

DESARROLLO Y APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS
BASADOS EN ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO
Y/O ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE
RELEVANCIA BIOLÓGICA

M.C. Missael Antonio Arroyo Negrete

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUÍMICA

**DESARROLLO Y APLICACIÓN DE PROCEDIMIENTOS BASADOS EN ANÁLISIS
POR INYECCIÓN EN FLUJO Y/O ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DE RELEVANCIA BIOLÓGICA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

M.C.Q. MISSAEL ANTONIO ARROYO NEGRETE

Director: Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-director: Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro del comité tutorial: Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Guanajuato, Gto. marzo del 2022

Responsiva

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad del presente trabajo de tesis, titulado “**Desarrollo y aplicación de procedimientos basados en análisis por inyección en flujo y/o espectrometría de masas para la determinación de compuestos de relevancia biológica**”, que presenta el **M.C.Q. Missael Antonio Arroyo Negrete**, para obtener el título de **Doctor en Ciencias Químicas**, en las instalaciones del Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Alumno

M.C.Q. Missael Antonio Arroyo Negrete

Director:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Director

Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro del comité tutorial

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Miembros del Jurado en el examen que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta el M.C.Q. Missael Antonio Arroyo Negrete.

Sinodales

Dr. J. Félix Gutiérrez Corona
Presidente

Dra. Alejandra Ramírez Segovia
Secretario

Dr. Moisés Guerrero Esperanza
Vocal

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa
Vocal

Dr. Armando Gómez Ojeda
Vocal

Dr. Oracio Serrano Torres
Suplente

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por el tiempo, esfuerzo y sacrificio que me han brindado a lo largo de toda mi formación. El camino fue largo y sinuoso, pero juntos alcanzamos este objetivo. De una manera muy especial te agradezco a ti Anáhuac mi amada esposa por estar conmigo desde el principio, y por darme el mejor regalo, nuestra hija adorada.

A mis asesores la Dra. Katarzyna y Dr. Kazimierz Wrobel, faltan las palabras para agradecer lo mucho que he aprendido de ustedes durante estos años. Gracias por haber me aceptado en su grupo, por mostrarme como es el camino de la investigación, por sus críticas y recomendaciones, todo nos llevó hasta este punto. Difícil imaginar que ya no escuchare sus gratas memorias.

A los distintos miembros del laboratorio Doctores, técnicos, y compañeros que conocí durante este tiempo, en especial para la Dra. Eunice y el Dr. Allan, por todos los consejos brindados.

A CONACYT por la beca otorgada.

A DAIP por los distintos apoyos otorgados.

Y finalmente a la Universidad de Guanajuato, fue un placer recorrer tus pasillos, aulas y laboratorios.

Dedicatoria

Creí que yo era el químico, pero ustedes trajeron equilibrio a mi vida.

Para Anah y Anel.

Índice

Responsiva	II
Sinodales	III
Agradecimientos.....	IV
Dedicatoria	V
Índice.....	VI
Índice de tablas.....	X
Índice de figuras	XII
Abreviaturas	XVIII
Resumen	XIX
1 Marco teórico.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Fundamentos teóricos del sistema FIA.....	5
1.2.1 Sistema FIA	5
1.2.2 Variación del perfil del segmento de la muestra	5
1.2.3 Fenómenos de convección y difusión y registro de las señales.....	6
1.2.4 Características de una señal FIA.....	8
1.2.5 Coeficiente de dispersión.....	9
1.2.6 Parámetros que influyen en la forma de la señal FIA	10
1.3 Espectrometría de masas	12
1.3.1 Componentes de un espectrómetro de masas.....	13
1.3.1.1 Fuente de ionización	13
1.3.1.2 Comparación entre MALDI y ESI.....	20
1.3.2 Separadores de masas.....	21
1.3.2.1 Cuadrupolo	21
1.3.2.2 Trampa de iones.....	23

1.3.2.3	Tiempo de vuelo	24
1.4	Uso del análisis por inyección al flujo en espectrometría de masas (FIA-MS)	26
1.4.1	Sistema FIA-MS	31
1.4.2	Parámetros que afectan la forma de la señal del pico de FIA-MS	32
2	Objetivos	35
2.1	Objetivo general	35
2.2	Objetivos particulares	35
3	Parte Experimental	36
3.1	Equipos de laboratorio	36
3.1.1	Instrumentación analítica	36
3.1.2	Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos	36
3.2	Estándares y reactivos	37
3.3	Programas de análisis de datos	37
4	Resultados y discusión	37
4.1	Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos en muestras de aceite de ricino por inyección al flujo por electronebulización y espectrometría de masas de alta resolución	37
4.1.1	Introducción	37
4.1.2	Objetivos particulares	39
4.1.3	Materiales y métodos	39
4.1.4	Resultados y discusión	43
4.1.5	Conclusión	56
4.2	Determinación de picolinato de cromo en suplementos alimenticios por FIA-ESI-ITMS/MS	58
4.2.1	Introducción	58
4.2.2	Objetivos particulares	59

4.2.3	Materiales y métodos	60
4.2.4	Resultados y discusión	63
4.2.5	Conclusiones	76
4.3	Determinación de colorantes azo sulfonados en Chile en polvo por MALDI-TOF MS..	77
4.3.1	Introducción.....	77
4.3.2	Objetivos particulares.....	79
4.3.3	Materiales y métodos	79
4.3.4	Resultados y discusión	82
4.3.5	Conclusiones	105
4.4	Fraccionamiento Isotópico de magnesio en Clorofila-a extraído de dos plantas con diferentes vías de fijación de carbono (C3, C4)	107
4.4.1	Introducción.....	107
4.4.2	Objetivos	109
4.4.3	Objetivos Particulares	110
4.4.4	Materiales y métodos	110
4.4.5	Resultados y Discusión	116
4.4.6	Conclusiones	127
5	Conclusiones	127
6	Bibliografía	129
7	Anexos	137
7.1	Determination of fatty acid methyl esters in cosmetic castor oils by flow injection–electrospray ionization–high-resolution mass spectrometry	137
7.2	Determination of chromium(III) picolinate in dietary supplements by flow injection - electrospray ionization - tandem mass spectrometry, using cobalt (II) picolinate as internal standardElectronic supplementary material	137
7.3	Determination of sulfonated azo dyes in chili powders by MALDI-TOF MS.....	137

7.4 Magnesium–Isotope Fractionation in Chlorophyll-a Extracted from Two Plants with Different Pathways of Carbon Fixation (C3, C4).....137

Índice de tablas

Tabla 1 Analizadores de masa más utilizados.....	22
Tabla 2 Estado del arte FIA-MS	29
Tabla 3 Estado del arte FIA-MS (continuación).....	30
Tabla 4 Estructuras y valores LogP de los distintos FAMEs empleados.....	46
Tabla 5 Parámetros analíticos evaluados para FAMEs de ácidos insaturados usando el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS.	50
Tabla 6 Parámetros analíticos evaluados para FAMEs de ácidos saturados usando el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS.	50
Tabla 7 Resultados del análisis de FAMEs en las muestras 1 y 8, obtenidos mediante el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS y GC-FID.	52
Tabla 8 Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración, utilizando el procedimiento FIA-ESI-ITMS/MS.	72
Tabla 9 Porcentajes de recuperación obtenidos para la extracción de picolinato de cromo mediante FIA-ESI-ITMS/MS.....	73
Tabla 10 Concentraciones de cromo encontradas en cuatro suplementos comerciales: resultados FIA-ESI-ITMS/MS correspondientes a Cr en forma de CrPic ₃ e ICP-MS provee la concentración de Cr total. Promedios y SD basados en tres replicas.	75
Tabla 11 El porcentaje de intensidad del aducto de sodio con respecto al ion molecular desprotonado, calculado para cada compuesto en presencia y en ausencia de BTAB. Intensidades de iones individuales tomadas de los espectros presentados en la Figura 35 a y 35 b.....	87
Tabla 12 Parámetros analíticos evaluados para cinco azo colorantes sulfonados usando el procedimiento propuesto por MALDI-TOF MS.....	97
Tabla 13 Resultados de recuperación obtenidos después de la adición estándar a las muestras 4-6.	100
Tabla 14 Parámetros analíticos evaluados para cinco colorantes azoicos sulfonados usando el procedimiento HPLC-DAD: Amarillo 6 – amarillo ocaso, rojo 5 – ponceau 2R, rojo 40 – rojo allura, amarillo 5 – tartrazina, rojo 2 – amaranto).....	103
Tabla 15 Resultados obtenidos para la determinación de colorantes azoicos sulfonados en productos comerciales mediante dos procedimientos analíticos.....	105

Tabla 16 Recuperación de magnesio en el procedimiento analítico (digestión ácida, evaporación y reconstitución previos a IC-MC-ICP-MS). La concentración inicial de Mg se fijó en 1 000 g L⁻¹, para las muestras de clorofila-a, el ajuste se basó en la determinación mediante ICP-MS con cuadrupolo (valores medios y RSD basados en cinco réplicas).....121

Tabla 17 Valores de la relación isótopos-magnesio obtenidos para las muestras analizadas en este trabajo (media 2SD, basada en cinco repeticiones) y valores seleccionados reportados en la literatura.125

Tabla 18 Fraccionamiento de isótopos de Mg observado durante 11 días de crecimiento de plantas y biosíntesis de clorofila-a.125

Índice de figuras

Figura 1 Configuración de un sistema FIA (VI – válvula de inyección, CR – bucle de reacción)	5
Figura 2 Efecto de la dispersión sobre la forma del segmento de una muestra en diferentes momentos durante su transporte por el sistema FIA: a) inyección; b) cuando la convección domina la dispersión; (c) cuando la convección y la difusión contribuyen a la dispersión; y (d) cuando la difusión domina a la dispersión .	6
Figura 3 Presentación grafica de la difusión axial y radial del segmento de muestra en sistema FIA. La banda gris es el perfil de flujo de la muestra y las flechas indican la dirección de difusión	7
Figura 4 Fiagrama típico registrado en un proceso de calibración. (inyección de cada solución por triplicado).	8
Figura 5 Típica señal analítica obtenida mediante un sistema FIA	9
Figura 6 Efecto del volumen de inyección de muestra en la dispersión en un sistema FIA. X = fracción volumétrica de la muestra; S = momento de inyección. Las gráficas corresponden a loops de inyección de 59, 108, 206, 403 y 795 μL .	11
Figura 7 Efecto de longitud de tubo sobre la señal en un sistema FIA.	12
Figura 8 Técnicas de ionización en espectrometría de masas para diferentes necesidades ordenadas por principales campos de aplicación	14
Figura 9 Diagrama de un dispositivo ESI .	16
Figura 10 Modelos de ionización MALDI; [I] protonación en fase gaseosa, mostrando la transferencia de carga de la matriz ionizada (mH^+) al analito (A). [II] Modelo del superviviente afortunado, mostrando la desorción directa del analito preformado mono-cargado (mH^+)	19
Figura 11 Esquema de un filtro de masas del tipo cuadrupolo lineal .	23
Figura 12 Diagrama FIA-MS, donde la inyección de muestra se realiza mediante el auto-muestreador comercial del equipo HPLC. b) “Fiagrama” típico, en el que se muestran etapas del proceso FIA.	27
Figura 13 Efecto del diámetro del capilar interno en la forma del pico del analito en el sistema FIA-MS, según lo reportado por Mol y van Dam .	33
Figura 14 Efecto del tipo de solvente sobre la eficacia de ionización del analito en FIA-MS	34

Figura 15 a) Montaje final del sistema FIA-ESI-QTOF; i) HPLC-Ultimate 3000, ii) válvula de inyección Rheodyne, iii) Espectrómetro de masas maXis impact. b) fuente de ionización ESI del espectrómetro de masas maXis impact.	40
Figura 16 Espectros de masas obtenidos para una solución estándar de FAMES; a) sin adición de estándar interno, b) con la adición de formiato de sodio como estándar interno, donde se muestra la formación preferente de aductos sodiados en presencia del IS.	47
Figura 17 Típicos fiagramas obtenidos para las primeras ocho soluciones de calibración inyectadas en tres réplicas sucesivas. Se extrajeron los iones de FAMES individuales con anchura de m/z 0.005 y se aplicó suavizado gaussiano de 2 puntos. Las soluciones inyectadas contenían los siguientes rangos de concentración: (a) 18.4 – 2357 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ricinoleato de metilo; (b) 16.3 – 2083 $\mu\text{g L}^{-1}$ de oleato de metilo; (c) 16.7 – 2143 $\mu\text{g L}^{-1}$ linoleato de metilo; (d) 2.33 – 298 $\mu\text{g L}^{-1}$ de linolenato de metilo L^{-1} ; (e) 2,79 – 357 μg de estearato de metilo; (f) estándar interno (75.13 mg L^{-1}).	48
Figura 18 Típicos registros de una corrida analítica realizada por FIA-ESI-QTOFMS (a) y por CG-FID (b) para la muestra 4	53
Figura 19 Típico fiagrama obtenido para nueve aceites cosméticos comerciales, cada grafica corresponde al ion extraído para un FAME individual (cada muestra inyectada por triplicado). .	55
Figura 20 Distribución relativa de ácidos grasos analizados en nueve aceites cosméticos comerciales.	56
Figura 21 Estructura de; a) picolinato de cromo (III), b) picolinato de cobalto (II).	59
Figura 22 Espectro de masas ESI-QTOF-MS de a) picolinato de cromo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y b) picolinato de cobalto 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ en formiato de amonio 10 mM (metanol:agua 1:1).	64
Figura 23 Patrón isotópico experimental y teórico de moléculas protonadas obtenidos por infusión directa de estándares individuales al sistema ESI-QTOFMS: a) picolinato de cromo, b) picolinato de cobalto.	65
Figura 24 Espectros ESI-ITMS del picolinato de cromo (1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$) registrados para diferentes soluciones portadoras; a) formiato de amonio 10 mM en metanol:agua (1:1, v/v); b) acetonitrilo:agua (1:1, v/v); c) 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo:agua (1:1, v/v).	65
Figura 25 Espectros ESI-ITMS del picolinato de cobalto (1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$) registrados en diferentes soluciones portadoras; a) formiato de amonio 10 mM en metanol:agua (1:1, v/v); b) acetonitrilo:agua (1:1, v/v); c) 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo:agua (1:1, v/v).	66

Figura 26 Efecto de la amplitud de fragmentación sobre la abundancia del ion producto obtenido en las transiciones m/z 419 \rightarrow 270 para CrPic ₃ (a) y m/z 304 \rightarrow 260, 304 \rightarrow 216 para CoPic ₂ (b).	67
Figura 27 Espectros de fragmentación obtenidos para a) m/z 420 de picolinato de cromo y b) m/z 304 de picolinato de cobalto.....	68
Figura 28 Repetibilidad de las señales registrados por FIA-ESI-ITMS/MS utilizando a) transiciones 419 \rightarrow 270 para el CrPic ₃ y b) 304 \rightarrow 260 para el CoPic ₂ , usando un flujo de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. (*RSD – desviación estándar relativa en base a las señales de analito e IS; **RSD – desviación estándar relativa para señales del analito normalizados por IS. Como señal analítica se tomó el área del pico).....	69
Figura 29 Efecto de la velocidad del flujo sobre la forma y repetibilidad de las señales FIA-ESI-ITMS/MS de CrPic ₃ (a) y CoPic ₂ (b), ambos con una concentración de 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$. (¹ RSD – desviación estándar relativa en base a las señales de analito; ² **RSD – desviación estándar relativa para señales del analito normalizados por IS. Como señal analítica se tomó el área del pico).....	70
Figura 30 Diagramas obtenidos para ocho soluciones de calibración inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con $m/z \pm 0.1$ y se aplicaron dos puntos para suavizado gaussiano. (a) ion extraído m/z 270 para el picolinato de cromo, las soluciones inyectadas contenían el intervalo de concentraciones de CrPi ₃ 3.91 – 500 $\mu\text{g L}^{-1}$; (b) ion extraído 260 para CoPi ₂ como estándar interno, concentración en todas soluciones 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$	71
Figura 31 Diagramas obtenidos para dos muestras reales con adición estándar correspondiente a 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ de CrPic ₃ en la muestra (en base a masa seca) inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con m/z 0.1 y se aplicaron dos puntos de suavizado gaussiano. (a) ion extraído 270 para el CrPi ₃ ; (b) ion extraído 260 para el CoPi ₂ como estándar interno.....	73
Figura 32 Diagramas obtenidos para muestras reales inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con m/z 0.1 y se aplicaron dos puntos Gaussian smoothing. (a) ion extraído m/z 269 para el CrPi ₃ ; (b) ion extraído m/z 259 para el CoPi ₂ 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ como estándar interno.	75

Figura 33 Estructuras de los colorantes azo sulfonados analizados, se utilizó rojo ácido 88 como estándar interno. ¹ nombre comercial, ² nombre en la comunidad europea, ³ color index, ⁴ nombre oficial FD&C, ⁵ formula molecular.....	83
Figura 34 Espectros típicos de MALDI-TOF MS adquiridos para la mezcla de colorantes azo sulfonados: amarillo 6, amarillo ocaso; rojo 5, ponceau 2R; rojo 40, rojo allura; amarillo 5, tartrazina; rojo 2, amaranto; rojo ácido 88 como IS. Para mayor claridad de presentación, los espectros fueron adquiridos bajo las condiciones finales, descritas en la sección “Materiales y métodos”. a) Mezcla estándar acuosa sin adición de BTAB (600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS). b) La misma mezcla estándar después de la adición de BTAB y la extracción en cloroformo.....	85
Figura 35 Efecto de la concentración de BTAB en la extracción de colorantes azoicos de una solución acuosa mixta. La solución contenía 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada colorante; para la extracción, a 1 mL de solución acuosa se agregaron 500 μL de cloroformo y después de la separación de fases, se registraron los espectros de absorción UV/Vis en la fase acuosa.....	87
Figura 36 Efecto del pH sobre la magnitud de las señales MALDI-TOFMS adquiridas para seis colorantes (600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS; las medias y las desviaciones estándar respectivas se presentan para cinco réplicas).....	88
Figura 37 Espectros típicos de MALDI-TOF MS obtenidos para la mezcla estándar (50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada colorante, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS) y un disparo de láser con adquisición de 20 o 100 espectros instantáneos, respectivamente.....	89
Figura 38 Efecto del número de espectros instantáneos adquiridos para amarillo ocaso por un disparo de láser. (E110, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS). Para mayor claridad en la visualización, se utilizaron las condiciones experimentales y otras condiciones instrumentales, como se describe en Materiales y métodos).....	90
Figura 39 Efecto del número de espectros instantáneos adquiridos para el rojo Allura por un disparo de láser. (E129, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS). Para mayor claridad en la visualización, se utilizaron las condiciones experimentales y otras condiciones instrumentales, como se describe en Materiales y métodos).....	91
Figura 40 Evaluación comparativa de diferentes modos automáticos del movimiento de láser; 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS; 20 espectros instantáneos en promedio por disparo del láser y una suma de 600 espectros por ciclo de movimiento del láser. a) Valores medios con sus	

respectivas desviaciones estándar calculadas para cinco réplicas de cada modo automático y cada colorante. b) Desviaciones estándar relativas (RSD, %) calculadas para los resultados presentados en a).	93
Figura 41 Efecto de la concentración de 9-aminoacridina (9-AA, matriz química), sobre la intensidad y repetibilidad de señales analíticas. (600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS, señales espectrales adquiridas después de la extracción a cloroformo y deposición "sándwich" en el objetivo - 600 disparos láser acumulados; condiciones finales aplicadas como se describe en materiales y métodos. Los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar se presentan para 5 repeticiones).	94
Figura 42 Espectros MALDI-TOF MS adquiridos para las soluciones de calibración y normalizados con el ion más intenso del IS (amarillo 6 - amarillo ocaso, rojo 5 - ponceau 4R, rojo 40 - rojo allura, amarillo 5 - tartrazina, rojo 2 - amaranto; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo 88 como IS; finalmente se seleccionó las condiciones experimentales e instrumentales como se describe en Materiales y métodos).	96
Figura 43 Señales MALDI-TOF MS adquiridas para la muestra 6 (línea discontinua), esta misma muestra con la adición estándar de cada analito correspondiente a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ (línea punteada) y 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ (línea continua) de cada analito. Los espectros se normalizaron por la señal más intensa (amarillo 6, amarillo ocaso; rojo 5, ponceau 2R; rojo 40, rojo allura; amarillo 5, tartrazina; rojo 2, amaranto; rojo ácido 88 como IS).	98
Figura 44 Espectros completos MALDI-TOFMS adquiridos para la muestra 6 (línea continua), esta misma muestra con la adición estándar de cada analito correspondiente a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ (línea discontinua) y 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ (línea continua gris) de cada analito. Los espectros se normalizaron con la señal más intensa. (Amarillo 6-amarillo ocaso, rojo 5-ponceau 2R, rojo 40-rojo allura, amarillo 5-tartrazina, rojo 2-amaranto; 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS; finalmente condiciones experimentales e instrumentales seleccionados como se describe en Materiales y métodos).	99
Figura 45 Cromatogramas típicos de HPLC-DAD obtenidos para: (a) mezcla estándar conteniendo 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito (amarillo 6-amarillo ocaso, rojo 5-ponceau 2R, rojo 40-rojo allura, amarillo 5-tartrazina, rojo 2-amaranto); (b) muestra 6 (rojo allura 107 $\mu\text{g g}^{-1}$).	102
Figura 46 Procedimiento de extracción con fotografías de las diferentes etapas del proceso.	112
Figura 47 Representación esquemática de la configuración instrumental para las mediciones de isótopos de Mg.	116

Figura 48 Separación de clorofilas por cromatografía líquida preparativa (centro) y confirmación de su identidad en base a los espectros de absorción (abajo) y por espectrometría de masas de alta resolución (arriba). Los datos presentados se obtuvieron para maíz y para berro de jardín; las fotografías muestran las fracciones obtenidas para ambas plantas en una sola corrida cromatográfica..... 120

Figura 49 Análisis de isótopos de magnesio en clorofila-a de berro de jardín (a) y de maíz (b). El panel de la izquierda muestra mediciones realizadas por el sistema MC ICP-MS durante la ejecución cromatográfica (las señales planas corresponden al estándar DSM-3 y la señal en forma de pico en el medio corresponde a la elución de Mg de la columna de intercambio catiónico). Relación isotópica $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ medida durante la elución del pico cromatográfico se presenta para las dos plantas en el panel derecho 122

Abreviaturas

A	Área de pico
B	Analizador de sector magnético
C	Concentración de analito en un tiempo determinado
C_0	Concentración del analito en ausencia de fenómenos de convección y difusión
CI	Ionización química
C_{\max}	Concentración del analito en el punto de respuesta máximo
D	Coefficiente de dispersión
D_{\max}	Coefficiente de dispersión en el punto de concentración máxima
EI	Electroionización
ESI	Ionización por electro nebulización
FIA	Análisis por inyección al flujo
FT-ICR	Analizador de resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier.
h	Altura de pico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
I	Punto de inyección
IS	Estándar interno
IT	Trampa de iones
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
Picr_3	Picolinato de cromo
Q	Separador de masas tipo cuadrupolo lineal
QIT	Separador de masas tipo cuadrupolo trampa de iones
SPE	Extracción en fase sólida
t_{inicial}	Tiempo inicial
TOF	Analizador de masas de tiempo de vuelo
$t_{\text{residencia}}$	Tiempo de residencia
VI	Válvula de inyección
W	Ancho de pico en un punto dado

Resumen

Los sistemas de análisis por inyección en flujo en acoplamiento con espectrometría de masas (FIA-MS) forman parte de un área de investigación creciente en química analítica. Las metodologías FIA-MS son ideales para una rápida cuantificación de analitos con buena precisión y exactitud. Los análisis FIA-MS se presentan como una alternativa a LC-MS, con el uso de la misma configuración instrumental, pero eliminando la columna cromatográfica. El análisis sin previa separación es posible para muestras de composición química relativamente simple, gracias a la alta resolución y selectividad de MS, aportando una ventaja muy importante, la cual consiste en acortar el tiempo de la corrida de muestra. Los métodos FIA-MS requieren de un control y optimización preciso de los parámetros FIA (velocidad de flujo, la longitud y diámetro del tubo, composición de la solución portadora) para llevar a cabo la cuantificación de múltiples analitos sin separación y con un alto nivel de confianza. Por otro lado, es importante la selección de las condiciones de cuantificación por MS, incluyendo el uso de un estándar interno adecuado. En este sentido, la tesis que se presenta a continuación tiene como principal objetivo contribuir en el desarrollo de procedimientos analíticos enfocados en la determinación de compuestos de relevancia biológica y medioambiental por espectrometría de masas usando preferentemente el principio de FIA.

Primeramente, en el capítulo 1, se presentan los fundamentos de la técnica de análisis por inyección al flujo, así como de su acoplamiento con espectrometría de masas. Se describen las partes que conforman el sistema FIA-MS, y las características a tomar en cuenta en el desarrollo de metodologías FIA. De igual manera, los distintos componentes de un espectrómetro de masas, en donde la comparación entre dos diferentes técnicas de ionización (ESI y MALDI) que fueron utilizadas durante el desarrollo de esta tesis son descritas.

Posteriormente, en el capítulo 2 se describe el desarrollo de un procedimiento FIA-ESI-QTOF para la determinación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) presentes en aceites de ricino cosméticos, donde un punto base en la optimización del sistema fue la aplicación de formiato de sodio $[\text{Na}(\text{NaCOOH})_3]^+$ el cual funcionó tanto como: i) fijador de masa en la calibración, ii) promotor de formación de aductos con sodio durante la ionización de FAMEs y iii) estándar interno durante la cuantificación. Para la obtención de los FAMEs correspondientes se realizó una reacción de transesterificación típica con KOH 2% y CH_3ONa 0.5% en metanol

con una posterior extracción con isooctano, los FAMEs resultantes fueron diluidos apropiadamente con la adición de una solución de agua:isopropanol:acetonitrilo (20:50:30 v/v) que contenía formiato de sodio 1.16 mmol L^{-1} como estándar interno. El análisis FIA fue llevado a cabo utilizando un puerto de inyección manual Rheodyne y la bomba del equipo HPLC (Ultimate 3000, Thermo Scientific); como solución portadora se utilizó una solución de agua:isopropanol:acetonitrilo (20:50:30 v/v) a un flujo de $80 \mu\text{L min}^{-1}$, la muestra se inyectó en intervalos de dos minutos a la fuente ESI de un espectrómetro de alta resolución, modelo maXis Impact (Bruker Daltonics). A partir de los datos obtenidos, se generaron los fiagramas de ion extraído para los iones $[\text{M}+\text{Na}]^+$ de cada FAME: m/z para IS; 265.2138 C14:0; 293.2451 C16:0; 315.2294 C18:3; 317.2457 C18:2; 319.2607 C18:1; 321.2764 C18:0; 335.2557 C18:1-OH; 349.3077 C20:0; 377.3390 C22:0. Los límites de detección para FAMEs de ácidos grasos insaturados se encontraron en el rango de $3.61\text{-}8.62 \mu\text{g L}^{-1}$, para los FAMEs de ácidos grasos saturados $8.51\text{-}82.4 \mu\text{g L}^{-1}$, estos valores se encontraron tres órdenes de magnitud abajo que los encontrados para GC-FID la cual es la metodología típica para el análisis de FAMEs. En el análisis de muestras reales se analizaron nueve productos, en los cuales se obtuvo buena concordancia para la metodología FIA-ESI-QTOF comparada con GC-FID. Se detectó una baja concentración de ácido ricinoleico en tres muestras, lo que es indicativo de adulteración de aceite de ricino con otros aceites vegetales.

En el capítulo 3, se desarrolló un procedimiento para la determinación de picolinato de cromo en muestras de suplementos alimenticios por FIA-ESI-ITMS/MS. El análisis FIA fue llevado a cabo utilizando un puerto de inyección manual Rheodyne y la bomba del equipo HPLC (Ultimate 3000, Thermo Scientific); como solución portadora se utilizó una solución de formiato de amonio 10 mM a un flujo de $200 \mu\text{L min}^{-1}$, la muestra se inyectó en intervalos de dos minutos a la fuente ESI de un AmaZon SL (Bruker Daltonics). El picolinato de cromo, así como el picolinato de cobalto utilizado como estándar interno fueron sintetizados en el laboratorio. El uso de formiato de amonio 10 mM como solución portadora para el sistema FIA permitió la disminución de ruido de fondo en los espectros de masa, así como la obtención de señales intensas predominantes a $m/z = 419.02$ y $m/z = 303.9$ correspondientes a los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ del CrPic_3 y CoPic_2 respectivamente. Para la cuantificación, se utilizó el espectrómetro con trampa iónica, operado en el modo MRM; para ello, se estableció un segmento único para la fragmentación de los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ del analito y del estándar interno. La amplitud de

fragmentación se fijó en 0.6 V donde se registraron las intensidades de los iones fragmentos más abundantes: $m/z = 269.8$ para CrPic_3 y $m/z = 259.8$ para CoPic_2 . En la optimización de parámetros del sistema FIA no se observó efecto significativo en la forma e intensidad de la señal FIA debido a la velocidad de flujo, la cual se fijó en $200 \mu\text{L min}^{-1}$, obteniéndose una frecuencia de muestreo de 3 minutos por inyección con desviaciones estándar relativas de las señales en el orden de 3-5%. La curva de calibración del CrPic_3 fue obtenida en un intervalo de concentración de $3.91 - 500 \mu\text{g L}^{-1}$ mostrando una buena linealidad ($R^2 = 0.9995$). Los porcentajes de recuperación variaron de 92.7 % - 110.2% según se detectó añadiendo 40 y $80 \mu\text{g g}^{-1}$ de estándar de CrPic_3 directamente a la muestra de suplemento alimenticio. En el análisis de muestras reales se utilizaron 4 suplementos alimenticios adquiridos en el mercado local los cuales informaban en su etiquetado la presencia de CrPic_3 . Para propósitos comparativos, el cromo total fue determinado en estos mismos productos por ICP-MS. Se observó una buena concordancia entre los resultados obtenidos mediante los procedimientos FIA-ESI-ITMS/MS y ICP-MS para las muestras S3 y S4, sin embargo, para las muestras S1 y S2 se detectaron discrepancias en el contenido de cromo, esto puede atribuirse a la presencia de otras especies de cromo que contribuyeron en el contenido total de Cr determinado por ICP-MS. En conclusión, el procedimiento propuesto FIA-ESI-ITMS/MS es adecuado para la determinación de CrPic_3 , ofreciendo una mejor especificidad y menor tiempo de análisis respecto a ICP-MS.

El capítulo 4 se centra en el análisis de cinco colorantes azo sulfonados en muestras de Chile en polvo, mediante la puesta a punto de un procedimiento basado en MALDI-TOF-MS. Para sobrellevar los problemas relacionados con el ruido espectral y la baja precisión en general, se utilizó rojo ácido 88 como estándar interno y la limpieza de la muestra se realizó mediante extracción de pares iónicos de los colorantes de interés con bromuro de benciltributilamonio (BTAB) de fase acuosa al cloroformo. Los parámetros clave que influyen en el rendimiento analítico fueron la concentración de BTAB, el pH de la fase acuosa, la cantidad de muestra, la técnica de deposición de la muestra y de la matriz química en la placa MALDI. Además, se llevaron a cabo los experimentos para ajustar la concentración de 9-aminoacridina (matriz química), el número de espectros instantáneos por disparo de láser y el ráster del movimiento del láser. La carga de muestra más alta correspondió a $100 \mu\text{L}$ de extracto agua/metanol tomado para la extracción, los límites de cuantificación del método para el amarillo ocazo (Y6), ponceau 2R (R5), rojo allura (R40) y amaranto (R2) se encontraron en el rango $1.50-3.10 \mu\text{g g}^{-1}$ ($29.0 \mu\text{g g}^{-1}$

para tartrazina, Y5). La adición estándar de dos puntos realizada en tres muestras arrojó recuperaciones porcentuales en el rango 86.4-115%; los resultados de la cuantificación fueron consistentes con los obtenidos por HPLC-DAD. Doce muestras de chile en polvo fueron analizadas y los resultados de nueve de ellos no estuvieron de acuerdo con la información proporcionada por los fabricantes; R40 fue encontrado y determinado en siete productos en el intervalo de concentraciones de $32.5 \pm 2.1 \mu\text{g g}^{-1}$, a $1125 \pm 73 \mu\text{g g}^{-1}$, amarillo ocaso y tartrazina se encontraron en concentraciones más bajas y en un número menor de muestras. El procedimiento MALDI-TOF MS puede recomendarse para el control rutinario de colorantes azoicos sulfonados en productos alimenticios, resaltando las siguientes ventajas: buena exactitud y precisión, simplicidad procedural, rapidez, sin efecto memoria y mínimo costo de operación del instrumento.

El capítulo 5, se presentan los resultados obtenidos en una colaboración con el Centro de Investigaciones Biológicas y Químicas, Facultad de Química de la Universidad de Varsovia, Polonia. El objetivo del estudio fue examinar si la vía de fijación de carbono (C4 – maíz y C3 - berros, respectivamente) podría tener un impacto en el fraccionamiento de isótopos de Mg en la clorofila-a. La aportación en esta colaboración se centró en el cultivo de plantas, extracción de clorofila y su purificación mediante cromatografía preparativa, así como la confirmación de su identidad por espectrometría de masas de alta resolución. Para el último punto, se utilizó el sistema ESI-QTOF MS con introducción de muestra mediante FIA, obteniéndose datos de masa exacta de patrón isotópico. Las partes verdes de las plantas y las fracciones de clorofila-a se enviaron a la Universidad de Varsovia donde fueron digeridas y sometidas a cromatografía iónica acoplada a través del sistema de desolvatación y ionización en plasma acoplado inductivamente al espectrómetro de masas con sistema de detección multicolector (MC ICP-MS). Como resultado, se encontró una preferencia por isótopos pesados de Mg en las partes verdes de maíz ($\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente}}$ 0.65 y 0.74 para dos replicas biológicas, respectivamente) y en la clorofila-a ($\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{clorofila-planta}}$ 1.51, 2.19). Por otra parte, hubo menor abundancia de isótopos pesados de Mg en partes verdes de berro de jardín (planta C3), con valores $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente}}$ (-0.87)-(-0.92) para dos replicas biológicas, respectivamente; así mismo la preferencia por isótopos pesados en la clorofila-a fue menos marcada respecto a la planta de maíz ($\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{clorofila-planta}}$ 0.55-0.52). Los efectos observados podrían ser atribuidos a una mayor producción de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP), requerido en la fijación de carbono en C4 comparado a C3, el cual

podría reducir la barrera cinética y hacer que el equilibrio de fraccionamiento prevalezca durante la incorporación de magnesio al anillo de protoporfirina.

1 Marco teórico

1.1 Introducción

Los avances en la instrumentación y metodología analítica contribuyen de manera importante en un mejor entendimiento de los procesos que ocurren en los organismos vivos de manera natural, en respuesta a condiciones medioambientales, a diferentes tipos de estrés y de los procesos asociados con enfermedades. En el estudio de organismos vivos, además de los clásicos integrantes de ciencias “ómicas” tales como genómica y proteómica, el interés científico se enfoca en áreas emergentes, incluyendo lipidómica, secretómica, glicómica, metabolómica, foodómica, metalómica, ionómica, entre otras. Relacionado con ello, continuamente va en aumento la variedad de especies químicas que es necesario determinar en sistemas in vitro, muestras clínicas, biológicas, medioambientales y también en alimentos [1-6]. Existe una creciente demanda de resultados confiables, obtenidos mediante procedimientos simples, minimizando la etapa de tratamiento de muestra, rápidos en términos de adquisición de datos y de su análisis, además, amigables al medio ambiente. Estos requisitos son retadores debido a la complejidad química de las muestras, coexistencia de compuestos que presentan estructuras y propiedades fisicoquímicas similares, y la necesidad de confirmar o identificar compuestos de interés que usualmente se encuentran en bajas concentraciones [7, 8].

Un grupo de técnicas que ofrecen alto desempeño en el contexto de estos retos son las de espectrometría de masas (MS). El fundamento básico de espectrometría de masas consiste en la conversión de los compuestos en iones en fase gaseosa para su separación en función de la relación masa/carga (m/z). Hoy en día existe una amplia variedad de configuraciones instrumentales que ofrecen diferentes combinaciones de dispositivos de ionización con varios tipos de separadores de masas de tal manera que, dependiendo del objetivo del análisis, se puede obtener información estructural y cuantitativa de compuestos en una amplia gama de la composición elemental, tamaño molecular, polaridad e incluso estabilidad [9, 10]. Dependiendo de la cantidad, concentración y propiedades fisicoquímicas de los analitos en una muestra dada, se hace la selección de una configuración instrumental más adecuada.

Utilizando espectrometría de masas de alta resolución y en tándem, se obtienen la masa exacta, el patrón isotópico y patrón de fragmentación del ion precursor; todos estos elementos

junto con las avanzadas herramientas de análisis de datos y la disponibilidad de librerías y bases de datos hacen que se pueden identificar y/o confirmar compuestos con base en su estructura molecular. Por otro lado, la espectrometría de masas es especialmente útil en el análisis cuantitativo; además de su selectividad basada en la estructura molecular, composición isotópica y masa exacta única de cada especie química, en la adquisición de las señales el ruido puede ser eliminado de manera eficiente logrando la determinación confiable de los analitos a nivel de trazas. Cabe mencionar aquí las modalidades de adquisición de señal tales como extracción selectiva de un ion, monitoreo de reacciones selectivas o de reacciones múltiples.

Por otro lado, entre las limitaciones de la espectrometría de masas hay que mencionar las interferencias de ionización. Las alteraciones de eficacia de ionización se presentan cuando el(los) analito(s) entran al dispositivo de ionización junto con otros compuestos químicos que modifican la composición de fase gaseosa respecto a la ionización que ocurre en ausencia de interferentes [11]. Es por ello por lo que, para muestras químicamente complejas, cuando se pretende obtener información sobre un número grande de compuestos o cuando se cuenta con un espectrómetro de baja resolución, se realiza un acoplamiento de MS con una de las técnicas separativas compatibles. En particular, la configuración basada en la separación por cromatografía de líquidos con detección MS ha sido ampliamente utilizada en proteómica, metabolómica, metalómica, en el análisis de residuos de pesticidas y de otros xenobióticos en muestras ambientales y en alimentos, en el análisis de fármacos y sus metabolitos, en la determinación de aditivos alimenticios, etc. [12].

Sin embargo, cabe señalar que, los análisis LC-MS y LC-MS/MS generan una enorme cantidad de datos, cuyo manejo es desafiante y tardado. En primer lugar, se requiere un alineamiento de datos en varias dimensiones (tiempo de retención en una o varias etapas de separación, valores de m/z en espectros de masas y de masas/masas) y después se utilizan programas de análisis de datos especializados que realizan la filtración y anotación de las señales correspondientes a un tiempo de retención, búsqueda de padrones isotópicos, aductos de iones, pérdidas neutras y de fragmentos; todos ellos son elementos necesarios para la identificación/confirmación de compuestos[13]. En los estudios comparativos entre dos grupos de muestras se utilizan además herramientas de análisis estadístico evaluando los datos cromatográficos y espectrales obtenidos para dos grupos de interés [14, 15]. Aunque no cabe

duda el alto poder de los sistemas LC-MS y LC-MS/MS, ninguno de ellos cumple con la demanda de procedimientos rápidos y simples, que se mencionó al inicio [16].

En el contexto de esta tesis parece interesante la opción más simple, en la que la muestra se introduce de manera directa a la fuente de ionización de un espectrómetro de masas de alta resolución, obviando la separación cromatográfica [16]. En el caso de las muestras sólidas o depositadas en superficie de un sólido, existen varias alternativas, entre ellas desorción/ionización por láser asistida por una matriz química (MALDI) o desorción - ionización por electro-nebulización (DESI) [17-19]; mientras que las muestras líquidas pueden ser introducidas a la fuente de ionización mediante infusión directa utilizando para ello una jeringa o con un sistema de inyección al flujo (FIA) [12, 20, 21]. En el segundo caso, los dispositivos de ionización típicamente utilizados son el de electro-nebulización (ESI), nano-ESI o ionización química a presión atmosférica (APCI). El principal requisito en la introducción directa es asegurar la resolución y la sensibilidad adecuadas para el objetivo del análisis. Por lo general, es necesario un tratamiento de muestra que permita al menos parcialmente eliminar la matriz química y así, reducir potenciales interferencias en la etapa de ionización [22]. Es importante mencionar que, al eliminar la separación cromatográfica, la muestra puede ser transportada en un solvente adecuado para lograr una alta eficacia de ionización. Por otro lado, la adquisición de datos espectrales se lleva a cabo bajo condiciones de compromiso entre lograr una detectabilidad aceptable de los compuestos y eliminar el ruido/interferencias. Las ventajas de la introducción directa respecto a los acoplamientos con sistemas separativos son obvias: (i) corto tiempo de adquisición de datos sin perder la posibilidad de adquisición de espectros MS y MS/MS[23]; (ii) procesamiento de datos más fácil debido a que el alineamiento se realiza solamente en una dimensión (m/z), (iii) la capacidad de los instrumentos de alta resolución permite distinguir especies isobáricas con base en la diferencia entre sus masas exactas [20].

Tradicionalmente, la infusión directa en espectrómetros de alta resolución es indicada para las muestras de composición simple y con el interés de identificar/cuantificar relativamente pocos compuestos. A manera de ejemplo, esta técnica se utiliza para confirmar la síntesis de uno o varios compuestos [24], en estudios de mecanismos de reacción [25, 26], para identificar compuestos en fracciones recolectadas en un fraccionamiento o una separación cromatográfica [10], o para la cuantificación de compuestos conocidos [27, 28]. No obstante, de manera reciente

se ha demostrado la factibilidad de la infusión directa en los análisis metabolómicos [17, 29, 30], transcriptómicos [31], lipidómicos [32, 33], foodómicos [34], entre otros. Estas nuevas aplicaciones han sido posibles gracias al desarrollo de instrumentación de alta resolución, programas de tratamiento/análisis de datos y también gracias a la creciente información disponible en librerías y bases de datos [34].

A pesar del uso común, la introducción directa al ESI mediante jeringa no es una solución ideal, ya que aumenta el riesgo de efectos de memoria. Dichos efectos pueden evitarse sustituyendo la jeringa por un ensamble FIA en el cual la solución portadora no solamente transporta la muestra hacia la fuente de ionización, sino que también limpia el sistema entre inyecciones sucesivas sin la necesidad de desmontar el dispositivo. La técnica de análisis en flujo ha sido utilizada en química analítica extensivamente durante el último medio siglo. En los casos más simples, FIA sirve para la introducción de muestra al sistema de detección/cuantificación (espectrofotometría UV/Vis, ICP-AES, ICP-MS, etc.), controlando el volumen de muestra, su transporte y dispersión (posibilidad de minimizar interferencias en la detección) y al mismo tiempo, mejorando la frecuencia de muestreo [35-37]. Por otro lado, en un sistema FIA pueden incorporarse diferentes tipos de reactores y/o mezcladores con el fin de llevar a cabo diluciones, extracciones, reacciones químicas o titulaciones; todos estos pasos se realizan en línea, en el transcurso del paso de la muestra desde el inyector hasta el detector [38, 39].

