras sólidas como lodos o suelos dado que el disolvente mejora la difusión de los analitos hacia la fibra o bien porque se producen cambios en la interacción fibra-analito. En estos últimos casos, en los que la extracción se ve incrementada, el porcentaje de disolvente añadido suele ser pequeño (inferior a un 5%). Recientemente se ha estudiado también la influencia de la adición de medios micelares a muestras acuosas sobre la extracción⁽⁴⁷⁾ y se ha comprobado que estos medios provocan descensos exponenciales de los rendimientos de las extracciones.

Estrategias de optimización

El hecho de que todos los factores anteriores influyan sobre la extracción y desorción de los analitos hace necesaria una adecuada y cuidadosa estrategia de optimización. En la bibliografía se observa que, de manera general, la optimización se lleva a cabo paso a paso, variando un solo factor y tomando como función respuesta las áreas de cada analito (aunque es preferible calcular los porcentajes de extracción). A pesar de esta tendencia

Tabla 1. Tipos de fibras de SPME actualmente comercializadas

Tipo de fibra	Espesor (μm)	Posible uso	Algunas familias de pesticidas para cuyo análisis se han utilizado
PDMS	7, 30, 100	GC y HPLC	Amidas, Carbamatos, Cloroacetamidas, Piridazinonas, Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
PDMS/DVB	60, 65	GC y HPLC (60 μm)	Amidas, Cloroacetamidas, Fenilureas, Piridazinonas, Tiocarbamatos, Triazinas
DVB/CAR/PDMS	50/30	GC	Triazinas
CAR/PDMS	75, 85	GC	Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
PA	85	GC y HPLC	Amidas, Carbamatos, Cloroacetamidas, Dinitroanilinas, Fenilureas, Organofosforados, Tiocarbamatos, Triazinas, Uracilos
CW/DVB	65, 70	GC	Amidas, Cloroacetamidas, Piridazinonas, Tiocarbamatos, Triazinas
CW/TPR	50	HPLC	Triazinas

mayoritaria, también se han utilizado con bastante éxito técnicas quimiométricas, como el diseño experimental^(34,48,49) o las redes neuronales artificiales (*artificial neural networks*, ANNs)⁽³⁵⁾ que permiten que el número de experiencias necesarias para la optimización sea menor

5. ACOMPLAMIENTO DE LA SPME A HPLC Y CE

El acoplamiento *on-line* de la SPME con un cromatógrafo de gases es bastante conocido y utilizado y, quizás, no lo es tanto para otras técnicas como el HPLC o la CE. La denominada *in-tube* SPME fue introducida también por Pawlizsyn⁽⁵⁰⁾ permitiendo el acoplamiento *on-line* de esta técnica con un cromatógrafo de líquidos. En este caso, la retención de los analitos y su posterior desorción se realizan en el interior de un capilar de GC o micro-LC (existe una gran variedad de capilares con fases estacionarias distintas que pueden ser utilizadas en *in-tube*

SPME) de longitud variable (50-60 cm suelen dar buenos resultados) situado antes de la inyección. La muestra es introducida en el capilar recubierto con la fase estacionaria por aspiración desde el vial que la contiene, de manera que los analitos son retenidos en su interior y, tras un tiempo seleccionado, la muestra es devuelta al vial. Una vez repetido este ciclo las veces necesarias, los analitos son desorbidos haciendo pasar fase móvil, o bien un disolvente apropiado por el mismo, introduciéndose posteriormente en la columna. En este caso, deben optimizarse el número de ciclos, el volumen de muestra que se introduce en el capilar, así como la naturaleza, el flujo y/o tiempo de extracción estática del extractante. De esta forma todo el proceso puede ser automatizado. Como limitación, cabe mencionar que sólo es aplicable a muestras bastante limpias, miscibles con la fase móvil y que no contengan partículas insolubles, para evitar así la obstrucción de los capilares (es importante filtrar la muestra

NUEVO KONIK K2 Q12®

Su

GC/MS
LC/MS
LC+GC/MS
DIP/MS



El universo de las
moléculas...
el mundo de KONIK

más de 25 AÑOS
de INNOVACIÓN

**HRGC, HPLC, HPLC+HRGC y/ó
HPLC/HRGC/DIP+MS TODO EN UNO**

La nueva dimensión en análisis molecular

KONIK - TECH®

KROM+MASS
www.konik-group.com

BARCELONA

Av. Cerdanyola, 73, 08172 Sant Cugat, Barcelona
T (+34) 93.590.28.40 F (+34) 93.590.28.44
e-mail: ventas@konik-group.com

MADRID

Corregidor José de Pasamonte, 31, Local 1, 28030 Madrid
Tel. (+34) 91.328.25.26 Fax (+34) 91.328.36.54
e-mail: madrid@konik-group.com

**DISEÑO Y
CALIDAD
EUROPEOS**



LINEA
COMPLETA

KONIK
2005/2006

Descubra las ventajas de
todos los acoplamientos

www.konik-group.com



KONIK MS Q12®

4-2000 amu
Cambio rápido de fuentes

Máxima sensibilidad y resolución

El sistema combinado HRGC/HPLC+MS incorpora opcionalmente:
Fuente para acoplamiento HRGC: permite ionización por impacto electrónico e ionización química; iones positivos y negativos. En el modo IQ (-) es el sistema más sensible del mercado.
Fuente para acoplamiento HPLC: optimizada para ionización a presión atmosférica (API) y electrospray (ESI).
Permite fácil análisis de péptidos y compuestos de alto peso molecular.



KONIK ROBOKROM®

AS, HS, P&T, SPμE
Multimodal

Flexibilidad inigualada

Sistema totalmente innovador exclusivo de KONIK. Puede configurarse a voluntad para siete modos operativos: (1) P&T: Purga y Trampa, (2) Espacio de Cabeza Estático, (3) μ-Extracción en Fase Sólida, (4) Desorción Térmica, (5) Inyección de Líquidos HRGC, (6) Inyección de Líquidos HPLC, (7) Micro-concentrador.
Opciones: Microagitación, evaporación controlada, microdosificación, microreacción. Estación de microquímica completa (derivatización precolumna, concentración, spiking,...).
Soluciones combinadas con HRGC únicas: TOGA, BTX, EPA,...



KONIK HRGC 4000

Horno $\pm 0.1^\circ\text{C}$ / Inyector Estanco / Neumática Digital

Máxima productividad

Cromatografía ultra-rápida: Horno de alta precisión y muy baja inercia térmica. Neumática digital (EPC y EMC). Temperatura de 25°C a 490°C en incrementos y visualización de 0.1°C .
Inyector estanco con septum frío (sin purga de septum): garantiza la máxima integridad de la muestra para compuestos de alto y bajo peso molecular. Ahorro de gas.
Todas las opciones de inyección disponibles para cualquier tipo de columna.
Gama completa de detectores, inclusive masas.



KONIK HPLC 600

6 Disolventes
Programación Temperatura

Automatización total



KONIK HPLC 550 TORRE y HPLC 600 MONOBLOQUE

Línea completa en HPLC: Isocrático, Gradientes, Biocompatible, Semi-preparativo, Iónico, etc. Detectores Fluorescencia, PDA, UV-VIS, Índice de Refracción, Conductividad, Electroquímico, Masas, EVLSD, etc. La solución óptima para su laboratorio con la mejor relación calidad/precio.

KONIK HPLC+HRGC K2 MULTIDIMENSIONAL

Único sistema comercializado HPLC+HRGC MULTIDIMENSIONAL (patentado US,6,402,947 B1).
Análisis de Pesticidas, PAH's, PCB's, ... por inyección directa de la muestra (aceites, concentrados, etc) en el HPLC.

KONIK-Tech
ISO 9001
CERTIFIED
COMPANY

KONIK - TECH®

KROM+MASS
www.konik-group.com

antes del análisis). El efecto memoria es inapreciable en esta técnica, lo que hace que además los límites de detección alcanzados sean menores que cuando la desorción se produce en el modo *off-line*. La *in-tube*-SPME se ha utilizado también en combinación con HPLC-ESI-MS^(51,52). Con objeto de mejorar la eficacia de la extracción de los compuestos se han desarrollado las variantes denominadas *wire-in-tube* y *fiber-in-tube* SPME que permiten la miniaturización de este tipo de sistemas (Figura 3)⁽⁵³⁾. En la *wire-in-tube*-SPME, un hilo muy fino de acero inoxidable se introduce en el interior del capilar, de manera que la superficie activa de éste sigue siendo la misma, pero se ha reducido su volumen interno, con lo que la extracción es más efectiva. En la *fiber-in-tube*, sin embargo, cientos de filamentos de un material polimérico están empaquetados longitudinalmente en el interior del capilar, de manera que se reduce también el volumen interno, pero la superficie activa es mucho mayor que la anterior, dado que dicho material polimérico puede ser utilizado como fase estacionaria. Además de la *in-tube* SPME, existen comercializados una serie de dispositivos que permiten llevar a cabo la extracción en el modo *off-line*, pero la desorción *on-line* con HPLC⁽⁵⁴⁾. En estos casos, la desorción de los analitos puede ser estática (el eluato permanece un tiempo en la interfase y posteriormente es introducido en la columna) o dinámica (a medida que se produce la desorción, el eluato entra directamente en la columna). En este último caso, es necesario destacar que si el disolvente o la fase móvil con la que los analitos son desorbidos no tiene una fuerza elutroica alta, los picos cromatográficos sufren un ensanchamiento considerable.

La SPME también ha sido acoplada a CE^(55,56) con interfases creadas en el propio laboratorio. Este acoplamiento es aún más complicado que el anterior dado que deben inyectarse volúmenes muy pequeños (nL). Actualmente, no está comercializado y no ha sido muy utilizado^(55,56), por lo que no es de extrañar que la gran mayoría de las aplicaciones publicadas hasta la fecha se hayan llevado a cabo en el modo *off-line*^(34,36).

6. DERIVATIZACIÓN

En GC, la derivatización de los analitos es una práctica usual para aumentar su volatilidad y/o reducir su polaridad pudiendo mejorar así tanto la eficacia de la extracción de la muestra real como su separación cromatográfica y la respuesta del detector⁽⁵⁾. Estos procesos de derivatización pueden llevarse a cabo en las fibras de SPME. En este sentido, el método más utilizado consiste en derivatizar directamente los analitos por adición del agente derivatizante a la propia matriz y la posterior extracción de los analitos derivatizados utilizando la fibra⁽⁵⁷⁾. También

puede llevarse a cabo la derivatización sobre la fibra de SPME: una vez completado el proceso de extracción, la fibra, con los analitos extraídos, se pone en contacto con el agente derivatizante⁽⁵⁸⁾. En este sentido, es recomendable que la derivatización se haga, si es posible, en el modo HS-SPME, para evitar posibles daños de la fibra. De la misma forma, también puede llevarse a cabo simultáneamente la extracción y la derivatización. En este caso, la fibra se sumerge durante un cierto tiempo en una disolución concentrada del agente derivatizante, de forma que quede recubierta con el mismo y la reacción de derivatización se produce sobre la superficie de la fibra simultáneamente con la extracción (no se trata de un proceso de equilibrio)⁽⁵⁹⁾. La derivatización puede también llevarse a cabo en el inyector del cromatógrafo. A medida que los analitos y el agente derivatizante (extraído conjuntamente) son térmicamente desorbidos de la fibra, se produce la reacción de derivatización en el propio inyector a alta temperatura⁽⁶⁰⁾. Hay que tener en cuenta que, en general, los procesos de derivatización suponen el introducir un paso más en el pretratamiento de muestra y, en algunos casos, presentan una baja reproducibilidad y repetibilidad, lo que hace que muchas veces este tipo de procesos tiendan a evitarse. Además, encontrar un agente derivatizante apropiado y que a su vez pueda ser utilizado con las fibras en alguna de las tres formas anteriores no es fácil. Un review muy reciente⁽⁶¹⁾ profundiza mucho más sobre el uso combinado de la SPME con estrategias de derivatización.

7. TÉCNICAS AFINES

Extracción sobre barra agitadora (*stir-bar sorptive extraction, SBSE*)

La SBSE⁽⁶²⁾ es bastante reciente y actualmente son cada vez más las aplicaciones publicadas en la bibliografía basadas en esta técnica. Este tipo de barras se comercializan con el nombre de Twister[®] y actualmente es necesaria una licencia para su uso. Se trata de barras magnéticas agitadoras que poseen un recubrimiento de PDMS (por ahora sólo se comercializa un tipo de barra, lo que limita su aplicación). Estos pequeños imanes encapsulados (Figura 4), pueden tener de 1 a 4 cm de longitud y están recubiertos por una capa de 55 ó 219 μL de PDMS (las fibras de 100 μm de PDMS suelen tener 0,5 μL), lo que hace que se extraiga una mayor cantidad de analitos y se alcancen límites de detección más bajos que con SPME. Los imanes de 4 cm se suelen utilizar con volúmenes de muestra comprendidos entre 100 y 250 mL, mientras que los de 1 cm se utilizan con volúmenes comprendidos entre 1 y 50 mL. Se trata de una técnica automatizable en GC (existe un sistema de desorción térmica

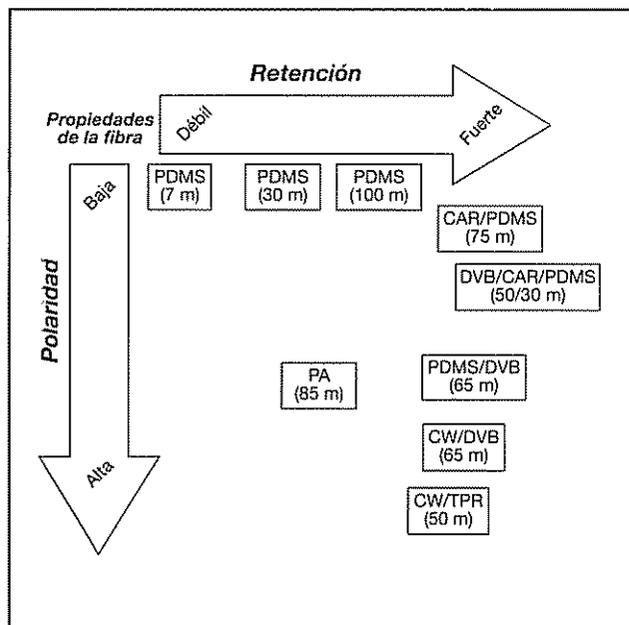


Figura 1. Propiedades de algunas de las fibras actualmente comercializadas. Adaptado de (13).

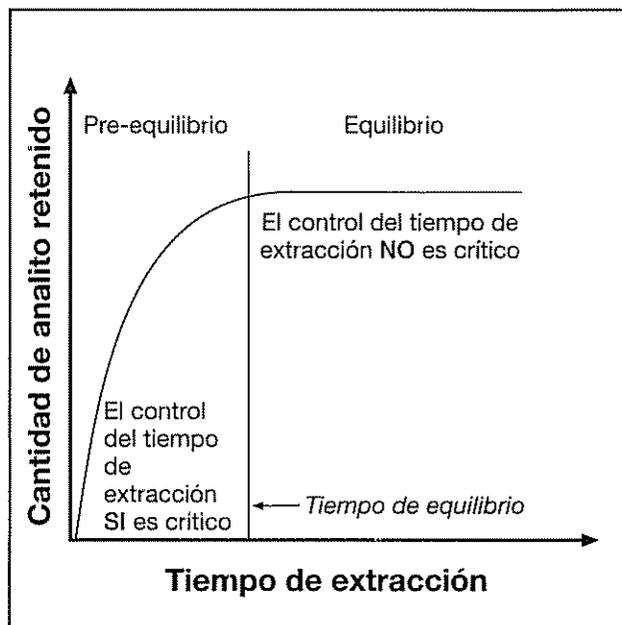


Figura 2. Variación con el tiempo de la cantidad de analito retenida por la fibra de SPME. Adaptado a partir de (5).

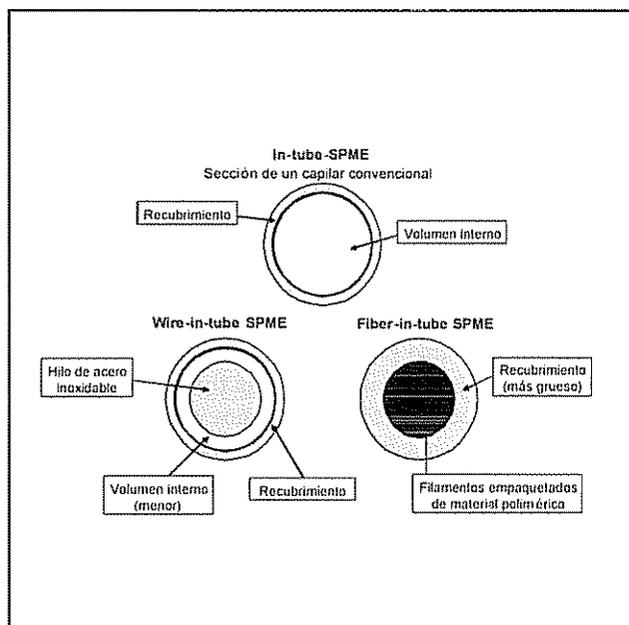


Figura 3. Dibujo esquemático de la sección transversal de los capilares utilizados en in-tube, wire-in-tube y fiber-in-tube SPME

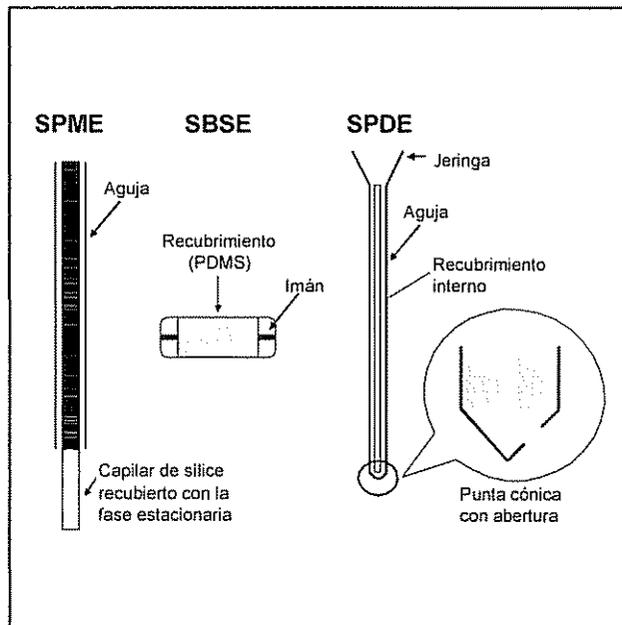


Figura 4. Representación esquemática de distintos dispositivos de microextracción: SPME, SBSE y SPDE.

comercial, Gerstel) A pesar de que el diseño original de la técnica fue llevado a cabo con una desorción térmica en un cromatógrafo de gases, aunque no se disponga del sistema de desorción comercial (que encarece la técnica), puede llevarse a cabo también una desorción con disolventes orgánicos e inyectar el mismo, bien sea en un cromatógrafo de gases, de líquidos o en CE. En todos los casos, los parámetros a optimizar son análogos a los de la SPME.

Aunque la SBSE está especialmente diseñada para inmersión directa, también se puede trabajar en el modo espacio en cabeza ⁽⁶³⁾ en cuyo caso recibe el nombre de headspace sorptive extraction (HSSE). En esta aproximación, la barra magnética se puede mantener suspendida en el espacio en cabeza mediante un hilo metálico que atraviese el septum. La SBSE ha sido utilizada en el análisis de pesticidas en diversas ocasiones ⁽⁶⁴⁻⁶⁹⁾ y recientemente estas barras también han sido preparadas mediante la técnica de sol-gel aplicándose al análisis de n-alkanos, PAHs y pesticidas organofosforados utilizando la GC como sistema de análisis ⁽⁷⁰⁾. Los límites de detección alcanzados fueron del orden de las partes por trillón (ppt)

Extracción dinámica en fase sólida (*solid phase dynamic extraction, SPDE*)

Este dispositivo ⁽⁷¹⁾, que constituye otra variante de la SPME, pretende solucionar varios problemas inherentes de la misma como son la fragilidad de la fibra, el delgado espesor de la fase estacionaria, así como el hecho de que la fibra no esté protegida y de que su flexibilidad sea limitada (aunque algunos de estos problemas se han solucionado con la in-tube SPME). Se trata de una jeringa que guarda en el interior de la aguja una capa de material sorbente (Figura 4). La SPDE se puede utilizar introduciendo en la misma directamente la muestra, o bien su espacio en cabeza (HS-SPDE). En ambos casos, es necesario introducir y expulsar (un determinado número de veces) del interior de la aguja la sustancia a extraer. De esta manera, es posible trabajar en condiciones dinámicas mientras se mantiene constante el volumen del espacio en cabeza. Una vez hecho esto, los analitos pueden ser desorbidos térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases. En el año 2000 se comenzaron a comercializar este tipo de dispositivos, aunque actualmente sólo está disponible un tipo de fibra de 50 μm de PDMS con un 10 % de carbono activo que recubre hasta 8 cm del interior de la aguja. El volumen de fase estacionaria en este tipo de agujas es de 4.4. mm^3 , aproximadamente, mientras que en una fibra de SPME-PDMS de 100 μm es de 0.94 mm^3 . La SPDE tiene como clara ventaja su fácil automatización y un muestreo más eficaz que la SPME.

Dado que se trata de una técnica nueva, el número de aplicaciones hasta ahora desarrollado no es muy elevado ⁽⁷²⁻⁷⁴⁾. En lo que al análisis de pesticidas se refiere, a modo de ejemplo, Lipinski y col. ⁽⁷¹⁾ han aplicado la SPDE (recubrimiento de PDMS de 7 μm de espesor) con posterior determinación por GC a un grupo de pesticidas en agua fortificada, llegando a límites de detección comprendidos entre 1 y 100 ng/L. La velocidad de extracción fue cinco veces mayor que utilizando fibras convencionales de SPME de 100 μm

Otros avances

Tal y como se ha señalado anteriormente, la temperatura de extracción es un factor que puede tener efectos contrapuestos sobre la extracción. Con objeto de poder aumentar la temperatura de la muestra para favorecer la extracción y de mantener la fibra a una temperatura inferior, para evitar que los analitos se desorban, Zhang y Pawliszyn idearon en 1995 ⁽⁷⁵⁾ la denominada SPME "enfriada internamente" (*internally cooled-SPME*). Este sistema, utilizado para la extracción de xileno, etilbenceno y tolueno, consigue enfriar el material sorbente haciendo pasar CO_2 líquido por un capilar interno a otro que actúa de fibra. A pesar del intento, este dispositivo no ha sido comercializado y tampoco ha sido muy utilizado.

Aparte de estas dos nuevas variantes de la SPME (SBSE y SPDE) y de la aparición de nuevos recubrimientos, la SPME parece estar encaminada hacia otro tipo de avance: la miniaturización y el acoplamiento directo a un espectrómetro de masas ⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾. Con el uso de sistemas miniaturizados se pueden resolver ciertos problemas como es el análisis de muestras de muy pequeño tamaño (a veces se disponen de pocos microlitros). También la velocidad del análisis puede verse incrementada enormemente, manteniendo altas eficacias de extracción a un bajo coste y, al mismo tiempo, puede reducirse el gasto de disolventes orgánicos perjudiciales para el medio ambiente. En este sentido se ha desarrollado un tipo de microextracción denominada *small-volume SPME* ⁽⁷⁸⁾ en la que se trabaja con volúmenes de muestra muy pequeños, introducidos en el interior de un capilar de vidrio. En este caso, tanto la eficacia como la velocidad de la extracción son muy altas. Una aplicación reciente y bastante prometedora es el uso de las fibras de extracción directamente como matrices utilizadas en MALDI (*matrix assisted by laser desorption/ionization*) ⁽⁷⁹⁾. La SPME-MALDI representa una alternativa prometedora en el análisis biomédico, farmacéutico, diagnóstico clínico, etc... pero aún está por explorar. Asimismo, el acoplamiento directo de la SPME a la interfase electrospray o nanospray podría tener también multitud de aplicaciones en un futuro próximo.

8. ALGUNAS APLICACIONES RECIENTES DE LA SPME AL ANÁLISIS DE PESTICIDAS

Hoy en día, cada vez son más los pesticidas utilizados y se hace necesaria una rápida y efectiva monitorización de los mismos en una amplia variedad de matrices ambientales (aguas, suelos, etc.) y, sobre todo, en la cadena alimentaria. Muchos pesticidas presentan una elevada toxicidad, así como una gran persistencia y movilidad medioambiental, lo que les convierte en uno de los grupos de contaminantes más importantes. Tal y como se ha señalado anteriormente, la SPME se ha aplicado con éxito al análisis medioambiental y, dentro de éste, al análisis de pesticidas. En España, son numerosos los grupos de investigación orientados en el análisis de pesticidas y que utilizan, entre otros, la SPME. A continuación se expondrán algunas aplicaciones recientes de la SPME al análisis de estos compuestos (Tabla 2).

SPME-GC

La GC es sin duda la técnica analítica más utilizada en el análisis de pesticidas, prueba de ello es la gran cantidad de bibliografía que se puede encontrar^(6,7,13) y la variedad de matrices a las que se ha aplicado, como aguas^(8,42), vinos^(9,84), mieles⁽⁶⁵⁾, suelos⁽⁶⁰⁾, sangre humana⁽⁶⁶⁾, zumos⁽⁹⁾, frutas^(87,88), peces⁽⁸⁹⁾, etc. Con SPME-GC, se han desarrollado métodos que permiten la determinación simultánea de multitud de pesticidas^(8,25,42), lo que sin duda constituye una de las aspiraciones de toda técnica. Sakamoto y Tsutsumi⁽⁴²⁾ han determinado 158 pesticidas en muestras de agua por HS-SPME-GC-MS utilizando una fibra de PA (aunque han examinado varios tipos de fibras) con recuperaciones comprendidas entre 54 y 160%. Dado que el principal problema que se plantea en estos casos es que unos pesticidas son mejor extraídos en determinadas condiciones que en otras, han extraído una misma muestra varias veces, aumentando la temperatura de extracción (hasta 100 °C), mejorando así la extracción de ciertos grupos de pesticidas. Gonçalves y Alpendurada⁽⁸⁾ han determinado 34 pesticidas pertenecientes a las familias de organoclorados, organofosforados, piretroides y triazinas en agua por SPME-GC con un detector de captura electrónica (*electron capture detection*, ECD) y otro termiónico (*thermionic specific detection*, TSD) utilizando una fibra de PDMS-DVB que han sumergido directamente en las muestras. Los LODs obtenidos se encontraron en el rango de las ppt. Cai y col.⁽²⁵⁾ han utilizado la tecnología sol-gel para obtener fibras de PPMS y PMS y así extraer 16 pesticidas organoclorados de extractos de té. Estas fibras, en comparación con las de PDMS comerciales, han demostrado tener una alta estabilidad térmica y una vida media muy larga. Asimismo, han com-

parado la eficacia de la fibra de PPMS (que es la que proporcionaba mejores resultados) para la extracción tanto por DI-SPME como por HS-SPME, previa a su determinación por GC-ECD. Los mejores resultados se obtuvieron por HS-SPME, con límites de detección inferiores a 0,081 ng/L.

Las técnicas de derivatización que hacen uso de las fibras de SPME y que se han descrito anteriormente, para mejorar la resolución y sensibilidad de los mismos en GC, han sido también utilizadas con dicho fin en el análisis de pesticidas^(38,98,99).

El reciente desarrollo de la cromatografía de gases completa en dos dimensiones (GCxGC)⁽⁹²⁾, por su elevada capacidad de separación, podría permitir, a priori, analizar algunas muestras sin un pretratamiento exhaustivo. Sin embargo, en muchos otros casos el pretratamiento de muestra sigue siendo necesario y, en este sentido, el uso combinado de la SPME y la GCxGC puede aportar interesantes resultados⁽⁹³⁾ en el análisis de mezclas complejas de pesticidas.

SPME-HPLC

Hay casos en los que los pesticidas no tienen la volatilidad adecuada para su determinación por GC y deben ser analizados por otra técnica, como HPLC o CE. La combinación SPME-HPLC se ha utilizado recientemente para el análisis de pesticidas como triazinas⁽⁹⁴⁾, fenilureas⁽⁸²⁾, carbamatos^(50,54,81), pesticidas organofosforados^(54,66), etc. ...

Gou y col.⁽⁸¹⁾ han analizado seis carbamatos (barban, carbaryl, clorprofam, metiocarb, promecarb y profan) en muestras de agua fortificadas mediante la *in-tube* SPME con un capilar de extracción Omegawax 250 (Supelco), una columna C18 y utilizando dos muestreadores distintos. Como fase móvil utilizaron acetonitrilo:agua 1:1 (v/v) en régimen isocrático. Los límites de detección obtenidos están comprendidos entre 0,44 y 17 µg/L. Wu y col.⁽⁸²⁾, por su parte, determinaron seis carbamatos (Figura 5) y seis fenilureas en agua y vino mediante *in-tube* SPME-HPLC-ESI-MS, utilizando capilares recubiertos de poli-N-metilpirrol (PMPY) y PPY, proporcionando éste último los mejores resultados. Para ello, optimizaron tanto los parámetros de extracción y desorción como los parámetros del electrospray (presión y temperatura del gas nebulizador, composición y flujo del líquido adicional, etc.). Los límites de detección del método se encontraban entre 0,01 y 1,2 µg/L. En este trabajo también se investigó la influencia de la adición de etanol a la muestra y se comprobó que la eficacia de la extracción disminuía con el aumento del porcentaje de etanol. Por

Tabla 2. Algunas aplicaciones recientes de la SPME de pesticidas acopladas a GC, HPLC y CE.

Pesticidas	Matriz	Detector	Fibra	Recuperación %	LOD (µg/L)	Ref.
GC						
158 pesticidas	Agua	MS	PA (HS-SPME)	54-160	~0.01	(42)
34 pesticidas	Agua	MS	PDMS-DVB (DI-SPME)	77-132	0.001-0.050	(8)
16 organoclorados	Té	ECD	PPMS (HS-SPME extracto de microondas)	39-101	0.015-0.081 ng/L	(25)
Vinclozolin, dicloran	Suelo	MS	PA (DI-SPME)	91-94	2-3 ng/g	(80)
Organofosforados	Vino	MS	PA (DI-SPME)	67-100	2-33	(9)
Forato, diazinon, metilparation, fentrotion, malation, fention, etilparation, metidation	Zumos			5-98	2-90	
HPLC						
Carbamatos	Agua	UV	Omegawax 250: polietilenglycol. (in-tube SPME)	34-105	0,44-17	(81)
Carbaryl, profam, metiocarb, promecarb, clorprofam, barban						
Carbamatos	Agua	(ESI)MS	PPY (in-tube SPME)	95-104	0,01-1,2	(82)
Carbaryl, profam, metiocarb, promecarb, clorprofam, barban	Vino			89-97		
Fenilureas						
Monuron, diuron, linuron, neburon, fluometuron y sinuron						
Fenilureas	Agua	UV	PDMS-DVB (DI-SPME, off-line) CW-TPR (DI-SPME, off-line)	85-113 85-111	0,5-5,1	(83)
Metoxuron, linuron, monuron, isoproturon, clorotoluron, monolinuron, metobromuron, buturon, clorbromuron						
Organoclorados	Vino	DAD	PDMS-DVB (DI-SPME, extracción off-line, desorción on-line)	95-103	4-27	(54)
Nuarimol, triadimenol, triadimefon, fopet, vinclozolin, penconazol						
CE						
Ciromazina, ciprodinil, pirimicarb, pirimetanil, pirifenox	Agua Zumos	(ESI)MS	PDMS-DVB (DI-SPME, off-line)	44-66	15 40-150	(34)
Triazinas	Agua	UV	PDMS-DVB (DI-SPME, off-line)	15-48	0.80-4.89	(35)
loxnil, o-fenilfenol, haloxifop, acifluorfen, picloram	Agua Frutas	(ESI)MS	CW-TPR (DI-SPME, off-line)	8-97	0.02-5 µg/g *	(36)

*Limite de cuantificación

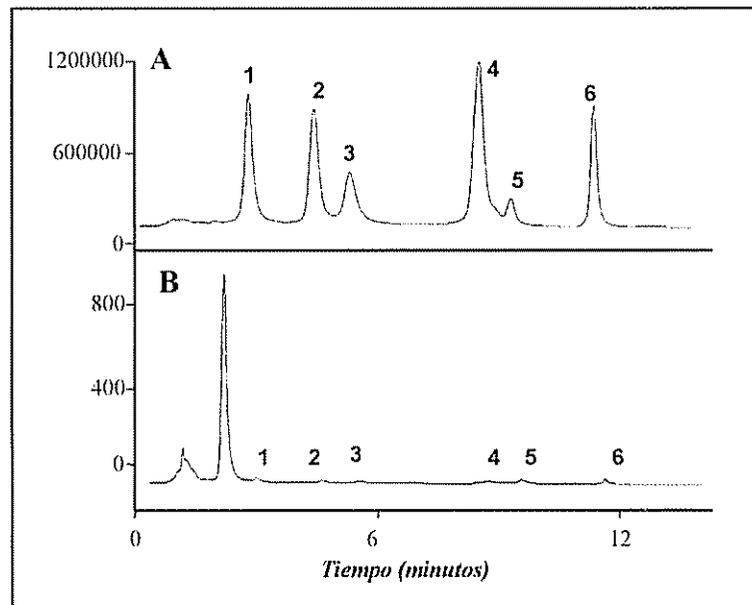


Figura 5. Chromatograma de una muestra de vino fortificada con seis fenilureas (8 $\mu\text{g/L}$). A) in-tube SPME-HPLC-ESI-MS (modo SIM); B) in-tube SPME-HPLC-UV. Identificación de los picos: (1) carbaryl, (2) profam, (3) metiocarb, (4) promecarb, (5) clorprofam, (6) barban. Redibujado a partir de la referencia (82).

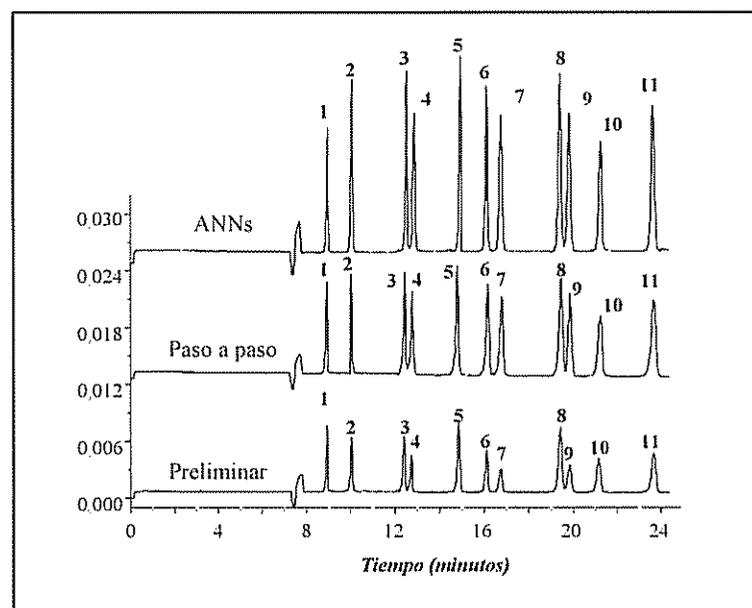


Figura 6. Electroferograma de una muestra de agua subterránea fortificada con 100 mg/L de cada triazina (ANN) Condiciones optimizadas utilizando ANNs (120 min de extracción, 10% NaCl, 40 min de desorción en 70% metanol 30% tampón de separación); (Paso a paso) Condiciones optimizadas paso a paso: 120 min de extracción, 10% NaCl, 30 min de desorción, 50% de metanol 50% tampón; (Preliminar) Condiciones no optimizadas (30 min de extracción, 0% NaCl, 10 minutos de desorción en el tampón de separación). Tampón: 19.3 mM borato sódico, 15.4 mM hidrógenofosfato disódico, 28.4 mM de SDS, pH=9.45, 7.5% de 1-propanol. Triazinas: (1) 2-hydroxidesetilazina (DEA), (2) simazina, (3) prometon, (4) atrazina, (5) simetrin, (6) ametrin, (7) propazina, (8) prometrin, (9) trietazina, (10) terbutilazina, (11) terbutrin. Redibujado a partir de referencia (35)

otro lado, Blasco y col. ⁽⁶⁶⁾ analizaron seis insecticidas organofosforados en mieles fortificadas (que tuvieron que ser diluidas en agua en relación 1/10) tanto por SPME y LC-MS por inmersión directa utilizando una fibra de PDMS como por SBSE y LC-MS. En ambos casos la desorción de los analitos se llevó a cabo en el modo *off-line* mediante disolventes orgánicos. La SBSE proporcionó los mejores límites de cuantificación, entre 0,04-0,4 mg/Kg, mientras que para la SPME se situaron en el intervalo 0,8-2 mg/Kg.