Cabe señalar que los sistemas FIA-ESI-MS conforman un área reciente de investigación con relativamente pocas aplicaciones en el análisis de muestras reales [40, 41]. La presente tesis se enfoca en el desarrollo metodológico en el área FIA-ESI-MS para cumplir con la demanda de procedimientos simples y rápidos para la determinación de compuestos de relevancia biológica.

1.2 Fundamentos teóricos del sistema FIA

1.2.1 Sistema FIA

El análisis por inyección al flujo (FIA, por sus siglas en inglés), es una técnica descrita por primera vez en 1975 por Ruzicka y Hansen de la Universidad Técnica de Dinamarca, basada en manejo de flujos continuos de muestra y de otras soluciones requeridas para detectar/cuantificar el analito de interés. FIA se realiza en régimen cinético y es utilizado principalmente para el análisis cuantitativo; consiste en la inyección rápida de un volumen definido de una solución de muestra al flujo laminar continuo de líquido portador, el cual es dirigido a un detector adecuado con ayuda de una bomba peristáltica [38, 42, 43]. Un típico sistema FIA incorpora válvulas de inyección con tubos flexibles para transportar la muestra, la solución portadora y/o los reactivos, bucles de mezclado, conexiones tipo T, además de bombas peristálticas y un detector [44] ([Figura 1](#)). Típicamente, la operación del sistema FIA es automatizada.

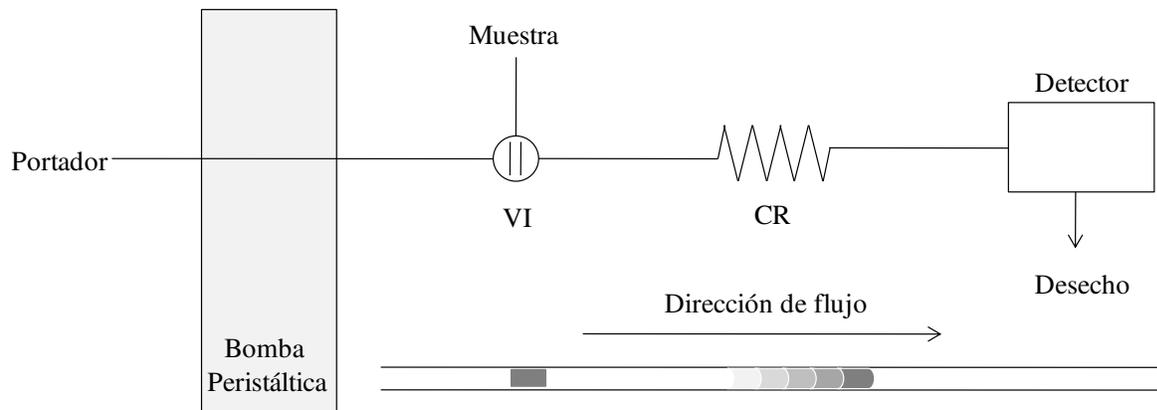


Figura 1 Configuración de un sistema FIA (VI – válvula de inyección, CR – bucle de reacción) [45].

1.2.2 Variación del perfil del segmento de la muestra

Una vez inyectado cierto volumen de la muestra al caudal de solución portadora, ésta forma un segmento. Dicho segmento cambia su forma durante el transporte a través del sistema FIA desde el momento de su inyección hacia el detector ([Figura 2](#)). La dispersión del segmento de muestra es causada por convección debida al flujo del portador y por la difusión causada por el

gradiente de concentración entre la muestra y el portador (difusión axial) y por la interacción con la pared del tubo (difusión radial).

1.2.3 Fenómenos de convección y difusión y registro de las señales

En ausencia de los fenómenos de convección y difusión, una muestra inyectada en un sistema FIA sería registrada en el detector con un perfil rectangular de acuerdo con la forma física del segmento en el momento de la inyección ([Figura 2 a](#)). La convección en un proceso FIA se produce durante un flujo laminar [46]. La velocidad lineal en las paredes del tubo es cero, pero la muestra en el centro del tubo se mueve con una velocidad lineal dos veces mayor que la de la corriente portadora. El resultado es un perfil de flujo con picos asimétricos que exhiben una distribución del tipo parabólico (x^2). La segunda contribución es la dispersión de la muestra es la difusión debido al gradiente de concentración entre la muestra y la corriente portadora, lo que resulta en ensanchamiento del segmento.

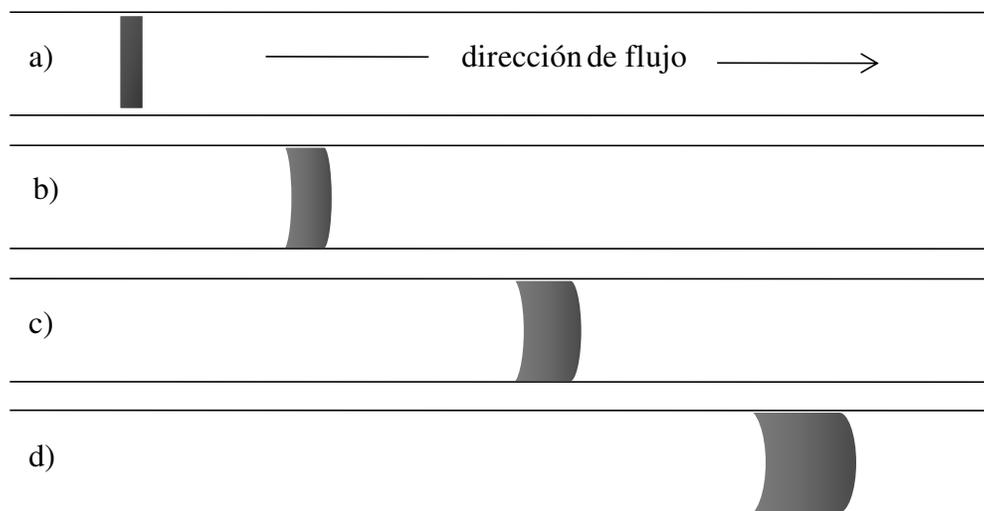


Figura 2 Efecto de la dispersión sobre la forma del segmento de una muestra en diferentes momentos durante su transporte por el sistema FIA: a) inyección; b) cuando la convección domina la dispersión; (c) cuando la convección y la difusión contribuyen a la dispersión; y (d) cuando la difusión domina a la dispersión [47].

Como se muestra en la [Figura 3](#), la difusión ocurre de manera paralela (axialmente) y perpendicular (radialmente) respecto a la dirección en la que se mueve la corriente portadora. La difusión radial es importante en el análisis de inyección al flujo, debido a que disminuye la velocidad lineal de la muestra en el centro del tubo, mientras que la muestra en el borde del tubo

experimenta un aumento en su velocidad lineal. La difusión ayuda a mantener la integridad del perfil de flujo del segmento de la muestra. Esto a su vez permite registrar la señal del analito en forma de pico definido por el paso de muestra por la celda del detector. La altura y el área del pico son proporcionales a la concentración del analito en la muestra, con lo cual se facilita la construcción de una curva de calibración para su determinación en muestras desconocidas. Debido a la operación continua del sistema, la introducción de muestras se realiza con cierta frecuencia con la adquisición de las señales en tiempo real. El registro de una secuencia de muestras (o soluciones de calibración) se denomina “fiagrama” y consiste en una serie de picos angostos presentados en las coordenadas de tiempo (eje X) e intensidad de la señal (eje Y). En la [Figura 4](#), se muestra un fiagrama de un proceso de calibración, donde cada solución estándar fue inyectada por triplicado. La frecuencia de muestreo depende del grado de dispersión, el cual puede ser controlado por factores como son la velocidad de flujo, el diseño del sistema FIA, longitud y diámetro de tubo, la viscosidad del líquido portador, entre otros. El flujo es controlado por el sistema de propulsión de la bomba peristáltica y es seleccionado de acuerdo con distintos factores como la forma de señal y velocidad de muestreo, el volumen de muestra y la aplicación deseada. Al ser reproducibles estos factores un sistema FIA concede alta repetibilidad en corridas sucesivas de la misma solución[48, 49].

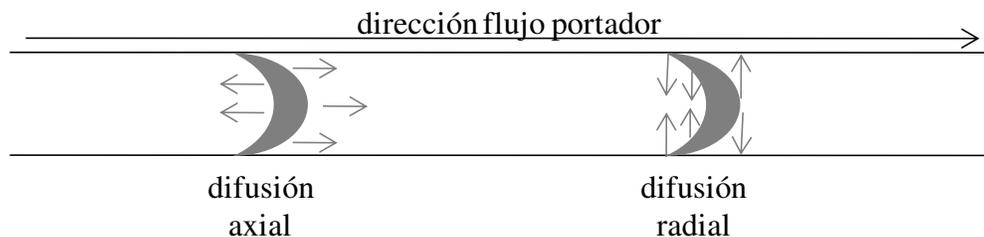


Figura 3 Presentación grafica de la difusión axial y radial del segmento de muestra en sistema FIA. La banda gris es el perfil de flujo de la muestra y las flechas indican la dirección de difusión [50].

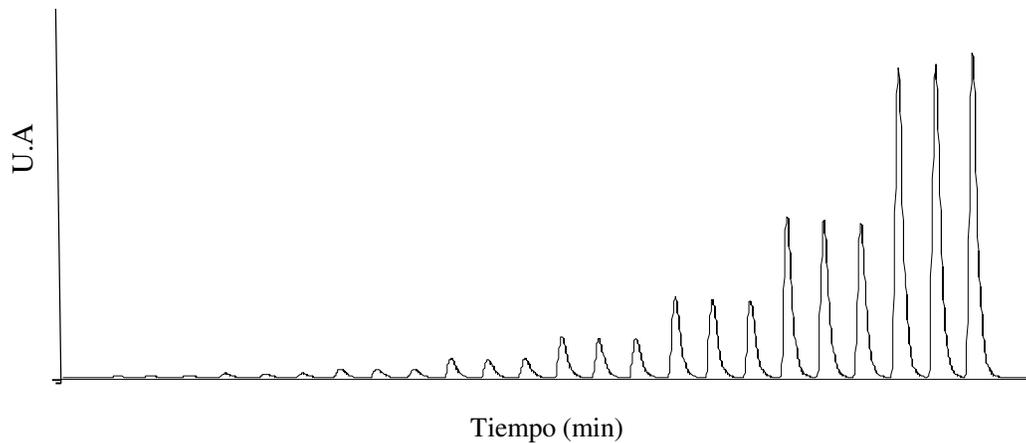
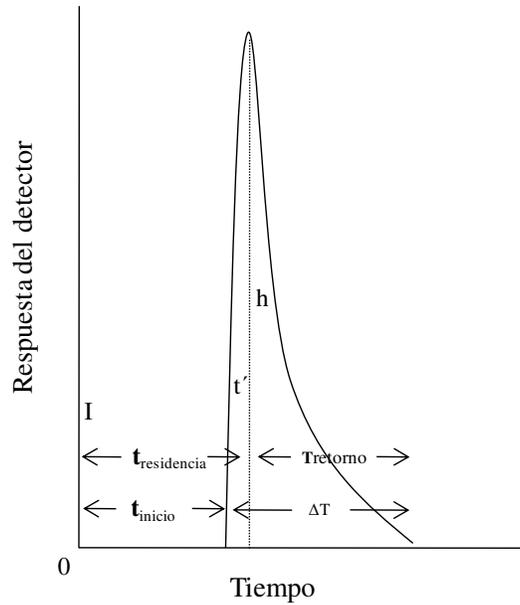


Figura 4 Diagrama típico registrado en un proceso de calibración. (inyección de cada solución por triplicado).

1.2.4 Características de una señal FIA

Cada señal en diagrama tiene forma de un pico asimétrico, la cual es dependiente de las condiciones de operación del sistema FIA. En la [Figura 5](#) se muestra una señal típica, marcando varios parámetros que caracterizan a la señal [51]. Dos parámetros definen el tiempo que tarda una muestra en pasar del inyector al detector. El tiempo inicial, $t_{inicial}$ es el tiempo entre la inyección de la muestra y su llegada al detector. El tiempo de residencia $t_{residencia}$, es el tiempo necesario para obtener la señal máxima, la diferencia entre el tiempo de residencia y el tiempo inicial es el tiempo t' , este se acerca a cero cuando la convección tiene más injerencia en la dispersión y aumenta de valor a medida que la difusión se vuelve más importante. El tiempo necesario para que la muestra pase a través del detector y la señal producida regrese a la línea base se describe igual forma con dos parámetros. El tiempo de duración de la señal, Δt , es el tiempo entre el inicio del registro de la señal analítica y su regreso a la línea base. El tiempo transcurrido entre la altura máxima de la señal y su regreso a la línea base es el tiempo de retorno, $T_{retorno}$, el cual permite determinar la frecuencia de muestreo. El parámetro característico final de un diagrama es la altura de pico de la muestra, h , el cual como ya se mencionó previamente se encuentra relacionado con la concentración del analito, por lo tanto, la sensibilidad de un método FIA se encuentra determinada por la altura de pico.



I = punto de inyección, h = altura de pico, A = área de pico, $t_{residencia}$ = tiempo de residencia $t_{inicial}$ = tiempo inicial.

Figura 5 Típica señal analítica obtenida mediante un sistema FIA [47].

1.2.5 Coeficiente de dispersión

La dispersión de un sistema FIA se clasifica mediante el uso de coeficiente de dispersión, definido por Ruzicka y Hansen [52, 53]. El cual para una muestra dada se define como:

$$D = \frac{C_0}{C}$$

Donde, C_0 es la concentración del analito en la muestra en ausencia de fenómenos de convección y difusión (concentración en el punto de inyección) y C es la concentración actual, obtenida utilizando un sistema FIA dado. El valor C será considerablemente menor que C_0 por injerencia de los fenómenos descritos anteriormente. De esta manera, D puede tomar valores entre uno en la ausencia de dilución a valores mayores cuando la dilución se incrementa. Con frecuencia, este parámetro tiene mayor relevancia en el máximo de pico (C_{max}), donde:

$$D_{max} = \frac{C_0}{C_{max}}$$

El grado de difusión, como ya se mencionó, es controlado por factores como la velocidad de flujo, longitud y diámetro del tubo, viscosidad del portador. Por lo que la optimización de un

sistema FIA para una aplicación específica requiere conocer cómo afectan estos factores al sistema [48, 54]. Cabe señalar que la clasificación de los sistemas FIA, dependiendo del valor D es:

- dispersión limitada ($1 < D < 2$) – cuando FIA es utilizado para transporte de muestra;
- dispersión media ($2 < D < 10$) – cuando se incorpora alguna reacción química en sistema FIA;
- dispersión alta ($D > 10$) – cuando la dilución de la muestra sobrepasa 10:1;
- dispersión reducida ($D < 1$) – cuando en el sistema FIA se integra un proceso de preconcentración (extracción con solventes orgánicos, o en fase sólida, pervaporación, diálisis, etc.)

1.2.6 Parámetros que influyen en la forma de la señal FIA

Volumen de muestra

De manera general, con el aumento de volumen inyectado, la magnitud de la señal incrementa hasta llegar a una meseta, como se muestra en la [Figura 6](#). Los parámetros FIA con el cambio de volumen de muestra son afectados de la siguiente manera:

1. El tiempo de inicio es independiente del volumen de muestra inyectado.
2. La posición del máximo de pico cambia en función del volumen inyectado.
3. La dispersión decrece al aumentar el volumen de la muestra, y también incrementa la anchura de pico.
4. La señal eventualmente se satura por efecto de la porción central que no sufre dilución por efecto del portador (meseta).

En la selección del volumen hay que buscar condiciones de compromiso entre sensibilidad (mayor magnitud de la señal con aumento de volumen) y anchura de pico (menor volumen favorece valor de S/N y permite aumentar frecuencia de muestreo) De esta manera, es preferible la aplicación de volúmenes relativamente pequeños de muestra para garantizar un alto rendimiento y una sensibilidad adecuada [55].

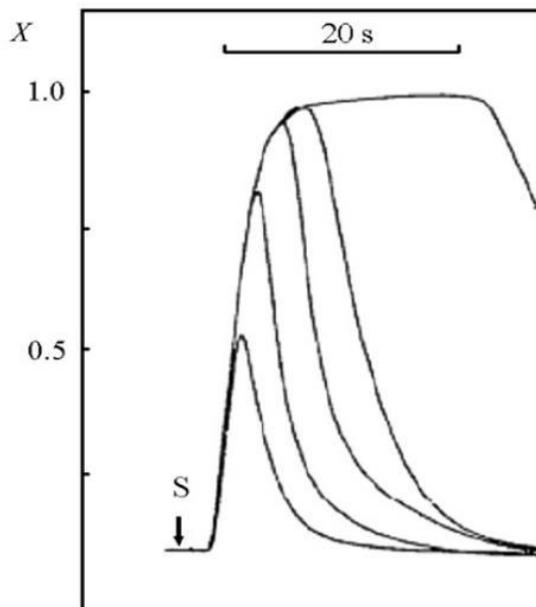


Figura 6 Efecto del volumen de inyección de muestra en la dispersión en un sistema FIA. X = fracción volumétrica de la muestra; S = momento de inyección. Las gráficas corresponden a loops de inyección de 59, 108, 206, 403 y 795 μL [50].

Longitud y diámetro de tubo

La [Figura 7](#) esquematiza la variación del tiempo de residencia y la altura de pico en función de la longitud del tubo en un sistema FIA, para un diámetro de tubo y un flujo fijos. Como se puede observar, a mayor longitud del tubo, mayor es el tiempo de residencia y mayor la dispersión. De la misma manera, el diámetro del tubo afecta a la dispersión en un sistema FIA, es decir, la dispersión se incrementa conforme la medida del diámetro disminuye [56, 57].

Velocidad de flujo

La velocidad de flujo del portador influye de manera opuesta en la señal analítica respecto al efecto de la longitud de tubo. Es decir, a una longitud y diámetro del tubo fijos, el incremento de flujo disminuye el tiempo de residencia y por ende la dispersión de los picos.

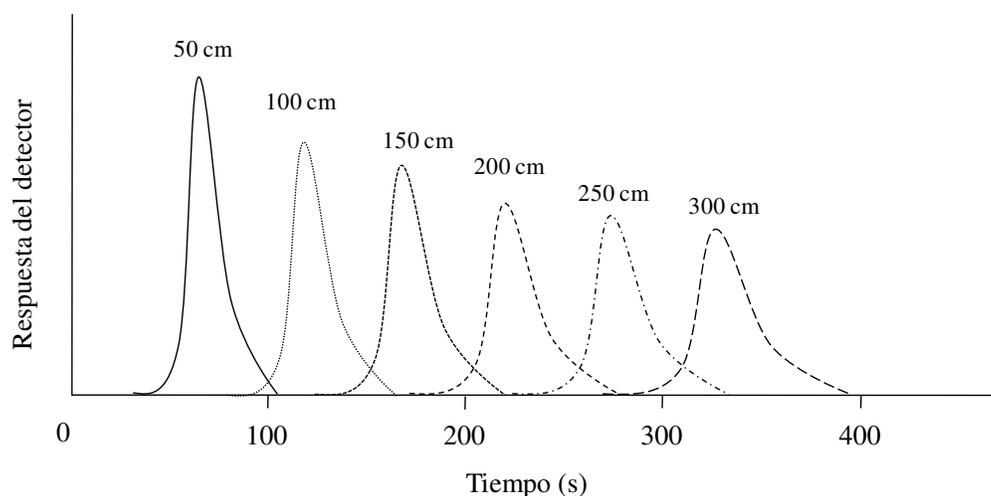


Figura 7 Efecto de longitud de tubo sobre la señal en un sistema FIA[45].

Los efectos que se acaban de describir aplican a todos los diseños FIA, aunque es necesario distinguir entre el uso de FIA para el transporte de muestra y otras aplicaciones denominadas de manera general “FIA con conversión”. La conversión es un término general y puede consistir en una reacción química, una dilución, un proceso de extracción, destilación, diálisis, entre otras. En este trabajo de tesis, el uso de FIA se limita al transporte de muestra hacia la fuente de ionización ESI del espectrómetro de masas.

1.3 Espectrometría de masas

Espectrometría de masas es un grupo de técnicas analíticas, en las cuales se obtiene la separación de iones generados en fase gaseosa en función de la relación masa/carga (m/z). Para la ionización, se pueden utilizar diferentes métodos y dispositivos, mismos que son clasificados como suaves, en los cuales ocurre la fragmentación de moléculas; y “duras” en los cuales los iones formados corresponden a fragmentos de las moléculas o incluso a átomos ionizados. Una vez separados, los iones se transmiten hacia el detector para su detección y conteo. La abundancia de los iones graficada contra la relación m/z se denomina espectro de masa.

Diversas técnicas de espectrometría de masas se distinguen principalmente dependiendo del tipo de dispositivo de ionización y del separador de iones utilizados. En el caso de espectrometría de masas atómica, el instrumento más típico integra el plasma acoplado inductivamente con el filtro de masas de cuadrupolo (ICP-QMS). Una ventaja importante que presenta esta configuración es que el ICP genera de manera muy efectiva iones mono-positivos de átomos de la mayoría de los elementos, ofreciendo límites de detección extremadamente bajos

(del orden de ng L^{-1}) y la capacidad de realizar análisis isotópico de los elementos, aun cuando es utilizando un separador de masa de baja resolución. En el caso las fuentes de ionización suave, de las cuales la más común es la ionización por electro-nebulización (ESI), en donde se conserva la estructura del compuesto de interés, permitiendo su identificación/confirmación con base en la masa exacta, patrón isotópico y espectro MS/MS. Dicha capacidad de identificación/confirmación de compuestos requiere el uso de analizadores de masas de alta resolución, mientras que los separadores de baja resolución (trampa iónica o arreglo de triple cuadrupolo) son más indicados para fines de cuantificación, por ejemplo empleando el método de monitoreo de reacciones múltiples (MRM). A continuación, se describen brevemente los componentes de un espectrómetro de masas [58].

1.3.1 Componentes de un espectrómetro de masas

1.3.1.1 Fuente de ionización

El primer componente de un espectrómetro de masas es la fuente de ionización. Independientemente del método por el cual se introduce una muestra en un espectrómetro de masas (GC, HPLC, inyección directa), el dispositivo de ionización es necesario para generar especies cargadas en fase gaseosa. Existe una gran variedad de técnicas de ionización, que de acuerdo con sus aplicaciones pueden ser clasificadas por su dureza/suavidad y por su utilidad en el análisis de compuestos, dependiendo de la polaridad y/o masa molecular. ([Figura 8](#)).

El método tradicional de ionización en espectrometría de masas molecular es la ionización electrónica (EI), misma que opera en las condiciones del vacío y en la cual se utiliza un haz de electrones para provocar la ionización de moléculas de los analitos en fase gaseosa. Un haz de electrones es formado por un filamento caliente (tungsteno) y los electrones son eléctricamente acelerados (70 eV) para colisionar con una muestra vaporizada, causando la expulsión de un electrón de los analitos y la subsiguiente formación de cationes; debido a alta energía de electrones, ocurre una fragmentación de moléculas [59]. Estas condiciones no son adecuadas para moléculas grandes o matrices complejas. La EI junto con la ionización química (CI) son los métodos utilizados en los equipos de GC-MS.

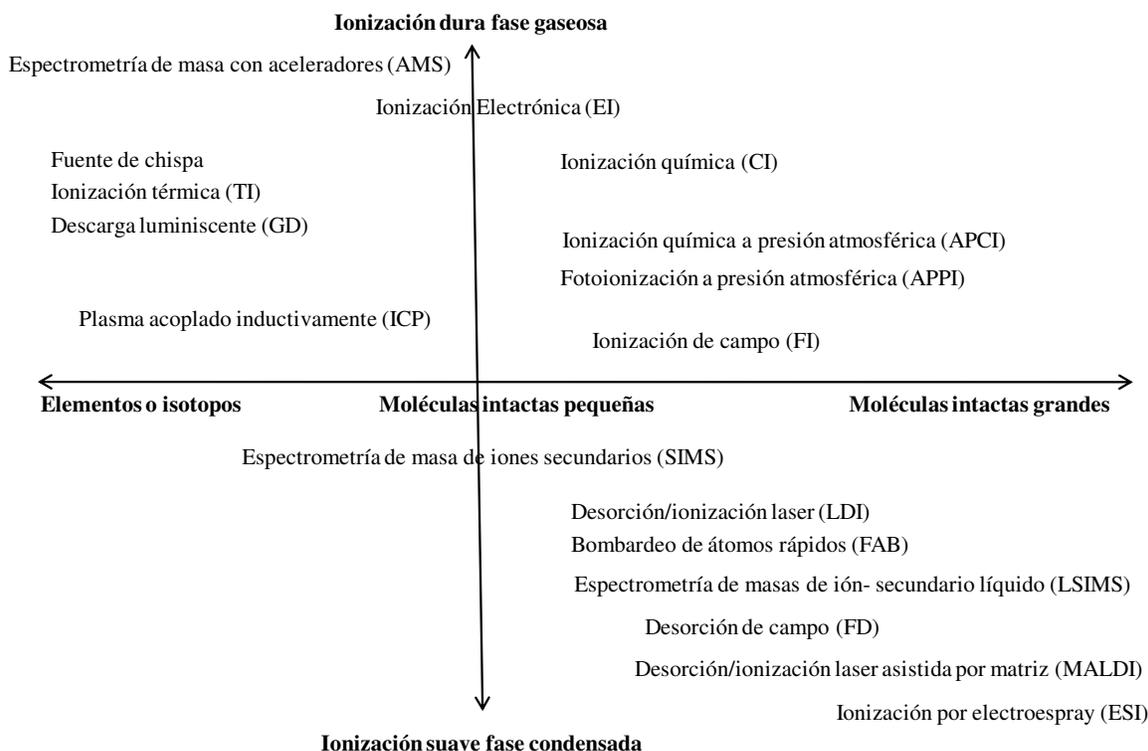


Figura 8 Técnicas de ionización en espectrometría de masas para diferentes necesidades ordenadas por principales campos de aplicación [60]

La CI y la ionización por desorción en plasma (PD) fueron introducidas para solventar algunas limitaciones de la EI. Ambas técnicas resultan en la formación predominante de moléculas protonadas o desprotonadas; ambas son más suaves respecto a EI y generan iones más estables que los radicales formados durante el análisis por EI-MS. En la CI, la eficacia de ionización depende de interacciones entre electrones energizados y moléculas neutras de un gas, como el metano, resultando en su ionización; los iones generados colisionan con los analitos en fase gaseosa, produciendo especies protonadas de los compuestos en la muestra [61]. Similar a la EI, estos métodos poseen algunas limitaciones; hay que mencionar, entre otros, su ineficiencia para ionizar compuestos de alta masa (<1000 Da) y el requerimiento de una buena estabilidad térmica y suficiente volatilidad de los compuestos analizados. Debido a su carácter suave, CI produce principalmente iones moleculares. Por su parte, la ionización PD, es una técnica de ionización “suave” pero adecuada para el análisis de biomoléculas, con masas moleculares del orden de 100 kDa. Cabe aclarar que el adjetivo “suave”, indica que la energía interna transmitida

al analito durante el proceso de ionización es baja comparando con energía de enlaces en las moléculas de los compuestos estudiados.

Con el surgimiento de otras técnicas como el bombardeo por átomos rápidos (FAB), la espectrometría de masas líquida de ion secundario (LSIMS), la desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electronebulización (ESI), han aumentado de manera substancial las capacidades de MS en diferentes campos de aplicación. Específicamente, ESI y MALDI, ambas de carácter suave, han permitido el estudio de moléculas en un amplio intervalo de tamaño molecular y masa, incluyendo moléculas grandes como lo son proteínas, lípidos, polisacáridos, y ácidos nucleídos o polímeros sintéticos [62]. En ESI, la muestra es introducida en forma de una solución con la velocidad del flujo típico de 1-1000 $\mu\text{L min}^{-1}$ a una aguja de nebulización a la que se le aplica un alto voltaje de 3 hasta 6 kV, produciendo gotas cargadas del aerosol, mismas que son rociadas desde la punta de la aguja a la atmosfera (nebulización). Se puede aplicar la polarización positiva o negativa en el capilar, dependiendo de la naturaleza del analito. Las gotas de aerosol se mueven con el flujo de gas de nebulización (nitrógeno) y son atraídas a la entrada del separador de masas por el voltaje aplicado; durante su trayectoria, ocurre la evaporación del solvente, estimulada por un gas de secado (típicamente nitrógeno, a 180 °C). Al disminuir el tamaño de las gotas, crece la repulsión electrostática entre iones contenidos en la solución, hasta el punto de la llamada explosión de Coulomb, cuyo resultado es la desintegración de gotas y liberación de iones individuales a la fase gaseosa. Los iones formados por ESI a presión atmosférica pasan a través de un orificio en el espectrómetro de masas para el análisis de masas como se muestra en la [Figura 9](#). Además del mecanismo de ionización ESI descrito arriba, se ha propuesto otro modelo basado en carga residual; en este caso la molécula con carga se formara en fase gaseosa por evaporación total del disolvente; este modelo es más probable para moléculas grandes [63].

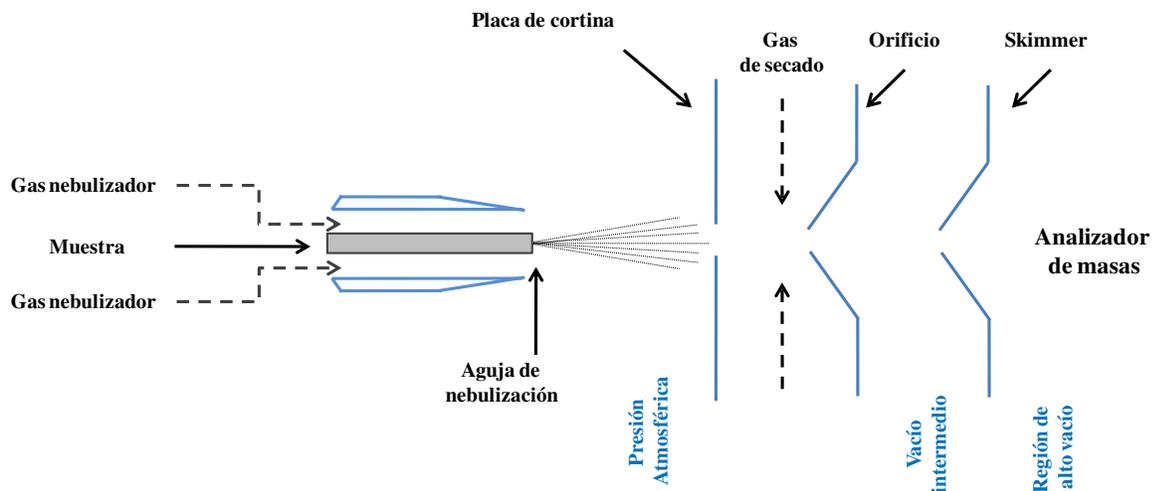


Figura 9 Diagrama de un dispositivo ESI [19].

Una de las desventajas de ESI es su susceptibilidad a cambios de eficacia de ionización, debido a la composición de solución introducida al sistema. Específicamente, la presencia de compuestos no volátiles, compuestos polares fácilmente ionizables, aumento de viscosidad, cambios de pH, provocan la supresión de ionización de los analitos. En muestras con concentraciones elevadas, la competencia entre compuestos por cargas limitadas o espacios en la superficie de la gota pueden también disminuir la eficiencia de la formación de iones. De esta manera, para disminuir o evitar la supresión de iones en ESI se aplican distintas estrategias, como son:

1. Las muestras son sujetas a distintos pasos de purificación, como la extracción en fase sólida (SPE), extracción líquido-líquido (LLE), precipitación de proteínas (PPT).
2. En acoplamientos LC-ESI-MS, las condiciones de separación cromatográfica se ajustan utilizando fases móviles compatibles (compuestos que favorecen ionización) y logrando separación de analitos de otros componentes de la muestra.
3. Cambiar el modo de ionización, cuando se utiliza ionización negativa algunos compuestos presentes son menos ionizables, dando un menor efecto de matriz.
4. Ajuste de las cantidades de muestra introducidas en la cámara de ionización por dilución de la muestra o reduciendo la velocidad de flujo ESI.

5. Empleo de un estándar interno (IS). Generalmente se utiliza un estándar interno con marcaje isotópico con una estructura y propiedades físicas similares a las del analito para compensar el efecto matriz, en lugar de eliminarlo [64].

Entre las estrategias mencionadas, el método de IS parece especialmente útil ya que permite recompensar cambios de eficacia de ionización en el análisis de muestras con composición variable, donde la eficacia de ionización cambia, además de que es difícil de prever y/o controlar. En espectrometría de masas, es altamente recomendable utilizar como estándar interno el mismo analito, pero enriquecido con uno de los isótopos estables de menor abundancia natural (^{13}C , ^2H , ^{15}N , etc.). Por otro lado, también es posible utilizar un estándar interno no-isotópico, tratando de escoger un compuesto de similar estructura y/o propiedades que el(los) analito(s). Tanto en el marcaje isotópico como en el estándar interno no-isotópico, al agregar a la muestra en un punto inicial del procedimiento, permiten reducir las variaciones en las corrientes de iones debido a las condiciones de ionización y fluctuaciones de la señal relacionadas con condiciones instrumentales, pero también ayudan a recompensar errores cometidos durante las operaciones previas a ESI-MS.

A su vez, la técnica de ionización MALDI se basa en la desorción/ionización de las moléculas de analito co-cristalizadas con una matriz química, usando un pulso láser. Típicamente, la muestra se prepara en un disolvente relativamente volátil; un pequeño volumen ($\leq 1 \mu\text{L}$) se mezcla con el exceso de una matriz apropiada (relación de volúmenes aprox. 1:1) en la superficie de una placa portamuestras MALDI. Una vez secado el depósito, se obtiene la co-cristalización deseada. Los componentes de la mezcla son llevados a la fase gaseosa por un pulso láser, que usualmente suele ser un láser de nitrógeno con una longitud de onda de 337 nm, el cual incide en el pocillo con muestra co-cristalizada. Cuando el pulso láser golpea a la muestra, la energía es absorbida por la matriz. Una parte de la matriz es vaporizada llevando moléculas de analito intactas a la fase de vapor, durante el proceso de expansión, los protones son intercambiados entre el analito y la matriz, causando la ionización de compuestos contenidos en la muestra. La matriz en MALDI como ya se mencionó anteriormente, tiene dos funciones importantes: a) absorber la energía láser y b) facilitar la ionización y separar las moléculas de analito una de otra para evitar la formación de agregados. Por lo tanto, la matriz se aplica en un exceso molar de 100 – 1 000 veces respecto a la cantidad de muestra; dicho exceso permite evitar

la interacción directa del haz de láser con los compuestos de la muestra y gracias a ello no ocurre fragmentación durante la desorción/ionización. Los principales requisitos de una buena matriz son sus propiedades de absorción a la longitud de onda del láser utilizado y buenas propiedades de mezclado con el analito para lograr una co-cristalización homogénea. En cuanto a los alcances de MALDI, en esta técnica no existe el requerimiento de polaridad de compuestos y la desorción/ionización es efectiva en un amplio intervalo de tamaños moleculares. Tras la generación de iones inducida por MALDI, los iones de moléculas mono-cargados son predominantes y más estables, aunque también se forman moléculas multi-cargadas y es común la cationización (aductos típicamente con sodio, potasio, amonio). Los iones formados mediante MALDI son separados con base a sus valores m/z en el analizador de masas. Los mecanismos de ionización en MALDI aún no se comprenden completamente, sin embargo, se han propuesto dos modelos [19, 65-67].

El primer modelo considera la protonación de moléculas en fase gaseosa, lo cual asume la producción de iones de analito en dos etapas: (1) fotoionización de moléculas de la matriz dentro de los cristales de muestra-matriz por el láser, produciendo iones de matriz; (2) transferencia de carga de los iones de matriz a los analitos neutrales ya en fase gaseosa. Con base a este modelo, se han seleccionado una serie de compuestos como matrices para un amplio rango de aplicaciones [19, 63].

El segundo modelo es el llamado modelo del “superviviente afortunado” y fue propuesto por Karas y col [68]. Este modelo asume la separación de cargas durante la co-cristalización; específicamente, en la fase condensada se forman clústeres de pares iónicos y estos se separan en fase gaseosa, liberando los iones de componentes de la muestra, de matriz y contraiones. La formación de pares iónicos y, en consecuencia, la eficacia del proceso MALDI, dependen de la naturaleza de matriz, del solvente, del pH, entre otros [69, 70]. El término “sobreviviente afortunado” se refiere a la población de iones de muestra que no han sido neutralizados por los contraiones en fase gaseosa. ([Figura 10](#)).

Finalmente, cabe mencionar una variante del segundo modelo, denominada “sobreviviente afortunado refinado”. En este caso también se considera que las moléculas de analito son incorporadas en los cristales de muestra/matriz como especies precargadas; sin embargo, se propone, que las moléculas de matriz al evaporarse en forma de iones principalmente

contribuyen en la neutralización de contraiones, favoreciendo de esta manera la formación de iones de analitos mono-cargados. Ambos modelos, protonación en fase gaseosa y del “sobreviviente afortunado”, destacan la importancia de la matriz para la ionización de analitos en MALDI-MS. La ocurrencia simultánea de estos mecanismos fue demostrada experimentalmente por Karas, quien utilizó una matriz deuterada. Asumiendo la ionización propuesta en el modelo 1, el ion del compuesto de la muestra se forma adquiriendo un protón de la molécula de matriz, por lo que se esperaba la presencia del ion $[M+D]^+$ en el espectro de masas. Por otra parte, el segundo modelo propone que las moléculas de analito ya están protonadas en la etapa de co-cristalización, por lo que en el espectro de masas deben presentarse iones con m/z $[M+H]^+$. La presencia de ambos tipos de iones $[M+H]^+$ y $[M+D]^+$, observada en el experimento validó la participación de ambos modelos de ionización. Una diferencia importante entre MALDI y otras técnicas de ionización es que MALDI genera iones de manera discreta y no es una fuente continua. En la siguiente sección se abordará una comparación más detallada entre MALDI y ESI, que fueron las técnicas de ionización mayormente utilizadas en el desarrollo de esta tesis.

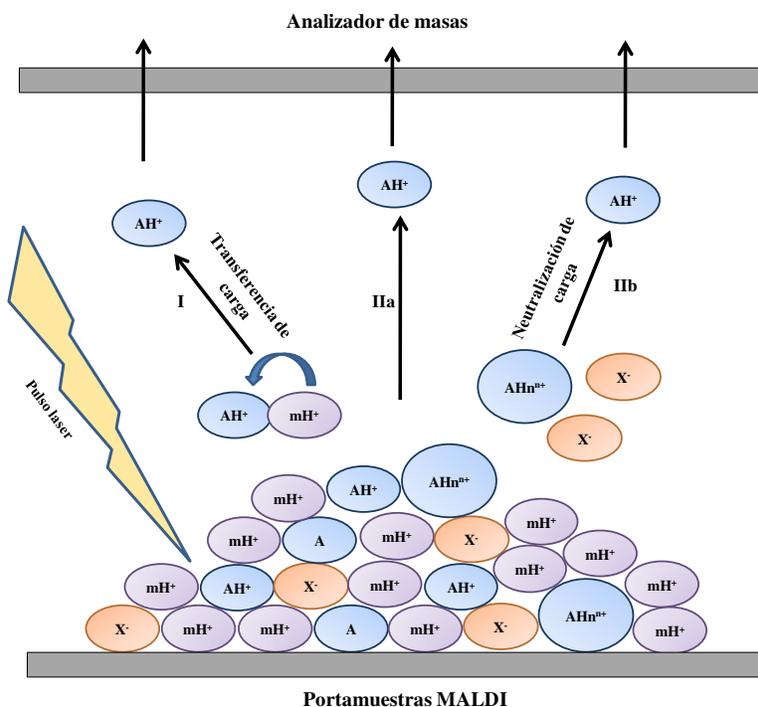


Figura 10 Modelos de ionización MALDI; [I] protonación en fase gaseosa, mostrando la transferencia de carga de la matriz ionizada (mH⁺) al analito (A). [II] Modelo del superviviente afortunado, mostrando la desorción directa del analito preformado mono-cargado (mH⁺) [19].

1.3.1.2 Comparación entre MALDI y ESI

Tanto ESI como MALDI, proveen ionización en el análisis de muestras con concentraciones bajas de analito, en el orden picomolar y ambas tienen carácter “suave”. Sin embargo, una de las diferencias principales entre ESI y MALDI es el estado físico en el que se encuentra la muestra. En ESI, la muestra se introduce en forma de una solución mientras que en MALDI la muestra es colocada en la placa y secada para obtener un depósito sólido. Como consecuencia de esta diferencia, el acoplamiento con LC resulta mucho más fácil en el caso de ESI. A pesar de que ESI es capaz de reproducir datos de una mejor manera que MALDI, debe tenerse en cuenta que la abundancia relativa de varios iones en el espectro ESI no es una representación real de la concentración de la muestra. Por lo tanto, se debe preparar una solución estándar con una calibración adecuada, preferiblemente con el uso de un análogo isotópico del analito [58, 71]. Así mismo, debido a la forma de introducción de muestra, el proceso de calibración es más simple en ESI y esta técnica es más utilizada para fines cuantitativos, mientras que MALDI tiene un uso preferencial en el análisis cualitativo o semicuantitativo. Específicamente, la intensidad de las señales en MALDI y su reproducibilidad depende fuertemente de la homogeneidad de co-cristalización de la muestra con la matriz, lo que compromete tanto la precisión como la exactitud [72, 73]. Aunque ambas técnicas de ionización son suaves y prácticamente sin fragmentación de moléculas, la formación de iones con cargas múltiples es más probable en ESI. Cabe también mencionar que ESI es efectivo en el análisis de compuestos polares en un amplio intervalo de masas moleculares, incluyendo aquellos de masas bajas. Por su parte, el requisito de polaridad no aplica en MALDI y en cuanto al tamaño de compuestos, es posible la ionización de moléculas grandes con masas de hasta cientos de kDa, tales como polímeros, mientras que, en la región de masas pequeñas, se presenta un ruido espectral debido a los iones provenientes de matriz. Sin embargo, cabe aclarar que, la formación de iones con varias cargas facilita registrar espectros de biomoléculas grandes, como proteínas, en una región de valores m/z bajos; en el caso de MALDI, la formación preferente de iones mono-cargados en MALDI es de importancia para la identificación del ion molecular de proteínas, carbohidratos y lípidos [63].

En esta tesis se utilizaron ambas técnicas de ionización, aprovechando las capacidades de cada una de ellas y tratando de contrarrestar las limitaciones. En particular, se desarrolló un nuevo procedimiento de determinación de colorantes azosulfonados mediante MALDI-TOF MS,

donde una parte central fue lograr una buena repetibilidad de las señales analíticas. Por otro lado, ESI se utilizó en el análisis cuantitativo de los FAMES y del picolinato de cromo.