SPME-CE

La electroforesis capilar constituye una técnica alternativa bastante atractiva en el análisis de pesticidas, gracias a las altas eficacias de separación y a la rapidez de análisis. Sin embargo, una de sus principales desventajas radica en su baja sensibilidad, aunque se ha ido mejorando mediante el desarrollo de técnicas de preconcentración en el propio capilar ⁽⁶⁵⁾. Actualmente, existen muy pocas publicaciones que combinen SPME y CE para el análisis de pesticidas ⁽³⁴⁻³⁶⁾ y, en todas ellas, la SPME se lleva a cabo en el modo *off-line*. En dos de los trabajos mencionados, la detección se lleva a cabo por MS ^(34,36). La primera aplicación de la SPME previa a la CE-MS para el análisis de pesticidas fue desarrollada por Rodríguez y col. ⁽³⁶⁾ y en ella determinaron ioxinil, o-fenilfenol, haloxifop, acifluorfen y picloram en extractos de uvas, manzanas, naranjas y tomates fortificados. La fibra que utilizaron fue de CW-TPR, encontrándose porcentajes de recuperación entre 7 y 94% y límites de cuantificación comprendidos entre 0,02 y 5 mg/Kg. En el segundo de estos trabajos ⁽³⁴⁾, se determinó un grupo de pesticidas (pirimetanil, pirifenox, pirimicarb, citomazine y ciprodinil) en agua y zumos de frutas fortificados por SPME y CE-ESI-MS. Se llevó a cabo una optimización (haciendo uso de un diseño experimental) de los distintos parámetros que influyen en el proceso de extracción y desorción, así como los parámetros del electrospray ⁽⁶⁶⁾. Una vez optimizados dichos parámetros se determinaron los pesticidas por medio de CE-ESI-MS en agua fortificada hasta 15 µg/L y en zumos de frutas (naranja y uva) fortificados hasta 40 µg/L. El tercero de estos trabajos fue llevado a cabo por Frías-García y col. ⁽³⁵⁾ y en él analizaron once triazinas en aguas subterráneas por MEKC-UV sumergiendo directamente una fibra de PDMS-DVB en la muestra. Los factores que afectaban al proceso de microextracción fueron optimizados mediante ANNs. La Figura 6 muestra la comparación entre el resultado de la optimización paso a paso y con ANNs. Los porcentajes de recuperación obtenidos estaban comprendidos entre 15 y 48%, siendo los límites de detección alcanzados entre 0,80 y 4,89 µg/L. Es

de esperar que la aplicación de estas dos técnicas (CE y SPME) al análisis de pesticidas vaya en aumento a medida que se consigan límites de detección del mismo orden que los obtenidos por GC o HPLC, lo que se podría llegar a conseguir al combinarlas con técnicas de preconcentración en el interior del capilar (técnicas de stacking, por ejemplo) ⁽⁶⁵⁾.

9. CONCLUSIONES

La SPME ha demostrado ser una técnica de extracción y preconcentración fiable en el análisis de multitud de compuestos, entre ellos los pesticidas. Actualmente existe una amplia variedad de fibras, lo que permite ampliar sus aplicaciones, y a las que se unen cada vez más nuevos recubrimientos que, por otro lado, son necesarios. Aunque sin duda alguna el principal reto que actualmente se nos plantea es su acoplamiento directo a un espectrómetro de masas o su miniaturización, ya que ampliaría aún más sus posibilidades. Asimismo, se han desarrollado una serie de nuevas técnicas (SBSE y SPDE) que han superado algunas de las limitaciones de la SPME y que han ampliado aún más su uso. Probablemente en el futuro se desarrollen otros.

En lo que al análisis de pesticidas se refiere, actualmente existe en la bibliografía una gran cantidad de artículos que utilizan la SPME en combinación con GC. Sin embargo, estas aplicaciones no son tan numerosas con HPLC, debido a que su acoplamiento no es tan sencillo. La CE, a pesar de ser actualmente una técnica cada vez más utilizada en el análisis de pesticidas, no ha sido aún muy utilizada con dicho fin en combinación con la SPME. Bien sea combinada con una técnica o con otra, en todos los casos, son muchos los factores experimentales que influyen en la misma y que deben ser cuidadosamente optimizados para llegar a obtener buenos resultados. En cualquier caso, lo cierto es que cada vez son más las publicaciones que hacen uso de la SPME, lo que demuestra su fiabilidad y aceptación por parte de la comunidad científica.

AGRADECIMIENTOS

J. Hernández Borges agradece al Ministerio de Educación y Ciencia la beca F.P.U. concedida para la realización de su tesis doctoral

BIBLIOGRAFÍA

- (1) C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
- (2) J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction Theory and Practice*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- (3) R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 175.
- (4) P. Popp, K. Kalbitz, G. Oppermann, *J. Chromatogr. A* 687 (1994) 133.
- (5) G. Vas, K. Vekey, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 233.
- (6) L.J. Krutz, S.A. Senseman, A.S. Sciumbato, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 103.
- (7) J. Beltran, F.J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
- (8) C. Gonçalves, M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 968 (2002) 177.
- (9) C.G. Zambonin, M. Quinto, N. De Vietro, F. Palmesano, *Food Chem.* 86 (2004) 269.
- (10) J.A. Koziel, M.Y. Jia, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 5178.
- (11) J.Y. Liu, G.B. Yang, Q.F. Zhou, K.W. Yang, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 459.
- (12) W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 251.
- (13) H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- (14) W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1081.
- (15) C.H. Xiao, S.Q. Han, Z.Y. Wang, J. Xing, C.Y. Wu, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 121.
- (16) Y. Liu, M.L. Lee, K.J. Hageman, Y. Yang, S.B. Hawthorne, *Anal. Chem.* 69 (1997) 5001.
- (17) T.P. Gbatu, O. Ceylan, K.L. Sutton, J.F. Rubinson, A. Galal, J.A. Caruso, H.B. Mark Jr., *Anal. Commun.* 36 (1999) 203.
- (18) S.D. Harvey, D.A. Nelson, B.W. Wright, J.W. Grate, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 217.
- (19) J. Wu, X. Yu, H. Lord, J. Pawliszyn, *Analyst* 125 (2000) 391.
- (20) E.H.M. Koster, C. Crescenzi, W. den-Hoedt, K. Ensing, G.J. de-Jong, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3140.
- (21) H. Yuan, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *Analyst* 126 (2001) 1456.
- (22) J. Wu, J. Pawliszyn, *Analyst* 124 (1999) 643.
- (23) W.M. Mullett, K. Levsen, J. Bortak, J. Wu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1695.
- (24) M.P. Stevens, *Polymer Chemistry*, Oxford University Press, New York, 1999.
- (25) L. Cai, J. Xing, L. Dong, C. Wu, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 11.
- (26) Z.Y. Wang, C.H. Xiao, C.Y. Wu, H.M. Han, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 157.
- (27) S.L. Chong, D. Wang, J.D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3889.
- (28) Z. Zeng, W. Qiu, M. Yang, X. Wei, Z. Huang, F. Li., *J. Chromatogr. A* 934 (2001) 51.
- (29) A. Kabir, C. Hamlet, K.S. Yoo, G.R. Newkome, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1034 (2004) 1.
- (30) T.-Y. Kim, K. Alhooshani, A. Kabir, D.P. Fries, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 165.
- (31) C.P. Palmer, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 105.
- (32) H.C. Chao, J.E. Hanson, *J. Sep. Sci.* 25 (2003) 345.
- (33) G.R. Newkome, K.S. Yoo, A. Kabir, A. Malik, *Tetrahedron Lett.* 42 (2001) 7537.
- (34) J. Hernández Borges, M.A. Rodríguez Delgado, F.J. García Montelongo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 25 (2004) 2065.
- (35) S. Frias-García, M.J. Sánchez, M.A. Rodríguez-Delgado, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 660.
- (36) R. Rodríguez, J. Mañes, Y. Picó, *Anal. Chem.* 75 (2003) 452.
- (37) F. Guan, K. Watanabe, A. Ishii, H. Seno, T. Kumazawa, H. Hattori, O. Suzuki, *J. Chromatogr. B* 71 (1998) 205.
- (38) M.-R. Lee, R.-J. Lee, Y.-W. Lin, C.-M. Chen, B.-H. Hwang, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1963.
- (39) M.R. Lee, Y.C. Yeh, W.S. Hsiang, B.H. Hwang, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 317.
- (40) R. Eisert, K. Levsen, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 59.
- (41) P.A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 206.
- (42) M. Sakamoto, T. Tsutsumi, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 63.
- (43) C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Bucholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1960.
- (44) R. Eisert, K. Levsen, *Am. Soc. Mass Spectrom.* 6 (1995) 1119.
- (45) M. Krough, H. Grefslie, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B* 689 (1997) 357.
- (46) R.-A. Doong, P.-L. Liao, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 177.
- (47) R.A. Doong, S.M. Chang, Y.C. Sun, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 528.
- (48) J. Salafranca, C. Domeño, C. Fernández, C. Nerón, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 257.
- (49) C. González-Barreiro, M. Lores, M.C. Casais, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 373.
- (50) R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140.
- (51) J. Wu, H. Lord, J. Pawliszyn, *Talanta* 54 (2001) 655.
- (52) J. Wu, Z. Mester, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 211.
- (53) Y. Saito, K. Jinno, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 53.

- (54) S. Millán, M.C. Sampedro, N. Unceta, M.A. Goicolea, E. Rodríguez, R.J. Barrio, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 135.
- (55) S. Li, S.G. Weber, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1217.
- (56) C.W. Whang, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.* 35 (1998) 353.
- (57) G.A. Mills, V. Walter, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 267.
- (58) G. Gmeiner, C. Krassing, E. Schmid, H. Tausch, *J. Chromatogr. B* 705 (1998) 132.
- (59) P.A. Martos, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2311.
- (60) Y.Q. Liu, S.R. Cho, N.D. Danielson, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 54.
- (61) E.E. Stashenko, J.R. Martínez, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 553.
- (62) E. Baltussen, H.-G. Janssen, P. Sandra, C.A. Cramers, *J. High Resolut. Chromatogr.* 20 (1997) 385.
- (63) J.C.R. Demyttenaere, R.M. Morfiña, N. De Kimpe, P. Sandra, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 147.
- (64) P. Sandra, B. Tienpont, J. Vercaemmen, A. Tredoux, T. Sandra, F. David, *J. Chromatogr. A* 928 (2001) 117.
- (65) P. Sandra, B. Tienpont, F. David, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 299-309.
- (66) C. Blasco, M. Fernández, Y. Picó, G. Font, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 77.
- (67) C. Blasco, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 201.
- (68) V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cogollo, S. Muñoz, I. Valor, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91.
- (69) A. Juan-García, J. Mañes, G. Font, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 119.
- (70) W. Liu, H. Wang, Y. Guan, *J. Chromatogr. A* 1045 (2004) 15.
- (71) J. Lipinski, J. Fresenius, *Anal. Chem.* 369 (2001) 57.
- (72) C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, *J. Chromatogr. A* 1024 (2004) 217.
- (73) F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *Foren. Sci. Intern.* 133 (2003) 32.
- (74) F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 231.
- (75) Z. Zhang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 67 (1995) 34.
- (76) E.C. Meurer, D.M. Tomazela, R.C. Silva, F. Augusto, M.N. Eberlin, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5688.
- (77) L.S. Riter, E.C. Meurer, I.C. Rodríguez, M.N. Eberlin, R.G. Cooks, *Analyst* 128 (2003) 1119.
- (78) P.L. Zhu, C.L. Liu, M.C. Liu, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 25.
- (79) H. Tong, N. Sze, B. Thomson, S. Nacson, J. Pawliszyn, *Analyst* 127 (2003) 1207.
- (80) D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 125.
- (81) Y. Gou, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Microcol. Sep.* 12 (2000) 125.
- (82) J. Wu, C. Tragas, H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 357.
- (83) H.-H. Ling, Y.-H. Sung, S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 57.
- (84) A.A. Boyd-Boland, J.B. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 163.
- (85) J.J. Jiménez, J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, A.L. Mayorga, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 269.
- (86) F. Hernández, E. Pitarch, J. Beltran, F.J. López, *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 65.
- (87) A. Sanusi, V. Guillet, M. Montury, *J. Chromatogr. A* 1046 (2003) 35.
- (88) C.G. Zambonin, A. Cilenti, F. Palmesano, *J. Chromatogr. A* 967 (2002) 255.
- (89) N. Hidalgo-Used, G. Centineo, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, *J. Chromatogr. A* 1017 (2003) 35.
- (90) T. Henriksen, B. Svenmark, B. Lindhart, R.K. Julher, *Chemosphere* 44 (2001) 1531.
- (91) J. Beltran, F.J. López, O. Cepria, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 808 (1998) 257.
- (92) J. Dallüge, J. Beens, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 69.
- (93) A. Williams, D. Ryan, A. Olarte Guasca, P. Marriott, E. Pang, *J. Chromatogr.* 817 (2005) 97.
- (94) S.-D. Huang, H.-I. Huang, Y.-H. Sung, *Talanta* 64 (2004) 887.
- (95) O. Núñez, S. Sentellas, *CTA* 23 (2002) 28.
- (96) J. Hernández-Borges, C. Simó, A. Cifuentes, *CTA* 24 (2003) 45.

* * *

Encaje Perfecto

GC
Thermo
GC/MS



TRACE™ DSQ™ GC/MS

Las tecnologías innovadoras de GC y MS de Thermo Electron garantizan productividad, sensibilidad y fiabilidad.

Thermo Electron, S.L.

Madrid: Sepúlveda, 7 A • 28108 Alcobendas • Tel. 916 574 932 • Fax 916 574 937

Barcelona: Acero, 30-32, Plta. 2 Mód 3 • 08038 Barcelona • Tel. 932 230 918 • Fax 932 230 982

Bilbao: Tel. 902 170 136 • Fax 902 170 136

www.thermo.com/chromatography • analyze.es@thermo.com

Analiza • Detecta • Mide • Controla™

Thermo
ELECTRON CORPORATION

All trademarks are the property of Thermo Electron Corporation and its subsidiaries.
© 2009 Thermo Electron Corporation. All rights reserved.

Hypersil™ GOLD



Thermo explota 30 años de experiencia para ofrecer las columnas de HPLC Hypersil GOLD

Corazón de Oro

En Thermo entendemos que el instrumento de HPLC es crucial para lograr grandes separaciones pero también creemos que el corazón de cualquier sistema de HPLC excelente, es una columna robusta, fiable e innovadora resultado de casi 30 años de experiencia en fases separativas.

Por esta razón nuestra familia de columnas Hypersil® GOLD extenderá la vida y las prestaciones de su sistema de HPLC con columnas innovadoras y verdaderamente probadas.

Ponga una columna Hypersil GOLD en el corazón de su HPLC, y comience una relación duradera con Thermo para sus necesidades en consumibles de HPLC. Nuestros especialistas le ayudarán a seleccionar la columna Hypersil GOLD que mejor se adapte a su aplicación.

Analiza • Detecta • Mide • Controla™

Thermo
ELECTRON CORPORATION

ARTICULOS

Determinación de aspártico, glutámico y glicina procedentes de muestras biológicas mediante RP-HPLC, utilizando como derivatizante el carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo.

Oreiro García M. Teresa, Vázquez Illanes M. Dolores, Sierra Paredes Germán y Sierra Marcuño Germán.
Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina. Universidad de Santiago de Compostela, San Francisco s/n, 15782. Santiago de Compostela, España.

RESUMEN

En este trabajo de investigación se desarrolla una técnica de cromatografía líquida en fase reversa sensible, rápida y muy sencilla, utilizando como derivatizante el carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo (AQC) y la detección por fluorescencia. Mediante la derivatización directa de los patrones o muestras con AQC, se determinaron simultáneamente aspártico, glutámico y glicina. Durante los experimentos de validación de la técnica se logró una buena linealidad de la recta entre las concentraciones 2,5 y 100 μM , con unos coeficientes de correlación $r^2 \geq 0,998$ para todos los aminoácidos analizados. La precisión intradía e interdía (%R.S.D.) fueron menores del 5,5%; en el caso de la exactitud el rango estuvo entre 95,3% y 105,2%. El límite de detección de todos los aminoácidos analizados para este método analítico es menor de 5 nM.

Abreviaturas: AMQ, 6-aminoquinolina; AQC, carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo; FMOC-Cl, cloroformato de 9-fluorenilmetilo; NHS, N-hidroxisuccinimida; OPA, orto-ftalaldehido; PICT, isotiocianato de fenilo

INTRODUCCION

El análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) empleando derivatización precolumna tiene diversas ventajas frente a la derivatización postcolumna, como permitir la determinación de pequeños volúmenes de muestra, una mayor sensibilidad, rapidez, y una instrumentación más simple. Esto unido a que con la derivatización precolumna se aumenta la hidrofobicidad de los analitos, facilitando así su retención por la columna, permite afirmar que la RP-HPLC con derivatización precolumna es una técnica muy adecuada a la hora del análisis de aminoácidos.

El método precolumna más utilizado para el análisis

de aminoácidos, en general, es la derivatización con orto-ftalaldehido (OPA) en presencia de mercaptano (β -mercaptoetanol, *tert*-butiltiol o ácido 3-mercaptopropiónico) (Yang et al., 1999; Bianchi et al., 1999; Piepponen y Skujins, 2001) o *N*-acetil-*L*-Cisteína (Soto-Otero et al., 1994; Liu et al., 1998). Uno de los inconvenientes que presentan estas técnicas es que los reactivos derivatizantes no reaccionan con aminas secundarias, como la prolina e hidroxiprolina. Además, los derivados de glicina, lisina y alanina son inestables (Reverter et al., 1997; Cohen, 2000). Este último es quizá el principal inconveniente de estas técnicas, al impedir su automatización. Los límites de detección son del orden de picomoles.

Junto con el OPA también se han utilizado con frecuencia otros reactivos derivatizantes como el isotiocianato de fenilo (PICT), que si reacciona con aminas secundarias, aunque a veces produce compuestos derivatizados inestables, sobre todo en el caso del aspártico y del glutámico debido a la presencia de sales. El exceso de reactivo tiene que ser eliminado para evitar la contaminación de la columna y una mala separación cromatográfica, añadiéndose así un paso más al proceso de derivatización. Entre sus ventajas está que los productos de derivatización se pueden congelar durante semanas sin que apenas se degraden. Su límite de detección se sitúa del orden de picomoles para casi todos los aminoácidos (Shah et al., 2002)

Otro reactivo derivatizante es el cloroformato de 9-fluorenilmetilo (FMOC-Cl) que reacciona rápidamente con aminas primarias y secundarias creando compuestos estables altamente fluorescentes, con la única excepción de la histidina. Entre sus desventajas está la interferencia de sales o detergentes y la necesidad de eliminar el exceso de derivatizante. El límite de detección se sitúa del orden de femtomoles.

Los primeros autores en describir y utilizar el carbamato de 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidilo como

derivatizante precolumna fueron Cohen y Michaud (1993) Durante la derivatización, las aminas primarias y secundarias reaccionan en segundos con el reactivo AQC, dando como resultado derivados estables fluorescentes tipo urea. El exceso se hidroliza espontáneamente produciendo 6-aminoquinolina (AMQ), dióxido de carbono y N-hidroxisuccinimida (NHS). Los compuestos derivatizados resultantes son estables a temperatura ambiente durante más de una semana y ninguno de los productos de la hidrólisis interfiere en el análisis posterior de los aminoácidos (Cohen y Michaud, 1993; Cohen, 2000).

Entre las ventajas del método se pueden citar: la sencillez del proceso de derivatización; la formación de compuestos derivatizados muy estables incluso en presencia de sales y detergentes (Cohen y De Antonis, 1994; van Wandelen y Cohen, 1997); una separación excelente y la posibilidad de tener los reactivos comercializados. Además utilizando la detección por fluorescencia se logran análisis con una alta sensibilidad, situándose los límites de detección entre 50 y 300 femtomoles (Cohen, 2000). Las desventajas son pocas en comparación con las ventajas: unos tiempos de análisis cromatográficos relativamente largos y un alto consumo de disolventes.

La técnica descrita se utilizó inicialmente para el análisis de aminoácidos procedentes de hidrolizados de proteínas con detección ultravioleta y por fluorescencia (Cohen y Michaud, 1993). Posteriormente, Cohen y De Antonis (1994) la utilizan para la determinación de aminoácidos en cereales, soluciones intravenosas y glucoproteínas comparando la detección por fluorescencia con la ultravioleta. Estos estudios demuestran la gran versatilidad del método y que, gracias a la detección por fluorescencia, los límites de detección logrados eran menores que con otros derivatizantes y más adecuados para determinadas muestras. Strydom y Cohen (1994) comparan la derivatización con PICT y AQC en aminoácidos, indicando que el AQC resulta ser mejor derivatizante, e incluso afirman que el PICT no da buenos resultados analizando muestras procedentes de hidrolizados de proteínas, a pesar de sí darlos en patrones. Otros autores, variando la técnica original, analizaron aminoácidos procedentes de muestras tan dispares como seroalbúmina bovina y neuromedina (Liu, 1994), aminoácidos y aminoazúcares procedentes de proteína de soja, quitina y lodos sólidos de aguas residuales (Díaz et al., 1996), colágeno y líquido procedente de cultivos celulares (van Wandelen y Cohen, 1997), plasma de cerdo (Reverter et al., 1997), muestras de microdiálisis de líquido cefalorraquídeo y de cerebro de rata (Liu et al., 1998), zumos de uva y vinos (Hernández-Orte et al., 2003) y plasma de humanos (Badiou et al., 2004).

PARTE EXPERIMENTAL

Reactivos.

El kit reactivo AccQ-Fluor y la fase móvil A concentrada AccQ-Tag son de Waters (Milford, MA, USA). El kit de derivatización consiste en el reactivo AQC en polvo, acetonitrilo para su disolución y una disolución de borato sódico. Los aminoácidos utilizados (aspártico, glutámico y glicina) son de Sigma (St. Louis, MO, USA). El agua ultra pura Milli-Q, y el acetonitrilo calidad HPLC, de Productos Químicos Romil (Cambridge, England).

Instrumentación y condiciones cromatográficas.

Se utilizó un sistema cromatográfico Alliance 2695 con un sistema de inyección automático, un sistema de desgasificación en línea, horno de columna y calentador/refrigerador de muestras. El detector de fluorescencia multicanal es un modelo 2475. Para el control, recogida y tratamiento de los datos se utilizó el programa informático Empower. Todos ellos componentes de Waters, Milford, MA, USA.

Para la separación de los aminoácidos se utilizó una precolumna Nova-Pak C₁₈ (20 mm×3,9 mm), conectada a una columna de 4 μm AccQ-Tag C₁₈ (150 mm×3,9 mm D.I.); ambas de Waters. La precolumna y columna se termostataron a 37°C, durante el análisis el flujo fue de 1 ml/min. Las fases móviles utilizadas para la separación de los aminoácidos fueron: la fase móvil A una disolución preparada con 200 ml del concentrado AccQ-Tag y 2 l de agua, la fase móvil B acetonitrilo calidad HPLC y la fase móvil C agua calidad HPLC. El gradiente utilizado para el análisis se muestra en la Tabla 1. El tiempo de análisis es de 21 minutos, a los que hay que añadir 12 minutos de lavado con una mezcla de acetonitrilo/agua (60%/40%) y 10 minutos de acondicionado con 100% de A para preparar el sistema para la siguiente inyección.

El detector tiene una celda de flujo con una capacidad de 8 μl, este se ajustó a una longitud de onda de excitación de 250 nm y a una longitud de onda de emisión de 395 nm. Las inyecciones se realizaron cada 43 minutos, con un volumen de inyección de 5 μl.

Preparación de patrones y derivatización.

Para la preparación de las diferentes concentraciones de patrones necesarios para la validación se partió de una disolución madre de 10 mM de aspártico, glutámico y glicina en una disolución estéril de Ringer (CINa 147 mM,

ClK 4,0 mM, Cl₂Ca 2,4 mM) que se conservó a -30°C en condiciones de oscuridad. Las concentraciones de patrones utilizadas para los experimentos de validación del método se prepararon mezclando un volumen apropiado de esta disolución madre con Ringer.

Durante un análisis rutinario 10 µl de la mezcla de patrones o de muestra se tamponan a pH 8,8 con 30 µl de solución de borato AccQ-Fluor. Los compuestos derivatizados se forman al añadir 10 µl de la disolución de AQC reconstituida (3 mg/ml en acetonitrilo). El AQC reacciona a temperatura ambiente con las aminas y el exceso de derivatizante se hidroliza espontáneamente en tan solo 1 minuto.

RESULTADOS

Linealidad y límites de detección.

Para el cálculo de la recta de calibrado (Tabla 2) se analizaron una serie de seis concentraciones patrón, desde 2,5 a 100 µM (tres réplicas de cada punto), además del blanco (sin analito, tan sólo disolución Ringer). En todos los casos los coeficientes de correlación (r^2) fueron mayores de 0,998, lo que demuestra una excelente linealidad de las rectas de calibrado.

Los límites de detección (señal/ruido=3/1) para todos los aminoácidos fueron menores de 5 nM.

Selectividad.

Para demostrar la ausencia de respuesta a los tiempos de retención de los aminoácidos de interés se inyectaron cinco muestras blanco, comprobándose así que no existen interferencias a los tiempos de retención de los analitos. La figura 1(a) muestra un cromatograma típico de una mezcla de aminoácidos (25 µM) y un blanco [Fig. 1(b)], donde se puede observar la buena selectividad del método. Como puede observarse todos los aminoácidos de interés son correctamente separados bajo las condiciones de análisis.

Precisión y Exactitud.

La precisión se expresó como la desviación estándar relativa (%R. S. D.) y la exactitud como la recuperación analítica. En ambos casos se hicieron estudios intradía, que consistieron en la inyección de cinco réplicas, el mismo día, de tres concentraciones de diferentes patrones. En el caso de los ensayos interdía se analizaron también tres concentraciones conocidas durante cinco días consecutivos. Las concentraciones utilizadas fueron 2,5 µM, 25 µM y 100 µM, las cuales se derivatizaron

como se describió anteriormente. En los ensayos intradía la precisión de las repuestas esta entre 0,9% y 2,6%, mientras que la exactitud abarca desde 95,3% a 98%. Para los ensayos interdía, la precisión se situó entre 4,5% y 5,5% y la exactitud entre 97,8% y 105,2% (Tabla 3).

Para la identificación de los diferentes analitos se utilizó el tiempo de retención. Tal y como se muestra en la Tabla 4, estos tiempos tanto en los ensayos intradía como interdía tienen una desviación mínima (menor de 0,36%), lo que permite una excelente e inequívoca identificación de los diferentes aminoácidos.

Estabilidad.

La determinación de la estabilidad de los patrones, de la fase móvil y de la mezcla de derivatización se comprobó previamente al estudio de la validación del método. Los patrones fueron analizados después de un largo período de congelación, comparándose los resultados obtenidos con los análisis de patrones preparados en fresco; no encontrándose variaciones significativas. En el caso de la fase móvil, preparada a partir del concentrado comercial, el fabricante garantiza su estabilidad durante más de un mes conservándola a 4°C. Nunca se utilizó la fase móvil reconstituida más de una semana con lo que se garantiza su estabilidad durante los análisis. Por otra parte, la mezcla de derivatización es estable a temperatura ambiente durante más de una semana (Cohen y Michaud, 1993; Cohen, 2000), teniendo la precaución de cerrar correctamente los viales ya que debido al pequeño volumen de la mezcla esta puede evaporarse.

CONCLUSIONES

El método descrito en este artículo utilizando derivatización precolumna con AQC ha demostrado ser una técnica rápida, selectiva, sensible y muy reproducible. Gracias a la formación de compuestos derivatizados en tan sólo un minuto y estables durante más de una semana, pueden realizarse gran cantidad de análisis de un modo automático, lo que supone una ventaja importante con respecto a otros métodos descritos. Gracias a la buena reproducibilidad de los tiempos de retención, la identificación de los distintos analitos es inequívoca y por ello no hay que analizar patrones entre muestras para confirmar el tiempo de retención de ningún analito, como afirma Parent (2001) acerca del Gaba derivatizado con OPA.

Tal como describen Strydom y Cohen (1994), una correcta derivatización precolumna depende de un proceso de derivatización reproducible, de la estabilidad de los compuestos derivatizados, de la posible interferencia

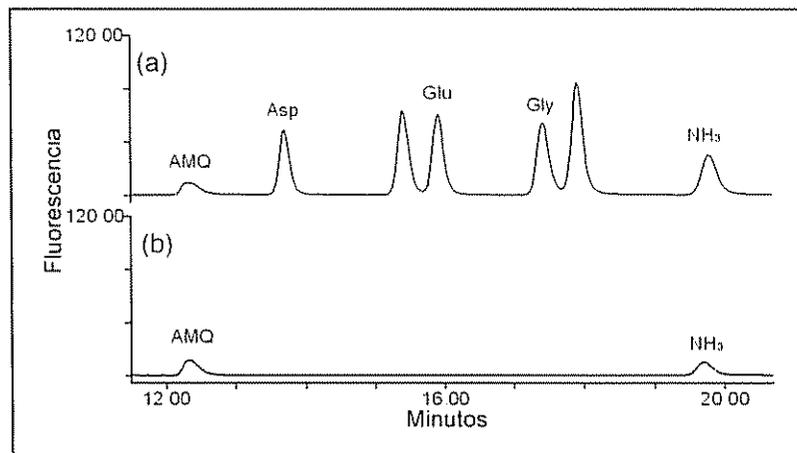


Figura 1. (a) Cromatograma de los distintos aminoácidos patrón derivatizados (25 μ M). (b) Cromatograma del blanco derivatizado. El volumen inyectado fue de 5 μ l. El gradiente utilizado es el correspondiente a la Tabla 1.

Tabla 1. Gradiente optimizado para la separación de los diferentes aminoácidos

Tiempo (min.)	Tampón Acetato (%)	Acetonitrilo (%)	Agua (%)
0	100	0	0
0,5	99	1	0
18,0	95	5	0
21,0	0	60	40
33,0	100	0	0

Tabla 2. Recta de calibrado entre 2.5 y 100 μ M de los diferentes aminoácidos ($\text{Área} = B \times \text{Concentración} + A$)

Aminoácidos	$A \times 10^{-3}$	$B \times 10^{-4}$	Error estándar ($\times 10^{-4}$)	r	r^2
Aspártico	-1,79	2,29	1,43	0,9991	0,9982
Glutámico	-2,26	3,04	1,73	0,9993	0,9987
Glicina	4,83	2,83	1,48	0,9996	0,9993

de compuestos formados en el proceso de derivatización y de la facilidad en la detección. Con el método descrito por nuestro laboratorio, se superan tales objetivos consiguiendo determinar correctamente los aminoácidos Asp, Glu y Gly en volúmenes muy pequeños (10 μ l) procedentes de muestras biológicas recogidas mediante microdiálisis en cerebro de rata.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren dar las gracias por sus acertados consejos a Ramón Soto Otero (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular). Esta investigación ha tenido el apoyo económico del proyecto XUGA PGI-DIT03PXIB20803PR de la Xunta de Galicia, España.

Tabla 3. Precisión y exactitud del método descrito

Aminoácidos/ Concentración teórica	(μM)	Intradía (n=5)		Interdía (n=5)	
		Precisión R.S.D. (%)	Exactitud (%)	Precisión R.S.D. (%)	Exactitud (%)
Aspártico	2,5	1,5	98	5,3	97,8
	25	1,1	96,7	4,5	104,2
	100	1,2	95,3	4,7	100,5
Glutámico	2,5	2,6	97	5,5	99,3
	25	1	96,9	4,7	104,3
	100	1,3	95,7	4,8	100,8
Glicina	2,5	1,9	96,6	5,5	102,3
	25	0,9	97,4	4,9	105,2
	100	1,1	96,6	5	102,3

Tabla 4. Tiempos de Retención y R.S.D. (%) de los aminoácidos durante los ensayos intradía e interdía.

Aminoácidos/ Concentración teórica (μM)	Tiempo de retención (min.)	Intradía (n=5)			Interdía (n=5)		
		Media	R.S.D. (%)	Tiempo de retención (min.)	Media	R.S.D. (%)	
Aspártico	2,5	13,6		13,7			
	25	13,6	13,6	0	13,7	13,6	0,36
	100	13,6		13,6			
Glutámico	2,5	15,8		15,9			
	25	15,8	15,8	0	15,9	15,8	0,31
	100	15,8		15,8			
Glicina	2,5	17,4		17,4			
	25	17,4	17,4	0	17,4	17,4	0
	100	17,4		17,4			

BIBLIOGRAFÍA

- Badiou S., Lehmann S., Cristol J-P y Ballet H. Determination of plasma amino acids by fluorescent derivatization and reversed-phase liquid chromatography separation. *Clinical Laboratory* 2004; **50**: 153-158.
- Bianchi L., Della Corte L. y Tipton K F. Simultaneous determination of basal and evoked output levels of aspartate, glutamate, taurine and γ -aminobutyric acid during microdialysis and from superfused brain slices. *Journal of Chromatography B* 1999; **723**: 47-59.
- Cohen S A. Amino acid analysis using precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. In *Methods in Molecular Biology Humana Press Inc*, Totowa, NJ, 2000; 39-47.
- Cohen S A y De Antonis K.M. Applications of amino acid derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *Journal of Chromatography A* 1994; **661**: 25-34.
- Cohen S A y Michaud D.P. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acids via high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 1993; **211**: 279-287.
- Díaz J., Lliberia Ll., Comellas L. y Broto-Puig F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance detection. *Journal of Chromatography A* 1996; **719**: 171-179.
- Hernández-Orte P., Ibaz M.J., Cacho J. y Ferreira V. Amino acid determination by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. *Chromatographia* 2003; **58**: 29-35.
- Liu H. Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A* 1994; **670**: 59-66.
- Liu H., Sañuda-Peña C., Harvey-White J D., Kalra S. y Cohen S A. Determination of submicromolar concentrations of neurotransmitter amino acids by fluorescence detection using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate method for amino acid analysis. *Journal of Chromatography A* 1998; **828**: 383-395.
- Parent M., Bush D., Rauw G., Master S., Vaccarino F y Baker G. Analysis of amino acids and catecholamines, 5-hydroxytryptamine and their metabolites in brain areas in the rat using in vivo microdialysis. *Methods* 2001; **23**: 11-20.
- Piepponen T.P. y Skujins A. Rapid and sensitive step gradient assays of glutamate, glycine, taurine and γ -aminobutyric acid by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection with o-phthalaldehyde-mercaptoethanol derivatization with an emphasis on microdialysis samples. *Journal of Chromatography B* 2001; **757**: 27-283.
- Reverter M., Lundh T. y Lindberg J E. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 1997; **696**: 1-8.
- Shah A., Crespi F. y Heidbreder C. Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value. *Journal of Chromatography B* 2002; **781**: 151-163.
- Soto-Otero R., Méndez-Alvarez E., Galán-Valiente J., Aguilar-Veiga E. y Sierra-Marcuño G. Quantitative analysis of neuroactive amino acids in brain tissue by liquid chromatography using fluorescent pre-column labelling with o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine. *Biomedical Chromatography* 1994; **8**: 114-118.
- Strydom D.J. y Cohen S A. Comparison of amino acid analyses by phenylisothiocyanate and 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate precolumn derivatization. *Analytical Biochemistry* 1994; **222**: 19-28.
- van Wandelen C. y Cohen S A. Using quaternary high-performance liquid chromatography eluent systems for separating 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate-derivatized amino acid mixtures. *Journal of Chromatography A* 1997; **763**: 11-22.
- Yang C-S., Tsai P-J., Chen W-Y., Tsai W-J y Kuo J-S. On-line derivatization for continuous and automatic monitoring of brain extracellular glutamate levels in anesthetized rats: a microdialysis study. *Journal of Chromatography B* 1999; **734**: 1-6.

NOTICIAS DE LA SECyTA

XI JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Las 11^{as} JORNADAS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL tendrán lugar en Barcelona del 15 al 17 de noviembre de 2005, en el Recinto de Fira de Barcelona GRAN VIA M-2 y en el marco de EXPOQUIMIA.