1.3.2 Separadores de masas

El separador de masas es la parte del espectrómetro en la cual los iones generados en la fuente de ionización son separados con base en sus valores m/z . En la [Tabla 1](#) se enlistan algunos tipos de separadores, utilizados comúnmente en instrumentos comerciales. Cabe señalar que algunos de ellos, como el cuadrupolo o la trampa iónica, funcionan como filtros de masa, mientras que los de sector de campo, ciclotrón o tiempo de vuelo, son analizadores de masa. Estos separadores varían en términos de resolución, rango de masas, y la capacidad para realizar experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) además de tener diferente diseño, tamaño y precio. Cabe también resaltar el uso combinado de los separadores con el fin de mejorar el desempeño del espectrómetro en ciertas aplicaciones. Tal es el caso de configuración cuadrupolo- tiempo de vuelo (QTOF), donde se obtiene una alta resolución de masas, o triple cuadrupolo (QQQ) que es especialmente útil en el análisis cuantitativo.

1.3.2.1 Cuadrupolo

Los separadores de cuadrupolo son filtros de masa que únicamente permiten el paso de iones con una cierta relación m/z en un tiempo dado que corresponde a un cierto ajuste de dos campos. El principio de un filtro de masas tipo cuadrupolo fue descrito por primera vez en 1950 por el ganador del premio Nobel de física Paul Wolfgang y era un filtro de iones adecuado para los instrumentos GC-MS. El movimiento de los iones en campos eléctricos es la base de la separación. El dispositivo de cuadrupolo consiste en un grupo de cuatro electrodos hiperbólicos o cilíndricos, montados en configuración cuadrada, donde un voltaje (U) de corriente directa (DC) es aplicado a dos de estos electrodos, y a los electrodos restantes se les aplica un voltaje alternante (V) con una radiofrecuencia (la frecuencia es denominada ω) ([Figura 11](#)). Los iones formados en la cámara de ionización son impulsados hacia un cuadrupolo por un campo eléctrico de 5 kV. Lógicamente, los iones cargados positivamente, se moverán en dirección al electrodo cargado negativamente. Sin embargo, cuando la polaridad es cambiada, los iones cambiarán su trayectoria siendo atraídos o repelidos hacia las varillas. En tal situación, los iones se someterán a una oscilación compleja (trayectoria) y con los valores adecuados de V , U y ω , para un ajuste dado, sólo los iones dentro de un rango estrecho de m/z logran llegar hacia el detector. Los iones

remanentes que poseen una trayectoria inestable entre las barras son eliminados antes de llegar al detector, mediante colisiones con uno de los electrodos.

Tabla 1 Analizadores de masa más utilizados.

Separador	Acrónimo	Principio
Tiempo de vuelo	TOF	Dispersión temporal de un haz de iones a los que se confirió la misma energía cinética; en condiciones de vacío, los iones se separan por su tiempo de vuelo en un tubo.
Sector magnético	B	Deflexión de un haz continuo de iones; separación por momento en un campo magnético debido a la fuerza de Lorentz.
Cuadrupolo lineal	Q	Haz de iones continuo en un campo cuadrupolar de radiofrecuencia lineal; separación debido a la inestabilidad de las trayectorias de los iones.
Trampa de iones	IT	Los iones son atrapados y almacenados en espacio delimitado por electrodos (trampa), aplicando un voltaje de RF bajo al electrodo de anillo; posteriormente el ajuste de voltajes permite expulsar los iones en función de su m/z . Se puede integrar la fragmentación de iones seleccionados por colisiones con un gas.
Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier	FT-ICR	Iones atrapados en un campo magnético (fuerza de Lorentz); separación por frecuencia de su oscilación en ciclotrón, detección de corriente de imagen y transformación de Fourier de señal transitoria.
Orbitrap	Orbitrap	Oscilación axial en campo eléctrico no homogéneo; detección de frecuencia después de la transformación de Fourier de señal transitoria.

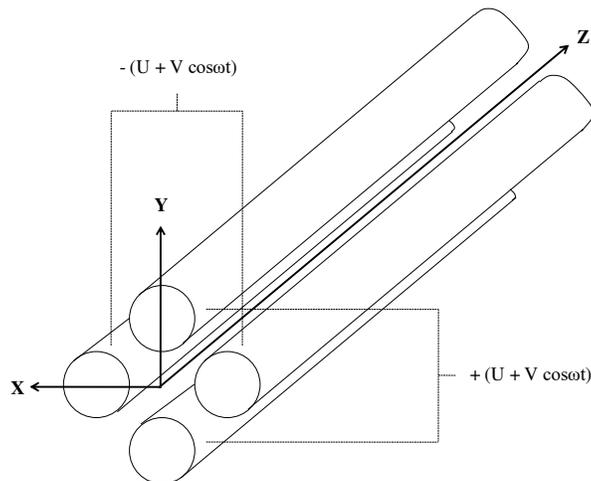


Figura 11 Esquema de un filtro de masas del tipo cuadrupolo lineal [19].

La mayor ventaja del cuadrupolo es su bajo costo, su relativo tamaño pequeño, robustez y fácil mantenimiento. Un cuadrupolo posee, sin embargo, una capacidad limitada para separar valores m/z altos (usualmente <4000 Da), tiene baja resolución y no permite realizar análisis MS/MS. Es posible superar la desventaja de no poder realizar análisis MS/MS conectando un cuadrupolo a otros analizadores pudiendo ser cuadrupolos adicionales (instrumentos de triple cuadrupolo) o un cuadrupolo acoplado a un TOF (Q-TOF). Un cuadrupolo de RF única funciona como un dispositivo de enfoque de iones que los guía hacia otros componentes del instrumento. Dicha funcionalidad se puede mejorar significativamente con hexapolos y octapolos, que, sin embargo, no pueden funcionar como filtros de iones.

1.3.2.2 Trampa de iones

La trampa de iones es un dispositivo que actúa como filtro de masas, similar a un cuadrupolo, donde los iones con un cierto valor m/z son almacenados en un compartimiento (trampa de iones) por un periodo de tiempo, seguida por su expulsión hacia el detector. El pozo de potencial de captura creado con la trampa iónica puede ser ejemplificado como un tazón en diferentes capas horizontales. Al inclinar el tazón a la derecha, es vertida la capa que corresponde a los iones de m/z más baja. La inclinación del tazón corresponde a la rampa de radiofrecuencia.

El dispositivo de trampa iónica consiste esencialmente en tres electrodos, dos de estos electrodos son idénticos y tienen geometría hiperboloide, estos son llamados electrodos “endcap” y se distinguen por el número de hoyos en el centro de cada electrodo, en la mayoría de los equipos estos electrodos tienen una sola perforación donde por un lado los iones pueden pasar periódicamente y por el otro electrodo pueden salir al detector. El tercer electrodo también posee una geometría hiperboloide y es llamado electrodo de anillo. Este electrodo es posicionado simétricamente entre otros dos electrodos endcap. La geometría de los electrodos está definida para generar un campo cuadrupolo ideal el cual producirá un pozo de potencial para el confinamiento de los iones [74].

Dentro de la trampa iónica, se puede fragmentar los de iones almacenados, lo cual permite obtener espectros de masas MS^n , para la identificación de compuestos y su cuantificación mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM); esta posibilidad ha sido explorada en la presente tesis para poner a punto un procedimiento de determinación de picolinato de cromo en suplementos dietéticos.

1.3.2.3 Tiempo de vuelo

El primer analizador de tiempo de vuelo fue construido en 1946 por W. E. Stephen. El principio de separación de iones es muy simple; a una población de iones de diferentes m/z se confiere cierta energía cinética y se le introduce a un tubo libre del campo en el cual se mantiene un alto vacío. Los iones se mueven en la misma dirección dentro del tubo de longitud fija (1 a 2 metros), obteniéndose como resultado una distribución correspondiente de velocidades en la cual la velocidad es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z , por lo que su tiempo de llegada al detector será distribuido de acuerdo con la raíz cuadrada de su relación m/z . En otras palabras, los iones con una relación m/z pequeña llegan al detector más rápido que aquellos con una relación m/z más grande [19, 63].

Independientemente del método de ionización, la carga eléctrica q de un ion de masa m_i es igual a un número z de electrones de carga e , y por lo tanto $q = ez$. La absorción de energía E_{el} al moverse a través de un voltaje U es dada por

$$E_{el} = qU = ezU$$

Por lo tanto, la energía potencial formada de una partícula cargada en un campo eléctrico es convertida en energía cinética E_{kin} . En movimiento de traslación, descrito por la siguiente ecuación.

$$E_{el} = ezU = \frac{1}{2}m_i v^2 = E_{kin}$$

Suponiendo que el ion originalmente se encontraba en reposo, la velocidad alcanzada se viene dada por la siguiente ecuación:

$$v = \sqrt{\frac{2ezU}{m_i}}$$

Dando como resultado que v es inversamente proporcional al cuadrado de las masas.

Aunque el analizador TOF tiene la ventaja de poder analizar masas en un alto rango de valores m/z , la linealidad de un analizador convencional TOF puede influenciar el poder de resolución, porque los iones entrantes al analizador TOF no tienen energías cinéticas idénticas y esto subsecuentemente puede afectar a las medidas de resolución. Este inconveniente puede sobrellevarse por el desarrollo del reflector (espejo electrostático), el cual es un dispositivo óptico de iones que modifica el camino de los iones dentro del TOF. Los iones con mayor energía cinética penetran a una profundidad mayor en el espejo de iones y, por lo tanto, los iones serán repelidos gradualmente, igualando el tiempo de su llegada al detector y de esta manera mejorando la resolución del espectro TOF. Otro factor es la profundidad del tubo, debido a que los iones en un reflector viajan por un camino de mayor longitud, mejorando la resolución, y brindando la posibilidad de obtención de masas precisas debido al aumento en el tiempo de vuelo.

Un analizador de masas TOF con reflectrón está equipado con dos detectores: el primero de ellos está más allá del espejo de iones y sirve para el modo lineal, cuando no se aplica el voltaje en reflectrón; el segundo detector está al final de la ruta que tienen los iones con voltajes de reflectrón encendidos. Debido al hecho de que un reflectrón puede resultar en la pérdida de iones, comprometiendo la sensibilidad, a causa de una mayor resolución.

Debido a su naturaleza, un analizador TOF es ampliamente vinculado a la fuente de iones MALDI, sin embargo, a menudo es utilizado en serie con cuadrupolo, lo que resulta adecuado

para realizar experimentos de espectrometría de masa en tándem. Las fuentes de ionización suave (ESI, MALDI) en conjunto con el analizador de masas TOF y/o Q-TOF permiten el análisis de moléculas en un amplio intervalo de masas, proporcionando datos para su identificación/confirmación y también para su cuantificación [19, 63].

1.4 Uso del análisis por inyección al flujo en espectrometría de masas (FIA-MS)

El acoplamiento del análisis por inyección al flujo con espectrometría de masas (FIA-MS) es ideal para una rápida y confiable anotación de compuestos, así como su cuantificación con una buena precisión y exactitud. Un sistema FIA-MS presenta una configuración similar a la de un sistema FIA típico, el cual incorpora un espectrómetro de masas como detector. El acoplamiento de la técnica FIA con la espectrometría de masas (MS) se realizó en la década de 1990 empleando espectrómetros con fuentes de ionización por electronebulización (ESI); el principal inconveniente de los métodos FIA-MS era su poca sensibilidad y susceptibilidad a cambios de eficacia de ionización. Debido a límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) relativamente altos, así como a una baja precisión, era necesaria una preparación y limpieza de muestra con el fin de simplificar su composición química y/o separar los compuestos de interés de potenciales interferentes. Las limitaciones de la introducción directa de muestra se pueden eliminar mediante previa separación cromatográfica, siendo los sistemas LC-MS muy utilizados en la actualidad. Por otra parte, con el desarrollo de espectrómetros altamente selectivos y sensibles, como el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y el espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), proporcionan el rendimiento que permite la implementación de FIA-MS para la determinación de bajas concentraciones de analitos en muestras relativamente complejas. Las aplicaciones de FIA-MS se extienden en el ámbito medioambiental, análisis de alimentos, farmacéutico y clínico; algunas de estas aplicaciones se resumen en [Tabla 2](#).

El sistema FIA-MS surge como un enfoque alternativo a LC-MS e infusión directa. Partiendo de la misma configuración instrumental para LC-MS con la abolición de la columna cromatográfica. Así pues, el sistema FIA-MS consiste en la inyección transitoria de pequeños volúmenes de muestra en una corriente de líquido portador que fluye directamente a la fuente de ionización de un instrumento MS ([Figura 12](#)). De esta manera, con cierta frecuencia al detector llegan bien definidos segmentos de la muestra. Obviamente, sin columna cromatográfica, el tiempo de la corrida analítica se reduce drásticamente.

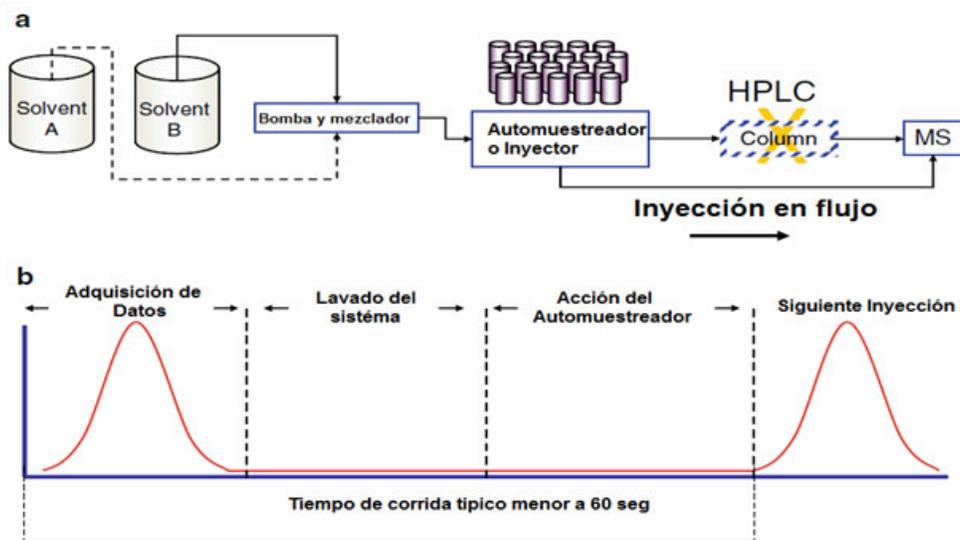


Figura 12 Diagrama FIA-MS, donde la inyección de muestra se realiza mediante el auto-muestreador comercial del equipo HPLC. b) “Fiagrama” típico, en el que se muestran etapas del proceso FIA[16].

Para la aplicación de acoplamientos FIA-ESI-MS y FIA-ESI-MS/MS en la cuantificación de múltiples analitos sin previa separación cromatográfica y con buena confiabilidad de resultados, es necesario seleccionar cuidadosamente varios parámetros del sistema FIA ([Tabla 3](#)), como lo son la velocidad de flujo, longitud y diámetro de tubo, introducción de la muestra y tipo de detector MS. Debido a la introducción directa de muestra, todos sus componentes entran a dispositivo de ionización al mismo tiempo y los resultados del análisis son susceptibles a interferencias tanto en la ionización como aquellas espectrales. Es por ello por lo que en procedimientos FIA-ESI-MS, es importante el uso de un estándar interno adecuado (IS). La normalización de la señal del analito por la del IS permite recompensar por cambios de la eficacia de ionización y también elimina las imprecisiones relacionadas con el procesamiento de muestra y con la adquisición de la señal. Aunque en la espectrometría de masas preferencialmente se utilizan estándares internos isotópicos (uno o varios analitos enriquecidos con isótopos estables pesados), también es posible emplear compuestos de diferente identidad que los analitos. En cuanto a los efectos de la matriz de muestra sobre la eficacia de ionización, pueden ocurrir tanto un deterioro como una mejora de dicha ionización [11]. Aunque estos efectos son observados también en LC-MS, en FIA-MS son más importantes debido a la falta del proceso de separación. Para sobrellevar los efectos de la matriz en FIA-MS, se puede llevar a cabo una calibración en

presencia de los componentes de muestra, esto se logra teniendo una muestra libre de analitos y utilizándola para la preparación de las soluciones estándar. En un estudio realizado por Nanita, utiliza FIA-MS/MS para realizar una dilución infinita en tiempo real para eliminar la influencia de la matriz en señales de analito. Mediante el procesamiento de datos y algoritmos matemáticos, Nanita transforma el perfil de la banda de dilución (señal FIA típica) en un gráfico de concentración contra tiempo para determinar la concentración actual del analito en una dilución infinita sin el efecto de matriz [47]. Por otra parte, FIA-MS presenta una clara ventaja sobre LC-MS ya que la composición de la muestra en el momento de la inyección, así como el líquido portador utilizado, no se limitan a los disolventes y reactivos aptos para la cromatografía líquida de fase inversa. En principio, cualquier líquido puede usarse en FIA-MS como el disolvente de la muestra siempre que exista compatibilidad con el método de ionización de MS empleado. En consecuencia, se puede probar una variedad de disolventes y aditivos (por ejemplo, modificadores de pH), lo que permite la selección de un diluyente de muestra adecuado [16, 75].

Resumiendo, se puede describir la técnica FIA-MS como rápida, simple, reproducible, robusta, sensible y específica. Proporciona un alto rendimiento y consume pequeños volúmenes de muestra, de reactivos y de solventes. Por lo tanto, es ideal para análisis cuantitativos automatizados de grandes números de muestras. Sin embargo, en algunos casos, las muestras deben someterse a un pretratamiento antes de que sean inyecten al sistema FIA.

En cuanto a los espectrómetros de masa, para estudios exploratorios (principalmente metabólica) se han utilizado los instrumentos de alta resolución tales como acoplamiento de cuádruplo con tiempo de vuelo, de trampa iónica linear con orbi-trampa o ciclotrón con transformada de Fourier. Por otro lado, cuando la identidad del(los) compuesto(s) a determinar es conocida y se cuenta con su(s) estándar(es), el aspecto más importante es poder aumentar la relación S/R por ejemplo utilizando la técnica MRM.

Tabla 2 Estado del arte FIA-MS

Muestra	Analitos	Tratamiento	FIA	Instrumentación	Ref
Frutas cítricas	Fungicidas	Extracción con acetato de etilo	Transporte	ESI (+)-TQ-MS MRM	[23]
Suplementos dietéticos	Lovastatina	Extracción MeOH: H ₂ O	Transporte	ESI (+)-TQ-MS MRM	[76]
Suplementos dietéticos	Medicamentos de pérdida de peso (sibutramina)	Extracción ACN	Transporte	ESI (+)-TQ-MS MRM	[77]
Orina	Creatinina	Dilución con ACN	Transporte	ESI (+)-TQ-MS MRM	[78]
Salsas y condimentos	Colorantes Sudan I-IV	Extracción ACN	Transporte	APCI (+)-QTOF-MS	[79]
Suero animal	Metformina	Precipitación de proteínas con ACN-HCOOH	Transporte	ESI (+)-QLT-MS MRM	[80]
Suero de pacientes de Alzheimer	Perfil metabólico	Fraccionamiento: MeOH-EtOH y extracción de la pastilla con CHCl ₃ -MeOH	Transporte	APPI-TOF-MS	[81]
Orina	Vinclozolina y sus metabolitos	Dilución	Transporte	ESI (-) – LTQ-Orbitrap-FTMS y MS/MS	[82]
Levadura (estrés por Cd)	Perfil metabólico	Extracción con HClO ₄ pH 2 (95°C, 5 min), centrifugar, dilución con MeOH-H ₂ O	Transporte	ESI (+/-) -LTQ-Orbitrap-MS, MS/MS; análisis estadístico	[17]
Alimentos	Multi-residuos orgánicos	Extracción con MeOH, dilución con MeOH-NH ₃ H ₂ O	Dilución	ESI-TQ-MS MRM	[83]

Tabla 3 Estado del arte FIA-MS (continuación)

Muestra	Analitos	Tratamiento	FIA	Instrumentación	Ref
Estudio de formación de complejos	Mezcla de tripéptidos con vanomicina	Un reactor en flujo con agitación continua	Transporte	ESI-ITTOF-MS	[84]
Alimentos	Residuos de pesticidas polares	Extracción con H ₂ O, MeOH-H ₂ O, Meh-HCOOH, MeOH-HCl	Transporte	ESI-TQ-MS MRM	[85]
Glóbulos rojos	Formas de hemoglobina	Lisis, dilución con HCOONH ₄	Transporte	ESI-QTOF-MS	[86]
Alimentos, glóbulos rojos	Poliaminas	Homogenización con HClO ₄ (4°C), centrifugación, derivatización con cloruro de dansilo, extracción con benceno, evaporación y redisolver en ACN	Transporte	ESI-MS	[87]
Proceso de oxidación avanzada	Tensos activos fluorados	Tratamiento O ₃ , O ₃ /UV, H ₂ O ₂ /O ₃ , reacción Fenton	Transporte	APCI (+)-TQ-MS, MS/MS ESI (-)-TQ-MS, MS/MS MRM	[88]
Resinas alquídicas de aceites vegetales	di- y tri-ésteres de glicerol y de pentaeritritol	Extracción con hexano, dilución MeOH-PrOH (90:1)	Transporte	ESI-QTOF-MS	[89]
Bebidas	Ácido benzoico	Dilución con MeOH	Transporte	ESI (-)-TQ-MS/MS MRM	[90]
Cuatro variedades de canela	Perfiles metabólicos	Extracción MeOH-H ₂ O	Clean-up (cartucho C18)	ESI-IT-MS PCA	[91]

1.4.1 Sistema FIA-MS

La Espectrometría de masas de alta resolución, es una herramienta muy potente en términos de análisis estructural de compuestos y también en el análisis cuantitativo, donde se requiere alta selectividad y sensibilidad. Precisamente gracias a ésta excepcionalmente alta selectividad basada en la medición de masa exacta, de patrón isotópico y de patrón de fragmentación, se puede lograr la identificación y cuantificación de varios compuestos, con base en el espectro de masas adquirido para una muestra introducida directamente a la fuente de ionización. Por otro lado, para sistemas químicos complejos, cuando se presentan interferencias de ionización y/o espectrales, resulta necesario el acoplamiento de MS con una etapa previa de separación cromatográfica o electroforética (GC, HPLC, CE). A pesar de las claras ventajas que presentan los sistemas GC-MS, LC-MS, estos sistemas requieren una vasta experiencia del analista en la adecuación de las condiciones de separación, ionización y de análisis de masas y, además, representan largos tiempos de análisis y un exhaustivo análisis de datos. Es por ello, que se puede notar cierta preferencia hacia la introducción directa de la muestra, buscando nuevas alternativas que permitan eliminar interferencias típicas. Cuando la muestra se encuentra en forma sólida, pueden utilizarse las técnicas de desorción/ionización por láser (LDI); en este sentido, además de sistema convencional MALDI, se han desarrollado otras técnicas tales como; DESI, DIOS, y DART [20]. Cuando la muestra es líquida, se prefieren fuentes de ionización ESI o APCI y precisamente en estos sistemas se ha integrado el concepto FIA [20, 41, 92]. El primer objetivo ha sido facilitar el transporte de muestra hacia la fuente de ionización, eliminar efectos de memoria existentes en dispositivos tradicionales de infusión directa y aumentar la frecuencia de muestreo [20]. Así pues, el sistema FIA-MS consiste en la inyección transitoria de la muestra en una corriente portadora que fluye directamente a la fuente de ionización de un instrumento MS ([Figura 12](#)). Un punto clave en el desarrollo del procedimiento FIA-MS es la selección de una solución portadora adecuada. La composición de esta solución debe asegurar su miscibilidad con la muestra, compatibilidad con el proceso de ionización, favoreciendo al mismo tiempo la formación de un solo tipo de iones (por ejemplo, iones $[M+H]^+$ o $[M+Na]^+$, si ESI opera en modo positivo), efectiva limpieza del sistema entre las inyecciones sucesivas, etc. En concordancia, con lo descrito en secciones anteriores, en aplicaciones más avanzadas, en el sistema FIA se pueden incorporar diferentes tipos de dispositivos para llevar a cabo operaciones de limpieza y/o

preconcentración de analitos en línea (dispositivos para extracción en fase sólida [93, 94] o cromatografía frontal [95, 96]).

1.4.2 Parámetros que afectan la forma de la señal del pico de FIA-MS

Como se mencionó anteriormente, es necesario examinar y seleccionar diferentes parámetros de operación en un sistema FIA con el fin de obtener una señal analítica lo mejor posible (alta intensidad, baja dispersión, corto tiempo de regreso a línea base, bajo ruido). En este sentido, el sistema FIA-MS se rige por los mismos parámetros que los sistemas FIA tradicionales, siendo parámetros de importancia la velocidad de flujo, la longitud y diámetro interno de los tubos, el volumen de la muestra y la presencia de dispositivos adicionales. Cabe sin embargo notar que dichos parámetros difieren sustancialmente de aquellos utilizados en sistemas con detección por espectrofotometría UV-Vis, electroquímica o por alguna de las técnicas de espectrometría atómica, ya que por la particularidad de los dispositivos de ionización en MS molecular, tanto los volúmenes, como los diámetros de tubos y velocidades de flujo son inferiores que en otros tipos de detectores. Investigaciones recientes han demostrado la importancia de la optimización del sistema FIA-MS mediante la evaluación de estos parámetros de inyección de muestra. Específicamente en el caso del sistema FIA-MS, la composición del líquido transportador, y el tamaño del tubo de conexión con la interfaz del espectrómetro son otros parámetros por considerar debido a que influyen en la eficacia de ionización. Por ejemplo, la importancia de las dimensiones del capilar de transporte es señalada en el trabajo de Mol y van Dam [56, 85], donde se observó una relación inversa entre diámetro interno del capilar e intensidad de la señal, debido a la reducción de la dispersión de la banda de inyección como lo muestra la [Figura 13](#). Un aspecto muy importante para la cuantificación es que la cantidad de muestra y el tiempo de su introducción al espectrómetro de masas tienen que ser suficientes para obtener una adecuada integración de la señal. En consecuencia, es necesario equilibrar la cantidad de muestra para asegurar la sensibilidad requerida y mantener la anchura de la señal lo más mínima posible [56].

Otro parámetro de vital importancia en FIA-MS, mencionada anteriormente es la composición del líquido transportador [57]; los componentes de este portador deben promover la ionización con preferencia de formación de un tipo de ion para cada uno de los analitos. El aumento de la eficacia de ionización es necesario para contrarrestar interferencias provocadas por falta de una separación cromatográfica. A su vez, al evitar la separación cromatográfica, existen

más opciones en la selección del portador; como un ejemplo, se pueden emplear soluciones de bajo o alto valor de pH, mismas que son prohibidas como fases móviles en cromatografía de fase inversa debido al deterioro de ciertas columnas. Así mismo, el uso de altos porcentajes de disolvente orgánico en la composición del portador puede mejorar la ionización, pero resulta poco práctico en separaciones HPLC. De ahí, que la mayor versatilidad del FIA respecto a HPLC se dé en cuanto al aseguramiento de una alta eficacia de ionización de solutos. La [Figura 14](#), muestra los resultados de un experimento representativo, donde se evaluó la sensibilidad colectiva de 12 plaguicidas cuando los extractos se diluyeron con metanol puro o metanol con 1% de acetato de amonio, ácido fórmico al 1% o hidróxido de amonio al 1%. La mejor respuesta de señal se obtuvo cuando el hidróxido de amonio se añadió al metanol y se utilizó el disolvente resultante como diluyente de muestra [83]. En el trabajo de tesis, se proponen diferentes variantes de sistemas FIA-MS, principalmente empleando FIA para transportar muestras al dispositivo de ionización.

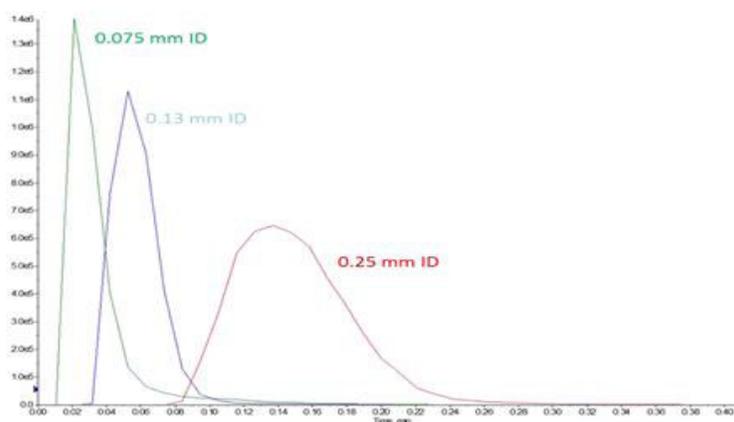


Figura 13 Efecto del diámetro del capilar interno en la forma del pico del analito en el sistema FIA-MS, según lo reportado por Mol y van Dam [56].

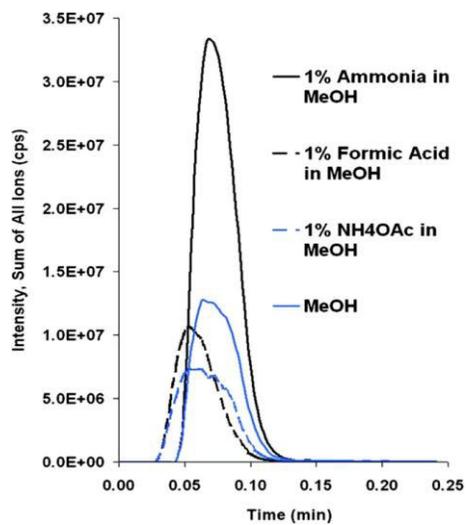


Figura 14 Efecto del tipo de solvente sobre la eficacia de ionización del analito en FIA-MS [46]

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es contribuir con el desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación de compuestos de relevancia biológica, utilizando esquemas de análisis por inyección al flujo y espectrometría de masas.

2.2 Objetivos particulares

Para lograr el objetivo general, el proyecto se dividió en cuatro partes con los siguientes objetivos particulares:

1. Desarrollar un procedimiento de determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante el procedimiento FIA-ESI-QTOF MS para su aplicación en el análisis de aceites cosméticos de ricino.
2. Poner a punto un procedimiento de determinación de picolinato de cromo en suplementos dietéticos, mediante FIA-ESI-IT-MS/MS, utilizando el método de monitoreo de reacciones múltiples.
3. Demostrar la viabilidad de determinación de colorantes azoicos en productos alimenticios mediante MALDI-TOF-MS, utilizando sistema FIA-ESI-QTOF MS para anotación estructural de iones formados en la fuente de ionización suave.
4. Participar en un estudio colaborativo con la Universidad de Varsovia, enfocado en el fraccionamiento isotópico de Mg en clorofila A en plantas con diferentes rutas de asimilación de carbono, realizando la extracción/fraccionamiento de clorofila y confirmando la identidad de clorofila A por FIA-ESI-QTOF MS.

3 Parte Experimental

3.1 Equipos de laboratorio

3.1.1 Instrumentación analítica

- Cromatógrafo de líquidos Agilent Series 1200 equipado con una bomba cuaternaria, un compartimiento con termostato para columna, un automuestreador y un detector espectrofotométrico de arreglo de diodos.
- Cromatógrafo de gases Clarus 500 con detector de ionización de flama (PerkinElmer, USA).
- Espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500 ce (Agilent Technologies), con celda de colisiones/reacciones tipo octapolo.
- Cromatógrafo de líquidos UltiMate 3000 (Dionex, Thermo Scientific) equipado con una bomba binaria, desgasificador, compartimiento con termostato para columna y un automuestreador.
- Espectrómetro de masas con trampa iónica Amazon SL equipado con una fuente de ionización por electronebulización (ESI-ITMS) (Bruker Daltonics).
- Espectrómetro de masas de alta resolución maXis Impact: ionización ESI y cuadrupolo-tiempo de vuelo ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).
- Espectrómetro de masas con desorción/ionización laser asistida con matriz y con analizador de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics), equipado con un láser smartbeamTM-II Nd:YAG (335nm,532 nm, 1064nm).

3.1.2 Equipos utilizados en el procesamiento de muestras y preparación de reactivos

- Purificador de agua Mili Q WaterPro Ps (Labconco).
- pH metro 3200P (Agilent technologies).
- Liofilizador FreeZone 2.5 Plus y frasco Fast-Freeze 600 mL (Labconco).
- Centrifuga Legend Mrico 17 (Thermo Scientific).
- Speed Vac (Vacufuge plus, Eppendorf AG, Hambueg, Germany).
- Cámara de crecimiento

3.2 Estándares y reactivos

Los estándares y reactivos durante el desarrollo de esta tesis serán descritos para cada sección.

3.3 Programas de análisis de datos

- Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics)
- Quanta Analysis (Bruker Daltonics)
- Flex Analysis 3.4
- Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).
- Microsoft Excel 2016.
- Statistica para Windows, Statsoft Inc.

4 Resultados y discusión

4.1 Determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos en muestras de aceite de ricino por inyección al flujo por electronebulización y espectrometría de masas de alta resolución

4.1.1 Introducción

El aceite de ricino, utilizado como un agente emoliente e hidratante, es un aceite vegetal extraído de la planta de ricino (*Ricinus communis*), donde su principal ingrediente son los triglicéridos compuestos por el ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico, C18: 1, OH), el cual representa hasta un 95% de los ácidos grasos totales en el aceite y le confiere a este aceite alta polaridad en comparación a otras grasas. Otros componentes incluyen principalmente ácidos grasos insaturados (linoleico, oleico, linolénico) y trazas de ácidos grasos insaturados (esteárico, palmítico, behénico, araquídico) [97, 98].

La determinación de ácidos grasos en el aceite de ricino de distintas regiones geográficas se ha reportado no sólo en el contexto de la ciencia de los cosméticos, sino también en aplicaciones industriales, y en la producción de biodiesel [97-101]. El enfoque más común se basa en la reacción de transesterificación que convierte triacilglicéridos en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) seguido de su separación por cromatografía de gases con ionización de llama o detección por espectrometría de masas [102-105]. A pesar de las ventajas de la cromatografía de gases en cuanto a su alto poder resolutivo, esta técnica presenta una desventaja la cual un tiempo de análisis relativamente largo, especialmente en el análisis de series grandes de muestras que típicamente se requieren en el control de calidad de productos comerciales. Por

otro lado, se ha demostrado la utilidad de la espectrometría de masas con fuentes de ionización suave en el análisis de triglicéridos y ácidos grasos [101, 106, 107], en particular, la capacidad de la ionización química a presión atmosférica (APCI) para la caracterización cualitativa de los productos de transesterificación del aceite de coco [108]. Debido a que APCI presenta la capacidad de ionizar eficientemente compuestos no polares, su uso fue apropiado en el análisis de aceite de coco, el cual se compone principalmente de ácidos grasos insaturados. Por el contrario, los ácidos grasos predominantes en los triglicéridos del aceite de ricino son insaturados, por lo que surge el interés de explorar la factibilidad de otra fuente de ionización suave como electro-nebulización (ESI), adecuada en el análisis de especies polares o iónicas en muestras líquidas.

Si se utiliza un espectrómetro de masas de alta resolución, se puede conseguir con facilidad incluso la identificación y cuantificación de muchos compuestos, incluso en matrices químicamente complejas o cuando la muestra es introducida mediante la infusión directa (DI). Sin embargo, DI presenta varios inconvenientes como efectos de memoria, baja frecuencia de muestreo y, en el caso del análisis cuantitativo, problemas con la integración de señales analíticas. Para contrarrestar estas limitaciones, se ha introducido el principio FIA-MS [16, 41]. Con respecto al análisis de ácidos grasos, Munoz y col [107], aplicaron una bomba del cromatógrafo de líquidos para la introducción de muestra a la fuente ESI operada en modo negativo; hidrolizados de carne de puerco fueron analizados utilizando un espectrómetro de masas con cuadrupolo simple, logrando una cuantificación confiable del ácido oleico total. Por otro lado, los autores no utilizaron el diseño típico de un sistema FIA, debido a que la muestra era introducida continuamente a la fuente de ionización y la integración de las señales analíticas no era la adecuada. En un sistema FIA-MS como se vio anteriormente en la [sección 1.4](#), la solución analizada es transportada a un espectrómetro de masas por la realización de inyecciones sucesivas de un volumen pequeño y constante en la corriente portadora, y mantenimiento de la frecuencia de muestreo constante. El fiagrama es obtenido al graficar la relación m/z en función del tiempo, donde cada pico de señal corresponde a una inyección realizada. Para múltiples componentes, las señales de los iones correspondientes a cada compuesto objetivo se pueden extraer del gráfico de iones totales obtenido en una sola corrida de muestra, y utilizarlos para la cuantificación [16, 92]. Las características más importantes de FIA son los siguientes: (i) muy buena repetibilidad; (ii) facilidad de integración de las señales; y (iii) alta frecuencia de muestreo.

Esta parte de la tesis forma una continuación del tema iniciado en el proyecto de maestría. Específicamente, se montó un sistema de inyección de flujo para la introducción de muestras al espectrómetro de masas con ionización por electronebulización-cuadrupolo-tiempo de vuelo (FIA-ESI-QTOFMS), para la determinación de FAME en aceites de ricino de uso cosméticos. Para propósitos comparativos, se utilizó GC-FID, produciendo resultados analíticos consistentes con los obtenidos por el procedimiento propuesto. FIA-ESI-QTOFMS permite realizar hasta treinta inyecciones por hora, lo que es una mejora sustancial en cuanto a la frecuencia de muestreo, comparado con cualquier separación cromatográfica.

El procedimiento propuesto es especialmente adecuado para FAMEs de ácidos grasos insaturados, siendo los principales ingredientes del aceite de ricino.

4.1.2 Objetivos particulares

- Montar el sistema FIA-ESI-QTOF.
- Poner a punto un procedimiento FIA-ESI-QTOF para la determinación de FAMEs de aceite de ricino.
- Determinar FAMEs en muestras de aceite de ricino comercial por el procedimiento propuesto.
- Realizar una evaluación comparativa del procedimiento propuesto, con GC-FID.

4.1.3 Materiales y métodos

Instrumentación analítica

El sistema FIA ([Figura 15](#)) se montó utilizando una válvula de inyección Rheodyne con un “loop” de inyección de muestra de 2 μ L, misma que fue conectada con una bomba de un cromatógrafo de líquidos (Ultimate 3000 RLSC system, Thermo Scientific Dionex) y una fuente de ionización por ESI mediante tubos PEEK (9 cm, 1/16", 0.005" i.d., Agilent Life Science Part N° 5042-6461). El espectrómetro de masas utilizado fue maXis impact ESI-QTOF-MS (Bruker Daltonics).

Para el análisis por cromatografía de gases se utilizó el equipo Clarus 500 con detector de ionización en flama (Perkin-Elmer, USA) que incorporaba una columna capilar HP-88 (100m x 0.25 mm, película 0.20 μ m, Agilent Technologies, USA).

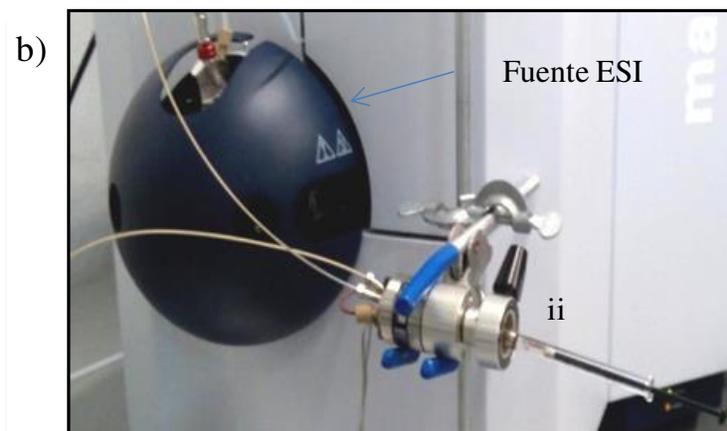


Figura 15 a) Montaje final del sistema FIA-ESI-QTOF; i) HPLC-Ultimate 3000, ii) válvula de inyección Rheodyne, iii) Espectrómetro de masas maXis impact. b) fuente de ionización ESI del espectrómetro de masas maXis impact.

Reactivos y muestras

Todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo. Por otro lado, se utilizaron los siguientes disolventes grado HPLC: metanol, acetonitrilo, isopropanol, isooctano, cloroformo (Fisher Scientific) y agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco).

Para la calibración se utilizó una mezcla de estándares de FAME Supelco (#18917) y ricinoleato de metilo (#83916 Sigma). El calibrante FAME mix Supelco C14-C22, 4 mg mL⁻¹, contenía la siguiente distribución individual de compuestos: 5% C18:3, 36% C18:2, 35% C18:1, 2% C22:0, 2% C20:0, 6% C18:0, 10% C16:0, 4% C14:0. Otros reactivos utilizados en este trabajo fueron adquiridos de la casa comercial Sigma: hidróxido de potasio, metóxido de sodio, formiato de sodio y el éster metílico del ácido tridecanoico (C13:0).

Nueve aceites de ricino de uso cosmético fueron adquiridos en la farmacia local; ocho de estos (muestras 1-8) fueron descritos con un contenido de aceite de ricino al 100%, y solo uno se describía como una mezcla de ricino y otros aceites vegetales (muestra 9).

Pretratamiento de muestra

En el tratamiento de muestra, 0.1 g de una alícuota de aceite fue diluida con 1 mL con isooctano: cloroformo (1:1), se agitó en vortex, y 40 µL fueron transferidos a un tubo Eppendorf de 2 mL para su posterior transesterificación. Específicamente, 400 µL de una solución metanólica de hidróxido de potasio 2% m/v y metóxido de sodio 0.5% m/v fueron añadidos, la mezcla fue agitada nuevamente en vórtex, centrifugada (10 000g, 5 min) y la fase de isooctano que contenía los FAMES fue recolectada. Dicho extracto obtenido fue diluido adecuadamente con la adición de un apropiado estándar interno para su posterior análisis mediante FIA-ESI-QTOFMS y GC-FID, respectivamente.

Procedimiento propuesto: Inyección en flujo – ionización por electronebulización – espectrometría de masas de alta resolución (FIA – ESI-QTOFMS)

Para en análisis FIA-ESI-QTOFMS se utilizó el sistema descrito en la [sección 4.1.3](#), La composición de la solución portadora fue de agua:isopropanol:acetonitrilo (20:50:30 v/v); la velocidad de flujo fue de 80 µL min⁻¹, con un intervalo de inyección de muestras cada 2 min. El sistema ESI fue operado en modo positivo con un voltaje de nebulización iónico 4 500 V, “plate

offset” 550 V, gas de secado 4 L min⁻¹, temperatura de secado 180 °C, presión de gas de nebulización 0.4 bar.

Los espectros fueron obtenidos con una velocidad de adquisición de 0.5 Hz y con un rango m/z de 50-1 000. A partir de los datos adquiridos de MS, se obtuvieron los diagramas de iones extraídos para los aductos de sodio de FAMES individuales aplicando la anchura de $m/z \pm 0.005$ y los siguientes valores m/z : 265.2138 (C14:0); 293.2451 (C16:0); 315.2295 (C18:3); 317.2451 (C18:2); 319.2608 (C18:1); 321.2764 (C18:0); 335.2557 (C18:1,OH); 349.3077 (C20:0); 377.3390 (C22:0) y m/z 226.9515 para el IS. Se aplicó substracción de línea base y filtración de las señales (suavizado gaussiano con 2 puntos) y la lista de valores de intensidades fue exportada a Excel, donde se obtuvieron las funciones de calibración y se llevó a cabo la cuantificación. La altura máxima normalizada por el estándar interno (clúster de formiato de sodio m/z 226.9515) fue utilizada como la señal analítica.