Organización

El programa científico de las 11^{as} Jornadas está organizado por la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA (SEQA), en colaboración con las siguientes Sociedades y Grupos especializados:

- Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECYTA)
- Sociedad de Espectroscopia Aplicada (SEA)
- Association of Environmental Sciences and Techniques (AEST)
- Divisão de Química Analítica (Sociedade Portuguesa de Química)
- Sociedad Española de Espectrometría de Masas (SEEM)
- Comité de Espectroscopia (SEDO)
- Grupo de Electroquímica (RSEQ y SEQA)
- Grupo de Especiación (SEQA)

Las Jornadas constarán de Conferencias Plenarias, Conferencias cortas (key-notes) y Comunicaciones Orales y en forma de Póster

El formato tiene como objetivo la transmisión del conocimiento entre los participantes y proporcionar una amplia exposición de lo último en equipamiento analítico. El programa permite a los participantes visitar la exposición técnica en Expoquimia y a la vez establecer relaciones profesionales con los fabricantes.

Comité Científico

Presidente: Dr. Juan Cacho
Secretario: Dr. Vicente Ferreira
Vocales: Dr. Enrique Barrado
Dra. Carmen Cámara
Dr. Víctor Cerdá
Dr. Manuel Dabrio
Dr. José Carlos Díez-Masa
Dra. M^a Teresa Galcerán
Dr. Emilio Gelpí

Dra. Milagros Gómez
Dr. José Luis F. C. Lima
Dra. Purificación López
Dra. Encarnación Lorenzo
Dr. Santiago Maspoch
Dra. Cristina Nerín de la Puerta
Dr. Juan Carlos Otero
Dr. Darío Prada
Dr. Ángel Ríos
Dr. Alfredo Sanz Medel
Dr. Miguel Valcarcel

Comité Organizador (SEQA)

Presidente: Dr. Juan Cacho
Secretario: Dr. Vicente Ferreira
Tesorero: Dr. Enrique Barrado
Vocales: Dr. Darío Prada
Dra. Carmen Cámara
Dr. Alfredo Sanz
Dra. M^a Teresa Galcerán

Fira de Barcelona: Pilar Navarro

Recinto

El conjunto de EXPOQUIMIA, EQUIPLAST Y EUROSURFAS constituye una de las expresiones químicas más importantes de Europa con la participación de 1.150 expositores directos sobre una superficie de 68.000 m² netos.

El sector de Instrumentación Analítica está situado en el pabellón num. 2 del recinto ferial con la participación de 158 expositores directos ocupando una superficie de 11.000 m² netos.

Es una excelente ocasión para discutir e intercambiar información y experiencias que se repite únicamente cada tres años.

Metodologías y especialidades

Las Jornadas pretenden recoger las contribuciones al desarrollo de las Ciencias de Separación, el Reconocimiento Atómico y Molecular y otras relacionadas con la moderna Química Analítica, así como sus aplicaciones en las diversas especialida-

des de la ciencia y la tecnología, con especial énfasis en:

- Medio Ambiente
- Alimentos
- Bioanálisis y Proteómica
- Nuevos Desarrollos en Instrumentación Analítica
- Nanotecnología y Miniaturización en Análisis Químico
- Materiales y Aplicaciones Industriales

Comunicaciones

El Comité Científico arbitrará su forma de presentación y los resúmenes, junto con el texto de los ponentes invitados, se publicará en el Libro de Resúmenes de las JAI.

Los trabajos presentados en forma de póster estarán expuestos a lo largo de toda la duración de las Jornadas. El tamaño del área de exposición es: 1 metro de alto por 1 de ancho.

El Comité Científico, en colaboración con las Sociedades participantes y las casas comerciales, otorgará premios a las mejores contribuciones en distintos temas. La forma y modo de presentar los trabajos se indicarán en las actualizaciones de la web.

Idioma de las JAI

Los idiomas oficiales de las Jornadas son español e inglés.

Presentación y selección de comunicaciones

Cada participante inscrito tendrá derecho a presentar una comunicación, que deberá enviar por correo electrónico, **antes del 10 de julio de 2005**, a:

comunicaciones@jai2005.com

de acuerdo con las siguientes instrucciones:

1. El resumen debe enviarse como archivo adjunto
2. En el "texto" debe indicarse el Tema Científico escogido

Temas

a. Alimentos y Seguridad Alimentaria.

- b. Bioanálisis y Proteómica.
- c. Contribuciones Teóricas y Docencia en Química Analítica.
- d. Nuevos Desarrollos en Instrumentación Analítica. Nanotecnología y Miniaturización en Análisis Químico
- e. Materiales y Aplicaciones industriales
- f. Medio Ambiente
- g. Especiación
- h. Biosensores y Métodos de Cribado (screening)
- i. Otros

3. En el "Asunto" se indicará "Comunicación a las 11ª JAI"

4. Cada resumen debe enviarse en un archivo aparte.

Se ruega a los participantes interesados en presentar comunicaciones, se atengan estrictamente al plazo de presentación para facilitar el trabajo de selección y confección del programa por parte del Comité Científico

Instrucciones para el resumen

Cada resumen se presentará en un documento de Word de una página A4 con fuente "Times New Roman" (tamaño de fuente 11 para el texto y 12 en negrita para el titular), con interlineado sencillo y márgenes de 3 cm por los cuatro lados.

Esquema a seguir:

- Título en negrita (*Times New Roman*, tamaño fuente 12)
- Línea en blanco
- Nombre y dirección, teléfono, fax y e-mail de los autores (*Times New Roman*, tamaño fuente 11)
- Línea en blanco
- Texto que permita evaluar el interés científico y técnico de la comunicación.

Puede incluirse alguna figura bibliográfica. La resolución de imágenes no debe exceder los 300 dpi. (*Times New Roman*, tamaño fuente 11)

Se recomienda a los participantes que presenten el resumen en inglés.

Publicación de las comunicaciones

Aquellos autores cuyas contribuciones hayan sido

aceptadas, pueden presentar un artículo con una extensión máxima de 8 páginas A4, para someter a las revistas especializadas *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *Journal of Chromatography* y *Journal of Mass Spectrometry*. En todos los casos deberán superar el proceso de revisión de la correspondiente revista. Debido a las limitaciones impuestas por la editorial, los editores aplicarán un estricto proceso de selección basado en su calidad y relevancia. Los artículos deben presentarse en soporte papel y electrónico (diskette o CD-ROM) en el mostrador de inscripción de las Jornadas.

Becas

Las JAI otorgará 60 becas a alumnos y estudiantes de tercer ciclo consistentes en la inscripción gratuita. Para acceder a las becas se deben reunir los siguientes requisitos:

- El solicitante debe presentar una comunicación
- El solicitante deberá ser un joven científico y miembro avalado por un miembro activo de las Sociedades participantes.
- El solicitante deberá presentar una carta de soporte a la solicitud de la beca escrita por su supervisor y que acompañe al Resumen.

La calidad y relevancia del trabajo presentado en el resumen son los principales criterios a ser juzgados.

Las solicitudes deben enviarse por fax (+34 93 4514813) o bien por correo postal (ASECON / JAI, Gran Vía 488 entlo. 1ª 08015 Barcelona).

Los miembros de la SECyTA deben ajustarse a las condiciones y forma de solicitud mencionadas, indicando además su pertenencia a la SECyTA y el nombre del investigador senior, miembro de la SECyTA, inscrito en las JAI que avala su solicitud.

Programa

En la página web: www.jai2005.com se puede consultar el programa de las JAI y los ponentes invitados

Asamblea General de la SECyTA

En el marco de las JAI se celebrará la V Asamblea General de la SECyTA (www.secyta.org).

Fechas clave

10/07/2005: Fecha límite envío de Resúmenes para Comunicaciones en forma de Póster

30/07/2005: Comunicación de trabajos aceptados

30/09/2005: Fecha tope de inscripción

15/10/2005: Fecha límite pago de la cuota de participación

14/11/2005: Inauguración de: EXPOQUIMIA (www.expoquimia.com), EQUIPLAST (www.equiplast.com), EUROSURFAS (www.eurosurfas.com)

15/11/2005: Colocación de posters de las JAI. Inauguración de las JAI

17/11/2005: Clausura de las JAI. Entrega de premios. Cóctel de despedida

Cuotas de Inscripción

	Antes del 16/09/05	Del 16/09/05 al 15/10/05
Cuota general	475 €	550 €
Socios de Grupos Organizadores *	330 €	450 €
Expositores de Expoquimia	330 €	450 €
Estudiantes (cuota reducida) **	150 €	175 €

* Para acogerse a la cuota de inscripción para socios de Grupos Organizadores no será necesario acompañar el justificante de pertenencia a la correspondiente Sociedad o Grupo, sino que es suficiente indicarlo claramente en el formulario de inscripción.

** La cuota reducida está dirigida a estudiantes de tercer ciclo y jóvenes investigadores. Para poder acogerse a esta cuota deberán remitir por fax (93 451 48 13) o correo postal (JAI, Gran Vía 488, Entlo. 1ª 08015 Barcelona) un certificado expedido por el Director del centro o Departamento acreditando estar realizando estudios en el mismo

La cuota de inscripción incluye:

- El acceso a las sesiones (conferencias, ponencias, sesiones con presentación en forma de póster)
- Coffee break
- Dossier que incluye el Libro de Resúmenes, Programa definitivo y listado de participantes.
- Entrada gratuita a EXPOQUIMIA, EQUIPLAST y EUROSURFAS.
- Cocktail



La masa exacta más fácil

para una mayor confianza en la identificación

Agilent LC/MSD TOF

- 3 ppm de exactitud en la masa
- Poder de resolución de 10.000
- Amplio rango dinámico
- Sensibilidad a nivel de bajos picogramos



La exactitud en la masa aporta confianza a la confirmación de productos de síntesis y la determinación de la composición elemental. El espectrómetro de masas Agilent LC/MSD TOF hace más sencilla la obtención de masas exactas mediante un sistema continuo y automatizado de introducción de una masa de referencia.

El amplio rango dinámico de los espectros asegura que se aprecien los componentes de la muestra tanto de mayor como de menor tamaño, y elimina la necesidad de diluir y repetir el análisis.

Con 3 ppm de exactitud en la masa, un poder de resolución de 10.000 y sensibilidad a nivel de bajos picogramos, el Agilent LC/MSD TOF cuenta con la exactitud, resolución y sensibilidad necesarias para hacer frente a prácticamente cualquier desafío.

Para ganar confianza en todas y cada una de sus identificaciones, póngase en contacto con Agilent inmediatamente.

Teléfono de contacto: 901 11 68 90
www.agilent.com/chem



Agilent Technologies

dreams made real

Instrucciones para la inscripción

Debe realizarse a través del formulario albergado en la web.

www.jai2005.com

y enviando, posteriormente, la fotocopia del justificante de pago a la Secretaría Técnica por fax 93 451 77 82, por correo postal (ASECON/JAI, Gran Vía C.C., 488, entlo 1º. 08015 - BARCELONA, o por correo electrónico: inscripciones@jai.com

El pago debe realizarse a favor de **ASECON/JAI: BBVA 0182-1006-82-0201525662**

Desplazamientos y alojamiento

EXPOQUIMIA facilitará a los participantes bonos descuento de Iberia y Renfe para su desplazamiento

Los participantes pueden reservar directamente su alojamiento o contactar con:

RACC, Agencia Oficial de Viajes de Fira de Barcelona.

Tfnos: +34 93 233 23 13 / 59 / 72

Fax: +34 93 233 35 03

Información adicional

Web: www.jai2005.com

E-mail: info@jai2005.com

Fax: +34 93 451 48 13

Tel.: +34 93 451 61 45

NUEVOS SOCIOS

Dulsat Coll, Joan Francesc
Almirall Prodesfarma
C/ Laureá Miró, 408-410
08980 Sant Feliú del Llobregat, BARCELONA

Erny, Guillaume Laurent
Dpto Tecnologías Sectoriales
Inst Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva, 3
28006 MADRID

González Hosannilla, Liliana Rocío
Dpto Toxicología, Bromatología e Higiene
Fac. Farmacia, Univ. Valencia
Av. Vicent Andrés Estellés, s/n
46100 BURJASSOT (Valencia)

Huidobro Peral, Angel Luis
Universidad San Pablo-CEU
Carretera 501, Km 0
Urbanización Montepincipe
28668 Boadilla del Monte, MADRID

Oreiro García, María Teresa
Dep. Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela
Rua San Francisco s/n
15782 Santiago de Compostela, A CORUÑA

Rodríguez Plaza, Pablo
Dpto Caracterización Alimentos
Inst. Fermentaciones Industriales (CSIC)
Juan de la Cierva, 3
28006 MADRID

Vidal Martínez, Lorena
C/ Zurbarán, 1, 3ºB
03640 Monóvar, ALICANTE

Vivó Truyols, Gabriel Ignacio
Van't Hoff Institute for Molecular Sciences (HIMS)
Polymer Analysis Group
Universiteit van Amsterdam
Nieuwe Achtergracht, 166
1018 - NW, Amsterdam (HOLANDA)



RESEÑA DE LIBROS

Bioanalytical Chemistry

S.R. Mikkelsen y E. Cortón

Wiley Interscience, New Jersey, 2004

360 Páginas.

No hace falta insistir en que muchos de los avances científicos están unidos a un avance en los métodos. Los avances espectaculares de la bioquímica en los últimos años no han sido la excepción. Quizá dentro de estos avances el que ha tenido más resonancia (mediática) haya sido la secuenciación del genoma humano. Detrás de él se encuentra la electroforesis capilar. Esto no quiere decir que la secuenciación del genoma humano haya sido posible gracias sólo a los desarrollos en electroforesis capilar. Es evidente que el proyecto Genoma Humano ha puesto juntos medios técnicos, humanos y económicos que van más allá de una sola técnica analítica. Pero como pone de manifiesto el reciente libro de Jame Shreeve, *The Genoma War*, el desarrollo de las técnicas automáticas de secuenciación del ADN por electroforesis capilar han jugado un papel de catalizador: han adelantado en casi diez años el disponer de una versión segura de la secuencia del genoma del homo sapiens.

Con antecedentes como estos, un libro con el título "Bioanalytical Chemistry" sólo puede ser bienvenido, pues llena un hueco existente en la bibliografía. Sus autores exponen en la introducción que cuando tuvieron que preparar en 1990 un curso de técnicas analíticas en bioquímica no encontraron un libro de texto que abordase todos los aspectos de esta rama de la química analítica. En estos casi quince años el arsenal de técnicas analíticas a disposición del bioquímico no ha hecho más que aumentar. La información a transmitir en un tratado de bioquímica analítica es hoy en día tan extenso para que éste tenga una cierta utilidad, que "empaquetar" en poco más de 350 páginas, como lo hace el libro que nos ocupa, tal cúmulo de información es una tarea casi imposible. En este sentido, el loable esfuerzo de los autores se ha plasmado en un manual de cierta utilidad a los alumnos, y quizá para los profesores, de últimos cursos de carrera. Es lo que pretendían los autores y no se puede pedir más a la obra.

El libro aborda, entre otros, aspectos de los métodos espectroscópicos para determinación de contenido en proteínas, ADN, carbohidratos y ácidos grasos de muestras, métodos enzimáticos de análisis, uso de anticuerpos en química analítica, biosensores, técnicas electroforéticas de análisis, métodos de ultracentrifugación analítica, métodos cromatográficos aplicados a la separación de biopolímeros, espectrometría de masas aplicada a proteínas y ácidos nucleicos, y validación de métodos bioanalíticos. Cada capítulo lleva, además de la bibliografía, una

colección de problemas, resueltos en un apéndice final.

Cada uno de los temas se borda de una manera pedagógica. La secuencia "fundamentos de la técnica, diferentes modalidades de ésta y sus aplicaciones" suele ser el esquema general utilizado para abordar cada tema. En mi opinión el desarrollo de algunos temas está ligeramente sesgado; así por ejemplo, los métodos enzimáticos de análisis, abordados en dos capítulos, vienen precedidos por un largo capítulo sobre enzimas (naturaleza, cinética, activadores e inhibidores), mientras que los métodos cromatográficos se exponen en un solo capítulo en el que no aparecen modos de separación tan populares en bioquímica como la cromatografía en fase inversa o la de hidrofobicidad. En este sentido es especialmente llamativo el capítulo dedicado a la espectrometría de masas en el que se da más extensión al análisis de microorganismos por espectrometría de masa que a la revisión de los métodos de ionización.

No cabe duda que la bioquímica analítica es, incluso a nivel de enseñanza, una disciplina a caballo entre la química analítica y la bioquímica, pero algunas técnicas descritas en el capítulo 8 tales como las de DNA shuffling, expresión celular, fago display, fusión mRNA-péptido, etc. caen más dentro de las técnicas de biología molecular que de las analíticas. En cualquier caso siempre puede ser interesante encontrarlas reunidas en un mismo capítulo.

En conclusión, el libro puede ser de interés para un curso de técnicas analíticas en las especialidades en química o bioquímica. La colección de problemas resueltos puede ser de utilidad al alumno para autoevaluar el grado de comprensión de los conceptos adquiridos.

J.C. Díez-Masa

Instituto de Química Orgánica (CSIC)

"The essence of Chromatography"

Colin F. Poole, Elsevier (2003)

925 pg

El título puede resultar equívoco, ya que a algunos les puede parecer que lo esencial de la cromatografía reside en los fundamentos, mientras que otros opinarán que ese título debe incluir una recopilación de lo más imprescindible. El autor opina como los últimos, ya que el libro realiza un amplio recorrido por las diversas modalidades cromatográficas vigentes, es decir se trata de información más amplia que profunda, lo que no representa ningún tipo de crítica a este enfoque, que suele ser muy conveniente para gran número de lectores. El libro representa una revisión y actualización del conocido "Chromatography today" que publicó el mismo autor en 1991.

El primer capítulo trata sobre conceptos generales y comunes a la mayoría de las técnicas cromatográficas (migración, retención, ensanchamiento de banda, resolución y cuantificación). Siguen dos capítulos dedicados a la cromatografía de gases (uno a la columna y otro a la instrumentación) y paralelamente otros dos, dedicados a HPLC. En los dos siguientes se describen la capa fina y la cromatografía de fluidos supercríticos respectivamente. Las diversas vertientes de la electromigración en capilar (electroforesis, electrocromatografía, electroenfoque, isotacoforesis y otras) se agrupan en el capítulo octavo. El noveno se dedica a los detectores espectroscópicos, concretamente a espectrometría de masas, espectrometría infrarroja con transformada de Fourier, reso-

nancia magnética nuclear. El siguiente versa sobre separación de estereoisómeros, especialmente enantiómeros, incluyendo aquí las separaciones con cristales líquidos. El último capítulo describe la cromatografía preparativa.

Cada uno de los capítulos incluye un gran número de referencias bibliográficas y hay un buen índice temático al final.

Tiene la coherencia de los libros escritos por un solo autor, y la posible desventaja de que, a pesar de su conocida experiencia, no posee la misma experiencia en todos los campos descritos.

Isabel Martínez-Castro
Instituto de Química Orgánica (CSIC)

ARTÍCULOS DE INTERÉS

“Respuestas modernas a preguntas antiguas”

Un review muy interesante ha sido publicado recientemente en *LGC Europe* Vol 16, Nº 6 (june 2004). El artículo está disponible on-line en la dirección: www.lgcceurope.com. Los autores, J. A. Tripp y E. M. Hedges del Research Laboratory for Archaeology en Oxford, presentan un resumen actual, conciso y de fácil comprensión referente al uso de técnicas analíticas modernas aplicadas a estudios arqueológicos. Dejando de lado los métodos clásicos para la datación de artefactos antiguos, como pueden ser el empleo del carbono-14 u otros isótopos radioactivos, el artículo se centra en el análisis de compuestos orgánicos aislados. Esta aproximación presenta la ventaja de proporcionar resultados mucho más exactos al eliminar posibles interferencias. Además, suministra información adicional sobre la muestra, ya que separa una señal isotópica en sus partes constituyentes. Previo a su aplicación, se requiere generalmente algún tipo de separación cromatográfica como pueden ser la cromatografía de gases (GC) o de líquidos (LC). Los analitos de interés son básicamente ácidos grasos, proteínas, aminoácidos e hidratos de carbono. La espectrometría de masas de aceleración (AMS) y la espectrometría de masas de relación isotópica (IRMS) son las técnicas de detección revisadas con más detalle. Los datos obtenidos desde la geología, la fauna, la botánica etc. permiten ayudar a reconstruir el medio ambiente de tiempos pasados y determinar incluso cuáles eran los hábitos alimenticios de nuestros antepasados, incluyendo la preparación de la comida.

Para ilustrar la importancia que tiene la aplicación de estas técnicas analíticas modernas, se puede hacer refe-

rencia a un rumor que apareció hace unos meses en la prensa no especializada referente a un coleccionista de Jerusalén que afirmaba estar en posesión de una caja funeraria de tiza, el llamado “osario de James”, atribuido al hermano de Jesús. En un intento de confirmar su autenticidad, se aplicó IRMS a la pátina de las letras de la inscripción del relicario (A. Ayalon et al. *J. Archaeol. Sci.*, 31, Issue 8, August 2004, 1185-1189). El estudio concluyó que la composición isotópica del oxígeno de la pátina de las letras no coincidía con todas las medidas efectuadas en pátinas naturales y, por lo tanto, que no podía haberse formado en las condiciones naturales que han existido en las montañas de Judea durante los últimos 3.000 años. En otras palabras, como poco la inscripción está falsificada y no sería muy recomendable comprar el objeto.

Más atrás en el tiempo nos lleva un estudio que investiga residuos encontrados en restos de jarras y fragmentos de loza de tumbas de Egipto (R. M. Guasch-Jané, *Anal. Chem.* 76, 2004, 1672-1677). En este caso, se buscaron marcadores para vino, como por ejemplo ácido tartárico, mediante LC con espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS). Valiéndose de esta técnica, fue posible la identificación en una jarra de la tumba de Tutanchamón de un antociano, el malvidin-3-glucosido, responsable del color del vino tinto joven. Con lo cual ya no cabe duda de que el vino que se usaba con fines ceremoniales y para el consumo de las clases altas de la sociedad en el antiguo Egipto era vino tinto.

Christian Dietz
Universidad Complutense de Madrid,
Fac. de CC. Químicas, Dpto. Q. Analítica



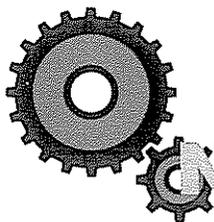
EMPRESAS colaboradoras

PROTECTORAS

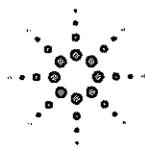
- AGILENT TECHNOLOGIES
SPAIN, S.L.
Ctra N-VI, km 18,200
28230 LAS ROZAS (Madrid)
- PERKIN ELMER ESPAÑA, S.L.
Avda Encuartes, 19
28760 TRES CANTOS (Madrid)
- THERMO ELECTRON CORPORATION
Sepúlveda, 7 - A
28108 ALCOBENDAS (Madrid)
- WATERS CROMATOGRAFÍA, S.A.
Ronda Can Fatjo, 7-A, 24
Parc Tecnologic del Vallés
08290 CERDANYOLA DEL VALLES (Barcelona)
- KONIK-TECH, S.A.
Avda. Cerdanyola, 73
08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS (Barcelona)

ASOCIADAS

- AL AIR LIQUIDE ESPAÑA, S.A.
Paseo de la Castellana, 35
28046 MADRID
- BRUKER ESPAÑOLA, S.A.
Av. de Castilla, 2 (P. E. San Fernando)
28830 SAN FERNANDO DE HENARES (Madrid)
- GILSON INTERNATIONAL B.V.
Apartado de Correos, 1075
28830 SAN FERNANDO DE HENARES (Madrid)
- GOMENSORO, S.A.
Aguacate, 15
28044 MADRID
- INGENIERÍA ANALÍTICA, S.L.
Carretera de Cerdanyola, 73
08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS
(Barcelona)
- IZASA, S.A.
Aragoneses, 13
Polígono Industrial Alcobendas
28100 ALCOBENDAS (Madrid)
- MILLIPORE IBÉRICA, S.A.
Avda. Llano Castellano, 13
28034 MADRID
- SCHARLAB, S.L.
La Jota, 86
08016 BARCELONA
- Servicio y Mantenimiento de Técnicas Analíticas,
S.A.L. (SYMTA, S.A.L.)
San Máximo, 31
28041 MADRID
- S.I.A. Enginyers, S.A.
Monturiol, 16, baixos
08018 BARCELONA
- S. E. DE CARBUROS METÁLICOS, S.A.
Av. Matapiñonera, 9
28700 S. SEBASTIÁN DE LOS REYES (Madrid)
- SUGELABOR
Sicilia, 36
28038 MADRID
- TEKNOKROMA
Cami de Can Calders, 14
08190 SANT CUGAT DEL VALLÉS
(Barcelona)
- VARIAN-IBÉRICA, S.L.
Avda Pedro Díez, 25, 3º
28019 MADRID
- VERTEX TECHNICS, S.L.
Comercio, 12-14 bajos
08902 HOSPITALET DE LLOBREGAT
(Barcelona)
- VWR International - EUROLAB, S.L.
Polígono Merck
08100 MOLLET DEL VALLÉS
(Barcelona)



NOVEDADES TÉCNICAS



Agilent Technologies

Innovating the HP Way

AGILENT TECHNOLOGIES PRESENTA LA PRIMERA FUENTE DE IONES MULTIMODO SIMULTÁNEO PARA ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Se espera que esta tecnología aumente la rapidez, exactitud y productividad de la monitorización de alto rendimiento en el descubrimiento de fármacos y en otras aplicaciones de investigación

PALO ALTO, California, 28 de febrero de 2005. Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) presentó hoy la nueva fuente Agilent, la primera fuente de iones multimodo simultáneo para espectrometría de masas. Se espera que esta tecnología mejore de forma considerable la velocidad, exactitud y productividad de la monitorización de alto rendimiento en el descubrimiento de fármacos y en otras aplicaciones de investigación.

La monitorización de alto rendimiento se utiliza para analizar un alto número de compuestos químicos con rapidez y alta sensibilidad. Para que sean analizables mediante espectrometría de masas, antes es preciso convertir todos los compuestos en iones. Puesto que no todas las moléculas responden al mismo modo de ionización, se han desarrollado múltiples fuentes de ionización para facilitar la monitorización de alto rendimiento. La fuente Agilent multimodo es la primera y única tecnología capaz de trabajar con ionización por electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI), los dos modos de ionización más ampliamente utilizados, de forma simultánea.

“A menudo, las empresas farmacéuticas sintetizan y monitorizan enormes librerías de compuestos con el fin de identificar moléculas con las propiedades deseadas”, explicó Taia Ergueta, directora general de la división de plataforma LC/MS de Agilent. “Hasta ahora, los investigadores tenían que hacer pasar toda la serie de compuestos por ambas fuentes de iones en experimentos sucesivos para asegurarse de cubrir todos los compuestos. Al eliminar la necesidad de cambiar de fuente y reanalizar las muestras, la fuente multimodo de Agilent puede mejorar considerablemente la velocidad, eficiencia y productividad del descubrimiento de fármacos y de otros tipos de investigación, como análisis de péptidos, forenses o medioambientales cuantitativos.”

La fuente Agilent multimodo opera a las velocidades de flujo típicas en cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), hasta 2 ml/min en todos los modos, lo que resulta crucial para la monitorización de alto rendimiento. La capacidad para trabajar a las velocidades normales en HPLC en dos modos simultáneamente y sin pérdida de sensibilidad en comparación con las fuentes independientes, representa una mejora considerable respecto a los dispositivos anteriores. Si bien la fuente multimodo proporciona una alta sensibilidad en todos los modos, ofrece también la flexibilidad de trabajar en modo ESI o APCI de forma independiente.

Agilent ha desarrollado esta nueva tecnología patentada para superar las limitaciones de las fuentes multimodo existentes que, al basarse en un diseño bien de división del flujo o de alternancia del voltaje, impiden la ionización simultánea y reducen el muestreo en un pico cromatográfico. La fuente Agilent multimodo tiene un novedoso diseño en el que el líquido entra a la fuente a través de un único nebulizador, se convierte en un aerosol con carga en una cámara ESI, sufre el secado en un contenedor térmico y pasa seguidamente a una cámara APCI. A continuación, los iones ESI y APCI se unen para entrar juntos al espectrómetro de masas. Al funcionar a elevadas velocidades de flujo y alta sensibilidad sin alternancia del modo, este diseño permite a los investigadores adquirir más datos de cada pico cromatográfico.

La fuente Agilent multimodo (G1978A) será compatible inicialmente con los detectores selectivos de masa de cuadrupolo de Agilent (G1946B/C/D y G1956A/B). Se espera introducir en meses próximos la compatibilidad con el espectrómetro de masas Agilent de tiempo de vuelo. Se requiere el software Agilent ChemStation B.01 de 32 bits para el control instrumental, la adquisición de datos y la gestión de datos. Existe más información disponible acerca de la fuente multimodo en la dirección www.agilent.com/chem/multimode.

AGILENT TECHNOLOGIES PRESENTA EL PRIMER SISTEMA HPLC-CHIP/MS DE LA INDUSTRIA PARA PROTEÓMICA

Se espera que esta revolucionaria tecnología aumente la velocidad, sencillez y productividad de la investigación proteómica

PALO ALTO, California, 23 de febrero de 2005. Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) presentó hoy el primer sistema de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) -chip/espectrometría de masas (MS) para identi-



ficación de proteínas. Se espera que esta revolucionaria tecnología LC/MS basada en microfluidos aumente de forma significativa la velocidad, sencillez y productividad de la investigación proteómica.

Muchos investigadores biomédicos emplean ya la proteómica, el análisis sistemático de la expresión, estructura y función de las proteínas, para estudiar las causas subyacentes a enfermedades como el cáncer. Las técnicas tradicionales empleadas en la preparación de las muestras proteicas para análisis MS, tales como la LC de nanoflujo, requieren complejos montajes instrumentales para mejorar el poder de separación y consumen cantidades relativamente elevadas de muestra. El nuevo e innovador sistema de Agilent simplifica la LC/MS, eleva al poder de separación y la sensibilidad, y reduce el tamaño de muestra requerido mediante la integración de múltiples funcionalidades en un único chip basado en microfluidos.

“El compacto tamaño del sistema de LC/MS microfluidica de Agilent, combinado con su sensibilidad, modularidad y sencillez de operación, aporta ventajas significativas en el análisis de complejos digestos proteicos y representa una tecnología puntera en los programas de descubrimiento proteómico”, declaró el profesor Pierre Thibault del Instituto de Investigación sobre Inmunología y Cáncer de la Universidad de Montreal.

El chip HPLC-Chip para identificación de proteínas

El chip HPLC-Chip para identificación de proteínas de Agilent (G4240A) proporciona una mayor cobertura de péptidos y una superior identificación de proteínas en comparación con la LC/MS de nanoflujo. Más pequeño que una tarjeta de crédito, el exclusivo HPLC-Chip para identificación de proteínas integra de forma transparente las capacidades de enriquecimiento y separación de la muestra de un sistema LC de nanoflujo con las intrincadas conexiones y puntas de spray utilizadas en la espectrometría de masas con electrospray. La tecnología elimina el 50% de las conexiones habitualmente necesarias en un sistema LC/MS, reduciendo drásticamente la posibilidad de fugas y volúmenes muertos, simplificando de forma significativa el flujo de trabajo, y mejorando la sensibilidad y fiabilidad durante el análisis.

Para permitir la gestión experimental y del cumplimiento, el HPLC-Chip incorpora una etiqueta de radiofrecuencia que contiene información como el identificador y el tipo de chip, datos de documentación, diagnósticos y operativos, y memoria adicional para comentarios del usuario. La etiqueta RF se lee cada vez que se inserta

el chip en la interfase HPLC-Chip Cube, actualizándose la información en la etiqueta antes de la extracción del chip. El HPLC-Chip para identificación de proteínas incorpora una columna de 43 mm x 75 µm empaquetada con material de fase reversa Zorbax Stable Bond 300A C-18 de 5 µm.

La interfase HPLC-Chip Cube

El segundo componente del sistema HPLC-Chip/MS es la interfase HPLC-Chip/MS Cube, que va montada en la solución proteómica de nanoflujo con espectrómetro de masas con XCT + trampa de iones de Agilent. Además de posicionar la punta de spray ortogonal con respecto a la entrada del MS para conseguir la máxima sensibilidad y robustez, la interfase HPLC-Chip Cube para MS carga y sella el chip de forma automática, estableciendo conexiones fluidicas a alta presión sin fugas.

La sustitución del HPLC-Chip es una operación sencilla que se completa en cuestión de segundos, a diferencia de los tiempos mucho más largos necesarios para cambiar columnas de LC. La interfase HPLC-Chip Cube está actualmente disponible como módulo estándar dentro del sistema LC Agilent Serie 1100 para MS.

“El HPLC-Chip ayuda a satisfacer las siempre crecientes demandas de productividad de nuestros clientes”, declaró Georges Gauthier, gerente de productos de tecnología HPLC-Chip de Agilent. “El primer HPLC-Chip disponible es para aplicaciones proteómicas, pero la tecnología tiene usos potenciales en una amplia gama de aplicaciones adicionales en las que se emplea LC/MS, entre las que cabe citar desarrollo y fabricación farmacéutica, química combinatoria, análisis de compuestos, seguridad alimentaria, control medioambiental y seguridad nacional”.

Acerca de Agilent Technologies

Agilent Technologies Inc. (NYSE: A) es líder mundial en tecnologías de comunicaciones, electrónica, biociencia y análisis químico. 28.000 empleados atienden a sus clientes en más de 110 países. Durante el ejercicio fiscal de 2004, la facturación neta de Agilent ascendió a 7.200 millones de dólares. Para más información acerca de Agilent, visite la web en la dirección www.agilent.com

Puede disponerse de más noticias ejecutivas, de ciudadanía corporativa y de tecnología en el sitio de noticias de Agilent en www.agilent.com/go/news



PRECISIÓN DE MASA Y TIP™: DOS DIMENSIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN ELEMENTAL.

Bruker Daltonics presenta sus espectrómetros de masas ESI-TOF de sobremesa micrOTOF™ y micrOTOF focus™, unas herramientas con excelentes prestaciones para medidas de masa exacta y que adicionalmente detectan el perfil isotópico verdadero (TIP) de los compuestos analizados debido a su alta capacidad de resolución. Esta combinación única reduce drásticamente el número de posibles candidatos en los estudios de determinación de fórmula molecular y la composición elemental de compuestos con pesos moleculares por encima de 500 Da puede ser identificada inequívocamente.

La espectrometría de masas es una técnica ampliamente utilizada para la determinación de la composición elemental de compuestos en campos como el desarrollo de nuevos fármacos, la metabolómica y en aplicaciones químicas. La última generación de espectrómetros de masas ESI-TOF proporciona una exactitud de masa mejor de 5 ppm, lo que es adecuado para una asignación inequívoca de fórmula molecular para moléculas hasta 300 Da. Si se tienen que analizar moléculas de más de 500 Da de masa, normalmente son múltiples las posibles fórmulas que coinciden con el peso molecular medido en condiciones de masa exacta, incluso algunas veces no basta con los conocimientos químicos para asignar una sola fórmula.

Los espectrómetros de masas micrOTOF™ se han desarrollado para realizar medidas de masa exacta de compuestos desconocidos. Adicionalmente a una exactitud de masa mejor de 3 ó 5 ppm (con calibración interna y externa respectivamente), proporcionan una ventaja única como es la medida del "True Isotopic Pattern" (TIP™) que mide la correlación entre los perfiles isotópicos medidos y teóricos siendo ésta representada como un valor de Sigma-FIT™. Esta combinación única resulta en una reducción significativa del número de fórmulas potenciales (Figura 1).

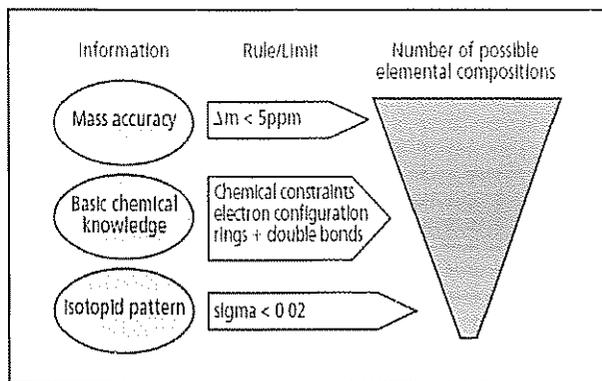


Figura 1. Determinación de la composición elemental

Tal y como se muestra en un estudio representativo realizado conjuntamente con Glaxo-SmithKline, el valor de Sigma-FIT™ es un criterio decisivo a la hora de elegir correctamente entre las posibles fórmulas propuestas. (Figura 2). En el ejemplo presentado se encontraron más de 400 fórmulas posibles a menos de 5 ppm de error de masa. La elección de la fórmula con masa más cercana a los resultados obtenidos conduce a una composición elemental incorrecta, mientras que la elección basada en la correlación de los perfiles isotópicos (Sigma-FIT™) conlleva la elección de la fórmula molecular correcta.