Para la calibración, se preparó una solución stock de FAMES tomando 0.5 mL del producto Supelco, 40 μL de ricinoleato de metilo 17.8 mg mL⁻¹, posteriormente la mezcla se diluyó a 1 mL con isopropanol; esta mezcla contenía 2 mg mL⁻¹ de FAMES C14-C22 y 0.712 mg mL⁻¹ de ricinoleato de metilo. A continuación, se realizaron diluciones seriadas con isopropanol en un rango de 2 a 2 048. Las soluciones de trabajo fueron obtenidas mezclando 50 μL de cada solución con 1 mL de agua: isopropanol: acetonitrilo (20:50:30) que contenía formiato de sodio 1.16 mmol L⁻¹. Los intervalos de calibración aplicados a cada FAME individual se presentan en la [Tabla 5](#) y [Tabla 6](#). Para el análisis de los distintos aceites, 50 μL de FAMES (ver [sección 4.1.3](#)) fueron mezclados con 1mL de esta misma solución de formiato de sodio. El análisis del blanco se realizó en paralelo con las muestras y tres réplicas fueron llevadas a cabo para cada análisis.

Procedimiento por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID)

Las condiciones para el análisis GC-FID fueron adoptadas de condiciones previamente establecidas [109]. El volumen de inyección fue de 1 μL , las condiciones fueron las siguientes: split 1:10, temperatura del inyector 225 °C, hidrógeno como gas acarreador 2 mL min⁻¹, gradiente de temperatura: 80°C en espera por 1 min; 175 °C en rampa de temperatura por 10 min, 6 min en espera; 210 °C 5 min en rampa, 3 min en espera; 230 °C, 26 min en rampa, 4.5 min en espera.

Los gases del detector fueron: hidrógeno 45 mL min⁻¹ y aire 450 mL min⁻¹, la temperatura del detector fue de 260 °C.

Para la calibración se prepararon cinco soluciones en tubos Eppendorf, tomando alícuotas apropiadas de soluciones de estándar de mix de FAMES, ricinolato de metilo 17.8 mg mL⁻¹, 200 µL de estándar interno (C13-0ME, 1 mg mL⁻¹ en isooctano) y se diluyó cada solución a 1 mL con isooctano. Los blancos se corrieron en conjunto con las muestras, realizando cada análisis por triplicado.

Análisis estadístico

Como ya se mencionó, todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado; se realizó una estadística descriptiva para obtener los valores medios y las desviaciones estándar respectivas. Las funciones de regresión lineal se obtuvieron utilizando Microsoft Excel 2016. Los resultados obtenidos por FIA-ESI-QTOFMS y mediante GC-FID se compararon estadísticamente usando la prueba t no pareada (Statistica para Windows, Statsoft Inc.) con un nivel de significación p <0,05.

4.1.4 Resultados y discusión

Procedimiento FIA-ESI-QTOF

Primeramente, se probó la viabilidad de la ionización de los distintos FAMES por electro-nebulización (ESI). Al introducir una solución estándar a la fuente de ionización que era operada en modo negativo, se observó que las abundancias para los distintos iones fueron en general bajas y no todos los compuestos de interés pudieron ser detectados. Por otro lado, el espectro de masas adquirido en el modo positivo (ESI (+)) mostraba iones de los FAMES protonados [M+H]⁺ y aductos con sodio [M+Na]⁺, prácticamente sin observar iones de fragmentación, por lo que se decidió trabajar en modo ESI positivo. Al analizar los espectros, es de importante enfatizar que una mejor ionización para los FAMES insaturados presentan una mejor ionización en comparación con los FAMES saturados, de acuerdo con las diferencias en cuanto a su polaridad. Para los FAMES insaturados (con valores logP en el rango 6.16-8.16), la eficacia de ionización mejoraba en comparación a los FAMES de ácidos grasos saturados de menor polaridad (logP en el rango 7.62-10.8). En la [Tabla 4](#) se resumen las distintas estructuras y valores logP de los

FAMEs de interés en este trabajo, observándose que la cuantificación de FAMES de ácidos grasos insaturados podría ser viable por ESI(+)-QTOFMS. De acuerdo con informes previos [97, 99, 103] y con base en la determinación de FAMEs en aceites de ricino cosméticos llevada a cabo en este trabajo mediante GC-FID, en el desarrollo del método se consideraron los siguientes ácidos grasos: ricinoleico, oleico, linoleico, linolénico, behénico, araquídico, esteárico y palmítico.

Otro aspecto importante en un enfoque cuantitativo es la formación de múltiples iones de un solo compuesto ($[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$) lo que inevitablemente deteriora la sensibilidad. En este sentido, con la adición de formiato de sodio a las soluciones de calibración y a las muestras, se favoreció la prevalencia de iones $[M+Na]^+$. Inicialmente, el formiato de sodio se consideró como calibrador de masas, pero en experimentos realizados se notaron algunos beneficios adicionales que se resumen a continuación:

- Formación preferente de iones $[M+Na]^+$ ([Figura 16](#));
- Calibración de masas: los iones de formiato de sodio forman una serie de iones agrupados de composición conocida, los cuales son ampliamente utilizados como calibradores en MS con modo positivo de ionización;
- Función del estándar interno (IS) en la cuantificación de FAMEs (normalización de las señales analíticas por la abundancia del ion $[Na(NaCOOH)_3]^+$ con m/z 226.9515).

Los valores de m/z seleccionados para la adquisición de las señales analíticas de los FAMEs individuales y para el IS se detallaron en la sección reactivos y muestras; la selectividad fue asegurada mediante el uso de la espectrometría de masas de alta resolución y la aplicación de un ancho de $m/z \pm 0.005$ durante la adquisición de la señal.

En la preparación del sistema FIA, la atención se centró en la forma adecuada del pico, manteniendo lo más baja posible la dispersión del segmento de la muestra y asegurando un número suficiente de puntos a lo largo del pico para una integración adecuada de las señales en los fiagramas [16, 41]. Para ello, se consideraron los siguientes parámetros: (i) volumen de “loop” de inyección de muestra, (ii) composición de la solución portadora, (iii) velocidad de flujo, (iv) frecuencia de muestreo. De acuerdo con las recomendaciones anteriores [56], se utilizó un tubo capilar PEEK con diámetro interno de 0.005” para conectar la válvula de inyección

Rheodyne con el ESI. El “loop” de muestra se hizo a partir del mismo tipo de tubo, PEEK; el volumen de 2 μL fue suficiente para la adquisición del espectro de masas y para la integración de la señal, y proporcionó la sensibilidad adecuada para nuestro propósito. La composición del portador tenía que presentar una viscosidad relativamente baja, para ser compatible con la fuente ESI, permitir la solubilización de los FAMES y del formiato de sodio, y asegurar un lavado eficiente del sistema entre inyecciones sucesivas. Se examinaron una serie de mezclas de los siguientes disolventes: acetonitrilo, agua e isopropanol, los cuales se han utilizado previamente como fases móviles en el análisis de FAMES por cromatografía líquida [110, 111]. Con la finalidad de encontrar la composición adecuada de estos disolventes se probaron diferentes relaciones de volumen, bajo los criterios de alta intensidad de señal y el menor tiempo posible del regreso a la línea base (medido desde el máximo de pico hasta llegar a la línea base). Con base en una serie de experimentos, se seleccionó la composición 20:50:30 de agua: isopropanol: acetonitrilo. Finalmente, el flujo se ajustó a $80 \mu\text{L min}^{-1}$ dando anchuras de picos a media altura en el intervalo de 0.5 – 1 min. Con una frecuencia de adquisición de 0.5 Hz, las señales observadas en los fiagramas se integraron utilizando de 15-30 puntos, pudiendo inyectar las muestras a intervalos de 2 minutos.

Tabla 4 Estructuras y valores LogP de los distintos FAMEs empleados.

<p>a) Ricinolato de metilo, *C₁₉H₃₆O₃, **C18:1,OH</p>		<p>LogP: 6.16 ± 0.23</p>
<p>b) Miristato de metilo, *C₁₅H₃₀O₂, **C14:0,OH</p>		<p>LogP: 6.55 ± 0.21</p>
<p>c) Linolenato de metilo, *C₁₉H₃₂O₂, **C18:3,cis-9,12,15</p>		<p>LogP: 7.12 ± 0.23</p>
<p>d) Palmitato de metilo, *C₁₇H₃₄O₂, **C16:0</p>		<p>LogP: 7.62 ± 0.21</p>
<p>e) Linoleato de metilo, *C₁₉H₃₄O₂, **C18:2, cis-9,12</p>		<p>LogP: 7.64 ± 0.22</p>
<p>f) Oleato de metilo, *C₁₉H₃₆O₂, **C18:1, cis-9</p>		<p>LogP: 8.16 ± 0.22</p>
<p>g) Estearato de metilo, *C₁₉H₃₈O₂, **C18:0</p>		<p>LogP: 8.68 ± 0.21</p>
<p>h) Araquidato de metilo, *C₂₁H₄₂O₂, **C20:0</p>		<p>LogP: 9.74 ± 0.21</p>
<p>i) Docosanoato de metilo, *C₂₃H₄₆O₂, **C22:0</p>		<p>LogP: 10.80 ± 0.21</p>

*Formula, ** abreviatura

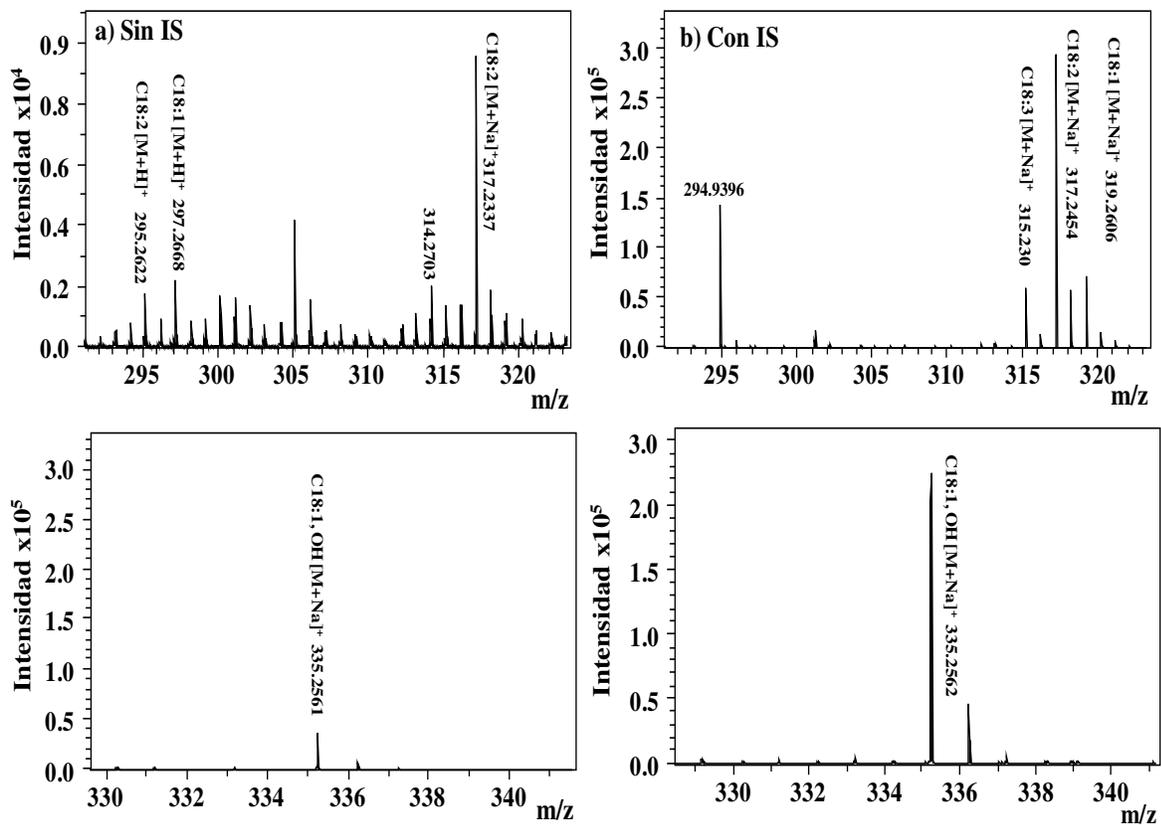


Figura 16 Espectros de masas obtenidos para una solución estándar de FAMES; a) sin adición de estándar interno, b) con la adición de formiato de sodio como estándar interno, donde se muestra la formación preferente de aductos sodiados en presencia del IS.

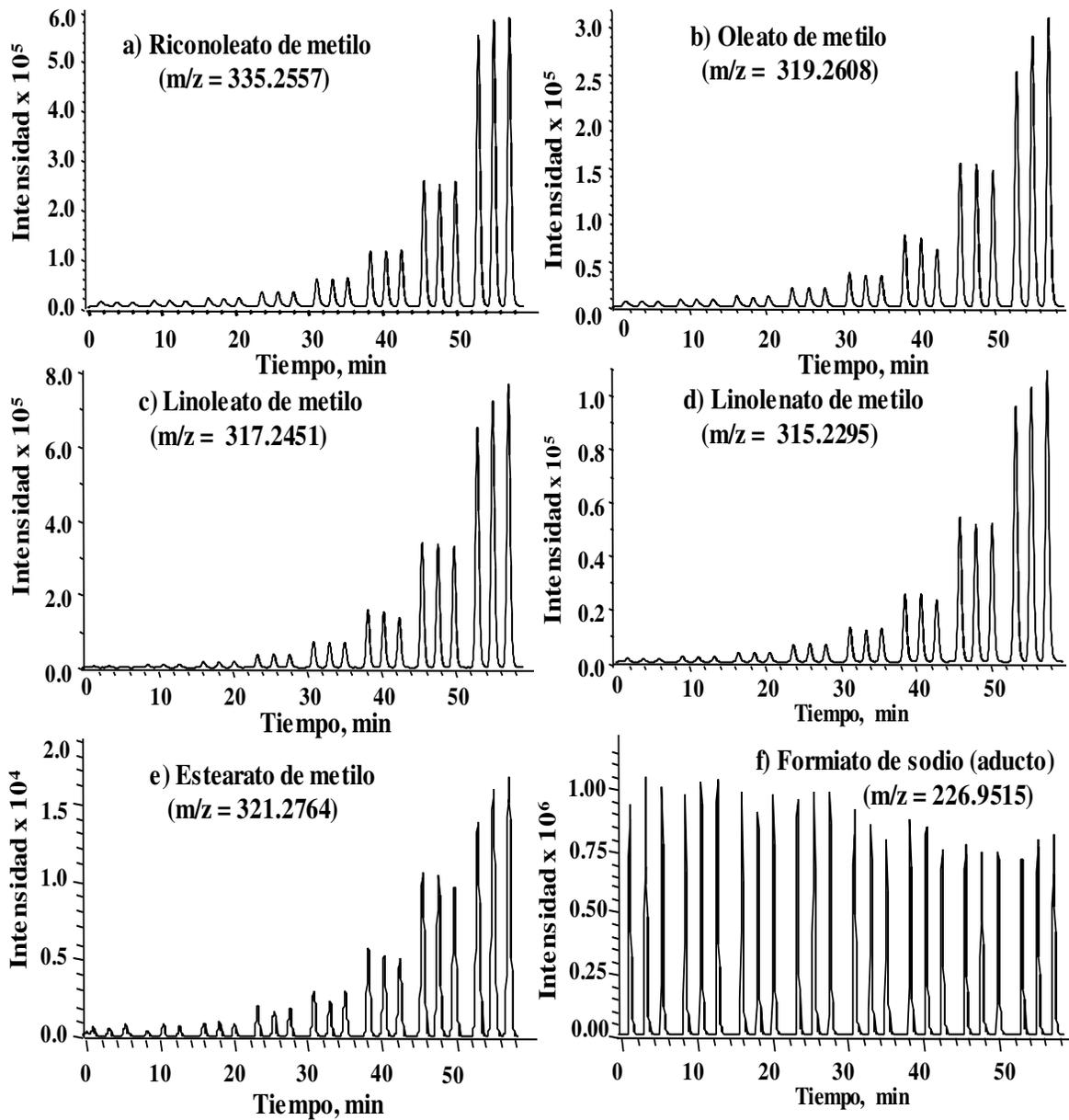


Figura 17 Típicos diagramas obtenidos para las primeras ocho soluciones de calibración inyectadas en tres réplicas sucesivas. Se extrajeron los iones de FAMES individuales con anchura de m/z 0.005 y se aplicó suavizado gaussiano de 2 puntos. Las soluciones inyectadas contenían los siguientes rangos de concentración: (a) 18.4 – 2357 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ricinoleato de metilo; (b) 16.3 – 2083 $\mu\text{g L}^{-1}$ de oleato de metilo; (c) 16.7 – 2143 $\mu\text{g L}^{-1}$ linoleato de metilo; (d) 2.33 – 298 $\mu\text{g L}^{-1}$ de linolenato de metilo L^{-1} ; (e) 2,79 – 357 μg de estearato de metilo; (f) estándar interno (75.13 mg L^{-1}).

En la [Figura 17](#), se muestran los fiagramas obtenidos utilizando condiciones FIA establecidas, para las inyecciones por triplicado de las primeras ocho soluciones de calibración. En cada una de las gráficas se presentan las señales extraídas para los iones individuales $[M+Na]^+$ para los FAMEs insaturados, así como para el estearato de metilo y los iones del IS. Como se describe en la sección, la mezcla estándar de FAMEs se diluyó en serie y todas las soluciones de analizaron mediante FIA-ESI-QTOFMS; sin embargo, el intervalo de calibración se seleccionó individualmente para cada compuesto, debido a las diferencias en eficacia de ionización. En la [Figura 17 a-e](#) se observa claramente el aumento de las señales con la creciente concentración del estándar; sin embargo, se debe tener en cuenta la alteración de la eficacia de ionización causada por la modificación de la composición química de las soluciones o las muestras de calibración, este es un problema conocido, que se produce en el enfoque cuantitativo ESI-MS y puede contrarrestarse por la normalización de la señal a la del estándar interno (IS). En el análisis de FAMEs por cromatografía de gases, el estándar interno típicamente utilizado es el éster metílico del ácido tridecanoico; debido a su carácter apolar y baja eficacia de ionización, este compuesto no pudo ser empleado en FIA-ESI-QTOFMS. Como ya se mencionó antes, se optó por utilizar el ion m/z 226.9515 correspondiente a un clúster de formiato de sodio como IS. La concentración del IS se estableció en 1.16 mmol L^{-1} produciendo una intensidad de señal ligeramente más alta que el punto de calibración más alto obtenido para los FAMEs individuales. Las señales correspondientes al IS en las soluciones de calibración se registran en la [Figura 17 f](#); como era de esperarse, para las soluciones de calibración más concentradas se obtuvieron intensidades del IS más bajas, con lo que se confirma la supresión de ionización para concentraciones elevadas y la necesidad de normalizar las señales por IS. Por otro lado, se puede observar una buena repetibilidad de señales para todas las señales obtenidas por triplicado en inyecciones sucesivas ([Figura 17](#)). Tomándose en cuenta los FAMEs insaturados, las desviaciones estándar relativas para las áreas de los picos fueron levemente peores (4-6%) en comparación a la altura de pico (2-4%), por lo tanto, se utilizó como señal analítica la altura de pico. Al normalizar la señal de los FAMEs a la del IS, la precisión se mejoró significativamente (RSD para mediciones de altura de picos FAME/IS insaturados: 0.9-1.2%).

Tabla 5 Parámetros analíticos evaluados para FAMES de ácidos insaturados usando el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS.

Parámetro	Ricinoleato de metilo C18:1, OH	Linolenato de metilo C18:3	Linoleato de metilo C18:2	Oleato de metilo C18:1
Rango de calibración, $\mu\text{g L}^{-1}$	36.8 - 4714	9.30 – 1192	33.5 – 4286	32.6 - 4167
Pendiente (s)	3.37	3.19	3.42	1.36
Error típico para s	2.24E-5	2.16E-5	2.13E-5	5.08E-5
Intercepto (b)	6.17E-5	4.97E-5	1.02E-4	7.21E-5
Error típico para b	0.049	0.073	0.042	0.051
R ²	0.9965	0.9947	0.9992	0.9991
DL, $\mu\text{g L}^{-1}$	3.72	3.89	3.61	8.62
CL, $\mu\text{g L}^{-1}$	15.1	13.0	12.1	29.3
CV*, %	0.9	1.1	0.9	1.2

DL-límite de detección, CL- límite de cuantificación, *- coeficiente de variación para el segundo punto de calibración

Tabla 6 Parámetros analíticos evaluados para FAMES de ácidos saturados usando el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS.

Parámetro	Behenato de metilo C22:0	Araquidato de metilo C20:0	Estearato de metilo C18:0	Palmitato de metilo C16:0
Rango de calibración, $\mu\text{g L}^{-1}$	59.5 – 1905	59.5 – 1905	89.3 – 1429	297 – 2381
Pendiente (s)	0.536	0.432	0.564	0.316
Error típico para (s)	1.14E-6	3.63E-6	3.70E-7	7.1E-7
Intercepto (b)	4.50E-6	7.75E-6	4.83E-6	1.83E-5
Error típico para (b)	0.011	0.026	0.011	0.005
R ²	0.9991	0.9925	0.9992	0.9984
DL, $\mu\text{g L}^{-1}$	8.51	14.1	20.2	82.4
CL, $\mu\text{g L}^{-1}$	29.4	47.1	67.3	275
CV*, %	2.5	3.2	3.9	4.6

DL- límite de detección, CL - límite de cuantificación, *- coeficiente de variación para el segundo punto de calibración

En la [Tabla 5](#) y en la [Tabla 6](#), se presenta un resumen de los intervalos de calibración y los típicos parámetros analíticos evaluados para los FAMES individuales insaturados y saturados, respectivamente. De igual manera se presentan las pendientes e intercepto de las funciones de

regresión lineal con los errores estándar relativos. Los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (CL) se evaluaron con base en la relación señal/ruido (ruido obtenido como desviación estándar para diez mediciones en blancos sucesivos); se adoptó el criterio de tres y diez desviaciones estándar, utilizando la señal normalizada por IS adquirida para el estándar de calibración más bajo para cada FAME. En consistencia con una mejor eficacia de ionización de los compuestos polares, la sensibilidad y el poder de detección fueron mejores para las FAMEs insaturadas en comparación con los FAMEs saturados. Específicamente, los límites de detección para la calibración de los FAMEs de ácidos grasos insaturados estaban en el rango de 3.61-8.62 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que para los compuestos saturados fue de 8.51-116 $\mu\text{g L}^{-1}$. La repetibilidad medida como coeficiente de variación para cinco inyecciones del segundo punto de calibración también era mejor para los FAMEs insaturados (0.9-1.2%) en comparación con los FAMEs saturados (2.5-5.7%). Las características anteriores indican la capacidad del procedimiento FIA-ESI-QTOFMS para la determinación de ocho FAMEs esperados en los aceites de ricino.

Análisis de aceites comerciales, comparando los resultados ESI-QTOFMS y GC-FID

Para los fines comparativos, se escogió el método GC-FID el cual es un método bien establecido para la determinación de FAMEs. A diferencia del método ESI-QTOFMS, el poder de detección de FID no depende de la polaridad del analito, pero generalmente es peor respecto a MS. Un punto a destacar es que las concentraciones utilizadas en ESI-Q-TOF-MS para la calibración fueron aproximadamente tres órdenes de magnitud menores comparadas con el procedimiento propuesto mediante el método GC-FID. Se analizaron nueve productos comerciales de aceite de ricino mediante ambos métodos. A manera de ejemplo, en la [Tabla 7](#), se presentan los resultados obtenidos para las muestras 1 y 8, donde se observa una buena concordancia entre valores obtenidos por el procedimiento propuesto y por GC-FID.

Tabla 7 Resultados del análisis de FAMES en las muestras 1 y 8, obtenidos mediante el procedimiento FIA-ESI-QTOFMS y GC-FID.

Se presentan valores medios y desviaciones estándar respectivos basados en tres repeticiones independientes; nd: no detectado; * y ** - indican la diferencia estadística encontrada entre los resultados de los dos procedimientos para la muestra 1 y 8, respectivamente (prueba t-test no pareada, $p < 0.05$).

FAME	Muestra 1 (promedio \pm SD, mg g ⁻¹)		Muestra 8 (promedio \pm SD, m g ⁻¹)	
	FIA-ESI-QTOFMS	GC-FID	FIA-ESI-QTOFMS	GC-FID
Ricinoleato de metilo (C18:1, OH)	764 \pm 19	787 \pm 24	6.71 \pm 0.70	nd
Linolenato de metilo (C18:3)**	5.42 \pm 0.32	5.59 \pm 1.21	85.4 \pm 2.6	68.9 \pm 1.9
Linoleato de metilo (C18:2)	44.1 \pm 2.9	43.9 \pm 0.9	572 \pm 11	579 \pm 9
Oleato de metilo (C18:1)	38.1 \pm 1.6	37.5 \pm 0.5	266 \pm 9	254 \pm 7
Behenato de metilo (C22:0)	6.61 \pm 0.40	nd	9.32 \pm 1.12	nd
Araquidato de metilo (C20:0)	6.62 \pm 0.59	nd	4.32 \pm 1.12	nd
Estearato de metilo (C18:0)	16.4 \pm 2.4	15.6 \pm 0.6	60.1 \pm 2.4	58.9 \pm 2.1
Palmitato de metilo (C16:0) *	45.3 \pm 2.1	30.8 \pm 1.1	21.5 \pm 1.6	23.1 \pm 3.2
R _{ins} , %	91.9	95.0	90.7	91.7
R, %	92.7	92.0	103	98.4

R_{ins}, % - contenido relativo de FAMES insaturados con respecto a FAMES totales encontrados en la muestra; R, % - porcentaje de recuperación del procedimiento medido como la suma de FAMES con respecto a la masa de la muestra.

Las diferencias estadísticamente significativas entre dos métodos solamente se detectaron para el linolenato de metilo de la muestra 8 y para el palmitato de metilo en la muestra 1 (ensayo t no pareado, $p < 0.05$). Para otras muestras, no reportadas en la [Tabla 7](#), se detectaron diferencias estadísticas para no más de dos compuestos por muestra y estos correspondían a los FAMES saturados de baja abundancia. La [Tabla 7](#), también muestra que bajas concentraciones de los ésteres metílicos del ácido behénico y araquídico pudieron ser cuantificadas mediante FIA-ESI-QTOFMS, pero no fueron detectados mediante GC-FID cuyo poder de detección es inferior en comparación con el procedimiento propuesto. Los porcentajes relativos de FAMES insaturados

(R_{ins} , %) calculados como la suma de los cuatro FAMES insaturados con respecto a la suma de todos los FAMES determinados en las muestras, también fueron consistentes entre los dos procedimientos.

Finalmente, para las nueve muestras analizadas, las recuperaciones de los ésteres metílicos de ácidos grasos calculados como la suma de FAMES con respecto a la masa de la muestra se encontraron en el rango de 91.7-108% para el procedimiento propuesto y 90.07-104% para el método GC-FID. La concordancia entre los resultados que se muestra en la [Tabla 7](#), donde también se observada para otros aceites cosméticos, es indicativa de una exactitud aceptable del procedimiento propuesto.

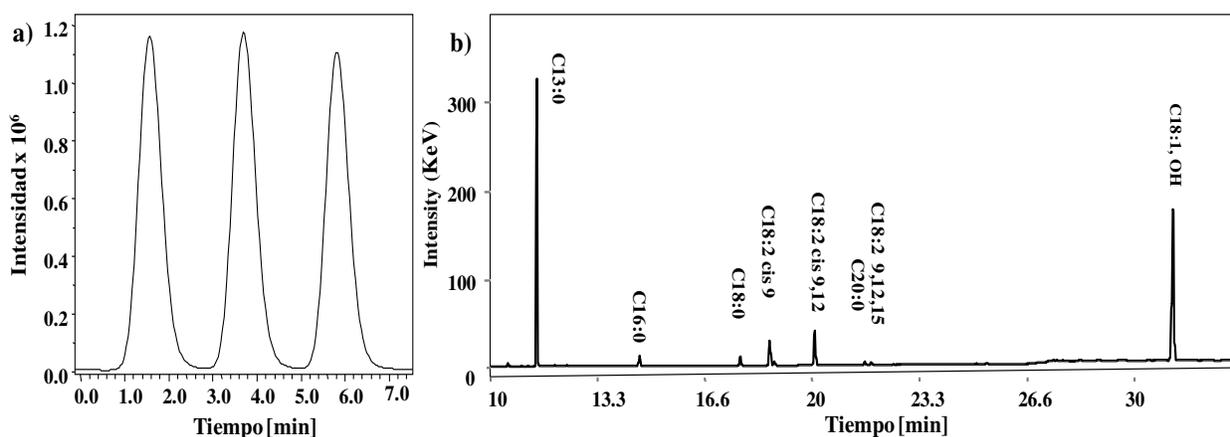


Figura 18 Típicos registros de una corrida analítica realizada por FIA-ESI-QTOFMS (a) y por GC-FID (b) para la muestra 4

La [Figura 18](#) muestra un fiagrama obtenido por el procedimiento propuesto y un cromatograma obtenido por GC-FID para la misma muestra real. Se observa claramente que el método propuesto es mucho más rápido; específicamente, los datos para compuestos individuales en una muestra se obtienen durante 35 min por GC-FID, mientras que por ESI-QTOF-MS en dos minutos.

Contenido de FAMES encontrados en productos comerciales

El fiagrama obtenido para las nueve muestras comerciales de aceite de ricino (tres réplicas) se muestran en la [Figura 19](#); cada grafica corresponde a las señales del ion $[M+Na]^+$ extraído para cada FAMES insaturado, para el estearato de metilo y el ion m/z 226.9515 como IS.

Cabe resaltar que todas las gráficas corresponden a la misma corrida analítica (un solo diagrama) y fueron obtenidas extrayendo los iones de compuestos individuales. De esta manera toda la información de nueve muestras con tres réplicas de cada una se registró durante aprox. 70 minutos. En una inspección rápida, se nota que el ricinoleato de metilo era el principal FAME solo en cinco productos comerciales, aunque las muestras 1-8 se describieron por el fabricante como 100% aceite de ricino. La distribución relativa de FAMEs determinada para nueve productos comerciales se presentan en la [Figura 20](#), para las muestras 1-5, el ricinoleato de metilo, representó 82.4-89.5% del total de FAMEs, mientras que para las muestras 6-9, el porcentaje de este FAME fue mucho más bajo (desde no detectado a 50.9%). La muestra 9, descrita como una mezcla de aceites vegetales y aceite de ricino, contenía 18.9% de ricinoleato de metilo con respecto al total de FAMEs.

En cuanto a la contribución relativa de FAMEs insaturados, las muestras 1-9 contenían respectivamente; 94.0%, 90.7%, 93.2%, 91.9%, 93.3%, 93.9%, 97.2%, 90.7% y 90.8%. Aunque los porcentajes elevados de ácidos grasos insaturados confirman los beneficios para la piel de los nueve aceites cosméticos analizados, su bajo contenido de ácido ricinoleico en algunos productos sugiere el problema de adulteración en los aceites de ricino comercializados en México.

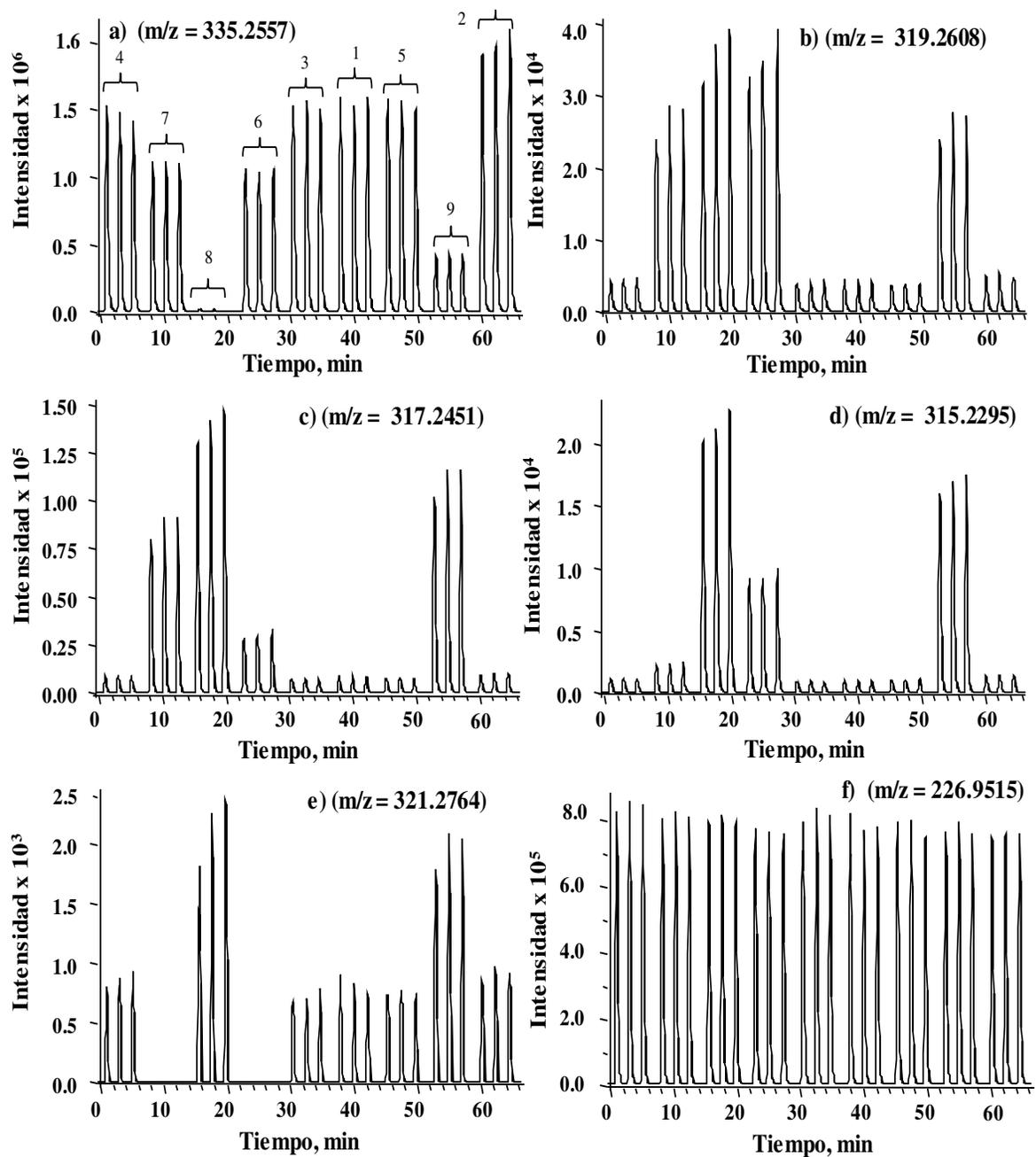


Figura 19 Típico diagrama obtenido para nueve aceites cosméticos comerciales, cada grafica corresponde al ion extraído para un FAME individual (cada muestra inyectada por triplicado).

Se extrajeron los iones individuales de FAME con m/z de ancho 0,005 y se aplicó suavizado gaussiano de 2 puntos.

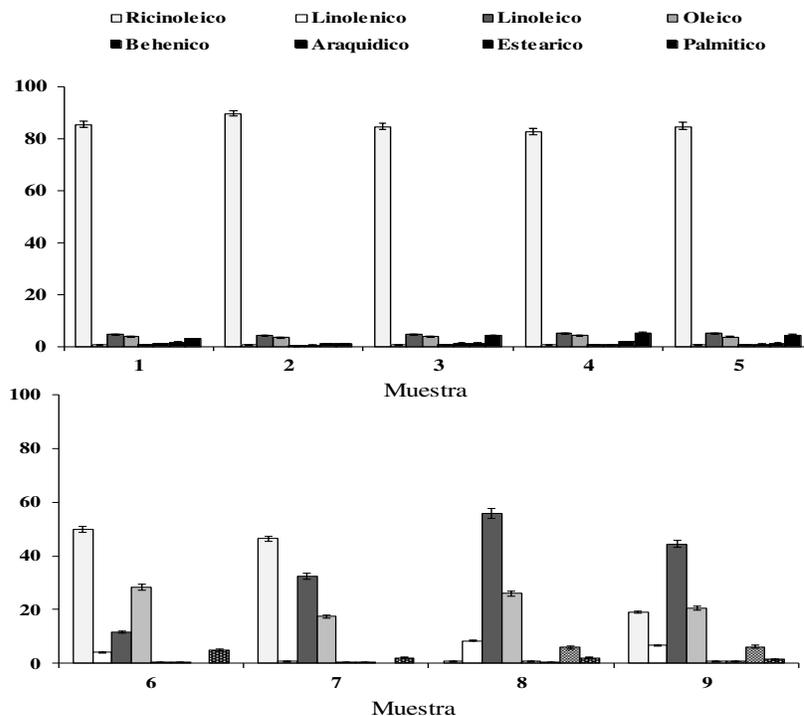


Figura 20 Distribución relativa de ácidos grasos analizados en nueve aceites cosméticos comerciales.

4.1.5 Conclusión

En esta parte del trabajo se continuó y se concluyó el proyecto iniciado en tesis de maestría. Específicamente, se montó un sistema de análisis por inyección al flujo para la determinación de FAMES en aceites de ricino cosméticos por espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electronebulización. En la puesta a punto del procedimiento FIA, se tomaron en cuenta el volumen de “loop” de inyección de muestra, la composición de la solución portadora, la velocidad de flujo y la frecuencia de muestreo, teniendo como objetivo lograr una forma adecuada de picos en el fiagrama, con baja dispersión, rápido regreso a línea base y sin efectos de memoria. En cuanto a las condiciones ESI-QTOFMS, se optó por la ionización en modo positivo, seleccionando los iones para cuantificación de cada uno de los FAMES y utilizando formiato de sodio como calibrador de masa y como IS. En relación con uso de formiato de sodio, hay que destacar sus tres roles importantes:

- i. La formación de una serie de clústeres de iones usados como calibradores de masa.

- ii. El ion $[\text{Na}(\text{NaCOOH})_3]^+$ (m/z 226.9515) empleado como estándar interno durante la cuantificación.
- iii. Fomenta la formación de aductos de sodio durante la ionización de FAMEs.

El procedimiento provee límites de calibración en un rango de $3.61 - 8.62 \mu\text{g L}^{-1}$ para FAMEs insaturados y para compuestos saturados en el rango $8.51 - 82.4 \mu\text{g L}^{-1}$. Con intervalos de tiempo de 2 minutos entre inyecciones, pudieron realizarse hasta 10 muestras por hora (tres replicas por muestra) con una excelente repetibilidad y produciendo resultados cuantitativos consistentes con los obtenidos mediante GC-FID. Cabe destacar que la frecuencia de inyección de muestra en GC-FID era de aprox. 30 min. En el análisis de aceites cosméticos comercializados en México, se detectó un problema de adulteración, lo que demuestra la necesidad de incluir la determinación de FAMEs en los esquemas de control de calidad de estos productos. Bajo este contexto, el procedimiento propuesto FIA-ESI-QTOFMS toma relevancia debido a su simplicidad, microescala, rapidez, alto poder de detección y alto rendimiento.

4.2 Determinación de picolinato de cromo en suplementos alimenticios por FIA-ESI-ITMS/MS

4.2.1 Introducción

El cromo trivalente (Cr(III)) es un micronutriente esencial, importante en el metabolismo de carbohidratos, lípidos, y proteínas, así como en la regulación de la insulina [112, 113]. El Cr(III) generalmente suele obtenerse de forma natural en cantidades de microgramos por el consumo de frutas, vegetales, carnes, cereales, y adicionalmente por suplementos alimenticios. De acuerdo con los valores recomendados por la Academia Nacional de Ciencias EUA, la dosis diaria segura y adecuada de cromo para los adultos es de 50 a 200 μg [114], mientras que la ingesta estimada en este país es de 50-60% del valor inferior del intervalo sugerido (25 - 30 $\mu\text{g}/\text{día}$) [115]. Por su parte, el panel de expertos de la Comunidad Europea estableció 300 $\mu\text{g}/\text{día}$ como la máxima dosis tolerable [116]. Aunque los reportes más recientes indican que la dieta equilibrada aporta suficiente ingesta de cromo [117], los suplementos dietéticos son de uso común en todo el mundo; estos productos son utilizados para mejorar el metabolismo de la glucosa y de lípidos, además de utilizarse también para adelgazar. Se ha reportado que distintos complejos orgánicos de cromo presentan una actividad mayor de absorción e incorporación al tejido que las sales inorgánicas, tales como el cloruro de cromo (III). El picolinato de cromo (III), ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{CrN}_3\text{O}_6$, CrPic_3) el cual consiste en tres moléculas de ácido picolínico con un ion de cromo trivalente (Cr(III)) en el centro ([Figura 21](#)), es un complejo estable, sin carga iónica y relativamente lipofílico, lo cual facilita su permeabilidad por las membranas biológicas y favorece su efecto benéfico mediante activación de la insulina. Debido a ésto el picolinato de cromo (III) ha sido ampliamente utilizado como suplemento alimenticio [118, 119]. No obstante, existen serias dudas sobre la eficiencia y seguridad de tomar suplementos de picolinato de cromo. Estudios recientes no encontraron ningún efecto beneficioso en la ingesta de picolinato de cromo incluso en combinación con un régimen de ejercicio, además, se sugiere que su ingesta a largo plazo induce daño oxidativo del ADN [119-121]. En este sentido, es necesario contar con procedimientos analíticos rápidos y sensibles que permitan la determinación de CrPic_3 en suplementos alimenticios. Para tal fin, se han reportado distintos procedimientos analíticos, principalmente basados en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con diferentes tipos de detectores [122-125], electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (CE-ICP-MS) [126], espectrometría de masas con ionización

por electronebulización y separador de masas de triple cuadrupolo (ESI-QQQ-MS) [123]. Por otro lado, estas técnicas a menudo consumen mucho tiempo, especialmente en el análisis de grandes series de muestras típicamente requeridas en el control de calidad de productos comerciales. En el contexto de este trabajo, es pertinente mencionar un estudio, donde se desarrolló un método por cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), utilizando ESI como fuente de ionización en modo positivo y la cuantificación se llevó a cabo mediante monitoreo de reacciones múltiples (MRM) [23, 124]. Dicho procedimiento requiere un extenso pretratamiento de muestra y presenta un tiempo de análisis alto, inherente a una separación cromatográfica. En el presente trabajo, se desarrolló un procedimiento de análisis por inyección al flujo para la introducción de muestra a la fuente de ionización ESI de un espectrómetro de masas de trampa iónica (FIA-ESI-ITMS) para la determinación de CrPic_3 en suplementos alimenticios por MRM utilizando picolinato de cobalto (CoPic_2) como estándar interno.