La opción Focus™ para MicrOTOF™.

En su configuración básica el sistema MicrOTOF™ consigue una resolución de masa de 10.000. La novedosa tecnología Focus incrementa la resolución espectrométrica del MicrOTOF™ a 15.000 sobre todo el rango del espectro (Figura 3).

En lugar de estar equipado con el llamado reflector en W, que típicamente pierde más del 70% de los iones a medir, la tecnología Focus™ utiliza múltiples avances en la óptica y detección de iones en el tiempo de vuelo optimizados para el uso de un reflector en V. Como resultado, se obtiene una transmisión sin sufrir pérdidas de iones.

Regulatori Compliance.

Para aquellos usuarios que lo necesiten, los equipos MicrOTOF™ ofrecen un entorno de software para cumplir con la parte 11 de la normativa 21CFR. Bruker Daltonics también ofrece servicios opcionales de IQ, OQ y PV a aquellos usuarios regulados por la normativa FDA.

Contacte con Bruker Biosciences Española para obtener más información: www.bruker.es.

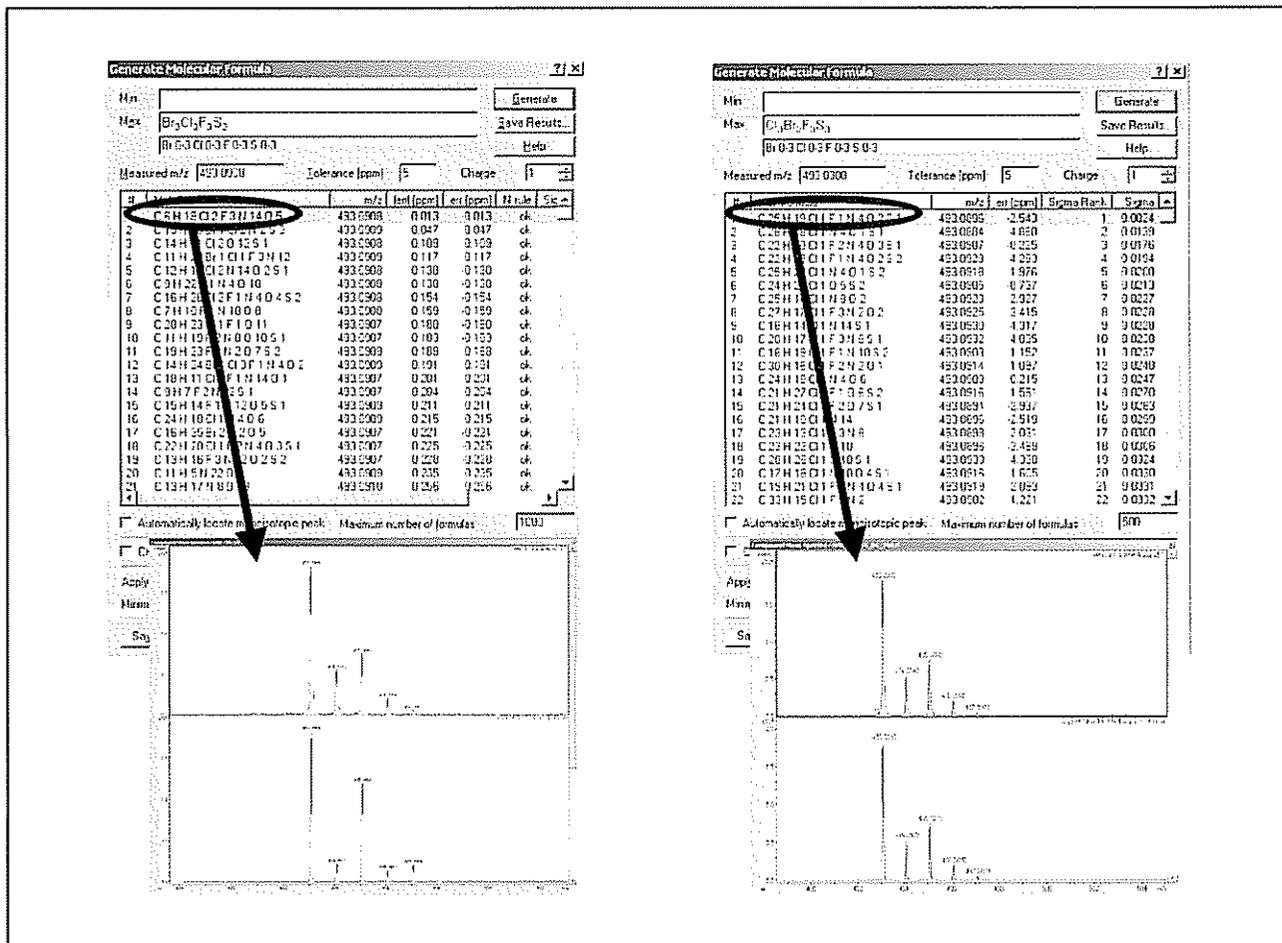


Figura 2. Sobre 400 posibles fórmulas a menos de 5 ppm de error de masa listadas según la masa y Sigma-FIT más cercanas. La asignación de fórmula correcta coincide con la la mejor correlación entre perfiles isotópicos

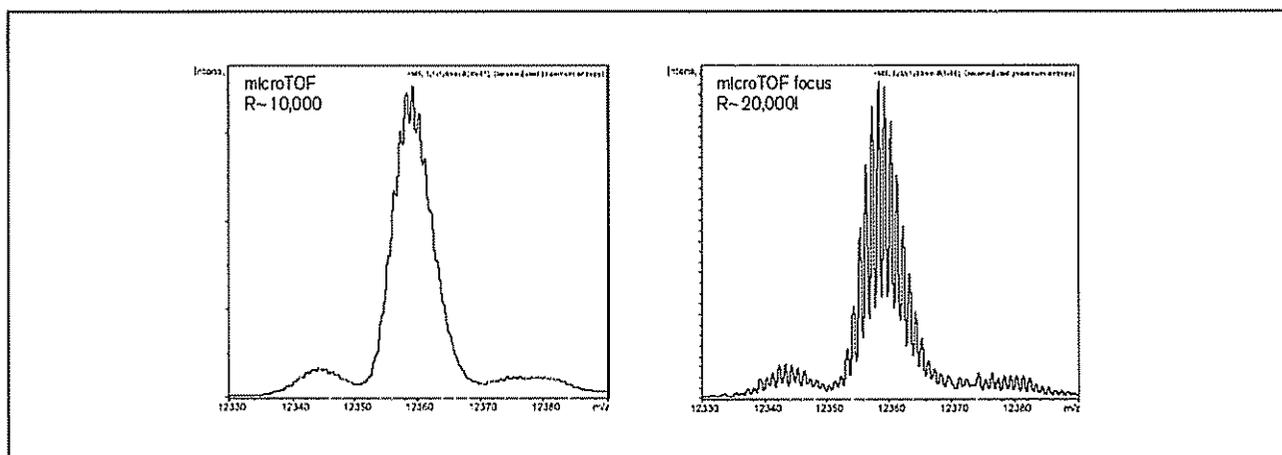
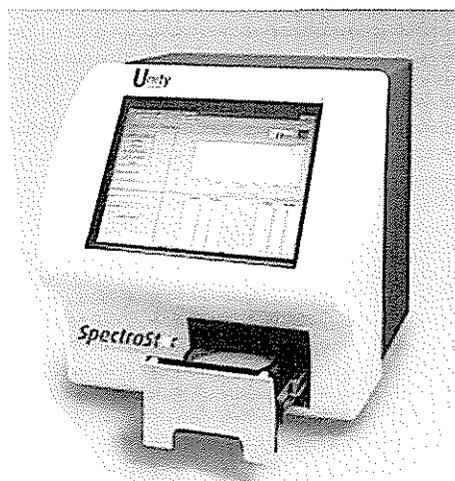


Figura 3. Espectro de masas de la proteína Citocromo C en ESI-TOF. Incluso en la configuración básica el microTOF proporciona una excelente resolución. Sin embargo, la nueva tecnología Focus proporciona claros beneficios en el análisis estructural de moléculas grandes (>10.000 Da.), como proteínas intactas.



ANALIZADOR POR INFRARROJO CERCANO SPECTRA STAR 2400



Gomensoro Instrumentación Científica, tiene el honor de anunciarles la distribución en exclusiva para España de los productos fabricados por **Unity Scientific**, en especial el analizador **Spectra Star 2400** y sus diferentes versiones.

El **Spectra Star**, analizador automático incorpora tecnología NIRS de nueva generación y se utiliza para el control de materias primas y fórmulas terminadas a nivel de producción y laboratorio con un coste atractivo.

Puede obtener la gran mayoría de los componentes en muestras rutinarias, sobre una gran variedad de productos, en pocos segundos.

Los resultados están contrastados frente a los métodos habituales de análisis empleados en el laboratorio químico.

El amplio abanico de aplicaciones permite una rápida instalación y resultados inmediatos, estando al alcance de cualquier empresa que requiera controles rápidos y fiables.

Si en el pasado se ha equipado con sistemas de filtro, tipo InfraAnalyzer o sistemas con monocromador y desea

renovar algún instrumento, conservando o transfiriendo el resultado de las calibraciones obtenidas, con el sistema **Spectra Star 2400** tiene la solución.

Un equipo de expertos en el manejo de las aplicaciones le proporcionará el apoyo necesario, garantizando la continuidad y precisión de los ajustes previos, facilitando la utilización y aplicando los controles de calidad establecidos por una gran mayoría de usuarios.

El SpectraStar 2400 posee una excelente exactitud, precisión y estabilidad inmejorables.

Utiliza una Escala Única de Estandarización de Longitudes de Onda haciendo sencilla la transferencia de calibraciones.

Sin mantenimiento y muy fácil de usar, utiliza el sistema Windows como programa base con pantalla interactiva de gran tamaño.

La Unidad Óptica está optimizada combinando la máxima energía de la lámpara con la vida media más larga posible (10.000 horas).

Cuantifica componentes como: Grasa, proteína, humedad, fibra, cenizas, carbohidratos, energía, ADF, NDF y otros muchos componentes rutinarios.

SOBRE LA TECNOLOGÍA NIR

Diseñada como una técnica para la predicción de la composición química aplicada a una gran variedad de muestras desconocidas, el infrarrojo cercano NIR utiliza reflectancia difusa en un rango del espectro entre 1200 y 2400 nm donde realiza las determinaciones.

Cuando el haz de luz incide sobre la muestra, parte de esta energía es absorbida y el resto reflejada. El porcentaje de luz absorbida varía con la longitud de onda y la estructura química de la muestra. La porción de energía que interacciona con la muestra puede ser determinada por comparación con la intensidad del haz original y la energía de la porción reflejada.

Una serie de muestras Standard son escaneadas con el propósito de obtener la correlación entre los diferentes niveles de constituyentes y la absorción de la radiación a una o más longitudes de onda. Usando un algoritmo de transformación y otros estadísticos proporcionan la ecuación para cuantificar los diferentes constituyentes en muestras desconocidas.



ESPECIFICACIONES

Tecnología

Incluye sistema monocromador soportado con varios anchos de banda (10 nm típico).
Fuente de IR. Lámpara halógena de Tungsteno con una vida media de 10.000 h.
Red holográfica NIR para uso desde 1200 a 2400 nm.
Detector: InGaAs con temperatura estabilizada.
Tiempo de barrido: Menor que 0.8 seg /por barrido.
Tiempo de análisis: De 10 a 60 segundos.
Intervalo entre punto-dato: 1 nm
Rango Fotométrico: 3 0 1200-2400 nm.
Ruido fotométrico: 20 micro AU a 1640 nm.
Haz de barrido : 225 mm².

Interfases de usuario

Sistema operativo: Windows 2000.
Pantalla: 10"VGA con pantalla táctil.
Software: Programa InfoStar para presentación y predicción de resultados.
Teclado y ratón opcional.

Configuraciones de muestreo

2400 D Cápsula Giratoria.
2400 W Ventana superior.

Dimensiones

2400 D (336 mm x 343 mm x 406 mm).
Peso : 15.9 kilos.
2400 W (330 mm x368 mm x381 mm).
Peso: 13.6 Kilos.
Alimentación: Voltaje:100-240 50-60 Hz.
Consumo : 75 VA.

Muestreo

La versión 2400 D SpectraStar puede ser equipada para utilizar varios tipos de cápsula para muestra existentes en el mercado. El modelo 2400 W puede usar cápsulas, bolsas de plástico, botellas, viales y placas de Petri.

VERSIONES Y COMPOSICIÓN

SpectraStar 2400D

Monocromador de reflectancia(1200-2400 nm) con sistema de lectura de muestra giratorio, incorpora computador y pantalla táctil y programa para predicción de resultados.

Composición del suministro:

Analizador SpectraStar 2400 D , cápsulas de muestra (2), programa InfoStar para análisis de rutina

Referencias:

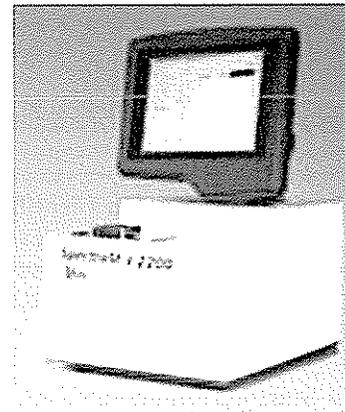
US-2400-001
US-2400-BL I

SpectraStar 2400W

Monocromador de reflectancia ventana superior de lectura, computador y pantalla táctil
Incorporada, programa para predicción de resultados

Composición del suministro:

Analizador SpectraStar 2400 D , cápsulas de muestra (2), programa InfoStar para análisis de rutina.



Estas especificaciones están sujetas a cambios. Todos los nombres y marcas son propiedad de sus respectivos dueños. © Copyright 2004 Unity Scientific LLC. Todos los derechos reservados.

Si esta interesado en ampliar la información rogamos contacte con:

GOMENSORO, S.A.
C/Aguate, 15
28044 MADRID

Tlf: 91 508 65 86
Fax: 91 508 65 11
www.gomensoro.net

KONIK - TECH[®]

KROM+MASS

PRESENTADO
EN LA
PITTCO
2005

DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS A NIVEL DE TRAZAS EN MUESTRAS AMBIENTALES USANDO GC-MS CON IONIZACIÓN QUÍMICA NEGATIVA

KONIK-TECH ha presentado en la última edición de la PITTCO 2005 una sesión oral de título "Trace Level Determination of Organochlorine Pesticides in Environmental Samples Using Gas Chromatography Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry" utilizando su nuevo espectrómetro de masas cuadrupolar KONIK MS Q12, plataforma innovadora que permite 3 entradas diferentes y 12 modos de ionización; HRGC (EI/CI/±), HPLC (ESI/APCI/±) y DIP (EI/CI/±). El concepto revolucionario de este sistema permite cambiar de GC/MS a HPLC/MS de forma sencilla en menos de 15 minutos.

En este trabajo, el instrumento KONIK MS Q12, acoplado al cromatógrafo de gases HRGC 4000 B y al automuestreador multimodal ROBOKROM, ha permitido una rápida optimización del método GC-MS en impacto electrónico (EI+) e ionización química negativa (NCI) para el análisis de pesticidas organoclorados, así como el análisis automatizado por microextracción en fase sólida (SPmE) de estos pesticidas en agua de bebida. Los resultados se han comparado con la técnica clásica de GCECD para el análisis de estos pesticidas. Las condiciones instrumentales y experimentales se indican en la tabla 1

En la Tabla 2 (página 2) se da a modo comparativo algunos parámetros de calidad del método SPmE-GC-MS en modo EI(+) y NCI y SPmE-GC-ECD para el análisis de agua de bebida.

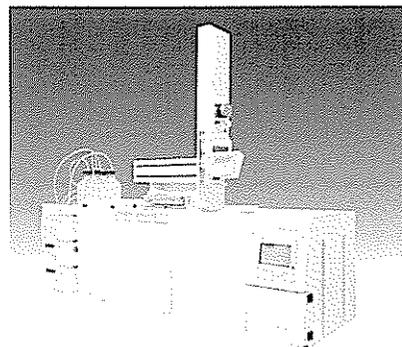
La técnica SPmE combinada con GC-EI-MS, GC-NCI-MS y GC-ECD permite el análisis de pesticidas en agua de bebida a niveles incluso inferiores a 0.1 ppb, límite legislado por la Comunidad Europea para la mayoría de ellos.

Estos métodos permiten la identificación de los compuestos a nivel de sub-ppb (Figura 1), especialmente en GC-NCI-MS que permite eliminar algunas interferencias que aparecen en el SIM en EI(+) y en GC-ECD, por lo tanto, este método puede resultar especialmente adecua-

do en el caso de muestras de matriz compleja. Además, en GC-NCI-MS, pueden mejorar los LODs optimizando el método SPmE o segmentando el cromatograma en el SIM para obtener mayor señal.