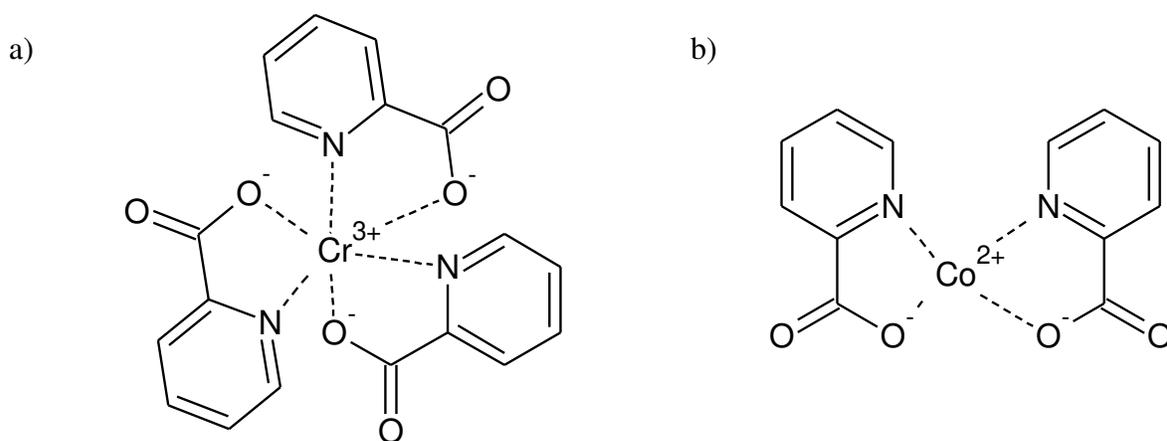


Figura 21 Estructura de; a) picolinato de cromo (III), b) picolinato de cobalto (II).

4.2.2 Objetivos particulares

- Montar un sistema FIA-ESI-ITMS/MS.
- Sintetizar picolinato de cromo y picolinato de cobalto como estándar interno.
- Poner a punto el procedimiento FIA-ESI-ITMS/MS para la determinación de picolinato de cromo en suplementos alimenticios.

- Determinar picolinato de cromo en suplementos alimenticios por el procedimiento propuesto.
- Realizar la validación del procedimiento, comparando los resultados con los obtenidos por ICP-MS.

4.2.3 Materiales y métodos

Reactivos y muestras

Todos los reactivos fueron grado reactivo (Sigma-Aldrich). Metanol, Acetonitrilo (Fisher Scientific) y agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) fueron utilizados ampliamente.

El CrPi₃ fue sintetizado de acuerdo con la patente US005677461A, donde el CrCl₃•6H₂O y el ácido picolínico en una relación molar 1:3 fueron disueltos en 30 mL de agua. El pH de la mezcla de reacción fue ajustado a 3.8, posteriormente la mezcla de reacción fue calentada a 80°C durante 30 minutos para completar la precipitación del producto formado. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y fue filtrada al vacío. El precipitado fue lavado y secado, obteniendo el picolinato de cromo.

Para la síntesis de CoPi₂, una solución acuosa de Co(NO₂)₂•6H₂O se añadió lentamente con agitación a una solución acuosa de ácido picolínico en una relación molar 1:2, la solución resultante se llevó a 80 °C por 6 h, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó a 4°C durante 24 h, el CoPi₂ resultante fue filtrado al vacío y lavado con agua para su posterior secado [127].

Cuatro muestras de suplementos alimenticios fueron comprados en el mercado local, los cuales en su etiquetado mostraban contener picolinato de cromo.

Pretratamiento de muestras

Se pesaron 50 mg de cada muestra previamente homogenizada en un mortero, a las cuales se añadieron 1 000 µL de acetonitrilo, se agitaron en vórtex por 5 minutos, posteriormente se dejaron en sonicación a 30 °C por 1 h para garantizar la extracción del picolinato de cromo [128]. Las mezclas se centrifugaron a 13 000g por 10 min; 400 µL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo Eppendorf para realizar la evaporación del acetonitrilo. El residuo fue reconstituido agregando 400 µL de solución portadora (formiato de amonio 10 mM, metanol-agua 1:1 v/v).

Finalmente, 50 μL de esta solución se transfirieron a un tubo Eppendorf que contenía 100 μL de IS de picolinato de cobalto 10 mg L^{-1} , 850 μL de solución de formiato de amonio 10 mM fueron añadidos para completar un volumen final de 1 mL. Las soluciones se centrifugaron a 13,000g por 10 min para su análisis mediante FIA-ESI-ITMS/MS. (para la muestra GNC se utilizó una dilución 1:500).

Para la determinación de Cr por medio de ICP-MS, se tomaron 50 mg de muestra homogeneizada y se añadieron 300 μL de ISTD Mix (2 mg L^{-1} de In, Y, Bi, Rh; 5 mg L^{-1} de Sc; 10 mg L^{-1} de Li); posteriormente se agregaron 1.5 mL de HNO_3 concentrado y la mezcla se dejó en digestión ácida a 110 $^{\circ}\text{C}$ por 20 h. Las muestras fueron centrifugadas (13 000 g, 10 min), y finalmente alícuotas de 150 μL fueron transferidos a un tubo y se completó el volumen a 5 mL con agua desionizada. Finalmente, las muestras fueron introducidas al sistema ICP-MS.

Procedimiento para el análisis de inyección al flujo-espectrometría de masas trampa iónica (FIA-ESI-ITMS/MS)

El sistema FIA consistió en una válvula de inyección Rheodyne con un loop de inyección de 100 μL , conectada a la bomba del cromatógrafo (Ultimate 3000 RLSC, Thermo Scientific Dionex) y a la fuente ESI por tubos PEEK (9 cm, 1/16", 0.005" i.d., Agilent Life Science Part N° 5042-6461). El espectrómetro de masas fue un Amazon SL de trampa iónica (Bruker Daltonics). El sistema FIA-ESI-ITMS fue controlado por el programa Hystar V3.2, los datos fueron procesados por el programa Data Analysis V4.1vSP2 (Bruker Daltonics). El flujo de la solución portadora fue de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$, las muestras fueron inyectadas por triplicado en intervalos de tres minutos. La fuente ESI fue operada en modo positivo con los siguientes parámetros: voltaje de nebulización 4500 V; voltaje de plato 500 V; presión de gas nebulizador 20 psi; gas de secado 8.0 L min^{-1} ; temperatura de la fuente 250 $^{\circ}\text{C}$ y un voltaje de salida del capilar de 4 500 V. Los espectros de masa fueron obtenidos por medio del modo UltraScan en un rango de m/z 50 – 700, con un control de carga de ion (ICC) target setting 100 000, tiempo de acumulación máximo de 1 000 ms, 11 promedios por experimento y un media móvil de 5. Los Smart parameter settings (SPS) se usaron para una optimización automática, la estabilidad del compuesto se fijó en 100%. Como gas de colisión se utilizó helio; los espectros MS/MS de los iones precursores fueron obtenidos con los mismos parámetros ICC. Para la cuantificación mediante MRM, se aplicó una

ventana de aislamiento de 4 a 100 ms; las amplitudes de fragmentación se fijaron en 0.4 para el CrPic₃ y el IS de CoPic₂. De los datos de MRM adquiridos, se obtuvieron los diagramas del ion cuantificador del CrPic₃ (m/z , 270) y el ion cuantificador del IS (m/z , 260) aplicando una ventana de $m/z \pm 0.05$. Las señales fueron filtradas (dos puntos Gaussian) y la lista de picos se exportó a Excel, donde se obtuvieron las funciones de calibración y se llevó a cabo la cuantificación. La señal analítica fue definida con el área de pico de CrPic₃ normalizada con la del estándar interno.

Para la curva de calibración, se preparó una solución de picolinato de cromo 1 000 µgCr L⁻¹ en formiato de amonio 10 mM (metanol:agua 1:1), se prepararon cinco soluciones de calibración cubriendo el intervalo de concentraciones de 3.91 – 500 µg L⁻¹ de Cr en forma de CrPic₃ y que contenían 1 mg L⁻¹ de picolinato de cobalto (IS). Cada análisis se realizó por triplicado.

Análisis de Cr por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

El instrumento utilizado en el análisis ICP-MS fue un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce; Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y una cámara de nebulización Peltier (2 °C). Las condiciones de operación del instrumento fueron las siguientes: potencia de radiofrecuencia 1 500 W, velocidad de gas del plasma 15 L min⁻¹, velocidad de flujo del gas portador 0.89 L min⁻¹, velocidad del gas make-up 0.10 L min⁻¹, sampling depth 8 mm, cono de muestreo y cono skimmer de níquel, tiempo de permanencia 100 ms por isótopo, gas He en la celda de colisión/reacción, con flujo de 4.5 mL min⁻¹. Se realizó una calibración externa de cinco puntos a niveles de concentración de elementos de 0.2 - 20 µg Cr L⁻¹ con la adición del estándar interno (10 µgY L⁻¹). Se obtuvieron las funciones de regresión lineal ($r^2 > 0.999$) y el límite de detección instrumental evaluado para ⁵²Cr fue de 15 ng Cr L⁻¹.

Análisis estadístico

Todos los análisis fueron realizados por triplicado; se llevó a cabo la estadística descriptiva para obtener los valores promedios y sus respectivas desviaciones estándar. Las funciones de regresión lineal se obtuvieron usando Microsoft Excel 2016. Los resultados obtenidos mediante FIA-ESI-ITMS/MS e ICP-MS fueron estadísticamente comparados usando una prueba-*t* no pareada (Statistica for Windows. Statsoft Inc.) con un nivel de significancia $p < 0.05$.

4.2.4 Resultados y discusión

Análisis ESI-QTOF de CrPic₃ y CoPic₂ sintetizados

Para confirmar la identidad de picolinato de cromo y picolinato de cobalto sintetizados, se adquirieron sus espectros de masa de alta resolución; para esto se utilizó un espectrómetro de masas ESI-QTOFMS modelo maXis impact, equipado con Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Se prepararon soluciones individuales de cada compuesto (1000 µg L⁻¹) en metanol-agua (1:1, v/v) que contenía formiato de amonio 10 mM. Estas soluciones se introdujeron al espectrómetro por infusión directa, aplicando en la fuente de ionización un fijador de masas estándar (formiato de sodio, $m/z = 362.9260$). ESI se operó en modo positivo con un voltaje de nebulización de 4500V, end plate offset 500V, gas de secado 4 L min⁻¹, temperatura de secado 180 °C y una presión de gas nebulizador 0.4 bar; el rango de m/z fue de 200 a 1 000. Los espectros ESI para el picolinato de cromo y picolinato de cobalto se muestran en la [Figura 22](#). En ambos espectros se observa una señal de alta intensidad a $m/z = 419.0209$ y $m/z = 303.9887$ correspondientes a los iones $[M+H]^+$ del CrPic₃ y CoPic₂ respectivamente. La identidad fue confirmada con base en la medición de masa exacta (error de masa 1.2 ppm y 0.7 ppm, respectivamente), la concordancia del patrón isotópico experimental con el calculado *in silico* ([Figura 23](#)) y, además, los resultados fueron congruentes con los reportados en otros estudios [123, 124]. Una vez confirmada la identidad del picolinato de cromo y del picolinato de cobalto por el análisis ESI-QTOFMS, estos se utilizaron como estándares del analito y de IS, respectivamente.

Procedimiento FIA-ESI-ITMS/MS

La siguiente etapa del trabajo consistió en el montaje del sistema FIA-ESI-ITMS/MS. Al utilizar el modo ESI positivo, en el espectro de masas del picolinato de cromo se identificó una señal intensa debida al ion protonado ($[M+H]^+$), de acuerdo con los resultados ESI-QTOFMS y a los resultados reportados anteriormente [124]. A continuación, se procedió con la selección de la composición del líquido portador para ser utilizado en el sistema FIA. Con base en la experiencia anterior y a las propiedades de polaridad/solubilidad de los complejos de Cr(III) y Co(II) con ácido picolínico, se tomaron en cuenta las siguientes soluciones: formiato de amonio 10 mM en metanol :agua (1:1, v/v), acetonitrilo :agua (1:1, v/v), 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo :agua (1:1, v/v). Se evaluó el efecto de estos portadores líquidos sobre la eficacia de ionización de

CrPic₃ y de CoPic₂; para ello, se prepararon soluciones de cada uno de los compuestos en cada uno de los potenciales portadores y se introdujeron por infusión directa al sistema ESI-IT-MS. Los espectros de masas correspondientes al CrPic₃ se muestran en la [Figura 24](#), donde se observa que la mejor eficacia de ionización se obtuvo al utilizar formiato de amonio 10 mM. Así mismo, esta solución favoreció la formación de aductos protonados durante el proceso de ionización y proporcionó la relación señal ruido más alta, comparando con las otras dos composiciones examinadas. Similares resultados fueron obtenidos para CoPic₂ ([Figura 25](#)), por lo que se seleccionó como la solución portadora el formiato de amonio 10 mM en metanol:agua (1:1).

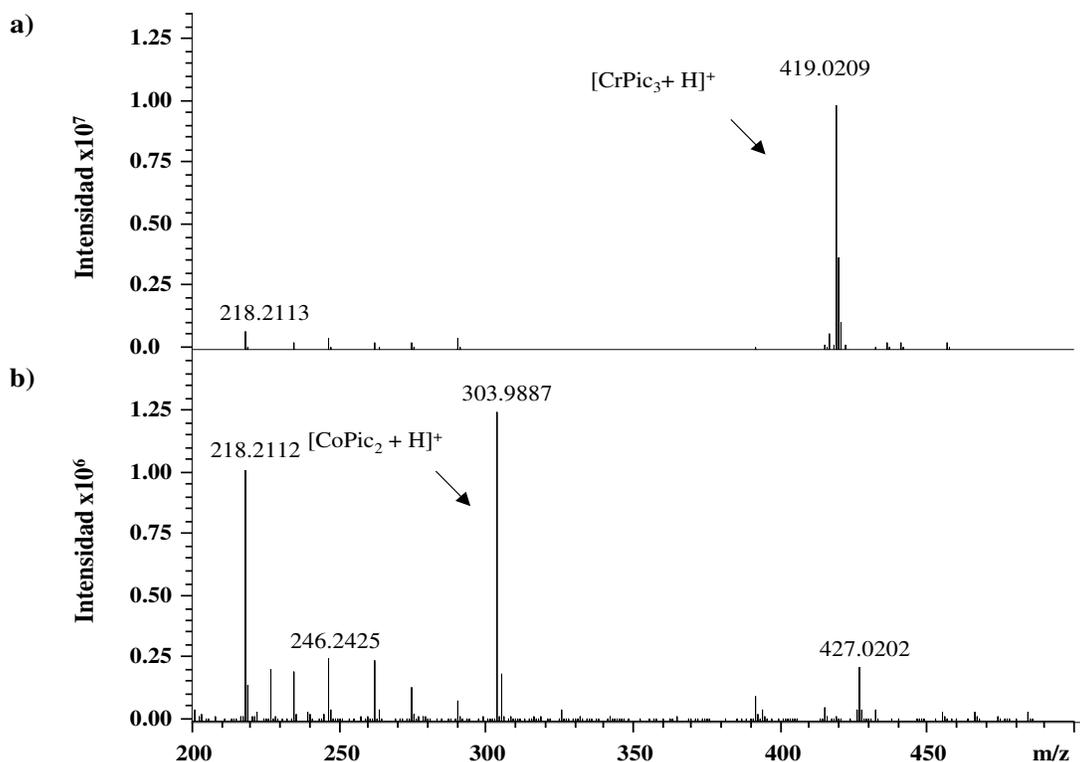


Figura 22 Espectro de masas ESI-QTOF-MS de a) picolinato de cromo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y b) picolinato de cobalto 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ en formiato de amonio 10 mM (metanol:agua 1:1).

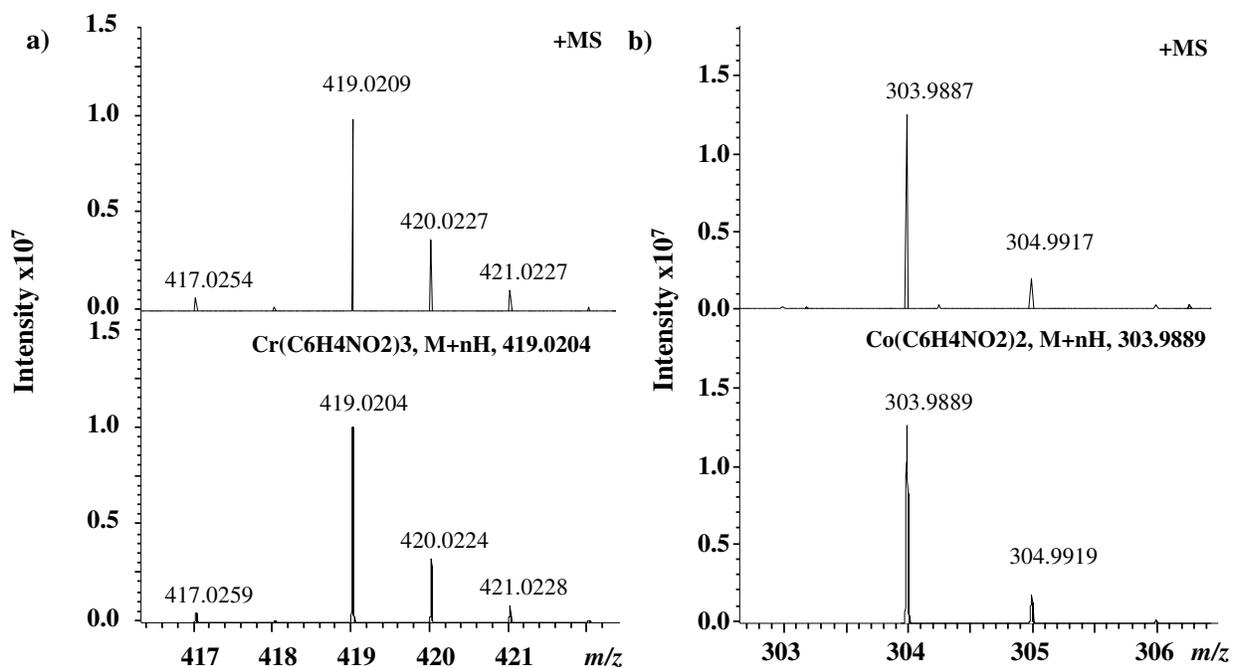


Figura 23 Patrón isotópico experimental y teórico de moléculas protonadas obtenidos por infusión directa de estándares individuales al sistema ESI-QTOFMS: a) picolinato de cromo, b) picolinato de cobalto.

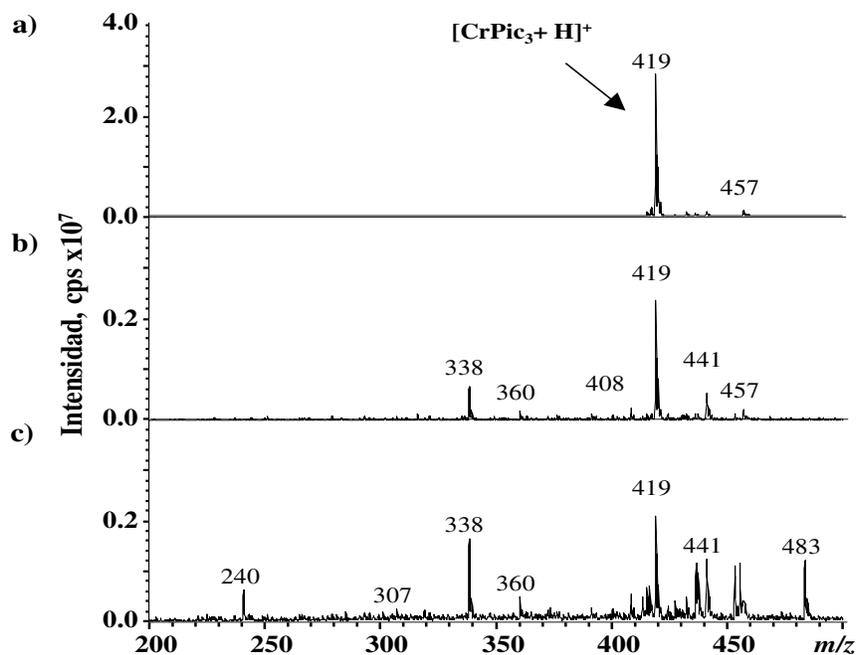


Figura 24 Espectros ESI-ITMS del picolinato de cromo ($1\ 000\ \mu\text{g}\ \text{L}^{-1}$) registrados para diferentes soluciones portadoras; a) formiato de amonio 10 mM en metanol:agua (1:1, v/v); b) acetonitrilo:agua (1:1, v/v); c) 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo:agua (1:1, v/v).

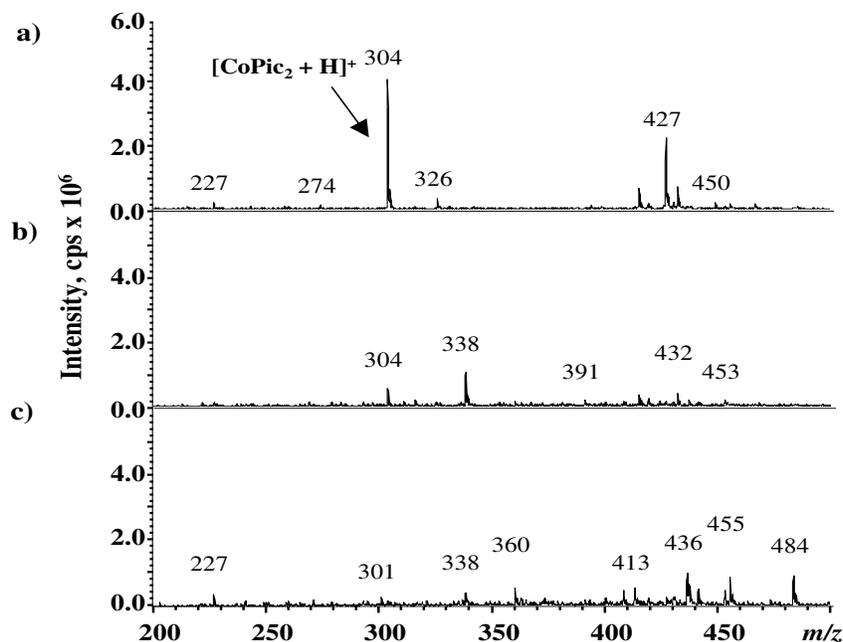


Figura 25 Espectros ESI-ITMS del picolinato de cobalto ($1\ 000\ \mu\text{g L}^{-1}$) registrados en diferentes soluciones portadoras; a) formiato de amonio 10 mM en metanol:agua (1:1, v/v); b) acetonitrilo:agua (1:1, v/v); c) 0.1 % ácido fórmico en acetonitrilo:agua (1:1, v/v).

En la búsqueda de las condiciones más adecuadas para realizar el monitoreo de reacciones múltiples, se escogieron los iones m/z 419 y 304 como precursores para CrPic_3 y CoPic_2 , respectivamente. Se obtuvieron espectros de fragmentación de ambos iones, observándose la formación de un ion intenso para picolinato de cromo (m/z 270) y de dos iones para picolinato de cobalto (m/z 260 y 216). Se estudió el efecto de amplitud de fragmentación, variando los valores en el intervalo 0.2 - 0.6 y registrando las intensidades de iones obtenidos en las transiciones m/z 419 \rightarrow 270 para el picolinato de cromo, y m/z 304 \rightarrow 260 y m/z 304 \rightarrow 216 para el caso del picolinato de cobalto. Con base en los resultados obtenidos ([Figura 26](#)), se fijó la amplitud de 0.4; hay que resaltar que en FIA, ambos compuestos son introducidos al mismo tiempo (sin separación) por lo que se define el mismo segmento de tiempo y la misma amplitud para fragmentación de los dos. Las condiciones finales de MRM se describieron en la sección [materiales y métodos](#); cabe señalar que los espectros en la [Figura 27](#), fueron obtenidos en estas condiciones finales. Para realizar la cuantificación mediante MRM, se seleccionaron transiciones 419 \rightarrow 270 y 304 \rightarrow 260 para CrPic_3 y CoPic_2 , respectivamente.

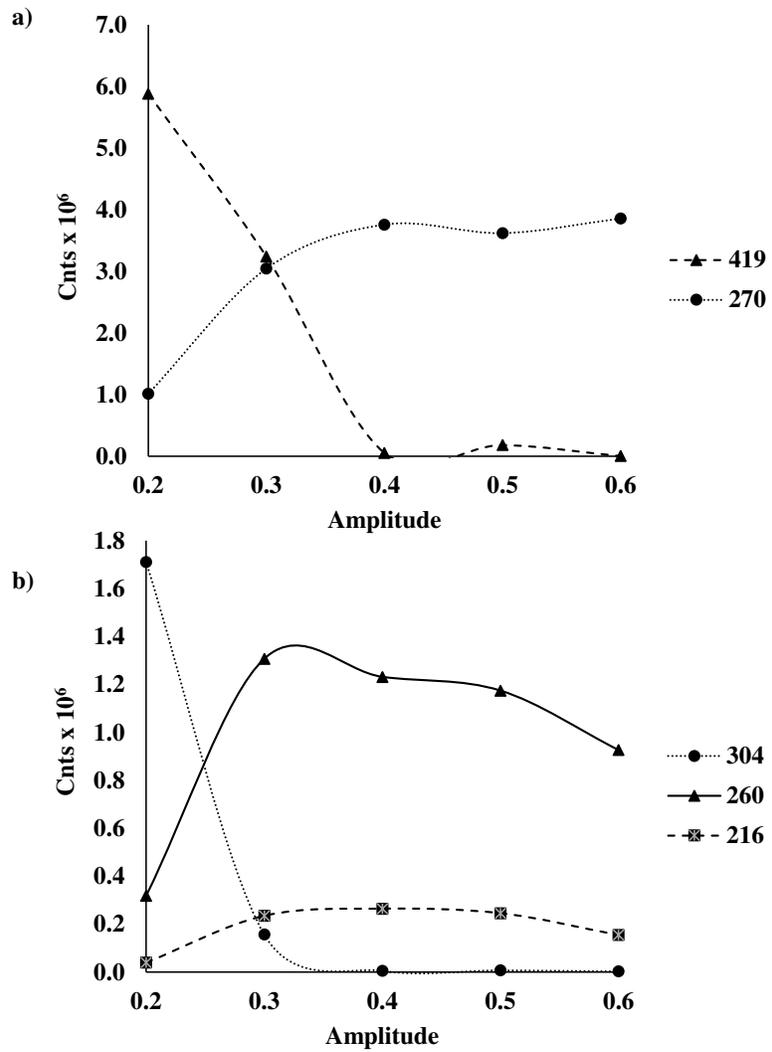


Figura 26 Efecto de la amplitud de fragmentación sobre la abundancia del ion producto obtenido en las transiciones m/z 419 \rightarrow 270 para CrPic₃ (a) y m/z 304 \rightarrow 260, 304 \rightarrow 216 para CoPic₂ (b).

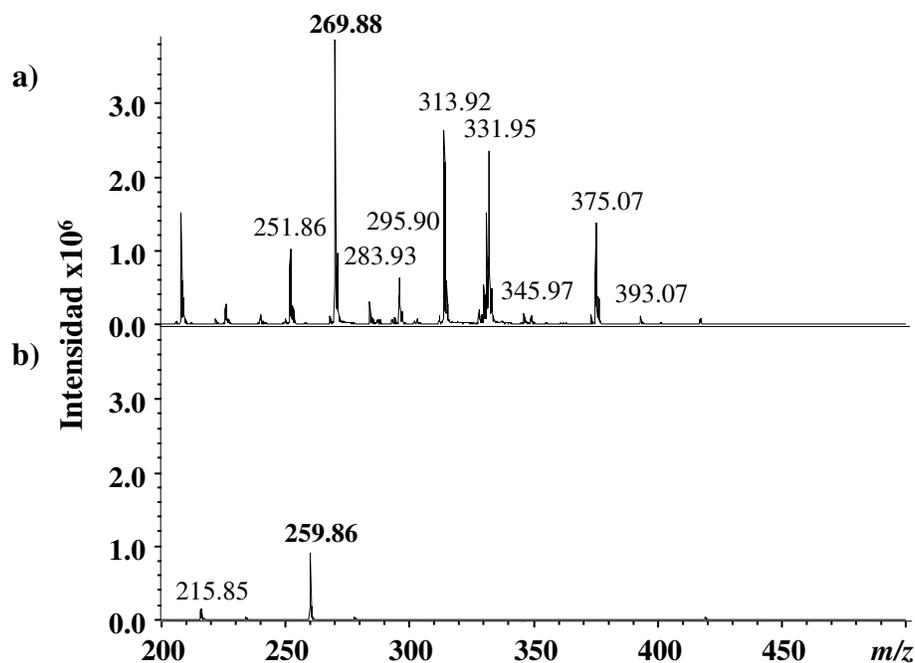


Figura 27 Espectros de fragmentación obtenidos para a) m/z 420 de picolinato de cromo y b) m/z 304 de picolinato de cobalto.

Utilizando las condiciones seleccionadas, se montó el sistema FIA-ESI-ITMS/MS, descrito en la sección de materiales y métodos y se procedió con el ajuste de las siguientes variables: (i) volumen de “loop” de inyección de muestra, (ii) intervalo de calibración y concentración del IS; (iii) velocidad de flujo y (iv) frecuencia de muestreo. Igual que para el análisis de FAMES, el reto fue obtener una baja dispersión del segmento de la muestra, buena simetría del pico con un corto tiempo de regreso a la línea base, así como evitar efectos de memoria. En base a la experiencia anterior (FAMES), se utilizó un tubo capilar PEEK con diámetro interno de 0.005” para conectar la válvula de inyección Rheodyne con el ESI. Para ejecutar el método de MRM, el volumen de inyección se ajustó a 100 μL permitiendo la acumulación/fragmentación de iones precursores con el tiempo de integración de señal espectral de 1 000 ms. En cuanto al intervalo de calibración, se partió de la concentración del CrPic_3 de 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$ y se realizaron diluciones sucesivas, observándose una buena linealidad en el intervalo de 3.91 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. La concentración del IS se ajustó a 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$, para asegurar que la magnitud de su señal fuera similar a la del estándar más alto de CrPic_3 .

En la [Figura 28](#) se presenta el registro las señales de CrPic_3 y CoPic_2 , obtenido para cinco inyecciones sucesivas de una solución estándar y de una muestra real; en este experimento el

volumen de flujo fue de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. Se observa una buena simetría de picos, con la anchura de las señales en media altura aproximadamente de 1 min. Hay que destacar que la normalización de las señales por la del IS provee una mejora sustancial de la repetibilidad tanto para la solución estándar como para la muestra real, obteniéndose una desviación estándar relativa de 0.5% (con base a 5 réplicas de inyecciones). Cabe también mencionar que, tomando la altura de pico como la señal analítica, las desviaciones estándar relativas fueron más altas, por lo que para la cuantificación se tomaron valores del área de pico normalizada por la del IS.

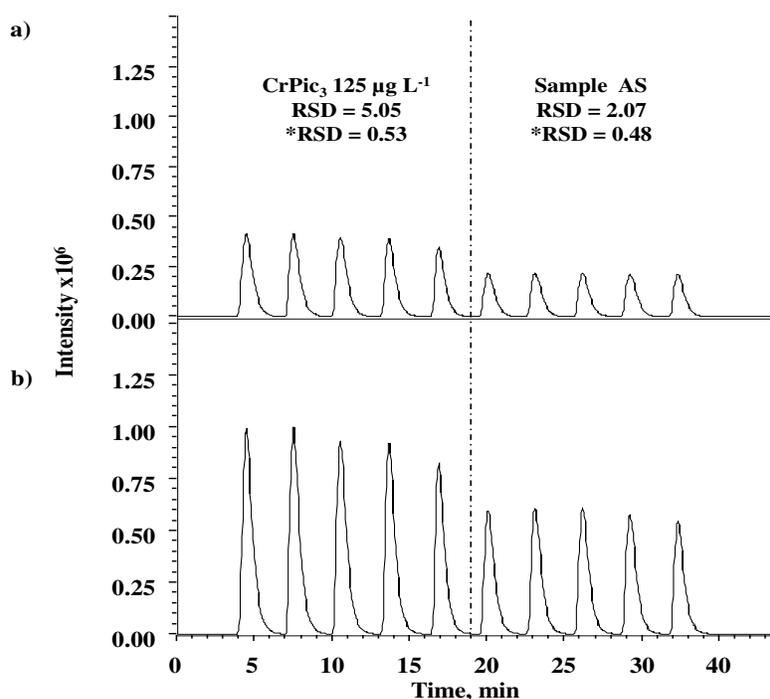


Figura 28 Repetibilidad de las señales registradas por FIA-ESI-ITMS/MS utilizando a) transiciones $419 \rightarrow 270$ para el CrPic_3 y b) $304 \rightarrow 260$ para el CoPic_2 , usando un flujo de $100 \mu\text{L min}^{-1}$. (*RSD – desviación estándar relativa en base a las señales de analito e IS; **RSD – desviación estándar relativa para señales del analito normalizados por IS. Como señal analítica se tomó el área del pico).

A continuación, se examinó el efecto de la velocidad de flujo, empleando un intervalo de $100 \mu\text{L min}^{-1}$ hasta $300 \mu\text{L min}^{-1}$. En la [Figura 29](#) se muestran diagramas correspondientes, donde se utilizó una concentración de $1\,000 \mu\text{g L}^{-1}$ del analito y del estándar interno. Como era de esperarse, el aumento de flujo causó una disminución paulatina de la magnitud de la señal y de su anchura. Específicamente, la anchura en media altura del pico era de 1 min para el flujo $100 \mu\text{L min}^{-1}$, 0.8 min para $150 \mu\text{L min}^{-1}$, 0.7 min para $200 \mu\text{L min}^{-1}$ y 0.6 min para $250 \mu\text{L min}^{-1}$ y para

300 $\mu\text{L min}^{-1}$. Con base en la magnitud de la señal y el valor RSD para señales normalizados por IS, para el trabajo posterior, se seleccionó el flujo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$. Con los parámetros FIA establecidos, los picos en los diagramas fueron integrados con base a 20 puntos (a partir de 10% de altura) y las inyecciones se realizaron en intervalos de 3 minutos.

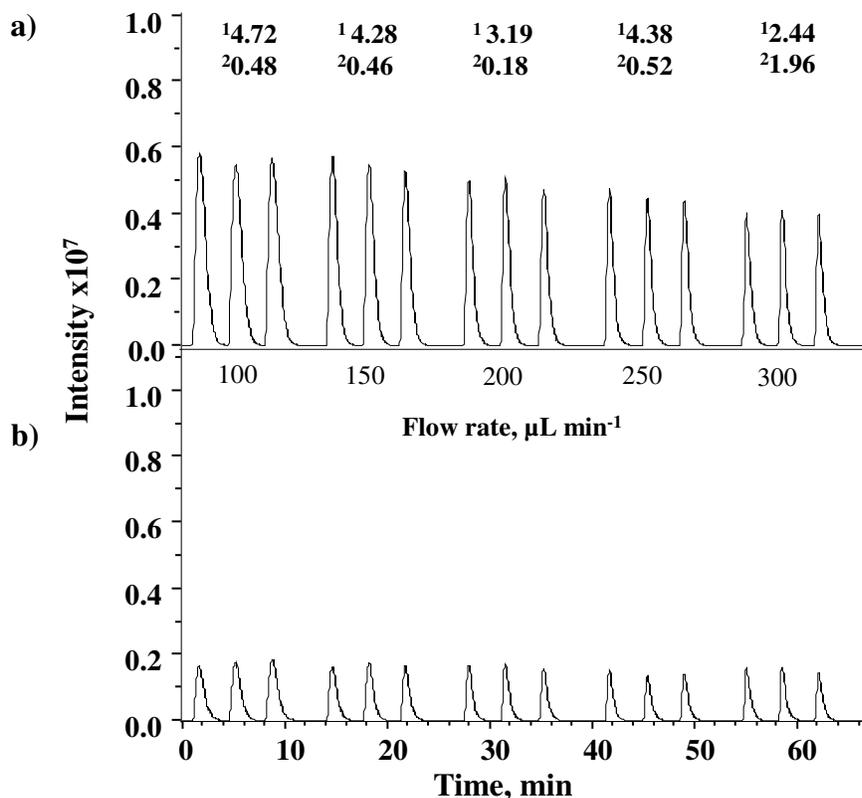


Figura 29 Efecto de la velocidad del flujo sobre la forma y repetibilidad de las señales FIA-ESI-ITMS/MS de CrPic₃ (a) y CoPic₂ (b), ambos con una concentración de 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$. (¹;RSD – desviación estándar relativa en base a las señales de analito; ²;**RSD – desviación estándar relativa para señales del analito normalizados por IS. Como señal analítica se tomó el área del pico).

Los diagramas obtenidos en el proceso de calibración son presentados en la [Figura 30](#). Cada una de las soluciones se inyectó por triplicado, registrando los picos correspondientes a los iones producto del picolinato de cromo y del picolinato de cobalto (IS). Se observa claramente un aumento de la intensidad de la señal del analito conforme aumenta su concentración en la solución mientras que, en el caso del IS, su señal constante se ve afectada por pequeñas

fluctuaciones. Las desviaciones estándar relativas evaluadas para cada punto de calibración, con base al área del pico normalizadas por IS se encontraron en el intervalo 0.10 - 2.0%.

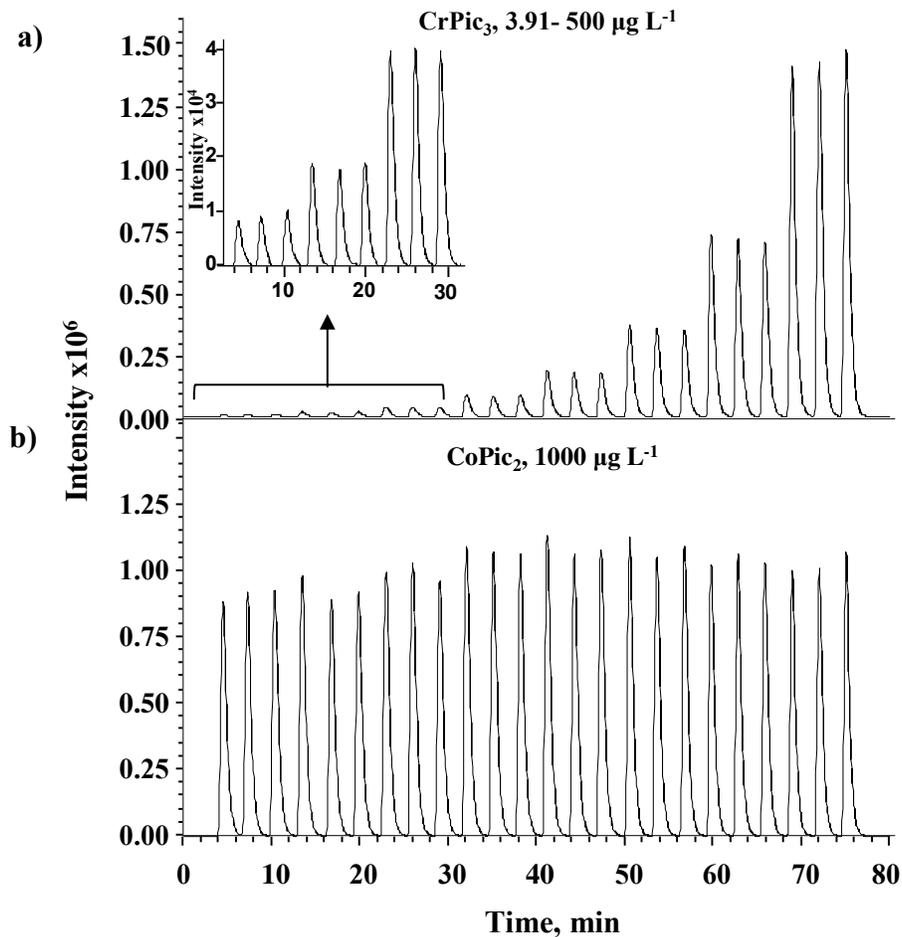


Figura 30 Fiagramas obtenidos para ocho soluciones de calibración inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con $m/z \pm 0.1$ y se aplicaron dos puntos para suavizado gaussiano. (a) ion extraído m/z 270 para el picolinato de cromo, las soluciones inyectadas contenían el intervalo de concentraciones de CrPi₃ 3.91 – 500 µg L⁻¹; (b) ion extraído 260 para CoPi₂ como estándar interno, concentración en todas soluciones 1 000 µg L⁻¹.

El intervalo de calibración y los parámetros analíticos evaluados para el picolinato de cromo se resumen en la [Tabla 8](#), comparando el proceso con y sin IS. Cabe señalar que, para las concentraciones de CrPic₃ por encima de 500 µg L⁻¹, se observó un desvío de la linealidad. En la Tabla 8 se presentan las funciones de regresión lineal con los errores típicos de la pendiente y del

intercepto, así como los límites de detección y cuantificación instrumentales. Dichos valores de LD y LQ se evaluaron conforme a la relación señal ruido (el ruido fue obtenido como la desviación estándar para diez mediciones sucesivas de blancos) empleando el criterio de tres y diez desviaciones estándar, respectivamente, y usando la señal adquirida del punto de calibración más bajo. Prácticamente para todos los parámetros, se obtuvo una mejora importante al aplicar la normalización de la señal empleando la del IS. Los respectivos límites de detección y de cuantificación del método correspondieron a 22 ng g⁻¹ y 76 ng g⁻¹ de picolinato de cromo en suplemento.

Tabla 8 Parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración, utilizando el procedimiento FIA-ESI-ITMS/MS.

Parámetro	Área/Área IS	Área
Intervalo de calibración, µg L ⁻¹	3.91 - 500	3.91 - 500
Pendiente (s)	3.02	13.2E+7
Error típico de s	0.02603	54.5E+4
Intercepto (b)	-0.011	9.8E+4
Error típico de b	0.00531	11.1E+4
R ²	0.9995	0.9998
DL, ng L ⁻¹	55	77
QL, µg L ⁻¹	0.19	0.26
CV*, %	0.61	3.05

DL, límite de detección; QL, límite de cuantificación.

*Coeficiente de variación para el punto 500 µg L⁻¹.

Para comprobar la exactitud del procedimiento propuesto, se llevaron a cabo experimentos de recuperación mediante dos puntos de adición de estándar para las muestras S1 y S2. En estos experimentos, se agregaron alícuotas del CrPic₃ directamente a 50 mg de cada muestra, correspondientes a las concentraciones del estándar de 40 µg g⁻¹ y 80 µg g⁻¹ en dichas muestras. Posteriormente se realizó el pretratamiento de muestra como se menciona en la sección de [materiales y métodos](#), agregando el IS. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los fiagramas registrados para el experimento de adición del estándar se presentan en la [Figura 31](#), y los resultados cuantitativos obtenidos se presentan en la [Tabla 9](#). Los porcentajes de recuperación fueron encontrados en el intervalo de 92.7-110%, lo que confirma una exactitud aceptable del procedimiento en el análisis de suplementos dietéticos de picolinato de cromo.

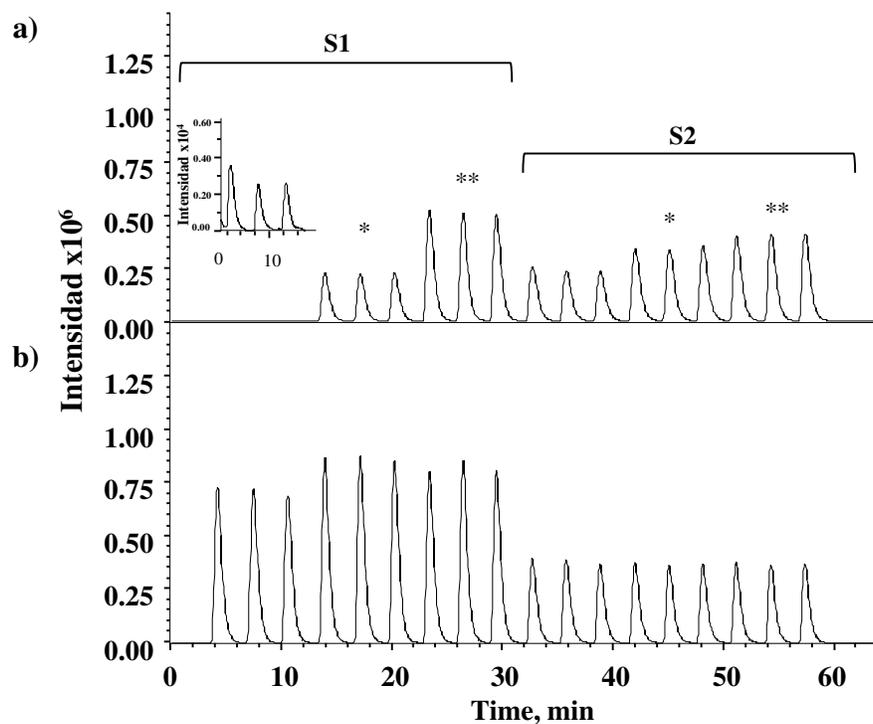


Figura 31 Diagramas obtenidos para dos muestras reales con adición estándar correspondiente a $40 \mu\text{g g}^{-1}$ y $80 \mu\text{g g}^{-1}$ de CrPi_3 en la muestra (en base a masa seca) inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con m/z 0.1 y se aplicaron dos puntos de suavizado gaussiano. (a) ion extraído 270 para el CrPi_3 ; (b) ion extraído 260 para el CoPi_2 como estándar interno.

Tabla 9 Porcentajes de recuperación obtenidos para la extracción de picolinato de cromo mediante FIA-ESI-ITMS/MS.

Muestra	(Promedio \pm SD, $\mu\text{g g}^{-1}$)		
	Agregado	Encontrado	R, (%)
DSP	0	0.49 ± 0.01	-
	40	37.8 ± 0.91	94.5
	80	88.3 ± 3.5	110
AS	0	95.9 ± 2.2	-
	20	43.1 ± 3.4	107
	40	74.2 ± 4.9	92.7

Análisis de suplementos dietéticos por FIA-ESIITMS/MS y por ICP-MS

Los fiagramas obtenidos para cuatro muestras de suplementos alimenticios adquiridos en el mercado local se muestran en la [Figura 32](#) (tres réplicas por muestra); como se describió anteriormente, las señales corresponden a la abundancia de iones cuantificadores m/z 269 para el picolinato de cromo y 259 para el picolinato de cobalto. En la Figura 32 puede observarse claramente que la muestra S4 presenta el contenido de CrPic_3 mayor en comparación a las demás muestras aun considerando que esta muestra tuvo una mayor dilución (1:500); así mismo es de notar que la muestra S1 contiene la menor cantidad de picolinato de cromo. Las variaciones en la señal del IS entre las muestras se deben a un diferente grado de dilución, pero para cada una de las muestras, la repetibilidad de las señales es buena.

Los resultados cuantitativos obtenidos por FIA-ESI-ITMS/MS, correspondientes a microgramos de Cr en forma de CrPic_3 por un gramo de suplemento se muestran en la [Tabla 10](#) junto con las concentraciones totales de Cr determinadas en estos productos por ICP-MS. Es importante resaltar que, tanto para FIA-ESI-ITMS/MS como para ICP-MS, los resultados se reportan como masa de cromo por un g de suplemento; sin embargo, para el procedimiento propuesto, se cuantifica selectivamente el cromo en forma de picolinato mientras por el ICP-MS se obtiene información del cromo total. Cabe señalar que solamente para el producto S4, el fabricante reportó el valor de 200 μg de Cr por pastilla (400 $\mu\text{g Cr g}^{-1}$), mientras que otros productos no tenían esta información en sus etiquetas. En el caso de GNC, los resultados obtenidos por dos procedimientos tuvieron buena concordancia, aunque aproximadamente 12% inferiores respecto al valor de etiqueta. El suplemento S3 contenía mucha más baja concentración de Cr, pero al igual que para el S4, los resultados obtenidos mediante dos procedimientos son congruentes, lo que es indicativo de una buena exactitud del FIA-ESI-ITMS/MS en este análisis y que además el CrPic_3 es la única forma de Cr en S4 y en S3. Por otro lado, para los dos restantes suplementos, las concentraciones de Cr resultaron muy inferiores al S4 y se obtuvieron mayores valores por ICP-MS comparando con el procedimiento propuesto. El mayor contenido de Cr total respecto a Cr en forma de picolinato, indica que los suplementes S2 y S1 contenían trazas de otras formas de cromo, además del CrPic_3 , el cual es el predominante. Los resultados obtenidos demuestran claramente la necesidad de llevar el control de calidad de los suplementos dietéticos y que el procedimiento propuesto puede ser utilizado en este tipo de análisis.

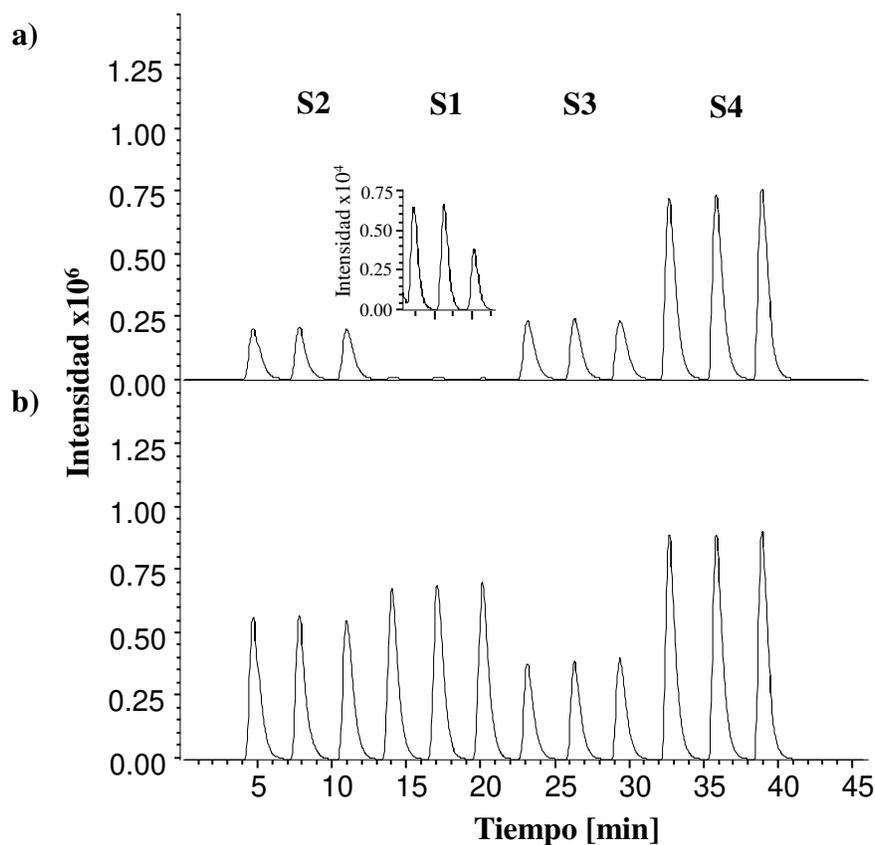


Figura 32 Diagramas obtenidos para muestras reales inyectadas en tres réplicas sucesivas; los iones fueron extraídos con m/z 0.1 y se aplicaron dos puntos Gaussian smoothing. (a) ion extraído m/z 269 para el CrPi_3 ; (b) ion extraído m/z 259 para el CoPi_2 $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ como estándar interno.

Tabla 10 Concentraciones de cromo encontradas en cuatro suplementos comerciales: resultados FIA-ESI-ITMS/MS correspondientes a Cr en forma de CrPic_3 e ICP-MS provee la concentración de Cr total. Promedios y SD basados en tres replicas.

Muestra	Promedio Cr \pm SD, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	FIA-ESI-ITMS/MS (CrPic_3)	ICP-MS (total Cr)
S21*	0.18 ± 0.01	0.47 ± 0.05
S1*	6.40 ± 0.09	13.1 ± 0.12
S3	11.2 ± 0.13	11.6 ± 0.09
S4	365 ± 5	359 ± 4

* statistical difference between two procedures detected, t-test, $p < 0,05$

4.2.5 Conclusiones

Se desarrolló un procedimiento para la determinación selectiva de picolinato de cromo en suplementos alimenticios por un esquema de inyección al flujo-espectrometría de masas con trampa iónica en el modo de monitoreo de reacciones múltiples. Primeramente, se sintetizó mediante un procedimiento simple el picolinato de cromo y el picolinato de cobalto como estándar interno, la identidad de ambos compuestos se confirmó utilizando ESI-QTOF MS, con en base en la medición de masa exacta de moléculas protonadas de CrPic₃ y CoPic₂ (error de masa 1.2 ppm y 0.7 ppm, respectivamente) y en base a congruencia entre el patrón isotópico experimental y aquel calculado in silicio. Para el análisis FIA-ESI-ITMS/MS, en base a experimentos sistemáticos, se establecieron distintos parámetros del sistema; i) formiato de amonio 10 mM (metanol-agua 1:1 v/v) como la solución portadora, ii) flujo de la solución portadora de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$; y iii) las transiciones m/z 419 \rightarrow 270 y 304 \rightarrow 260 para el picolinato de cromo y el IS, fijando la amplitud de fragmentación en 0.4. El procedimiento provee un límite de cuantificación instrumental de 0.19 $\mu\text{g L}^{-1}$ y límite de cuantificación del método 76 ng g^{-1} ; todos parámetros analíticos se vieron favorecidos por el uso de IS Con intervalos de inyección de dos minutos por muestra, y se obtuvo un alto rendimiento de muestreo con excelente repetibilidad. Los porcentajes de recuperación para dos puntos de adición de estándar en dos diferentes muestras se encontraron en el rango de 92.7-110%, en el análisis de muestras reales de suplementos alimenticios la cuantificación fue consistente con los datos obtenidos con ICP-MS para dos muestras comerciales, lo cual es un indicativo de una exactitud aceptable. Para otros dos suplementos comerciales, los resultados del procedimiento propuesto fueron más bajos respecto a ICP-MS, lo que sugiere presencia de trazas de otras formas de Cr en estos dos productos. El amplio intervalo de concentraciones de CrPic₃ encontrado en suplementos comerciales, así como discrepancias detectadas entre el contenido de Cr total y de CrPic₃, claramente demuestran la necesidad de implementar un esquema de control de calidad de este tipo de suplementos. En este contexto, el procedimiento FIA-ESI-ITMS/MS propuesto es atractivo debido a la simplicidad, su dimensión microescala, alto poder de detección y su alto rendimiento.

4.3 Determinación de colorantes azo sulfonados en Chile en polvo por MALDI-TOF MS

4.3.1 Introducción

Como se mencionó en la [sección 1.3.1](#) entre las características distintivas de MALDI-TOF MS se encuentran su alta velocidad de adquisición de datos y su versatilidad. Los iones individuales de moléculas no fragmentadas son formados en un amplio rango de masas moleculares, sin que sea relevante su polaridad y con una mejor tolerancia a la composición química de la muestra en comparación con otras fuentes de ionización suave.

El análisis cuantitativo de moléculas pequeñas (< 800 Da) mediante MALDI-TOF-MS es desafiante, principalmente debido al ruido de fondo relacionado a la matriz en el rango espectral m/z bajo y a la homogeneidad incierta de la co-cristalización con la matriz [66, 129]. En un intento para mejorar el rendimiento analítico en la región de bajas masas, han surgido distintas modificaciones de la técnica, en las cuales se evita el uso de una matriz química, en las que se utilizan diferentes tipos de superficies o nanomateriales, logrando la desorción/ionización de la muestra y proporcionan bajo ruido espectral [130, 131]. Sin embargo, en aplicaciones rutinarias, MALDI presenta un amplio rango de matrices químicas disponibles comercialmente, lo cual hace que se siga siendo atractivo y además se han desarrollado estrategias para contrarrestar los problemas típicos relacionados con el uso de estas [67, 129, 132].

Uno de los campos en donde se requiere con urgencia el desarrollo de procedimientos rápidos, simples y confiables, es en la cuantificación de diversos compuestos con baja masa molecular en productos alimenticios; en este sentido, MALDI-TOF-MS luce como una herramienta atractiva, pero poco explorada. Principalmente esta técnica ha sido aplicada en la evaluación de microorganismos en alimentos, y en menor medida en el estudio de la autenticación/adulteración o contaminación en alimentos [133-137] y para la determinación de fitoquímicos [138-141]. Recientemente, en nuestro grupo de investigación se demostró la viabilidad de MALDI para la determinación de metales pesados en conservas de pescado y tequilas [142, 143].

Para mejorar la apreciación visual de productos alimenticios, la adición de colorantes naturales o sintéticos ha sido una práctica común. Entre éstos, se encuentran los colorantes azo sulfonados que son populares debido a su estabilidad, buena solubilidad en agua, y bajo costo. Por otro lado, durante la digestión gastro-intestinal, son liberadas aminas aromáticas nocivas, por

lo que la utilización de azo colorantes se encuentra regulada en muchos países, aunque con criterios no uniformes [144, 145]. La determinación de azo colorantes en alimentos ha sido un tema activo de investigación y se han revisado exhaustivamente diferentes enfoques [146-149]. Además de los ensayos espectrofotométricos, se han propuesto varios procedimientos basados en cromatografía en capa fina, la electroforesis capilar y la cromatografía líquida con detección espectrofotométrica y por espectrometría de masas [146, 147]. Cabe destacar también algunas aplicaciones de técnicas electroquímicas [148]. En cuanto al sistema MALDI-TOF MS, se ha demostrado su capacidad para el análisis de colorantes azo polisulfonados [150]; igualmente, esta técnica fue utilizada para estudiar la unión de péptidos/proteínas con azo colorantes y en la investigación de la bio-degradación de colorantes [151]. Lovejoy y col. informaron de una interesante aplicación de líquidos iónicos a base del ion tetraalquilfosfonio para la extracción y detección en un solo paso de colorantes azo sulfonados en textiles mediante MALDI-MS sin matriz química [152]; sin embargo, en la literatura no hemos encontrado ningún intento de cuantificación de azo colorantes en productos alimenticios por MALDI-TOF-MS convencional.

Como un ingrediente común de muchos platillos en la cocina mexicana, se encuentran disponibles en este país diferentes marcas de chile en polvo y estos productos también se exportan a todo el mundo. La determinación de colorantes artificiales en alimentos se ha centrado principalmente en los colorantes ilegales Sudan [79, 153, 154], pero también se han estudiado los compuestos azo sulfonados, algunos de los cuales figuran en las etiquetas de los productos [155]. En el presente estudio, se propone un procedimiento para la determinación de cinco colorantes azo sulfonados en polvos de chile por medio de MALDI-TOF-MS. Los compuestos seleccionados incluyen amarillo 5 y amarillo 6 que se encuentran aprobados mundialmente; rojo 40 y rojo 2 que se encuentran aprobados únicamente en algunos países; y rojo 5 el cual se encuentra totalmente prohibido [144, 145]. Para solventar los problemas relacionados con aplicaciones de MALDI convencional en la cuantificación de moléculas pequeñas, se establecieron los siguientes puntos a abordar: (i) la selección de un estándar interno no isotópico adecuado [142, 143]; (ii) la aplicación de surfactantes catiónicos para la separación/extracción de compuestos objetivos en forma de pares iónicos y para reducir el ruido espectral [156]; (iii) experimentos sistemáticos para establecer las condiciones instrumentales más adecuadas en términos de alta relación señal-ruido y una aceptable repetibilidad [129]. En el análisis de algunos productos comerciales, los resultados obtenidos fueron consistentes con los proporcionados por

HPLC-DAD; sin embargo, el corto tiempo de análisis y alto rendimiento deben destacarse como ventajas importantes del sistema MALDI-TOF MS.

4.3.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un procedimiento basado en MALDI-TOF-MS para la determinación de cinco colorantes azo sulfonados en muestras de chile en polvo.
- Establecer un pretratamiento de muestra basado en la separación/extracción de colorantes en presencia de un surfactante catiónico.
- Aplicar un estándar interno no isotópico para la normalización de las señales MALDI-TOF-MS de los analitos.
- Establecer las condiciones de co-cristalización y de adquisición de datos MALDI-TOF MS que aseguren la relación señal/ruido más alta posible.
- Realizar el análisis de muestras reales, provenientes de los mercados locales.

4.3.3 Materiales y métodos

Reactivos y muestras

Los seis siguientes colorantes azo sulfonados fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich: Rojo Allura (FD& Red 40, 6-hidroxi-5-[(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenil) azo]-2-naftalenosulfonato disódico; número de catálogo 458848, pureza reportada 80%), rojo ácido 88, (4-(2-hidroxi-1-naftilazo)-1-naftalensulfonato de sodio, número de catálogo 195227, pureza reportada 75%), ponceau 2R (FD&C Red 5, 4-[2-(2,4-dimetilfenil) diazen-1-il]-3-hidroxinaftaleno-2,7-disulfonato disódico; número de catálogo P-2395, pureza reportada 70%), amaranto (FD&C Red2, (4E)-3-oxo-4-[(4sulfonato-1-naftil)hidrazono]naftaleno-2,7-disulfonato trisódico; número de catálogo 120561, pureza reportada 80%), amarillo ocaso (FD&C Yellow 6, 6-hidroxi-5[(4sulfofenil)azo]-2-naftalensulfonato; número de catálogo 201952, pureza reportada 90%) y tartrazina (FD&C Yellow 5, (4E)-5-oxo-1-(4-fenilsulfonato)-4-[(4fenilsulfonato)hidrazono]-3-pirazolcarboxilato; número de catálogo 201952, pureza reportada 60%). Se determinó la pureza real de los colorantes como se reporta en la literatura y se obtuvieron los siguientes valores: 76 % para rojo allura, 79% para rojo ácido 88, 71% para ponceau 2R, 83% para amaranto, 88% para amarillo ocaso, y 54% para tartrazina [157]. Con base en estos resultados, se prepararon soluciones estándar individuales a una concentración 1.0 mg mL⁻¹ en agua desionizada.

Todos los demás reactivos químicos fueron de grado reactivo analítico: hidrocloreto de trietilamina, ácido fórmico, hidróxido de amonio, bromuro de benciltributilamonio (BTAB), 9-aminoacridina (9-AA). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) y los solventes metanol, acetonitrilo, cloroformo (Sigma) grado HPLC.

Doce diferentes marcas comerciales de chile en polvo fueron compradas en el mercado local en la ciudad de Guanajuato, México. De acuerdo con la descripción proporcionada por los fabricantes, los productos 2 y 4 contenían rojo allura, mientras que los productos 3, 5, y 12 contenían amarillo ocaso y tartrazina. Para los otros siete productos (1, 4, 6, 8-11), la adición de colorantes no era reportada en la etiqueta. Previo al análisis, cada producto se molió manualmente en un mortero de porcelana y fue tamizado.

Procedimiento MALDI-TOF MS

Una porción de chile en polvo (0.5 g) fue suspendida en 10 mL de 1:1 agua/metanol y llevada al vórtex (2 min). La mezcla se centrifugó (10 000g, 10 min) y se tomó una alícuota del sobrenadante (10 µL para muestras 1, 2, 6-, 10, y 12; y 40 µL para muestras 3-5 y 11) y se colocó en un tubo Eppendorf (2 mL) agregando 100 µL de estándar interno (rojo ácido 88, 10 µg mL⁻¹ en agua desionizada) seguido por 800 µL de una solución acuosa de BTAB 10 mmol L⁻¹. El volumen se llevó a 1 mL con agua desionizada ajustando a pH 8 con un tampón Britton-Robinson. En paralelo, se utilizó el blanco y una serie de soluciones estándar mixtas que contenían 12,5-800 µg L⁻¹ de cada analito para la calibración (estándar interno, BTAB; pH 8; volumen final 1 mL igual que para las muestras). Los pares iónicos formados por los colorantes azo sulfonados con BTAB fueron extraídos con 500 µL de cloroformo. Una vez que la fase orgánica fue recolectada y centrifugada (10, 000 × g, 10 min), se depositó en una placa MALDI de acero (ground Steel) mediante el método de sándwich de la siguiente manera: 1 µL de solución de matriz (9-AA 1 mg mL⁻¹ en 9:1 metanol/agua) secada a temperatura ambiente, 1 µL de muestra o solución de calibración secada, 1 µL de solución de matriz secada.

Se utilizó un modelo AutoFlex speed MALDI-TOF-MS de Bruker Daltonics con el software flexAnalysis 3.4. Este instrumento está equipado con un láser smartbeamTM-II Nd:YAG (266 nm, 532 nm, 1064 nm). Los espectros de masa se adquirieron en el intervalo *m/z* 360-560 en modo lineal negativo, utilizando una intensidad de láser 40% y frecuencia de 1 000 Hz. En cada

medición, se adquirieron 20 espectros instantáneos para cada disparo del láser y se promediaron; para el movimiento de laser en el pocillo, se utilizó la opción “large spiral raster” y se acumularon un total de 600 espectros. Para la calibración de masas, se utilizaron valores m/z 193.00, 747.14, y 377.06, correspondientes a 9 AA $[M-H]^-$, erioglaucina $[M-H]^-$, y rojo ácido 88 $[M-H]^-$, respectivamente.

Para la cuantificación, se utilizaron las intensidades de los iones monoisotópicos normalizados por la del estándar interno (IS): m/z 407.00, 435.03, 451.03, 467.00, 536.97, y 377.06 para amarillo 6, rojo 5, rojo 40, amarillo 5, rojo 2, y rojo ácido 88, respectivamente (m/z 377.06 para IS). Se realizaron tres réplicas independientes, y cada solución obtenida se colocó en tres pocillos; de este modo, se obtuvieron los valores promedios de nueve mediciones por muestra.

Para los experimentos de recuperación, se utilizaron las muestras 4 - 6; para los dos primeros se agregaron 25 μL y 50 μL de soluciones individuales de estándar (1.0 mg mL^{-1} , cada uno) directamente a 0.5 g de chile en polvo, lo que correspondía a la adición de 50 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Para la muestra 6, se agregaron 100 μL y 200 μL de una solución de estándares individuales que correspondía a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 400 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada estándar agregado en la muestra sólida. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

Procedimiento HPLC-DAD

Como se describió anteriormente, 0.5 g de muestra fue resuspendida en 10 mL de 1:1 agua/metanol. Después se agitó en vórtex (2 min) y se centrifugó (10 000g, 10 min). Posteriormente, 700 μL de sobrenadante fueron recolectados y evaporados (SpeedVac, 60 °C), el residuo fue reconstituido en 250 μL de trietilamina 3.0 mmol L^{-1} , pH 6.2. Se prepararon cinco soluciones de calibración en la fase móvil A, cubriendo un rango de concentración para cada analito de 0.15-5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Una alícuota de muestra o de solución de calibración se diluyó 10 veces en fase móvil A, se filtró (0.22 μm filtro Whatman), y se inyectaron 5 μL en el sistema cromatográfico. Se utilizó un cromatógrafo Agilent Series 1200 equipado con una bomba cuaternaria, un compartimiento de termostato para columna, un automuestreador, un detector de arreglo de diodos, y el software Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La separación se llevó a cabo en una columna de fase inversa empleando la modalidad de pares

iónicos, como se describe en la literatura [158]. La columna cromatográfica fue una Kinetex C18 (150 x 3 mm, 2.6 μm) con un cartucho de guarda columna ULTRA C18, ambos de Phenomenex. La columna se mantuvo a 40 °C. Las fases móviles fueron, A: trietilamina 3 mmol L⁻¹ con 5 % de acetonitrilo, pH 6.2 ajustado con ácido fórmico y B: metanol, se utilizó el siguiente gradiente: 0 min 0% B, 1.0 min 10 % B, 8.0 min 55% B, 10.2 min 85% B, y 10.8 min 0% B (con 5 min para reequilibrar la columna). Se utilizó una velocidad de flujo de 0.35 mL min⁻¹. La detección espectrofotométrica se llevó a cabo a 500 nm para rojo 40, rojo 5, y rojo 2, mientras que para amarillo 6 y amarillo 5 se utilizó 400 nm. Cada muestra se analizó con dos replicas independientes.

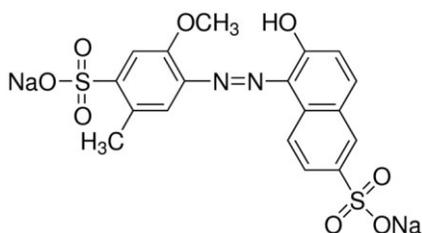
Análisis estadístico

La estadística descriptiva se realizó para obtener las medias y desviaciones estándar. Se utilizó la prueba *t* no apareada para muestras independientes con el fin de comparar las concentraciones medias obtenidas para dos procedimientos analíticos. Se realizó la prueba *F* para verificar la igualdad de varianzas. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. El software utilizado fue Microsoft Excel 2010.

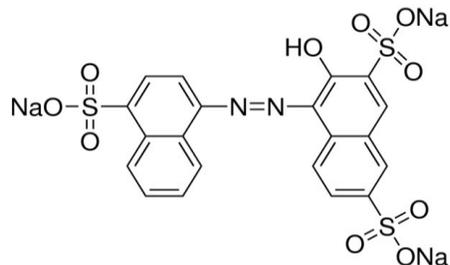
4.3.4 Resultados y discusión

Debido a la presencia de grupos sulfonados, los colorantes seleccionados en este trabajo son muy solubles en agua y forman especies aniónicas a pH cercanos a 7; por lo tanto, se utilizó una mezcla de agua/metanol para la extracción de los colorantes de los chiles en polvo. En base a estudios previos, se aplicó 9 aminoacridina como una matriz química que asegurar una ionización eficiente de pequeñas moléculas ácidas en modo negativo. Cabe señalar que la desorción/ionización laser sin matriz no era factible. El estándar interno seleccionado (IS) fue el azo colorante rojo 88, el cual tiene una estructura y propiedades similares a las de los analitos, sin embargo, no se utiliza como colorante alimenticio; de hecho, no se encontró ninguna señal correspondiente al rojo ácido 88 en los espectros de masas adquiridos para las muestras analizadas. Las estructuras químicas de los colorantes se presentan en la [Figura 33](#).

¹ Allura red
² E129
³ C.I. 16035
⁴ FD&C Red No. 40
⁵ C₁₈H₁₄N₂Na₂O₈S₂



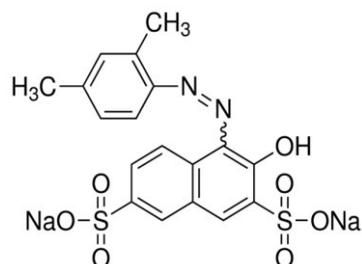
Amaranth
E123
C.I 16185
FD&C Red No.2
C₂₀H₁₁N₂Na₃O₁₀S₃



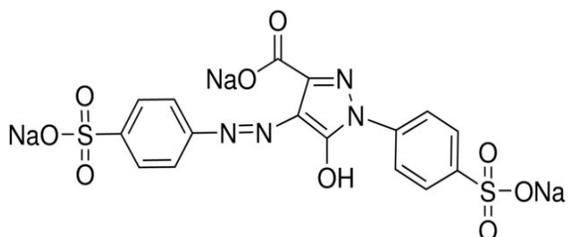
Sunset yellow
E110
C.I. 15985
FD&C Yellow No. 6
C₁₆H₁₀N₂Na₂O₇S₂



Ponceau 2R
E124
C.I. 16150
FD&C Red No. 5
C₁₈H₁₄N₂Na₂O₇S₂



Tartrazine
E102
C.I. 19140
FD&C Yellow No. 5
C₁₆H₉N₄Na₃O₉S₂



Acid red 88 (IS)
C.I 15620

C₂₀H₁₃N₂NaO₄S

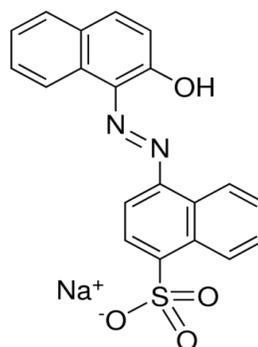


Figura 33 Estructuras de los colorantes azo sulfonados analizados, se utilizó rojo ácido 88 como estándar interno. ¹ nombre comercial, ² nombre en la comunidad europea, ³ color index, ⁴ nombre oficial FD&C, ⁵ formula molecular.

En un primer intento, se depositaron extractos agua/metanol de Chile en polvo directamente sobre la placa MALDI con 9-AA como matriz química; los espectros obtenidos eran complejos y difíciles de interpretar, lo que indicó la necesidad de un pretratamiento de la muestra. A continuación, se analizó una solución acuosa de estándares mezclada con metanol ($600 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS), en la [Figura 34](#) se presenta un espectro típico de ésta. Las señales más intensas corresponden a las moléculas desprotonadas de los azo colorantes ácidos con m/z 407.00 para amarillo 6, 435.03 para rojo 5, 451.03 para rojo 40, 467.00 para amarillo 5, 536.97 para rojo 2, y 377.06 para rojo ácido 88; sin embargo, el espectro era ruidoso y contenía picos debidos a la formación de aductos con sodio. Para solventar estos problemas, se propuso un procedimiento de limpieza basado en la extracción de los colorantes en un disolvente orgánico, formando pares iónicos con un surfactante catiónico adecuado.

Al hacerlo, se podrían eliminar componentes de la muestra altamente polares e iones (sodio), esperando la reducción del ruido espectral. Con respecto al tensoactivo, se ha demostrado previamente en un reporte, que la adición de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) reducía las señales relacionadas con la matriz en el análisis de pequeños compuestos fenólicos [159]. Por otro lado, se encontró que el BTAB proporciona una mejor extracción del colorante azoico sulfonado erioglaucina A, en comparación con CTAB [160], al cual se le atribuyen a interacciones de electrones π presentes en anillos aromáticos del surfactante y en los colorantes azoicos, la cual potencializa la formación de pares iónicos [161]. En las siguientes secciones, se describen experimentos sistemáticos que se realizaron para establecer las condiciones experimentales e instrumentales más apropiadas para el procedimiento propuesto.

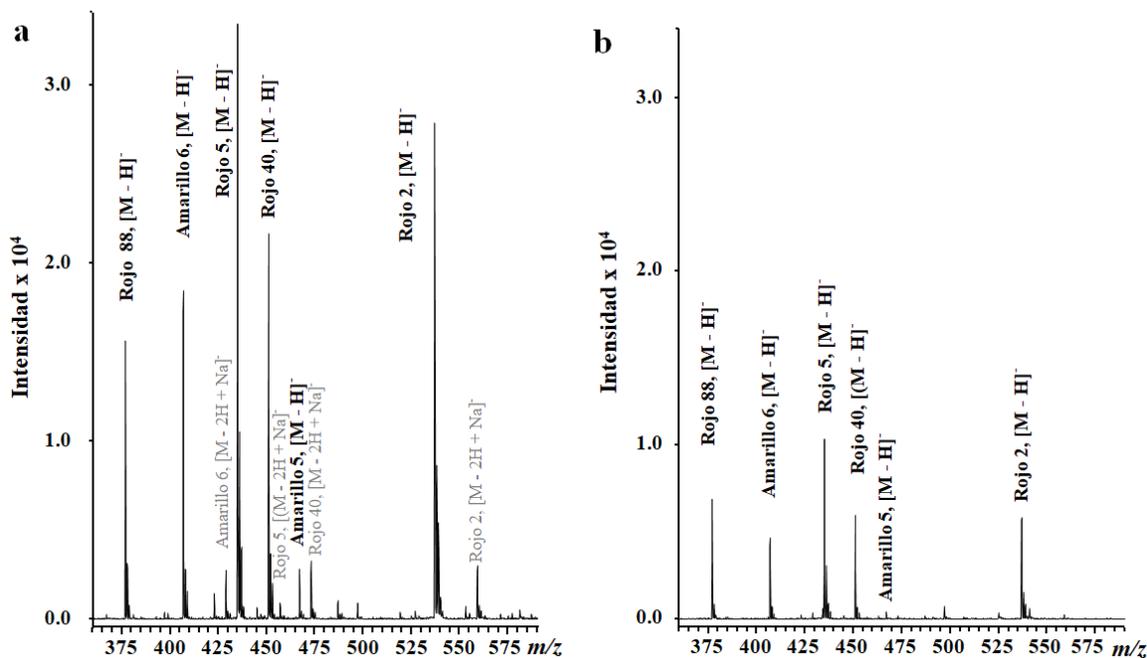


Figura 34 Espectros típicos de MALDI-TOF MS adquiridos para la mezcla de colorantes azo sulfonados: amarillo 6, amarillo ocaso; rojo 5, ponceau 2R; rojo 40, rojo allura; amarillo 5, tartrazina; rojo 2, amaranto; rojo ácido 88 como IS. Para mayor claridad de presentación, los espectros fueron adquiridos bajo las condiciones finales, descritas en la sección “Materiales y métodos”. a) Mezcla estándar acuosa sin adición de BTAB ($600 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS). b) La misma mezcla estándar después de la adición de BTAB y la extracción en cloroformo.

Procedimiento de pretratamiento de muestra para el análisis MALDI-TOF MS

Para asegurar la extracción eficiente de los azo colorantes seleccionados, se probaron concentraciones variables de BTAB (hasta 10 mmol L^{-1} en solución acuosa) usando la misma mezcla estándar de los seis colorantes. La extracción se realizó con cloroformo, que fue seleccionado conforme un estudio anterior y debido a que proporcionó un secado relativamente rápido y homogéneo en el porta muestras MALDI. En la [Figura 35](#) se muestran los espectros de absorción UV/Vis de los colorantes, registrados en la fase acuosa después de la extracción con BTAB; en base a estos resultados, la concentración de BTAB se estableció en 8 mmol L^{-1} . Como era de esperar, los aductos de sodio en los espectros MALDI-TOF MS obtenidos en la fase de cloroformo se redujeron notablemente y los espectros presentaron un menor ruido con respecto a los adquiridos directamente para la solución agua/metanol ([Figura 34 b](#)); se calculó el porcentaje de intensidad de los aductos de sodio con respecto a los iones de moléculas desprotonadas para

cada compuesto en presencia y en ausencia de BTAB, y los valores obtenidos se muestran en la [Tabla 11](#). Los resultados obtenidos confirman que la extracción mediante pares iónicos de los colorantes utilizando un solvente orgánico, permitió reducir de manera sustancial la formación de aductos de sodio. De acuerdo con estudios anteriores [132, 156, 159, 162], la presencia del surfactante suprimió las intensidades de los iones objetivo; sin embargo, las relaciones señal/ruido no fueron deterioradas. En los trabajos citados, se prestó especial atención en la selección de las relaciones surfactante/analito/matriz; aunque no se pudo hacer una generalización, se sugirieron bajas proporciones de surfactante [159]. En contraste con las aplicaciones previamente mencionadas, en este trabajo, el criterio principal para la selección de la concentración de BTAB fue asegurar una eficiente extracción de los analitos. En este diseño, la concentración del surfactante en la fase de cloroformo dependía de la cantidad total de especies que formaban pares iónicos, por lo que era necesario establecer un volumen adecuado del extracto de muestra. En esta etapa, el desafío fue obtener intensidades de señal que permitieran la cuantificación de los analitos minimizando su supresión debido a la presencia de BTAB. El volumen total de la fase de agua/metanol se estableció en 1 mL, se utilizaron 500 μL de cloroformo para la extracción y se analizaron alícuotas de extracto de muestras que iban desde los 10 μL hasta los 200 μL . Mientras que el volumen más bajo estaba determinado por la concentración de colorantes azoicos analizados en una muestra dada (se seleccionaron alícuotas de 10 μL o 40 μL), el más alto no podía exceder los 100 μL debido a la supresión excesiva de la ionización. Cabe destacar que el ruido de fondo espectral se eliminó de manera eficiente en cualquier volumen del extracto de muestra.

Otro parámetro de importancia tanto para la extracción como para la intensidad de la señal fue el pH de la fase acuosa. Los espectros MALDI-TOF-MS se registraron para los extractos de soluciones de mezcla estándar ajustadas a pH en el rango de 6 a 10 con un tampón Britton-Robinson. En la [Figura 36](#) se presentan las intensidades de las señales con las respectivas desviaciones estándar (cinco repeticiones) para cada colorante y cada valor de pH; de acuerdo con estos resultados, para el procedimiento se seleccionó pH 8. Aunque la extracción de azo colorantes fue eficaz a $\text{pH} > 7$, los espectros de masas registrados a pH 9 o superior presentaron una repetibilidad deficiente que debería atribuirse a una homogeneidad empeorada debida a la co-cristalización (percibida visualmente).

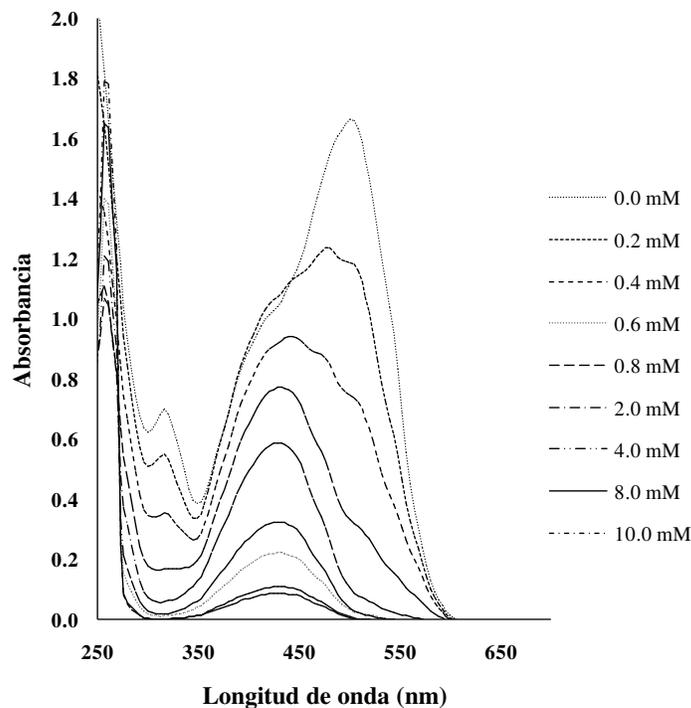


Figura 35 Efecto de la concentración de BTAB en la extracción de colorantes azoicos de una solución acuosa mixta. La solución contenía $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada colorante; para la extracción, a 1 mL de solución acuosa se agregaron $500 \mu\text{L}$ de cloroformo y después de la separación de fases, se registraron los espectros de absorción UV/Vis en la fase acuosa.

Tabla 11 El porcentaje de intensidad del aducto de sodio con respecto al ion molecular desprotonado, calculado para cada compuesto en presencia y en ausencia de BTAB. Intensidades de iones individuales tomadas de los espectros presentados en la Figura 35 a y 35 b.

% de aductos sodiados con respecto a iones moleculares desprotonados		
Colorante	Sin BTAB	Con BTAB
R88	0	0
Y6	12.5	4.90
R5	1.85	0.95
R40	11.8	3.20
Y5	0	0
R2	5.76	2.10

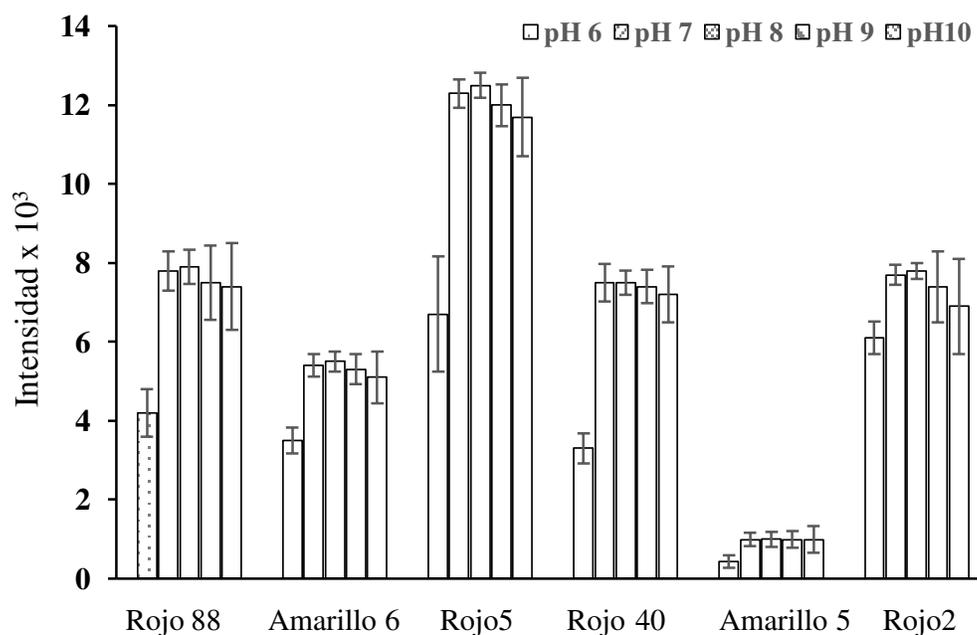


Figura 36 Efecto del pH sobre la magnitud de las señales MALDI-TOFMS adquiridas para seis colorantes ($600 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito, $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS; las medias y las desviaciones estándar respectivas se presentan para cinco réplicas).

Selección de parámetros MALDI-TOF

Con base en la experiencia y recomendaciones [129, 142, 143], se aplicó una intensidad de láser relativamente baja (40%). Dado que se ha informado sobre el enriquecimiento tanto de surfactante como de los colorantes en la superficie del depósito en la placa MALDI [159], se varía el número de espectros instantáneos adquiridos durante un disparo de láser con el fin de obtener la mayor magnitud de señal posible. Como se muestra en la [Figura 37](#), para 100 espectros instantáneos, las señales promediadas fueron más bajas en comparación con la adquisición de 20 espectros instantáneos, lo que confirma que los analitos se concentraron cerca de la superficie. En la [Figura 38](#) y [Figura 39](#), se muestran los datos obtenidos para el amarillo ocaso (amarillo 6) y rojo allura (rojo 40). Específicamente, los valores promedios con las respectivas desviaciones estándar se presentan para 20-100 espectros instantáneos adquiridos promediando o sumando los espectros individuales; como se puede observar, utilizando un promedio de 20 espectros se logró la mejor repetibilidad y las señales relativamente más intensas.

En base a estos resultados, para la cuantificación se utilizaron señales adquiridas como promedio de 20 espectros instantáneos por un disparo de láser.