Información adicional en
www.konik-group.com
y applications_lab@konik-group.com

KONIK-TECH
Barcelona +34 93 590 28 40
Madrid +34 91 328 25 26





GC:	Equipo:	KONIK HRGC 4000 B
	Columna:	J&W-DB-5MS, 30 m, 0.25 mm, 0.25 µm
	Gas Portador:	He; 1 ml/min
	Inyector:	250 °C, modo inyección: split/splitless 3 min
	Horno:	60 °C (3 min); 30 °C/min; 180 °C (0 min); 8 °C/min 210 °C (2 min); 4 °C/min 270 °C (10 min)
	Detector:	ECD 330 C, make-up: N ₂ a 50 ml/min
SPmE	Equipo:	KONIK ROBOKROM
	Bandeja:	32 viales 20 ml; 18 ml de muestra / estándar; 1.8 g NaCl; T° amb.
	Tipo fibra:	Polidimetilsiloxano 100-µm (PDMS)
	T° absorción:	30 °C
	t absorción:	30 min (no equilibrio)
	Agitación:	Magnética
MS	Equipo:	KONIK MS Q12
	Modo ionización:	Impacto electrónico (EI+)
	T° fuente:	160 °C (EI+); 140 °C (NCI)
	T° línea transferencia:	270 °C
	Rango masas:	40-600 (EI+); 30-450 (NCI)
	Velocidad barrido:	600 ms (EI+, NCI)
	Modo SIM:	100 ms por ion (EI+, NCI)
	Gas de reacción:	Metano a 1.1 ml/min (NCI)

Tabla 1. Condiciones cromatográficas, de SPmE y de MS

	GC-MS EI (SIM)		GC-MS NCI (SIM)		GC-ECD	
	LOD (ppt)	LOD (ppt)	Precisión BSD ^a (%) (n=5)	LOD (ppt)	Precisión BSD ^a (%) (n=5)	
α-BHC	11	6	8.7	14	5.6	
β-BHC	37	56	11.2	151	2.0	
γ-BHC	8	12	9.5	20	3.1	
δ-BHC	33	24	11.2	58	4.0	
Heptachlor	22	17	8.7	24	7.7	
Aldrin	30	6	7.5	36	10.0	
Heptachlor epoxide	6	4	10.7	4	5.6	
Endosulfan I	-	3	12.0	4	4.0	
p,p'-DDE	18	15	11.4	35	12.0	
Dieldrin	4	5	10.0	6	6.7	
Endrin	94	93	n.c.	6	6.0	
Endosulfan II	42	4	4.1	4	4.4	
p,p'-DDD	3	21	12.0	17	11.0	
Endrin aldehyde	260	5	8.6	12	4.0	
Endosulfan sulfate	70	4	13.5	-	-	
p,p'-DDT	5	330	n.c.	50	7.0	
Methoxychlor	4	100 ^b	-	43	11.2	

^a nivel concentración = 0.4 ppb | ^b nivel concentración = 0.7 ppb | ^c interferencia a m/z 241 | ^d T° fuente = 220 °C
n.c. no cuantificado

Tabla 2. Comparación de los parámetros de calidad en la determinación de agua de bebida por SPmE

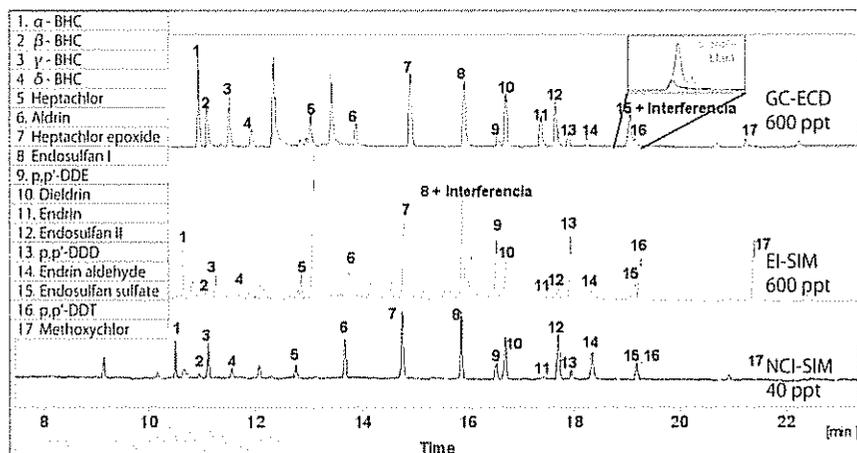
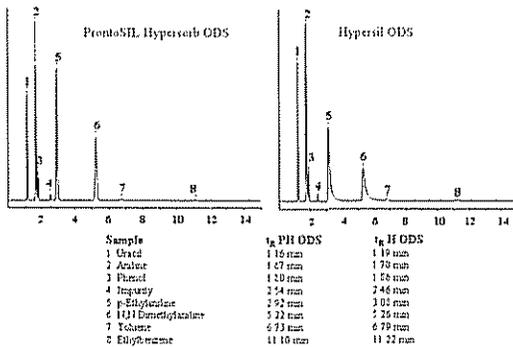


Figura 1. Cromatograma de una muestra de agua de bebida adicionada a nivel de ppt obtenidos por SPmE por GC-ECD, GC-EI-MS y GC-NCI-MS en modo SIM



Scharlab presenta las columnas originales ProntoSIL. Se trata de una sílica esférica ultrapura. Estrictos controles de fabricación garantizan una gran constancia en: distribución de partícula y de poro, tamaño y volumen de poro y área superficial. Es un material extremadamente reproducible, fiable y con altos rendimientos



La gama de fases ProntoSIL es muy amplia. Más de 10 tipos diferentes de C18, cada uno disponible en diferentes tamaños de partícula y dimensiones, hacen de esta línea la solución ideal para el cromatografista. Además se incluyen otras fases en fase reversa, fases normales, de intercambio iónico, fases para aplicaciones específicas en análisis mediambiental, etc

Destacamos las columnas que están en oferta de lanzamiento: las ProntoSIL Hypersorb ODS. Se trata de la alternativa más parecida a Hypersil ODS. Presenta una actividad silanofílica algo menor que Hypersil ODS por ser su sílica algo menos ácida. La polaridad es comparable. El fabricante asegura la misma selectividad pero con mejor simetría de pico

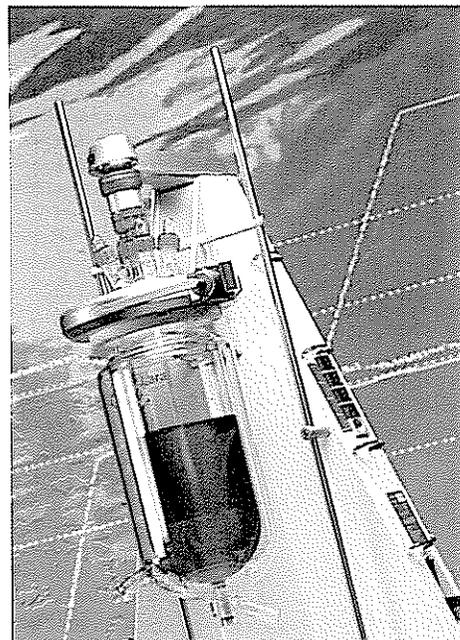
Para más información, obtener aplicaciones o beneficiarse de la oferta de lanzamiento de estas columnas contacte con nuestro SERVICIO DE CONSULTA CROMATOGRÁFICA: cromato@scharlab.com o al 9021 70692



LARA™, NUEVO ESTÁNDAR EN LA AUTOMATIZACIÓN DE PROCESOS

Radleys (Saffron Walden, UK) ha presentado recientemente Lara™, un reactor controlado (Controlled Laboratory Reactor-CLR) que supone un nuevo estándar en la automatización de procesos por su gran flexibilidad y facilidad de manejo.

Con muchos años de experiencia desarrollando y suministrando reactores de vidrio para los laboratorios de procesos de mayor renombre en todo el mundo, Radleys ha diseñado ahora un innovativo sistema modular que ofrece prestaciones asociadas normalmente a equipos de mayor coste. A diferencia de los sistemas manuales convencionales, Lara™ proporciona una solución completa e integrada, con hardware y software específicamente diseñados para darle las mejores ventajas.





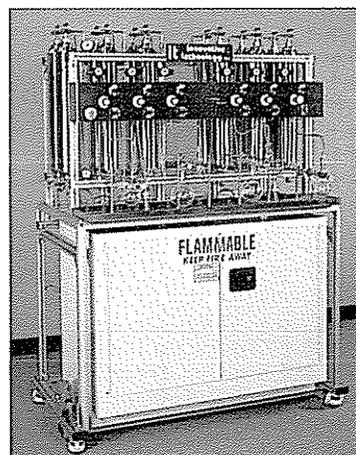
El sistema Lara™ estándar comprende un juego de reactores de vidrio encamisados muy fácilmente intercambiables (500ml, 1 litro 5 litros), agitación integral, fijación segura con un sistema de control vía PC intuitivo y muy fácil de usar. Su diseño compacto minimiza el espacio necesario y permite colocarlo en una vitrina extractora estándar. Ofrece conexión directa a 3 sensores y la posibilidad de controlar un número ilimitado de aparatos vía conexión RS232, o bien, input/output analógicos. Lara™ ha sido diseñado para trabajar en un rango de temperatura de -70 a + 200 oC y puede ser usado con atmósfera inerte o vacío.

El sistema tiene una serie de características extremadamente prácticas y simples que hacen que el día a día del equipo sea muy fácil y productivo. Cada detalle, desde el nueva pinza que se acciona con una sola mano y que sostiene el reactor de vidrio, hasta el sistema de agitación extremadamente fácil de colocar, han sido diseñados buscando la máxima simplicidad y facilidad de manejo. Una serie de módulos de expansión estarán disponibles para Lara para desarrollar sus capacidades y funcionalidad a medida que las necesidades experimentales cambien. Dichos módulos incluirán adición automatizada de reactivo, calorimetría, cristalización, extracción líquido/líquido, fraccionamiento y muestreo automático.



SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE DISOLVENTES PURESOLV™

El sistema PURESOLV™ elimina el agua y el oxígeno de los disolventes utilizando columnas de baja presión. Esta nueva tecnología es una alternativa segura y efectiva frente a los métodos de destilación tradicionales, que conllevan un riesgo importante de incendio. En este caso, la purificación se hace en frío, y no se utilizan metales alcalinos ni hidruros.



El sistema SPS es flexible y permite albergar columnas para la purificación simultánea de 2 a 7 disolventes distintos. Los más habituales son Éteres, THF, Hexanos, Diclorometano, Tolueno, Acetonitrilo, DMF y Metanol, pero no dude en consultarnos si desea purificar algún otro producto.

Para más información contacte con:
Scharlab, S L
Tel: +34 902170692
Fax: +34 937152765
E-mail: cromato@scharlab.com
Web: www.scharlab.com

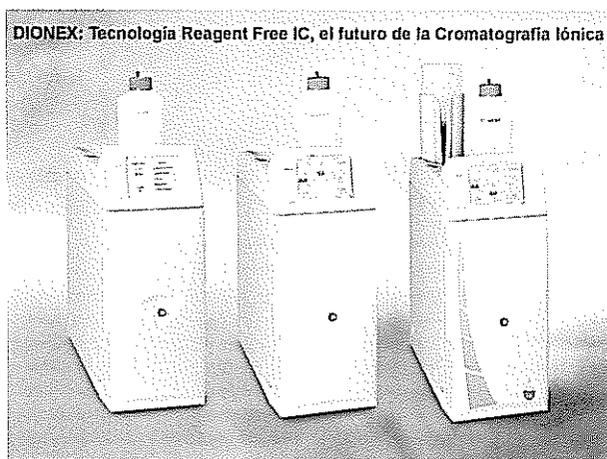


DIONEX: INVESTIGACION Y DESARROLLO DE COLUMNAS: El bromato en la legislación europea.

En tan sólo un año de comercialización, la columna IonPac AS19 se ha convertido en una herramienta fundamental para el análisis de bromato. La combinación de esta columna y el Cromatógrafo Iónico ICS 2000, con su tecnología RFIC, abren la posibilidad de analizar el bromato utilizando la elución con hidróxido.

La tecnología RFIC permite generar eluyentes de alta pureza en línea, añadiendo sólo agua. Generando los eluyentes de esta manera se eliminan las posibles fuentes de contaminación. En este caso el KOH formado, al no estar expuesto al CO₂ de la atmósfera, no se contamina y queda libre de carbonato.

El uso de hidróxido como eluyente en esta aplicación elimina la interferencia que genera el pico negativo del agua. La necesidad de utilizar un loop relativamente grande implicaba, en el caso de la elución con carbonato, la aparición de un enorme pico negativo que interfería la integración del pico de bromato.



DIONEX incorpora en sus equipos de Cromatografía Iónica, la Autosupresión Electroquímica del eluyente, que prácticamente elimina la conductividad de fondo del mismo, con lo cual permite detectar niveles de concentración muy pequeños.

El equipo utilizado en esta aplicación es un Cromatógrafo Iónico DIONEX, modelo ICS2000 configurado con sistema de desgasificación en continuo, gene-

rador de eluyente en línea y termostatación de columnas, con los siguientes accesorios:

A/ Columnas Aniones:

- Columna trampa: CR-ATC
- Columna protectora: IonPac AG19
- Columna separadora: IonPac AS19
- Columna supresora: ASRS Ultra II

B/ Sistema de Adquisición de Datos:

- Chromeleon TM (Versión 6.60- SP1a)

La supresora ASRS Ultra II consigue una muy buena estabilidad de línea base incluso trabajando en el modo de recirculación. En este tipo de análisis, de concentraciones a nivel de ppb, la relación señal/ruido debe optimizarse. Si es necesaria una estabilidad mayor puede ponerse a funcionar en el modo de agua externa.

Hay que aclarar que debido a la gran potencia del Software Chromeleon, asociado al ICS2000, en una misma inyección pueden cuantificarse perfectamente tanto los componentes mayoritarios como los minoritarios.

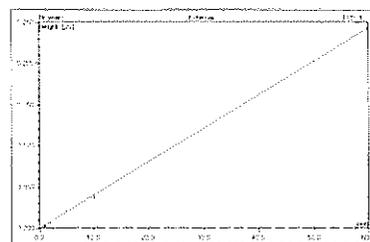
Es decir en nuestro report final podemos presentar los datos cromatográficos en dos impresiones diferenciadas, para la correcta visualización de los picos más pequeños, pero la toma de datos se realizó una sola vez.

Concentración de los patrones y coeficiente de correlación

La recta de calibrado del bromato se ha obtenido a partir de seis patrones de distinta concentración, habiéndose encontrado el siguiente coeficiente de correlación:

	Autocal1	Autocal2	Autocal3	Autocal4	Autocal5	Autocal6	r ²
BrO ₃ ⁻	1 ppb	2 ppb	5 ppb	10 ppb	25 ppb	50 ppb	99,99

Los patrones se prepararon sobre un agua mineral comercial, para que hubiera una cierta presencia de iones





No.	Ret. Time min	Peak Name	Cal. Type	Points	Corr. Coeff.	Offset	Slope	Curve
3	8,98	Bromato	0LOff	5	99,9973	-0,0013	0,0041	0,0000
Average:					99,9973	-0,0013	0,0041	0,0000

Condiciones cromatográficas

La calidad de agua que DIONEX recomienda para trabajar en todas sus aplicaciones es agua desionizada de 17,8 MOhm/cm o superior

Eluyente: C10 mM KOH durante 10 min., 10-45 mM KOH en 15 min. más, 45 mM KOH durante 5 min
 Flujo eluyente: 1 mL/min
 Loop: 350 uL
 Conductividad línea base: 1,2 uS

Características generales de la AS19:

- Columna de alta capacidad: 240 microeq por columna
- Compatible con eluyentes con pH entre 0 y 14
- Compatible con muestras con pH entre 0 y 14
- Compatible con solventes orgánicos: modificadores selectividad, limpieza...
- Temperatura de trabajo optimizada: Ambiente.

Como dato final, indicar que la columna IonPac AS19 cumple y supera los requerimientos descritos en las normas US EPA 300.0, 300.1 y 317.

Nuevas Columnas IonPac AS20 y AS21

AS20

La nueva columna IonPac AS20 es una columna de alta capacidad basada en la elución con hidróxido, diseñada para la determinación de trazas de perclorato en agua potable.

La capacidad y selectividad de la AS20 aseguran que el perclorato se puede cuantificar a niveles inferiores a ug/L, mediante la detección por conductividad, y usando la supresión, incluso en presencia de altas concentraciones de cloruro, sulfato o carbonato

Alta capacidad: 310 microeq por columna (4 x 250 mm)

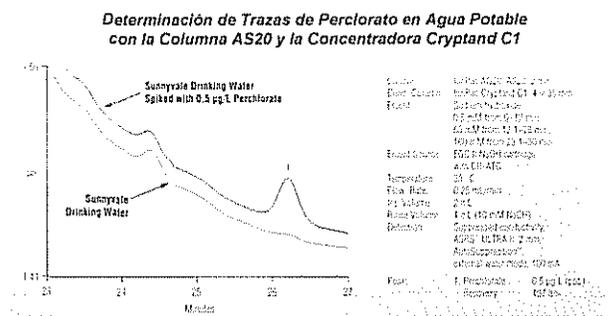
Es la columna especificada en el Método EPA 314.1
 Se usa conjuntamente con la columna concentradora Cryptand C1

AS21

La IonPac AS21 es también una columna basada en la elución con hidróxido, diseñada para la rápida separación de perclorato en aguas potables, aguas residuales u otras matrices, mediante la detección con MS o MS/MS.

La AS21 es ideal para la separación de una gran variedad de aniones ambientales como el arseniato, tungstato, cromato, yoduro o perclorato.

Es la columna especificada en el Método EPA 331.0



Contacte con **VERTEX Technics** para mayor información. **VERTEX Technics** es el distribuidor de **DIONEX** en España: www.vertex.es

- Of. Barcelona: 93 223 33 33
- Of. Madrid: 91 324 00 14
- Of. Bilbao: 94 447 19 99
- Of. Valencia: 96 348 90 92
- Of. Vigo: 98 670 00 72



La gama más completa de gases, materiales y servicios específicos para análisis e investigación.

Pensando en las necesidades específicas de los laboratorios, Air Liquide ofrece con la Gama Alphagaz, una oferta totalmente adaptada a los requerimientos de pureza de la cadena analítica.

Los gases puros y mezclas, los materiales e instalaciones, así como los servicios de la Gama Alphagaz, son la mejor solución para instrumentación analítica e investigación, a partir de la gestión, el mantenimiento y el control de todos los sistemas por parte de Air Liquide.

Air Liquide contribuye a la fabricación de múltiples productos de nuestro día a día y a la preservación de la vida, dentro de una gestión de desarrollo sostenible, gracias a soluciones innovadoras basadas en las últimas tecnologías.



Gases de pureza garantizada en su laboratorio

Waters

Ayer. 

 Hoy.

Acquity

Ultra Performance LC

Presentamos el nuevo sistema Waters® ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography™ (UPLC™). Ultra rapidez, ultra sensibilidad y ultra resolución que rebasan los límites de la HPLC de hoy para entrar en un nuevo dominio de ultra productividad y ultra prestaciones. Basada en los mismos principios fundamentales que la HPLC la UPLC™ permite expandir las aplicaciones de la cromatografía líquida a extremos no imaginados hasta ahora. Ya es posible ver más claro. ACQUITY UPLC™ de Waters: más confianza en los resultados.

Visite www.ultraperformance.com



For Complete  Confidence

Waters Cromatografía, S.A.

Ronda de Can Fatjó 7A • Parc Tecnològic del Vallès • 08290 Cerdanyola del Vallès
Tel. 936 00 93 00 • Fax 936 00 93 60
Avenida de Europa, 21 • Parque Empresarial La Moraleja • 28810 Alcobendas
Tel. 912 03 91 00 • Fax 916 61 08 55

www.waters.com • eMail spain@waters.com

© 2004 Waters Corporation. Waters, ACQUITY Ultra Performance Liquid Chromatography y UPLC son marcas registradas de Waters Corporation.