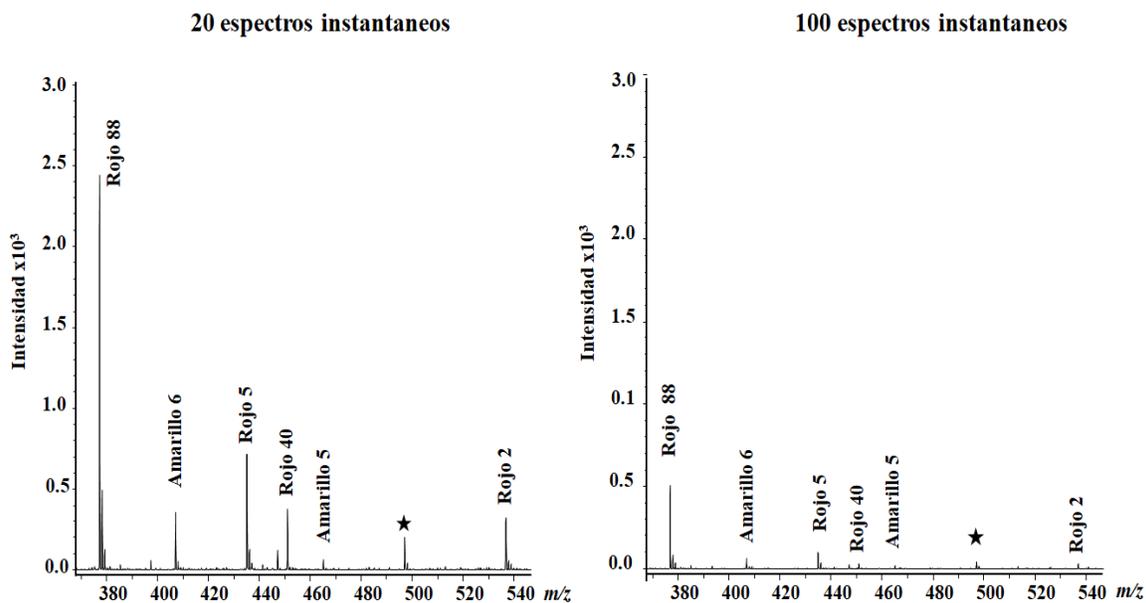


Figura 37 Espectros típicos de MALDI-TOF MS obtenidos para la mezcla estándar ($50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada colorante, $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS) y un disparo de láser con adquisición de 20 o 100 espectros instantáneos, respectivamente.

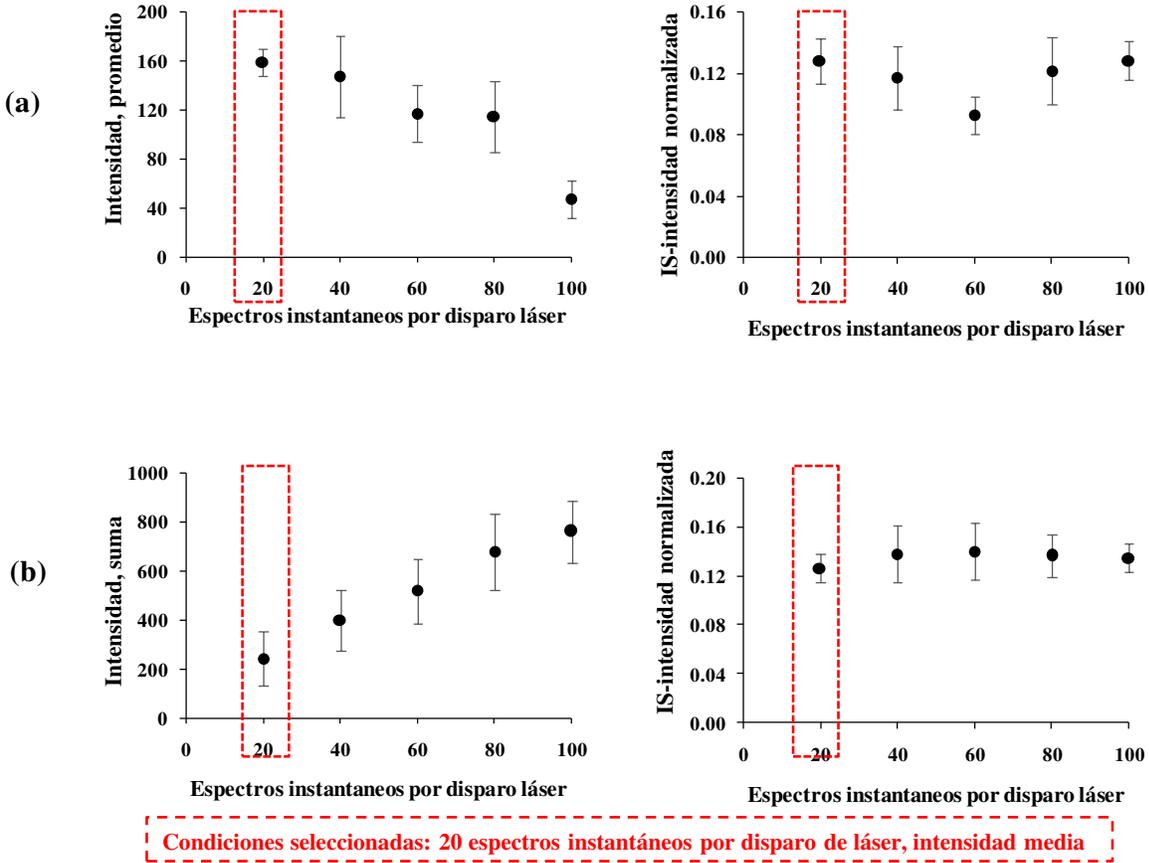


Figura 38 Efecto del número de espectros instantáneos adquiridos para amarillo ocaso por un disparo de láser. (E110, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS). Para mayor claridad en la visualización, se utilizaron las condiciones experimentales y otras condiciones instrumentales, como se describe en Materiales y métodos).

(a) Valores promedios de las intensidades para n espectros en una toma; medias y desviaciones estándar presentadas para cinco réplicas de disparos realizados en diferentes sitios.

(b) Suma de intensidades para n espectros en una toma; medias y desviaciones estándar presentadas para cinco réplicas de disparos realizados en diferentes sitios.

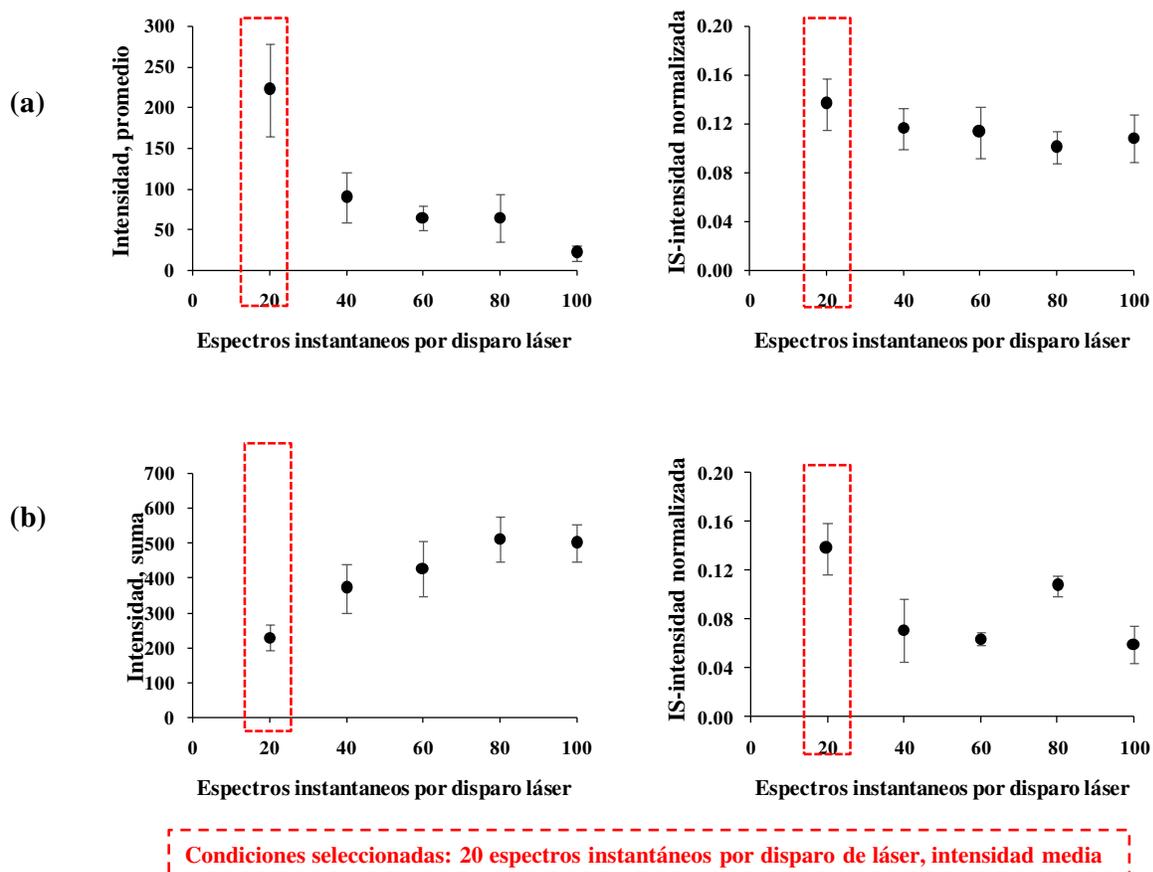


Figura 39 Efecto del número de espectros instantáneos adquiridos para el rojo Allura por un disparo de láser. (E_{129} , $50 \mu\text{g L}^{-1}$; $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS). Para mayor claridad en la visualización, se utilizaron las condiciones experimentales y otras condiciones instrumentales, como se describe en Materiales y métodos).

(a) Valores promedios de las intensidades para n espectros en una toma; medias y desviaciones estándar presentadas para cinco réplicas de disparos realizados en diferentes sitios.

(b) Suma de intensidades para n espectros en una toma; medias y desviaciones estándar presentadas para cinco réplicas de disparos realizados en diferentes sitios.

El modelo AutoFlex speed MALDI-TOF-MS ofrece seis modos de movimiento láser para la adquisición automática de señales y todos ellos fueron probados. Al aumentar el número de disparos para cada movimiento del láser, las intensidades de las señales obtenidas al sumar disparos individuales aumentaron gradualmente. Dado que no se observó ninguna mejora adicional para más de 600 espectros acumulados, finalmente fue seleccionado este número. Para la solución estándar mixta que contenía $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada colorante y $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS, los espectros se adquirieron en el extracto de cloroformo utilizando diferentes modos de movimiento del láser (20 espectros instantáneos promediados por disparo láser y una suma de 600 espectros por ciclo). Los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar obtenidos para cinco réplicas se presentan en la [Figura 40](#) para seis azo colorantes sulfonados; para una mejor comparación de la repetibilidad de las señales, las desviaciones estándar son mostradas en la [Figura 40 B](#). Se puede observar que el modo spiral_large proporcionó señales relativamente intensas con una precisión claramente mejor en comparación con otros movimientos láser. Lo más probable es que, con este modo específico de adquisición, el movimiento de laser cubre de manera uniforme toda la superficie del pocillo, con suficiente espacio entre disparos individuales para asegurar la desorción de sitios intactos y no precalentados en la superficie.

El siguiente parámetro por estudiar fue la cantidad de matriz química utilizada en el análisis. Cabe señalar que, entre los diferentes métodos de deposición en la placa, la mejor homogeneidad de co-cristalización se obtuvo mediante una técnica tipo sándwich con una alícuota de $1\text{-}\mu\text{L}$ de la matriz, seguido de $1\text{-}\mu\text{L}$ de muestra y otra porción de $1\text{-}\mu\text{L}$ de matriz (cada uno de estos se secó antes de la siguiente deposición). La concentración de 9-AA en la capa superior e inferior se varió en el rango de $0\text{-}1.5 \text{ mg mL}^{-1}$ y, en cada uno de los casos, los espectros de la mezcla de estándares se adquirieron en cinco repeticiones. Los resultados de estos experimentos son presentados en la [Figura 41](#); se seleccionó una concentración de 1.0 mg mL^{-1} debido a las buenas intensidades de señal y la buena repetibilidad. Es importante mencionar que la selección de una concentración relativamente baja de matriz química fue consistente con los resultados de otros estudios [129, 159, 163].

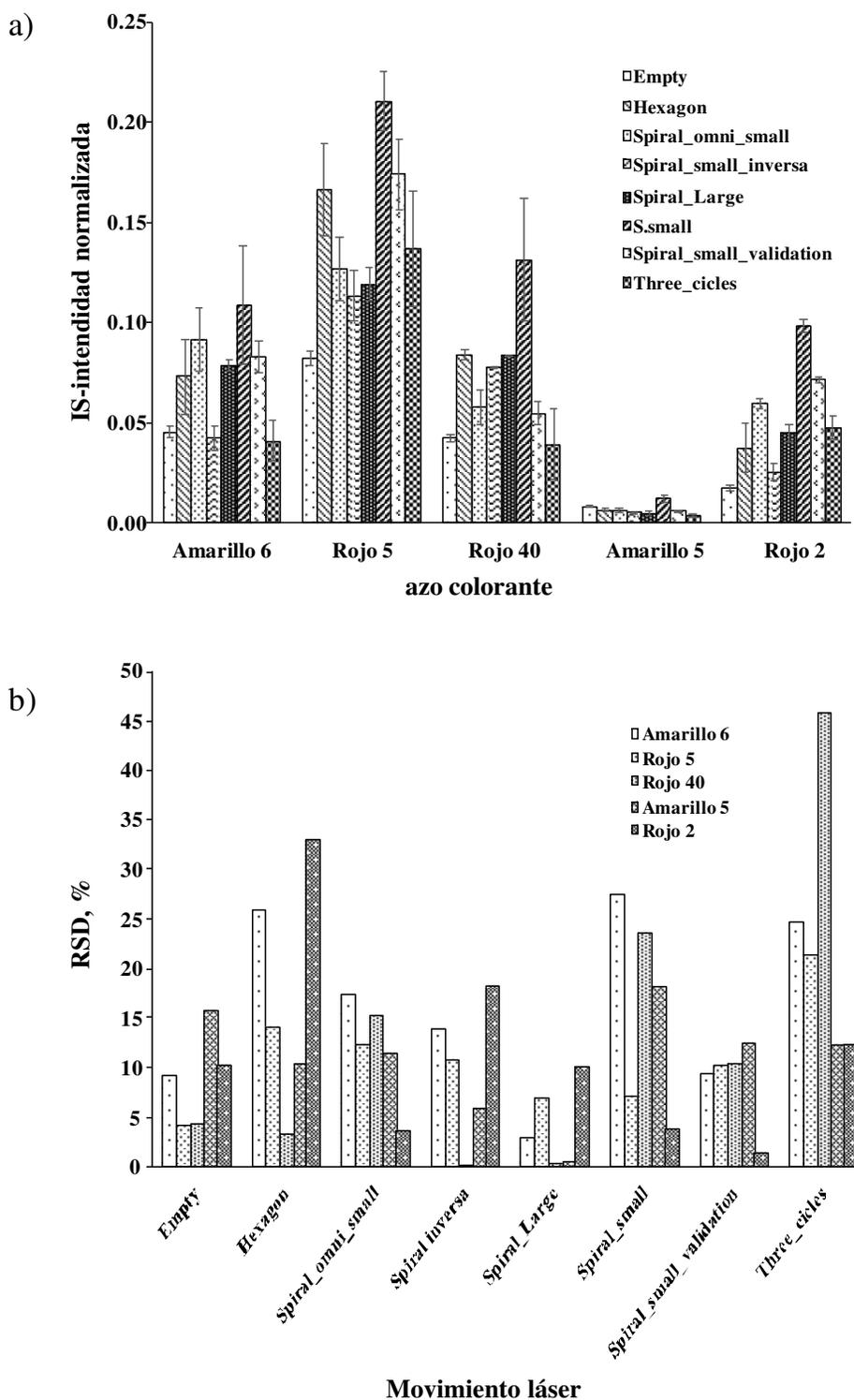
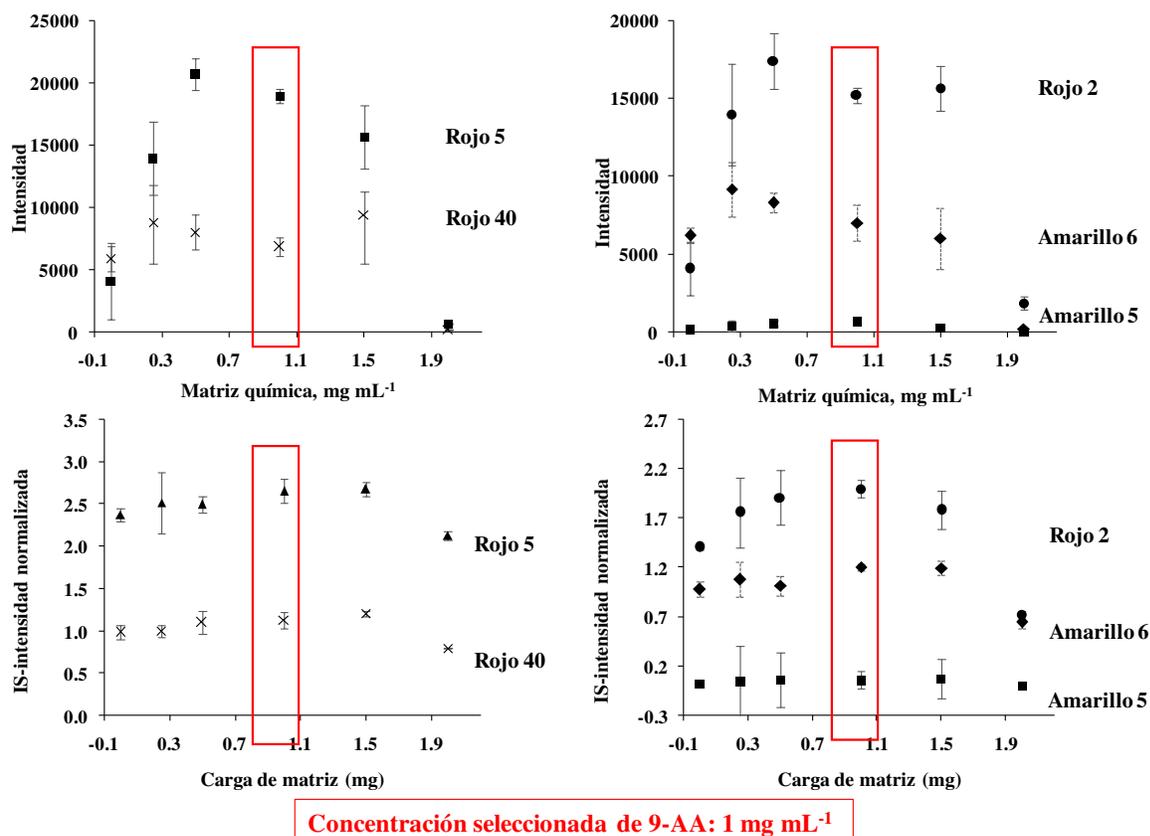


Figura 40 Evaluación comparativa de diferentes modos automáticos del movimiento de láser; $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS; 20 espectros instantáneos en promedio por disparo del láser y una suma de 600 espectros por ciclo de movimiento del láser. a) Valores medios con sus respectivas desviaciones estándar calculadas para cinco réplicas de cada modo automático y cada colorante. b) Desviaciones estándar relativas (RSD, %) calculadas para los resultados presentados en a).



Concentración seleccionada de 9-AA: 1 mg mL⁻¹

Figura 41 Efecto de la concentración de 9-aminoacridina (9-AA, matriz química), sobre la intensidad y repetibilidad de señales analíticas. (600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS, señales espectrales adquiridas después de la extracción a cloroformo y deposición "sándwich" en el objetivo - 600 disparos láser acumulados; condiciones finales aplicadas como se describe en materiales y métodos. Los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar se presentan para 5 repeticiones).

Calibración y validación del procedimiento MALDI-TOF MS

Las soluciones de calibración se prepararon como se describe en la sección de materiales y métodos; después de la adición de BTAB y realizar una extracción con cloroformo, se adquirieron los espectros respectivos en tres replicas independientes (depósitos en tres pocillos en la placa del porta muestra), utilizando las condiciones anteriormente seleccionadas. Los espectros típicos obtenidos en el proceso de calibración se presentan en la [Figura 42](#). Para cada analito, la función de regresión lineal se obtuvo utilizando el promedio de las señales del analito (el ion mono-isotópico más intenso) normalizadas con la del IS. [142]. En la [Tabla 12](#) se presentan los parámetros analíticos del método de cuantificación propuesto; cabe señalar que, sin la

normalización por IS, tanto la linealidad como la repetibilidad fueron claramente peores ($R^2 < 0.98$). Los límites de detección y cuantificación (DL y QL, respectivamente) se evaluaron sobre la base de una relación señal-ruido 3 y 10, respectivamente, utilizando el estándar de calibración más bajo y adquiriendo el ruido individualmente para cada compuesto, en las proximidades de sus valores m/z . Los límites de detección y cuantificación del método (método DL y QL, respectivamente) se calcularon sobre la base de las señales del analito adquiridas en presencia de la muestra 4 la cual no contenía ninguno de los azo colorantes sulfonados analizados en este trabajo. Para la muestra 4, se tomaron 40 μL del extracto de agua/metanol; sin embargo, como se describió anteriormente, este volumen podría aumentarse hasta 100 μL y, por lo tanto, los métodos DLs y QLs para ambas alícuotas se incluyen en la [Tabla 12](#). Se puede observar que la capacidad de detección/cuantificación del procedimiento mejoró proporcionalmente al incrementar el volumen.

Cabe mencionar que los parámetros más pobres se obtuvieron para Amarillo 5; entre los seis colorantes, este compuesto presenta la polaridad más alta, lo que podría resultar en un proceso de desorción/ionización menos eficiente. No obstante, el límite de cuantificación del método evaluado para amarillo 5 permite verificar si un producto dado cumple con la legislación vigente; Los azo colorantes sulfonados son regulados en las salsas de Chile por el Codex Alimentarius CXS 306R-2011 con la concentración máxima permitida de amarillo 5 establecida en $100 \mu\text{g g}^{-1}$. Este colorante también está permitido de acuerdo con la normativa alimentaria de la Comunidad Europea con un límite máximo de 100 a $250 \mu\text{g g}^{-1}$ (individualmente o en combinación con otros colorantes) [164]. En cuanto a los otros colorantes, la capacidad de cuantificación del procedimiento propuesto es igualmente adecuado con propósitos de control de alimentos. Específicamente, amarillo 6 y rojo 40 por la Comunidad Europea que los niveles máximos para compuestos individuales o en combinación con otros deben permanecer en el rango de $5\text{-}200 \mu\text{g g}^{-1}$ y $25\text{-}250 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente; su regulación en USA está debajo de los criterios de buenas prácticas de manufactura [164]. El rojo 2 no se encuentra permitido como aditivo alimenticio en algunos países y el rojo 5 está generalmente prohibido [144, 164].

Para demostrar la exactitud del procedimiento propuesto, se realizaron experimentos de recuperación mediante la adición de estándar de dos puntos, como se describió en la sección de materiales y métodos. Los espectros MALDI-TOF-MS registrados en el análisis de la muestra 6

se muestran en la [Figura 43](#) (Espectros completos presentados en la [Figura 44](#)). Por su parte, los resultados cuantitativos obtenidos para las muestras 6-4 se presentan en la [Tabla 13](#), observándose los valores de porcentaje de recuperación en un intervalo de 91.2-115% para amarillo 6, 85.4-113% para rojo 5, 89.6-108% para rojo 40, 87.2-107% para amarillo 5, y 84.6-111% para rojo 2. Los resultados del experimento de recobro son indicativos de un rendimiento analítico aceptable.

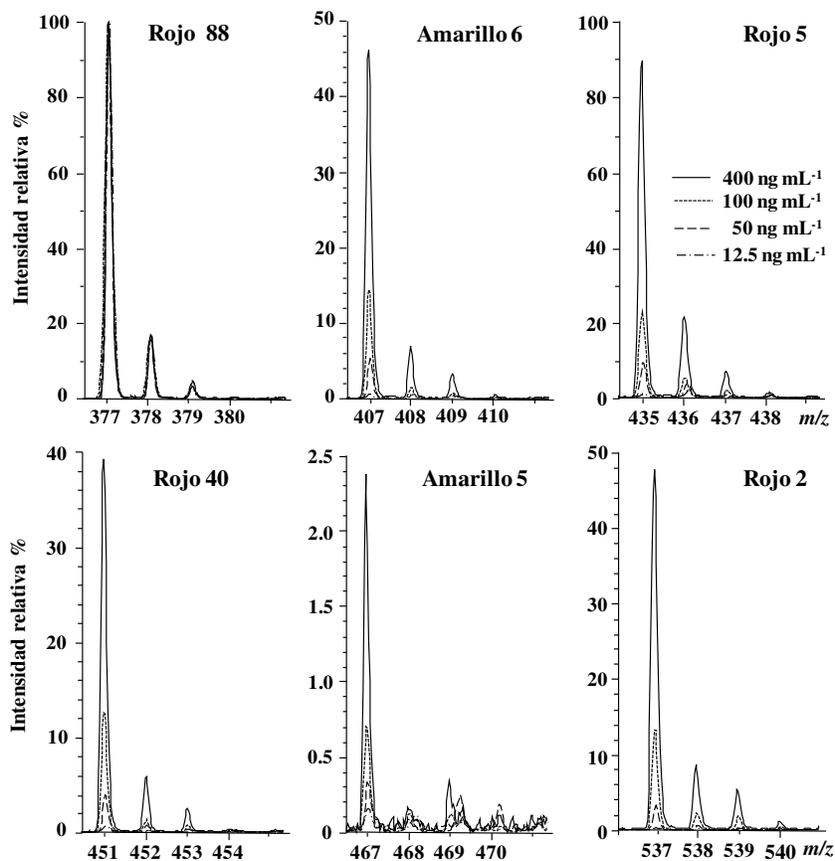


Figura 42 Espectros MALDI-TOF MS adquiridos para las soluciones de calibración y normalizados con el ion más intenso del IS (amarillo 6 - amarillo ocaso, rojo 5 - ponceau 4R, rojo 40 - rojo allura, amarillo 5 - tartrazina, rojo 2 - amaranto; 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de rojo 88 como IS; finalmente se seleccionó las condiciones experimentales e instrumentales como se describe en Materiales y métodos).

Tabla 12 Parámetros analíticos evaluados para cinco azo colorantes sulfonados usando el procedimiento propuesto por MALDI-TOF MS.

Parámetro	Amarillo ocaso	Ponceau 2R	Rojo allura	Tartrazina	Amaranto
<i>m/z</i>	407.1	435.1	451.1	466.1	537.1
Rango de calibración, $\mu\text{g L}^{-1}$	12.5 - 600	12.5 - 800	12.5 - 600	25 - 400	12.5 - 600
Pendiente, s	1.557	2.924	1.417	0.118	1.642
(SD para s)	(0.064)	(0.102)	(0.056)	(0.010)	(0.059)
Intercepto, b	0.0234	0.0423	0.0186	0.0029	0.0299
(SD para b)	(0.0036)	(0.0072)	(0.0033)	(0.0011)	(0.0048)
R^2	0.9967	0.9980	0.9986	0.9968	0.9983
(SD para R^2)	(0.0017)	(0.0023)	(0.0025)	(0.0015)	(0.0012)
DL, $\mu\text{g L}^{-1}$	4.54	2.18	3.63	42.9	4.37
QL, $\mu\text{g L}^{-1}$	14.8	7.28	12.1	143	14.6
Método DL ^a , $\mu\text{g g}^{-1}$	2.3	1.1	1.8	22	2.2
Método QL ^a , $\mu\text{g g}^{-1}$	7.6	3.6	6.1	72	7.3
Método DL ^b , $\mu\text{g g}^{-1}$	0.93	0.45	0.73	8.6	0.87
Método QL ^b , $\mu\text{g g}^{-1}$	3.10	1.50	2.44	29.0	2.90

Las funciones de regresión lineal fueron obtenidas para intensidades normalizadas por el IS de los iones mono-isotópicos, los límites de detección y cuantificación (DL, QL) se calcularon acorde a la guía ICH. (SD para tres diferentes muestras).

^a DLs y QLs del método, evaluados sobre la base de una alícuota de muestra 4 de 40- μL .

^b DLs y QLs del método, evaluados sobre la base de una alícuota de muestra 4 de 100- μL .

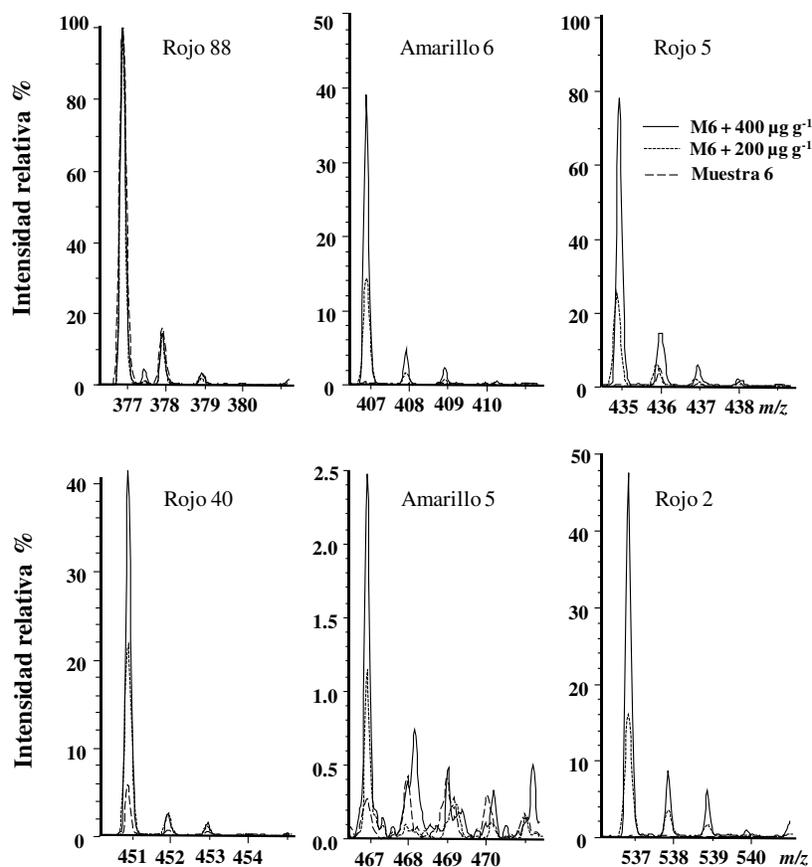


Figura 43 Señales MALDI-TOF MS adquiridas para la muestra 6 (línea discontinua), esta misma muestra con la adición estándar de cada analito correspondiente a 200 µg g⁻¹ (línea punteada) y 400 µg g⁻¹ (línea continua) de cada analito. Los espectros se normalizaron por la señal más intensa (amarillo 6, amarillo ocaso; rojo 5, ponceau 2R; rojo 40, rojo allura; amarillo 5, tartrazina; rojo 2, amaranto; rojo ácido 88 como IS).

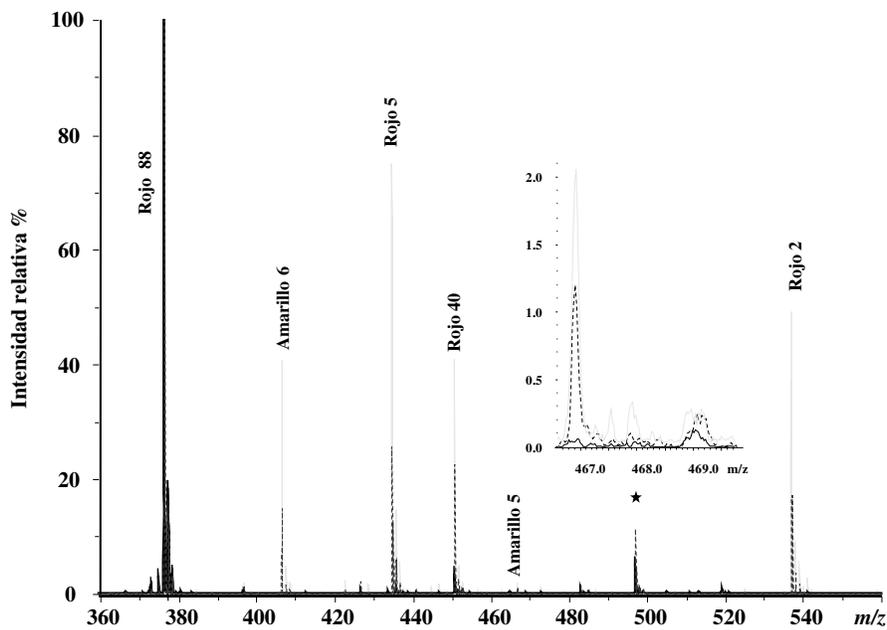


Figura 44 Espectros completos MALDI-TOFMS adquiridos para la muestra 6 (línea continua), esta misma muestra con la adición estándar de cada analito correspondiente a $200 \mu\text{g g}^{-1}$ (línea discontinua) y $400 \mu\text{g g}^{-1}$ (línea continua gris) de cada analito. Los espectros se normalizaron con la señal más intensa. (Amarillo 6-amarillo oca, rojo 5-ponceau 2R, rojo 40-rojo allura, amarillo 5-tartrazina, rojo 2-amaranto; $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$ de rojo ácido 88 como IS; finalmente condiciones experimentales e instrumentales seleccionados como se describe en Materiales y métodos).

Tabla 13 Resultados de recuperación obtenidos después de la adición estándar a las muestras 4-6.

Colorante	Muestra 4			Muestra 5			Muestra 6		
	Añadido	Determinado	R	Añadido	Determinado	R	Añadido	Determinado	R
	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	%	$\mu\text{g g}^{-1}$	$\mu\text{g g}^{-1}$	%
Amarillo 6	0	ND	-	0	26.9 \pm 1.3	-	0	ND	-
	50	53.5 \pm 3.2	107	50	80.5 \pm 1.1	107	200	214 \pm 7	107
	100	91.2 \pm 2.2	91.2	100	137 \pm 2	110	400	458 \pm 11	115
Rojo 5	0	ND	-	0	ND	-	0	ND	-
	50	52.4 \pm 1.7	105	50	42.7 \pm 1.7	85.4	200	199 \pm 14	99.5
	100	103 \pm 4	103	100	103 \pm 5	103	400	452 \pm 16	113
Rojo 40	0	ND	-	0	ND	-	0	110 \pm 4	-
	50	54.2 \pm 2.5	108	50	44.8 \pm 1.6	89.6	200	306 \pm 3	98.0
	100	96.5 \pm 1.5	96.5	100	91.5 \pm 3.8	91.5	400	526 \pm 5	104
Amarillo 5	0	ND	-	0	ND	-	0	<LQ	-
	50	51.3 \pm 1.0	103	50	49.3 \pm 2.1	98.6	200	174 \pm 8	87.2
	100	98.8 \pm 1.2	98.8	100	107 \pm 4	107	400	362 \pm 6	90.5
Rojo 2	0	ND	-	0	ND	-	0	ND	-
	50	50.0 \pm 3.2	100	50	42.3 \pm 2.1	84.6	200	193 \pm 4	96.5
	100	98.3 \pm 3.5	98.3	100	89.7 \pm 2.2	89.7	400	442 \pm 8	111

Descripción detallada proporcionada en la sección de materiales y métodos; valores medios y desviaciones estándar calculadas para tres repeticiones amarillo 6-amarillo ocaso, rojo5-ponceau 2R, rojo 40-rojo allura, amarillo5-tartrazina, rojo 2-amaranto, ND no detectado.

Resultados procedimiento HPLC

Con el fin de validar el procedimiento propuesto, se llevó a cabo el análisis mediante separación de pares iónicos de los colorantes con trietilamina por cromatografía de líquidos en una columna de fase inversa con detección espectrofotométrica de matriz de yoduros (HPLC-DAD), adoptando las condiciones descritas anteriormente con modificaciones menores [158]. Específicamente, se utilizó una columna diferente (Kinetex, 150 x 3 mm, 2.6 μm) y, dado que se utilizó una cantidad menor de colorantes con respecto al estudio citado, se modificó el gradiente de elución y con ello, el tiempo total de separación (corrida analítica de 15 min en comparación a los 40 minutos reportados). El orden de elución fue el siguiente: tartrazina (5.47 ± 0.03 min), ponceau 2R (6.52 ± 0.09 min), amarillo ocaso (8.12 ± 0.07 min), rojo allura (8.97 ± 0.08 min), y amaranto (10.20 ± 0.07 min). Los cromatogramas típicos registrados para la solución de estándares y para la muestra 6 se presentan en la [Figura 45](#). La calibración se realizó en el intervalo de concentraciones de $0.15\text{-}5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada compuesto, y los parámetros analíticos obtenidos se muestran en la [Tabla 14](#). Los límites de detección instrumentales fueron más altos que las reportadas anteriormente ($27.8\text{-}54.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra $10 \mu\text{g mL}^{-1}$) [158], sin embargo, se consideran adecuados para el propósito de este trabajo.

Los extractos de chile en polvo se prepararon conforme al procedimiento MALDI-TOF MS; se evaporaron $700 \mu\text{L}$ de muestra agua/metanol, se reconstruyeron en $250 \mu\text{L}$ de la fase móvil, y se diluyeron diez veces ($5 \mu\text{L}$ inyección). Los límites de detección y cuantificación del método se encontraban en el rango de $1.99\text{-}3.87 \mu\text{g g}^{-1}$ y $6.62\text{-}12.9 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente ([Tabla 14](#)). Cabe destacar que, para los otros cuatro analitos, a excepción del amarillo 5, el poder de detección del procedimiento MALDI-TOF MS fue mejor ([Tabla 12](#)) a pesar de que se cargaron cantidades menores de muestra en el instrumento: $40\text{-}100 \mu\text{L}$ del extracto de muestra inicial, un volumen final de $500 \mu\text{L}$ (fase cloroformo), y $1 \mu\text{L}$ deposición para MALDI-TOF MS.

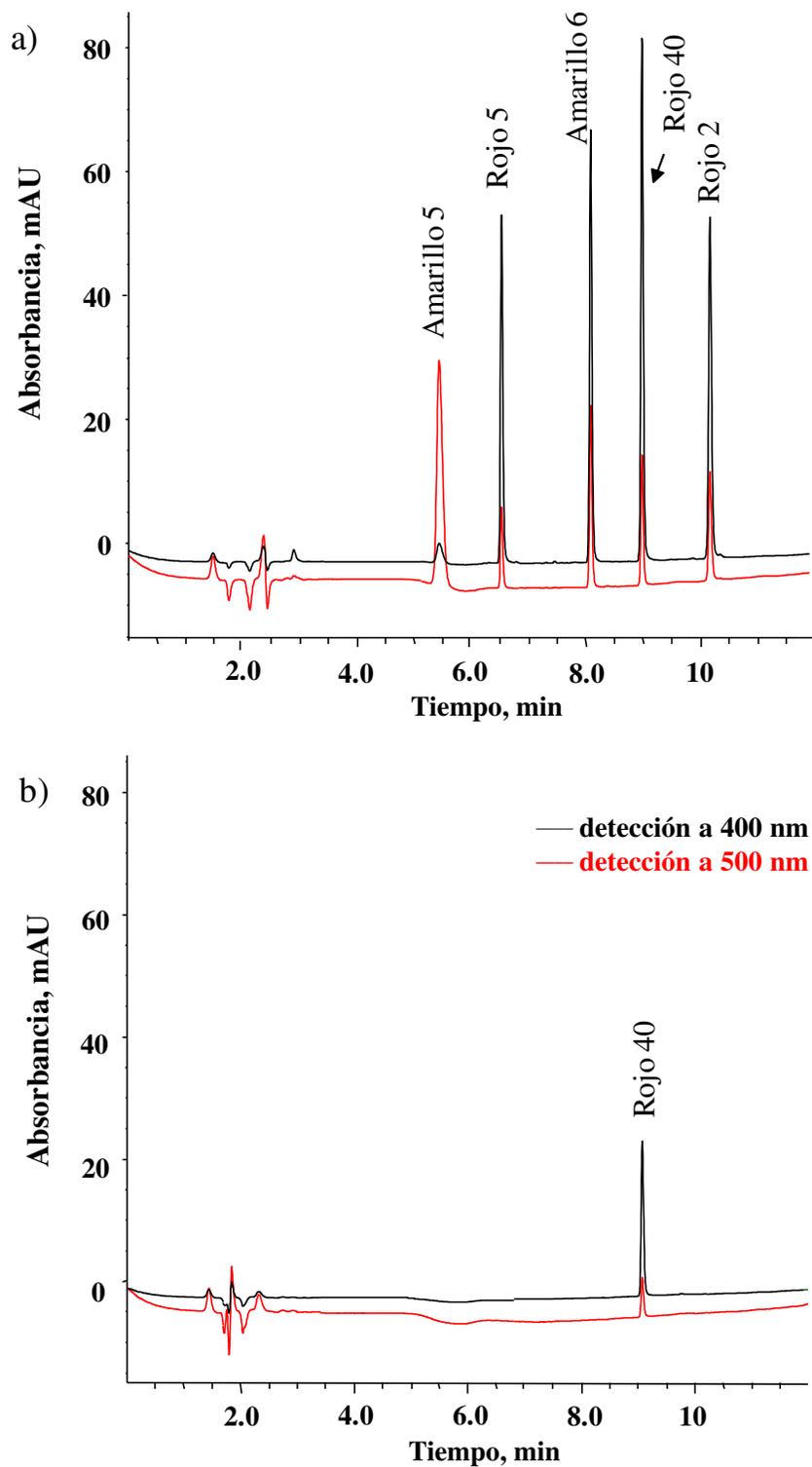


Figura 45 Cromatogramas típicos de HPLC-DAD obtenidos para: (a) mezcla estándar conteniendo 5.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito (amarillo 6-amarillo oca, rojo 5-ponceau 2R, rojo 40-rojo allura, amarillo 5-tartrazina, rojo 2-amaranto); (b) muestra 6 (rojo allura 107 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Tabla 14 Parámetros analíticos evaluados para cinco colorantes azoicos sulfonados usando el procedimiento HPLC-DAD: Amarillo 6 – amarillo ocaso, rojo 5 – ponceau 2R, rojo 40 – rojo allura, amarillo 5 – tartrazina, rojo 2 – amaranto).

Parámetro	Amarillo 5	Rojo 5	Amarillo 6	Rojo 40	Rojo 2
Longitud de onda analítica, nm	400	500	400	500	500
Tiempo de retención, min	547 ± 0.03	6.52 ± 0.09	8.12 ± 0.07	8.97 ± 0.08	10.2 ± 0.1
Intervalo de calibración, µg mL ⁻¹	0.15 – 5.0	0.15 – 5.0	0.15 – 5.0	0.15 – 50	0.15 – 55.0
Pendiente, s	51.25	32.48	41.78	51.05	38.86
(SD para s)	(0.23)	(0.73)	(0.12)	(0.12)	(0.64)
Intercepto, b	2.52	5.08	3.24	3.42	2.83
(SD para b)	(1.0)	(0.56)	(0.10)	(0.09)	(0.51)
R ²	0.9994	0.9988	0.9991	0.9990	0.9983
(SD para R ²)	(0.0004)	(0.0002)	(0.0001)	(0.0001)	(0.0002)
DL, µg mL ⁻¹	27.8	54.2	42.1	34.5	45.3
QL, µg mL ⁻¹	92.7	181	140	115	151
DL método, µg g ⁻¹	1.99	3.87	3.00	2.46	3.24
QL método, µg g ⁻¹	6.62	12.9	10.0	8.21	10.8

Funciones de regresión lineal obtenidas para las áreas de pico de los distintos colorantes: desviación estándar para tres réplicas independientes; límites de detección y cuantificación instrumentales y del método calculados de acuerdo con la guía ICH, utilizando la muestra 4.

Análisis de polvos de Chile

Los resultados obtenidos utilizando el procedimiento propuesto (MALDI-TOFMS) y el procedimiento HPLC-DAD para el análisis de 12 chiles en polvo comerciales se presentan en la [Tabla 15](#). Para gran mayoría de muestras y de colorantes, se observa una buena concordancia entre ambos procedimientos; en la aplicación de la prueba *t*, se encontró una diferencia significativa sólo para el amarillo 6 en la muestra 5 y para rojo 40 en la muestra 10 ($p < 0.05$). Por otro lado, para las muestras 3 y 6, se detectó amarillo 5, pero no pudo ser cuantificado por el procedimiento propuesto; los resultados HPLC-DAD confirmaron que las concentraciones de este colorante estaban por debajo del límite de cuantificación del método de MALDI-TOF MS

(Tabla 12). En general, los resultados obtenidos indican una buena confiabilidad analítica del procedimiento propuesto mediante MALDI-TOF MS. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que de acuerdo con los resultados en la Tabla 15, la precisión fue mejor para el análisis cromatográfico (RSD 0.5-2.8%) que para MALDI-TOF MS (RSD 2.9-6.5%).

La adición de azo colorantes fue reportada por los fabricantes para cinco chiles en polvo (muestras 2-5, 12). Nuestros resultados corroboran la presencia de rojo 40 en la muestra 2, mientras que ninguno de los cinco colorantes se detectó en la muestra 4, a pesar de que la etiqueta del producto menciona lo contrario. Para la muestra 3 y 12, el amarillo 6 y amarillo 5 coincidieron con la información proporcionada en la etiqueta de los productos, pero en la muestra 5 sólo se encontró el amarillo 6. Aunque no se reportó la adición de azo colorantes para los otros siete productos, seis de ellos contenían rojo 40 en un intervalo de 32.5-535 $\mu\text{g g}^{-1}$; en la muestra 6, también se detectó amarillo 5 (de acuerdo con los resultados MALDI-TOF MS). Entre los 12 productos comerciales analizados, solo dos (4,11) se encontraban libres de azo colorantes sulfonados (o contenían concentraciones por debajo de los límites de detección del método respectivo de los dos procedimientos). Estos hallazgos son relevantes debido a que tres de los colorantes analizados (rojo 2, rojo 5, y rojo 40) se encuentran prohibidos en ciertos países, incluyendo USA [165]. De acuerdo con la Directiva 94/36/EC del Parlamento y Consejo Europeo, el nivel máximo permitido de rojo 5 en decoraciones, sazonadores, salsas en polvo, y productos similares corresponde a 500 $\mu\text{g g}^{-1}$. En el análisis de chile en polvo comercializados en Taiwán y China, no se detectaron los azo colorantes sulfonados [166, 167] y no se encontraron otros datos cuantitativos para este tipo de productos. Por otro lado, se reportó un amplio rango de concentraciones para otros alimentos en polvo, como se muestran en los siguientes ejemplos; 13.50 \pm 0.69 amarillo 6 en bebidas en polvo de China [168]; 9.22 $\mu\text{g g}^{-1}$ rojo 2, 91 $\mu\text{g g}^{-1}$ rojo 5, 108 $\mu\text{g g}^{-1}$ rojo 40 en gelatinas de fruta de Irán [169]; 25.7-36.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ Rojo 40 en bebidas mexicanas [170]; 51-51 $\mu\text{g g}^{-1}$ amarillo 6, 26-26 $\mu\text{g g}^{-1}$ rojo 40, 81 \pm 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ amarillo 5 en polvos de refrescos turcos [171]. Estos datos junto a los resultados obtenidos en este trabajo claramente indican la necesidad de controlar azo colorantes sulfonados en alimentos en polvo y el procedimiento MALDI-TOF-OMS propuesto es adecuado para este propósito. Cabe señalar que, la adquisición de datos, incluyendo cinco puntos de calibración y 12 muestras (todas ellas en tres

réplicas), tarda menos de 20 minutos, lo que significa un tiempo menor en comparación a otras técnicas analíticas.

Tabla 15 Resultados obtenidos para la determinación de colorantes azoicos sulfonados en productos comerciales mediante dos procedimientos analíticos.

Muestra	MALDI-TOF MS		HPLC-DAD			
	Amarillo 6	Rojo 40	Amarillo 5	Amarillo 6	Rojo 40	Amarillo 5
1	< DL	521 ±21	<LQ	< DL	551 ± 11	< DL
2	< DL	1125 ± 73	<DL	< DL	1096 ± 27	< DL
3	102 ± 3	< DL	<LQ	99.6 ± 0.5	< DL	31.5 ± 2.1
4	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
5	26.9 ± 1.7*	< DL	<DL	30.2 ±0.7*	< DL	< DL
6	< DL	110 ± 4	<LQ	< DL	107 ±1	52.4 ±1.3
7	< DL	264 ± 15	< DL	< DL	282 ± 3	< DL
8	< DL	483 ± 15	< DL	< DL	500 ±4	< DL
9	< DL	535 ± 23	< DL	< DL	518 ± 8	< DL
10	< DL	32.5 ±2.1*	< DL	< DL	28.3 ± 0.8*	< DL
11	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
12	220 ± 8	< DL	293 ±11	218 ±2	< DL	306±3

Ponceau 2R y amaranto no fueron detectados en ninguna muestra. Los valores medios son proporcionados con sus respectivas desviaciones estándar ($\mu\text{g g}^{-1}$).

* Diferencia estadística detectada, test *t*, $p < 0.05$

4.3.5 Conclusiones

En este trabajo, se propone un procedimiento simple mediante MALDI-TOF-MS para la determinación de cinco colorantes azo sulfonados en polvos de Chile. Para el pretratamiento de muestra, se añadió un surfactante catiónico, bromuro de benciltributilamonio (BTAB), produciendo una extracción selectiva y eficiente de especies aniónicas en forma de pares iónicos a cloroformo, y una co-cristalización uniforme de los compuestos de interés con la matriz química en la placa MALDI. BTAB también permitió reducir el ruido de fondo espectral, específicamente se favoreció la formación de iones protonados sobre los aductos con sodio. Las

imprecisiones debidas a la fluctuación de señales, típicas en el análisis de pequeñas moléculas por MALDI-TOF-MS, podrían controlarse por la aplicación de rojo 88 como estándar interno. Los experimentos sistemáticos mostraron que la concentración de BTAB, el pH de la fase acuosa, la técnica de deposición de muestra, la concentración de 9-AA como matriz química, el número de espectros instantáneos por disparo laser, y el movimiento del láser durante la adquisición de datos fueron los parámetros clave que influyeron en el rendimiento analítico. Utilizando las condiciones finales y la carga de muestra más alta correspondiente a 100 μL del extracto agua/metanol, los límites de cuantificación del método para amarillo 6, rojo 5, rojo 40, y rojo 2 se encontraban en el intervalo de 1.50-3.10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (29.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ para amarillo 5). Los resultados obtenidos confirman que, en la presencia del surfactante, los compuestos objetivos tienden a acumularse cerca de la superficie; por lo tanto, una deposición de muestra tipo “sándwich” y un pequeño número de espectros instantáneos (20) fueron lo más apropiado. Para la adición de estándar de dos puntos, los porcentajes de recuperación obtenidos para tres muestras diferentes estuvieron en el intervalo 84.6-115% para los cinco colorantes azo sulfonados y los resultados de cuantificación para 12 productos comerciales coincidieron con los datos de HPLC-DAD, lo cual es indicativo de una buena exactitud del procedimiento MALDI-TOF MS. El rojo allura (rojo 40) se encontró como el principal colorante azo sulfonado en polvos de chile, este se presentó en siete productos a concentraciones de $32.5 \pm 2.1 \mu\text{g g}^{-1}$ hasta $1125 \pm 73 \mu\text{g g}^{-1}$; otros dos colorantes añadidos en concentraciones más bajas y determinados en un menor número de muestras fueron el amarillo ocaso (amarillo 6) y tartrazina (amarillo 5). Para nueve muestras (75% de todas las analizadas), los resultados obtenidos no fueron consistentes con la información proporcionada por los fabricantes, lo que claramente indica la necesidad de un control estricto de azo colorantes sulfonados (entre otros aditivos) en productos alimenticios comerciales. El procedimiento MALDI-TOF-MS propuesto es una alternativa viable para esta tarea analítica y posee grandes ventajas como el no presentar efectos memoria, ser un procedimiento simple, proporcionar una alta velocidad de adquisición de datos y un mínimo costo de operación del instrumento. Sin embargo, es conveniente mencionar que el procedimiento propuesto tiene una precisión menor a los métodos HPLC bien establecidos.

4.4 Fraccionamiento Isotópico de magnesio en Clorofila-a extraído de dos plantas con diferentes vías de fijación de carbono (C3, C4)

4.4.1 Introducción

El fenómeno del fraccionamiento de isotopos estables, dependiente de la masa se encuentra bien documentado para varios elementos tanto en sistemas abióticos como bióticos [172]. Este fenómeno ocurre como resultado de uno o varios procesos fisicoquímicos o biológicos en los que existe preferencia por el isotopo pesado o ligero y por ello, la abundancia relativa de isótopos queda modificada. Los datos analíticos son útiles en la evaluación de los ciclos biogeoquímicos de elementos y son necesarios para un mejor entendimiento de sus vías isotopo-dependientes en organismos vivos [173, 174], teniendo aplicaciones importantes en estudios de procedencia/autenticación de alimentos, en arqueometría, ciencias forenses, entre otros [175, 176]. Mientras que para elementos tradicionales (C, H, O, N, S), las mediciones de fraccionamiento de isotopos estables pueden llevarse a cabo rutinariamente, los estudios que se centran en isótopos estables de metales/metaloides no tradicionales son mucho más desafiantes debido al fraccionamiento menos pronunciado y a una mayor discriminación de las masas [174]. La espectrometría de masas de alta resolución (analizador de dos sectores de campo) con ionización en plasma acoplado inductivamente y con detector tipo multicolector (MC ICP-MS) es aceptada como un estándar de oro para proveer datos confiables del fraccionamiento de isótopos para metales de relevancia geoquímica y biológica [177, 178]. Esta técnica ofrece ionización eficiente, alta resolución de masas y mediciones de alta precisión con un requisito de muestra relativamente bajo y alto rendimiento. Por otro lado, MC ICP-MS es un complejo instrumento, sensible a la composición de la matriz de la muestra, susceptible a efectos de memoria e interferencias espectrales y que sufre del sesgo de masa [178]. Para lograr una alta exactitud y precisión, no sólo los parámetros de operación instrumentales deben seleccionarse cuidadosamente, sino que también se debe priorizar un extenso procedimiento de limpieza de la muestra. Para metales como el Mg, Ca, y Sr, el acoplamiento directo de la cromatografía iónica (IC) a MC ICP-MS ha sido propuesto como una alternativa factible simplificando la preparación de muestra [179-181]. En dicha configuración instrumental, el eluyente de la columna fue pasado a través de un supresor autorregenerativo para el reemplazo de los aniones de la fase móvil por iones OH⁻ y, entonces, sólo la fracción de la columna que contenía los metales de interés

entraban en el plasma. Esto se logró dentro de una válvula de inyección de seis puertos, donde en el efluente de la columna antes y después de la elución, se descartó mientras que la solución bracketing se dirigía al MC ICP-MS [179].

El magnesio es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, del cual sus tres isótopos más estables son, ^{24}Mg (78.99%), ^{25}Mg (10.00%), ^{26}Mg (11.01%) [172, 176, 182], los cuales presentan una baja variación en su distribución entre diferentes localidades ($\delta^{26}\text{Mg}$ de aproximadamente hasta 6%). Incluso aunque existan diferencias de masas relativamente grandes entre los tres isótopos y el Mg no tiene isótopos radiogénicos ni con actividad redox, las mediciones de fraccionamiento de isótopos aun así son demandantes, debido a las problemáticas de interferencias espectrales y a la necesidad de una alta precisión. En concordancia con estos experimentos, MC-ICP-MS proporciona una precisión de hasta 0.10 ‰ o en ocasiones mejor [172, 180, 183].

El magnesio es un importante nutriente mineral en todos los dominios de la vida y se ha prestado una atención considerable en descifrar el fraccionamiento de sus isótopos en plantas [172, 184, 185]. En los trabajos citados, se estudió el proceso de fraccionamiento que podría ocurrir durante el crecimiento de las plantas, la absorción de elementos del suelo o una solución nutritiva y durante su transporte de las raíces a las hojas. De acuerdo con el actual estado del arte, el enriquecimiento con isótopos pesados ocurre durante la captación de Mg, después de lo cual los isótopos ligeros son preferencialmente transportados a las hojas; sin embargo, el resultado observado siempre depende de condiciones medioambientales, disponibilidad de nutrientes, estrés impuesto externamente, y otras variables [172, 184, 185]. Es importante destacar que para la medición de relaciones isotópicas por MC ICP-MS, es necesaria la digestión y la eliminación de la matriz muestra lo más completamente posible. En la práctica se realiza la digestión ácida de la biomasa de una específica parte morfológica o de toda la planta y, por lo tanto, las contribuciones de procesos biológicos individuales no pueden ser evaluadas.

Por otro lado, existe demanda para tener una mejor comprensión de los procesos del fraccionamiento que potencialmente ocurren a nivel sub-celular; en este sentido, se ha estudiado el fraccionamiento de isótopos de Mg durante la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos [185-189] y este tema también se ha abordado mediante cálculos teóricos [190]. En estudios experimentales realizados en extractos de clorofila, se ha informado tanto el agotamiento [172, 185, 186] como en el enriquecimiento [187, 189] con isótopos pesados en pigmentos, en relación

con las hojas o el medio de cultivo. En este sentido, se ha propuesto que el fraccionamiento de isótopos ocurre durante la inserción de Mg en la protoporfirina IX por la quelatasa de magnesio, con quelación preferencial de isótopos de magnesio ligeros dentro de la estructura de la enzima antes de su inserción en el sitio de coordinación [187].

Los datos experimentales de fraccionamiento de magnesio se han obtenido para plantas superiores que presentan vía de fijación de carbono C3 [185, 187], en cianobacterias [186, 188] y fitoplancton marino [189], mientras que las plantas C4 aún no han sido consideradas. Es de destacar que las plantas C4 han evolucionado en ambientes secos/cálidos para reducir la fotorrespiración y el riesgo de deshidratación, y para lograr una entrega más eficiente de CO₂ en la fotosíntesis [191]. El paso adicional de fijación de carbono en C4 con respecto a plantas C3 se basa en la conversión enzimática de CO₂ a ácido oxaloacético en las células mesófilas; este compuesto de cuatro carbonos es entonces transformado a malato y se entrega a las células de la vaina donde el CO₂ es liberado y se vuelve a fijar por la encima RuBisCO en el ciclo de Calvin-Benson. Bajo condiciones de alta intensidad de luz, temperaturas elevadas y limitaciones de agua y CO₂, la fotosíntesis es más eficiente en plantas C4; sin embargo, los requerimientos de energía en forma de adenosina trifosfato (ATP) también es superior [192].

Parece factible que un estado energético en cloroplastos de plantas C3 y C4 puedan tener un impacto en el fraccionamiento de isótopos de Mg durante la síntesis de clorofila. Para verificar este supuesto, se cultivaron berro de jardín (C3) y maíz (C4) [193] en exactamente las mismas condiciones hidropónicas y el fraccionamiento de isótopos de magnesio en clorofila-a se evaluó mediante cromatografía iónica (IC)-MC ICP-MS. Las fracciones de clorofila-a se obtuvieron de extractos de planta por cromatografía de fase inversa a escala preparativa y la identificación de compuestos se confirmó mediante espectrometría de masas de alta resolución. Se ha propuesto una posible justificación biológica de los resultados obtenidos.

4.4.2 Objetivos

Estudiar el fraccionamiento isotópico del magnesio en clorofila-a, en comparación con la solución nutriente y el tejido vegetal, en dos plantas con diferentes vías de fijación de carbono (C3 y C4) mediante MC ICP-MS acoplada a cromatografía iónica.

4.4.3 Objetivos Particulares

- Obtener cultivos hidropónicos de maíz (C4) y de berros (C3) en las mismas condiciones de temperatura, humedad, iluminación y con la misma composición de solución de nutrientes;
- Lograr la extracción de clorofilas y su separación por cromatografía de líquidos en una columna preparativa de exclusión por tamaño molecular;
- Confirmar la identidad de compuestos separados mediante FIA-ESI-QTOF-MS;
- Participar en el análisis de datos y en la discusión de resultados de fraccionamiento isotópico de Mg en fracción de clorofila-a de dos tipos de plantas (análisis IC-MC-ICP-MS realizado en la Universidad de Varsovia)

4.4.4 Materiales y métodos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Agua desionizada (18.2 M Ω cm, Water PROTM PS, Labconco, Kansas, MO, USA), metanol grado HPLC, isopropanol, dioxano y acetona adquiridos de Sigma (Milwaukee, WI, USA) fueron utilizados durante todo el trabajo.

Ácido nítrico ultrapuro y peróxido de hidrógeno fueron de J. T. Baker (Instra-Analyzed Plus).

El hipoclorito de sodio y el ácido metanosulfónico fueron reactivos de Sigma; la solución nutriente Hoagland modificada contenía Ca(NO₃)₂ (0.35mM), CaCl₂ (2.1mM), MgCl₂ (0.91mM), KH₂PO₄ (0.97 mM), KNO₃ (1.22 mM), H₃BO₃ (23 μ M), MnCl₂ (3.9 μ M), MoO₃ (23 μ M), Fe(NO₃)₃ (10 μ M), Zn(NO₃)₂ (0.37 μ M), CuSO₄ (0.44 μ M), pH 5.8, fue preparada de igual manera con reactivos Sigma [194].

El resto de los reactivos y materiales se utilizó en el laboratorio de la Universidad de Varsovia: Una solución estándar multi-elemental para ICP-MS que contenía Li, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, Ba, Tl, Pb, Bi, U a 9.8 mg L⁻¹, y Be, Fe, As, Se, Zn a 100 mg L⁻¹, de Merck ICP VI (Merck, Darmstadt, Germany).

El fraccionamiento isotópico se midió en relación con la solución estándar de Mg DSM-3 (Dead Sea Magnesium Ltd., Israel) y se utilizó el material de referencia Cambridge-1 con un valor de $\delta^{26}\text{Mg}$ en relación con DSM-3 -2.58 ± 0.14 (2 σ) [195].

Crecimiento de plantas y extracción de clorofila

Se adquirieron semillas de berro de jardín (*Lepidium setivum* cv. *Ogrodowa*) y de maíz (*Zea mays*) en mercados especializados en Polonia y México, respectivamente. Una vez esterilizada la superficie con hipoclorito de sodio al 3% *m/v* durante 20 min, las semillas fueron remojadas en agua desionizada por 60 min y posteriormente se germinaron y cultivaron hidropónicamente, utilizando el nutriente modificado Hoagland. Las bandejas con cultivos de plantas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento sin luz por las primeras 48 h y posteriormente, se aplicaron ciclos de doce horas de luz (6am-6pm, 25°C, 60.8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{S}^{-1}$ de irradiancia de fotones de una lámpara fluorescente) y oscuridad (6am-6pm, 18°C); la humedad relativa se mantuvo alrededor del 60%. La posición de las bandejas se cambiaba cada día dentro de la cámara de crecimiento para asegurar las mismas condiciones para todos los cultivos. Las partes verdes fueron cosechadas después del onceavo día. La [Figura 46](#), muestra una fotografía de los cultivos en la cámara de crecimiento justo antes de la cosecha. Para cada tipo de planta, la biomasa obtenida fue enjuagada dos veces con agua desionizada, inmediatamente homogenizada por trituración en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizada. El crecimiento de ambas plantas fue realizado dos veces: en junio y en septiembre del 2019, respectivamente (dos replicas biológicas).

La extracción de pigmentos se realizó como se describe en la literatura [196], con ligeras modificaciones. En cada etapa, las muestras se protegieron de la luz para evitar la degradación de la clorofila. Para resumir, 100 mL de metanol fueron añadidos a 4 g de biomasa liofilizada y después del vortex, la mezcla se mantuvo a 4°C por 24 h. El residuo sólido se eliminó por filtración (Whatman 541); el filtro fue lavado dos veces con porciones de metanol 5 mL. Las clorofilas fueron precipitadas del filtrado por adición de dioxano y agua desionizada, produciendo la composición de metanol:dioxano:agua 10:1:1 (*v/v*). Para completar la precipitación, las muestras se dejaron a -20 °C por 24 h y finalmente se filtraron. La fracción de clorofila fue lavada con dos porciones de 5 mL de la mezcla del solvente y finalmente disuelta en 10 mL de acetona. Un esquema general del procedimiento con fotografías tomadas en diferentes estados del procedimiento se presenta en la [Figura 46](#).

Dos extractos correspondientes a dos cosechas (junio y septiembre 2019) fueron obtenidas para cada planta.

Purificación de Clorofila-a y Análisis por FIA-ESI-QTOFMS

La separación de clorofilas en los extractos de acetona fue realizada usando un cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento Agilent 1200 con detector de arreglo de diodos y columna preparativa Zorbax 300 SB-C18 (250 x 9.4 mm, 5 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se realizó una inyección manual a través de una válvula de inyección de seis puertos montada externamente (Rheodyne) con un loop de inyección de 500 μL . La columna fue mantenida a 40 $^{\circ}\text{C}$, se utilizó como fase móvil metanol:isopropanol (1:1, v/v) a 2.5 mL min^{-1} de velocidad de flujo. Los cromatogramas fueron registrados con detección a 700 nm y 663 nm y las fracciones de clorofila-a se colectaron entre 4.4 min y 5.4 min de la corrida cromatográfica. Para el análisis de fraccionamiento isotópico, se realizaron aproximadamente 20 corridas cromatográficas y las fracciones de clorofila-a obtenidas para una cosecha fueron agrupadas y evaporadas (SpeedVac, Vacufuge plus, Eppendorf AG, Hamburg, Germany 45 $^{\circ}\text{C}$); esto se logró mediante la evaporación parcial de las respectivas fracciones individuales de columna en una serie de tubos Eppendorf y combinaciones sucesivas de alícuotas para obtener finalmente clorofila-a sólida de cada planta y de cada una de las dos cosechas, en un solo tubo. Se obtuvieron dos tubos por planta, cada uno correspondiente a diferentes cosechas (junio y septiembre 2019).

Para confirmar la identidad de las clorofilas, se recolectaron las fracciones I y II de una corrida cromatográfica y se diluyeron con 1% v/v ácido fórmico. Las soluciones fueron ingresadas a la fuente de ionización del espectrómetro de masas de alta resolución (ESI-QTOF MS, modelo maXis impact con paquete Data Analysis 4.1, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). La introducción se realizó utilizando un montaje del sistema FIA descrito anteriormente: formiato de amonio 10 mM en metanol-isopropanol 1:1 v/v como solución portadora, volumen de inyección 4 μL , velocidad de flujo 80 $\mu\text{L min}^{-1}$. El fijador de masa se aplicó directamente en la fuente de ionización (formiato de sodio, m/z 1 221.9906). La fuente ESI se operó en modo positivo con un voltaje de nebulización de iones de 4 500 V, compensación de placa final 500 V, gas de secado 4 L min^{-1} , temperatura de secado 180 $^{\circ}\text{C}$ y presión de gas de nebulizado 0.4 bar; el rango de masas m/z fue de 50 a 1 250.

Digestión de muestras y determinación de elementos por ICP-MS

Esta parte experimental se llevó a cabo en la Universidad de Varsovia; con el fin de proporcionar la información completa, se describe a continuación el procedimiento realizado allí. Para la determinación de Mg total en la biomasa liofilizada y en extractos de acetona, respectivamente, 50 mg y 0.5 mL de alícuota fueron digeridos en un Milestone Ethos One Microwave Digestion System, usando 5 mL de ácido nítrico concentrado y el siguiente programa: 15 min de rampa a 180 °C y 40 bar, mantener por 10 min. Las muestras se diluyeron apropiadamente y se introdujeron al cuadrupolo ICP-MS (Perkin Elmer NexION300D, Waltham, MA, USA); se monitoreó el isótopo ^{26}Mg . Además, el magnesio se determinó también en la solución nutritiva, después de una apropiada dilución.

Para la determinación de elementos totales y mediciones isotópicas en la fracción de clorofila-a, se añadió 1 mL de ácido nítrico concentrado a un tubo Eppendorf que contenía las fracciones respectivas de la columna, agrupadas y evaporadas, y las muestras fueron dejadas a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente, el contenido del tubo fue transferido a un recipiente de PTFE, 3 mL de ácido nítrico concentrado fueron añadidos, y una digestión asistida por microondas fue realizada en condiciones similares a las anteriores: 15 min de rampa a 180 °C y 40 bar, entonces se mantuvo por 25 min. Una vez enfriado a temperatura ambiente el tubo, 1 mL de peróxido de hidrógeno fue añadido, y el programa de temperatura fue repetido. La solución obtenida se transfirió cuantitativamente a un tubo Falcon que se colocó en agua hirviendo hasta su completa evaporación (aproximadamente 7 h). El residuo sólido fue disuelto en un volumen apropiado de agua con una pequeña adición de ácido nítrico para la obtención de una concentración final de magnesio de aproximadamente 1 mg L⁻¹ y una concentración de ácido de 0.02 M. En paralelo, 50 mg de alícuotas de la biomasa liofilizada de cada cosecha, DSM-3 (1000 µg L⁻¹ de Mg), Cambridge-1 (1 000 µg L⁻¹ de Mg), y un blanco fueron procesados. Para examinar la posible pérdida de magnesio durante las operaciones anteriores, se tomó una alícuota de 50 µL después de cada paso de la digestión y el Mg total fue determinado por ICP-MS convencional (equipado con cuadrupolo). Adicionalmente, los elementos que potencialmente afectan las mediciones isotópicas de Mg fueron determinados en la solución final (^{23}Na , ^{27}Al , ^{44}Ca , ^{57}Fe , ^{68}Zn).

Análisis por Cromatografía Iónica en acoplamiento con MC ICP-MS

La [Figura 47](#) muestra un esquema de la configuración instrumental adoptada [180]. Una alícuota de 25 μL de muestra se mezcló en un automuestreador (AS-D) con fase móvil y se introdujo a un cromatógrafo iónico (Dionex ICS-5000+, Thermo Scientific, Dreieich, Germany), en el cual fue montada una columna de intercambio de cationes inorgánicos IonPacKC16 (3 \times 250 mm, 5 μm) con un guarda columnas IonPac CG16 (3 \times 50 mm). La columna se mantuvo a 40 $^{\circ}\text{C}$, como fase móvil se utilizó el ácido metano sulfónico 51 mM a un flujo de 0.36 mL min^{-1} . El efluente de la columna se pasó a través del supresor de iones auto-regenerativo (CDRS 600 2 mm) operado a 20 $^{\circ}\text{C}$ y posteriormente, se llevó a través de un detector de conductividad a una válvula de seis puertos. De esta manera, únicamente la fracción de la columna correspondiente a la elución de Mg (de 7.0 min a 9.5 min) se dirigió al plasma, mientras que, durante el resto de la corrida cromatográfica, el efluente de la columna se descartó y la solución bracketing (DMS-3) se bombeó al nebulizador con un caudal de flujo 0.36 mL min^{-1} . Se utilizó el nebulizador de desolvatación Aridus II (CETAC Technologies, Omaha, NE, USA), configurando las temperaturas de la cámara de niebla y del desolvatador a 120 $^{\circ}\text{C}$ y 160 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente; la velocidad de flujo del gas de arrastre (Ar) fue aproximadamente 7.50 L min^{-1} y la velocidad de flujo del gas nebulizador (Ar) fue de 0.50 L min^{-1} . Se utilizó un modelo espectrómetro de masas modelo “Plasma II” multicolector de alta resolución equipado con 16 copas de Faraday (Un Instruments, Wrexham, UK). El plasma fue operado a un poder de RF de 1 300 W, un flujo de gas refrigerante de 13.6 L min^{-1} y una velocidad de flujo de gas auxiliar de 1.17 L min^{-1} ; conos de interfaz de níquel fueron utilizados. Tres colectores (L-4, H-2, H-8) se utilizaron para las mediciones de isótopos de magnesio 24, 25, y 26, respectivamente, con tiempos de integración para cada isótopo de 0.5 s. Para cada isótopo, el magnesio eluido de la columna fue registrado como un pico transitorio y el área total fue integrada. En contraste, el Mg de la solución bracketing produce dos picos superiores planos (antes y después de la elución del Mg de la columna) y se integraron las señales para cada isótopo de la región plana.

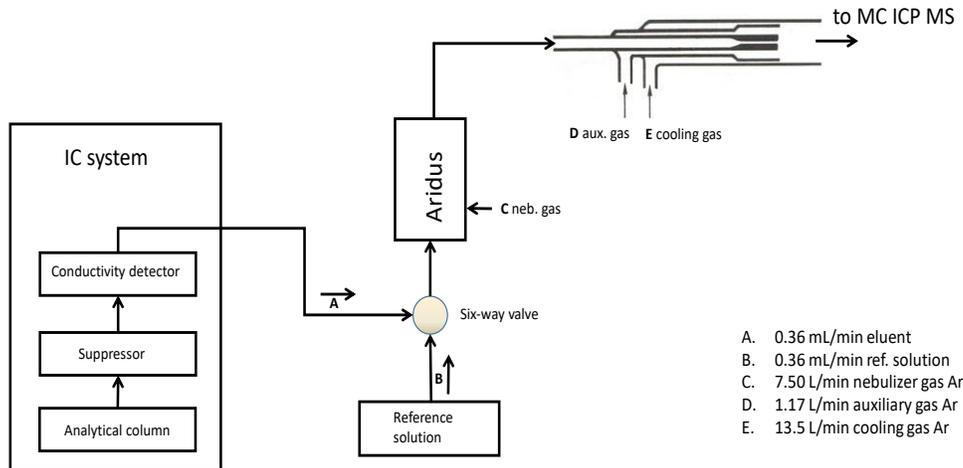


Figura 47 Representación esquemática de la configuración instrumental para las mediciones de isótopos de Mg [197].

El fraccionamiento isotópico del Mg en las muestras analizadas se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación, en el cual ^xMg corresponde a las señales de ^{25}Mg o ^{26}Mg :

$$\delta^x \text{Mg}(\text{‰}) = \left(\frac{\left(\frac{^x\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{muestra}}}{\left(\left(\frac{^x\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3(1)}} + \left(\frac{^x\text{Mg}}{^{24}\text{Mg}} \right)_{\text{DSM3(2)}} \right) / 2} - 1 \right) \times 1000$$

Análisis estadístico

Todas las mediciones por ICP-MS y IC-MC ICP-MS fueron llevadas a cabo en cinco réplicas; la estadística descriptiva fue realizada para obtener los valores medios y las respectivas desviaciones estándar (Microsoft Excel 2016, Microsoft, Munich. Germany).

4.4.5 Resultados y Discusión

La idea original de este trabajo fue examinar si diferente sistema de fijación de carbono en plantas C3 y C4 y si tiene algún efecto sobre el fraccionamiento de isótopos de magnesio en clorofila-a en estas plantas. Para ello, se trabajó con cultivos hidropónicos de maíz y berro de

jardín (plantas C4 y C3, respectivamente). Múltiples factores relacionados con el entorno de la planta, etapa de crecimiento, la parte morfológica, así como las condiciones aplicadas durante el pretratamiento de muestra, pueden afectar la fragmentación de isótopos. Para evitar la contribución de estas variables, ambas plantas fueron cultivadas y procesadas simultáneamente en exactamente las mismas condiciones de crecimiento, y aplicando el mismo protocolo de manejo, cosecha y tratamiento de muestra. Se prepararon dos replicas biológicas para cada planta, cultivándolas en junio y septiembre en 2019. En tal enfoque, los posibles cambios en el fraccionamiento de magnesio pueden ser atribuidos específicamente a la fisiología individual de la planta. En cada réplica biológica, se obtuvo un solo extracto combinado de clorofila-a para berro de jardín y para maíz, respectivamente; estos extractos se digirieron con ácido y fueron apropiadamente diluidos. Se realizaron cinco réplicas técnicas tomando alícuotas de dichas muestras preparadas para las mediciones mediante IC-MC-ICP-MS (en total 20 corridas analíticas). En paralelo, se midió el fraccionamiento de magnesio en las partes de las plantas recolectadas de dos réplicas biológicas, aplicando también cinco muestras biológicas (20 corridas analíticas por IC-MC-ICP-MS) después del mismo procedimiento de digestión.

Separación y caracterización de clorofila-a

Entre los diferentes protocolos para la extracción de pigmentos en las plantas, en este trabajo se adoptó aquel utilizado anteriormente para la determinación de la composición de isótopos de carbono y nitrógeno estables. Como se describe en la sección crecimiento de [plantas y separación de clorofilas](#), la separación de pigmentos se realizó mediante cromatografía a escala preparativa. Se observó la elución de tres fracciones con detección espectrofotométrica con arreglo de diodos, como se muestra en la [Figura 48](#); en la misma figura, se muestran los espectros de absorción adquiridos en el vértice de la primera y segunda fracción, aportando evidencia que las fracciones I y II correspondían a clorofila-b y clorofila-a, respectivamente. De hecho, el máximo de absorción para la fracción I correspondía a 654 nm y para la fracción II, dos máximos de absorción fueron observados (uno menos intenso a 616 nm y otro más intenso a 665 nm), de acuerdo con los datos reportados en la literatura [198, 199]. Las fotos de las fracciones recolectadas en una sola corrida se muestran en la Figura 48 tanto para maíz como para berros.

Para confirmar la identidad de las clorofilas en fracciones I y II, se obtuvieron espectros de masas de alta resolución. De acuerdo con el enfoque principal del trabajo, la introducción de

las soluciones diluidas con el ácido fórmico al 1% se llevó a cabo mediante el sistema FIA previamente descrito. Tal como se mencionó en la parte de materiales y métodos, la solución portadora contenía 10 mM formiato de amonio en metanol-isopropanol (1:1), lo que permitió realizar inyecciones sucesivas sin observar contaminación cruzada ni efectos de memoria. Se aplicó el volumen de inyección de 4 μL y velocidad del caudal de 80 $\mu\text{L min}^{-1}$, lo que permitió registrar adecuadamente los espectros. Basándose en la medición de masa exacta y buena concordancia entre los patrones isotópicos experimentales y teóricos, se confirmó que la fracción I correspondió a clorofila-b y la fracción II era clorofila-a, los cuales presentaron errores de masa 3.9 ppm y 1.7 ppm, respectivamente. Más importantemente aún, los resultados anteriores demuestran que el Mg es preservado en la estructura del pigmento después del procedimiento de extracción y separación cromatográfica. También se debe mencionar que la clorofila-a fue más abundante en ambas plantas en comparación a la clorofila-b, que es consistente con lo reportado en otros trabajos [186, 200]. En cuanto a la fracción III se observaron iones asociados a feofitina junto con una serie de señales no identificadas; estas fracciones no fueron consideradas en experimentos posteriores.

La concentración total de Mg encontrada en la biomasa liofilizada de maíz correspondía a $2.64 \pm 0.04 \text{ mg g}^{-1}$ en la primera cosecha (junio) y $2.45 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1}$ en la segunda cosecha (septiembre). Para el berro de jardín, los respectivos valores fueron $6.67 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1}$ y $7.45 \pm 0.04 \text{ mg g}^{-1}$. El principal objetivo durante la preparación de muestra era la obtención de cantidades individuales adecuadas de clorofilas (que contienen Mg unido), suficientes para realizar las mediciones de la relación isotópica para este elemento mediante IC-MC-ICP-MS. El magnesio en los extractos crudos de pigmentos representó alrededor del 2.7-3.2% de su contenido total en planta de maíz y 3.3-3.9% en berro de jardín. Para ambas plantas y dos réplicas biológicas, estos valores porcentuales fueron inferiores comparando con aproximadamente 6% reportado previamente para el trigo (*Triticum aestivum L.*) [185], que debe atribuirse principalmente al protocolo de extracción/separación no cuantitativa y, en menor medida, a las diferencias fisiológicas entre las especies biológicas y un tiempo de crecimiento más corto utilizado en este trabajo. Asimismo, el magnesio se determinó en las fracciones de clorofila digeridas con ácido; la masa total obtenida en clorofila-a obtenida de los experimentos de junio fue de 94 μg para maíz y 115 μg para berro de jardín, mientras la cosecha de septiembre las masas respectivas fueron 88 μg y 95 μg . En base a estos datos, las soluciones para IC-MC-ICP-

MS analizadas fueron preparadas ajustando la concentración final de magnesio a aproximadamente a 1 mg L^{-1} . Para clorofila-b, el contenido de Mg en las fracciones agrupadas para ambas plantas y dos réplicas biológicas se encontraban siempre por debajo de $20 \text{ }\mu\text{g}$, por lo tanto, fue insuficiente para una adecuada medición de la relación Mg-isótopo. Para otros metales, los cuales representan interferencias potenciales en la medición de relaciones entre isótopos de Mg, se determinaron las concentraciones totales en cuatro fracciones de clorofila-a (dos plantas, dos cosechas) y fueron las siguientes: $0.31\text{-}0.50 \text{ }\mu\text{g Zn}$, $2.67\text{-}13.2 \text{ }\mu\text{g Ca}$, $0.43\text{-}1.57 \text{ }\mu\text{g Na}$; Al y Fe se detectaron por debajo del límite de cuantificación del ICP-MS. Bajas concentraciones de estos elementos y la aplicación de la separación por cromatografía iónica garantizó mediciones de isótopos de Mg sin interferencias.

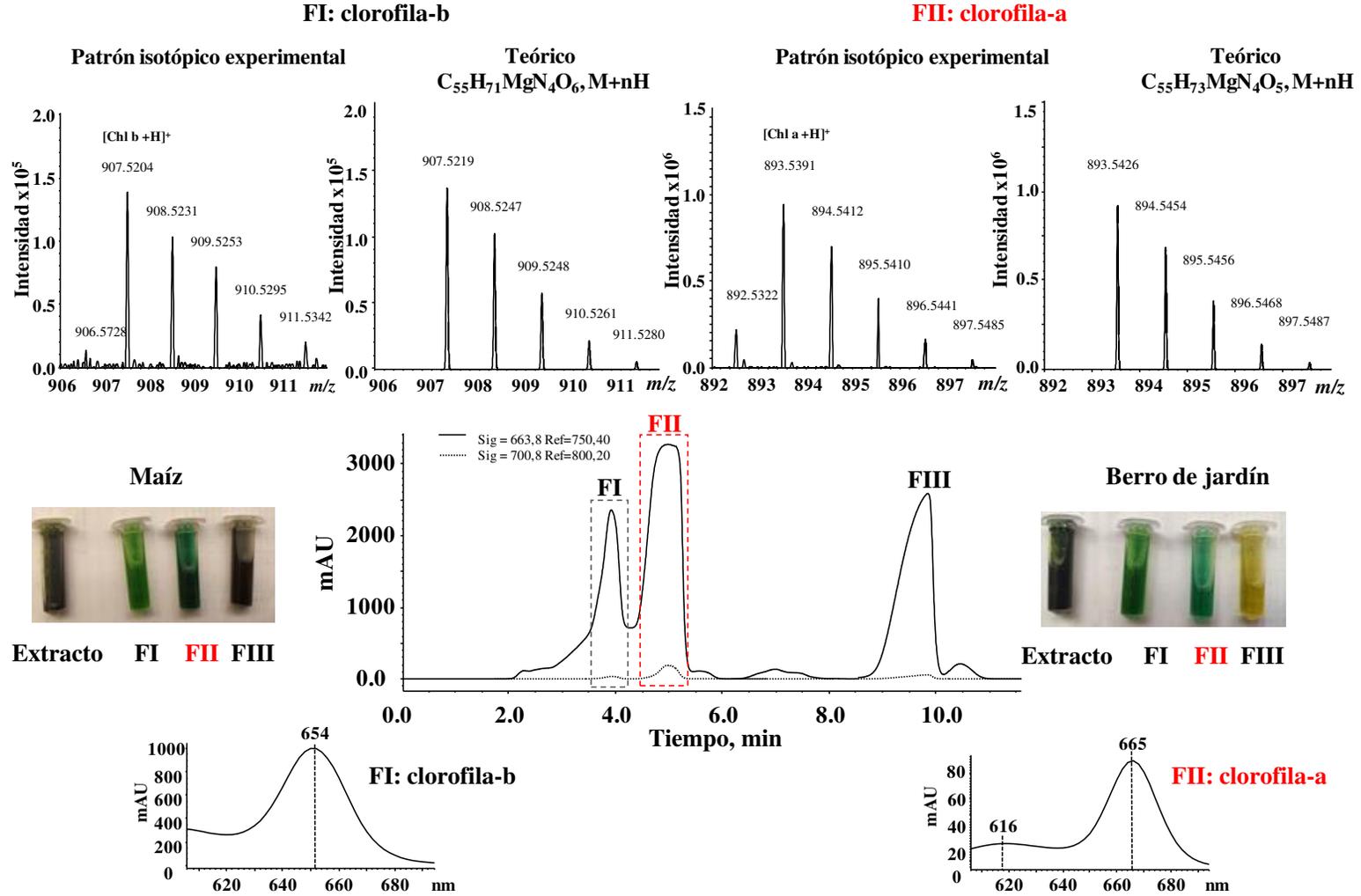


Figura 48 Separación de clorofilas por cromatografía líquida preparativa (centro) y confirmación de su identidad en base a los espectros de absorción (abajo) y por espectrometría de masas de alta resolución (arriba). Los datos presentados se obtuvieron para maíz y para berro de jardín; las fotografías muestran las fracciones obtenidas para ambas plantas en una sola corrida cromatográfica.

Fraccionamiento isotopos de magnesio en clorofila-a

El principal reto en el análisis de la clorofila digerida con ácido por IC-MC-ICP-MS era asegurar una retención eficiente de magnesio en la columna de intercambio catiónico. En un primer intento, alta acidez de estas muestras causó una elución parcial de magnesio en un volumen muerto (incluso después de una adecuada medición de magnesio). Los experimentos sistemáticos realizados utilizando una solución estándar de magnesio con diferentes adiciones de ácido nítrico muestran que, para una apropiada retención de magnesio, la concentración de ácido nítrico no debe exceder 0.02 M. Para disminuir la acidez de las muestras y evitar la dilución excesiva, se decidió evaporar las soluciones obtenidas de digestiones ácidas, y ajustar la concentración de ácido durante la reconstitución. Como se describió en la sección [materiales y métodos](#), previo a las mediciones por IC-MC ICPS, todas las mezclas contenían aproximadamente 1 mg L⁻¹ de Mg y 0.02 M de ácido nítrico. La recuperación de Mg en el procedimiento analítico se probó para estándares DSM-3 y Cambridge-1, así como las muestras de clorofila-a. Los resultados obtenidos se presentan en la [Tabla 16](#), los valores porcentuales se encontraron en el rango de 78.9%-104%, los cuales se consideraron aceptables. De la misma manera cabe mencionar que las diferencias entre los valores $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ para los estándares DSM-3 y Cambridge-1 medidos directamente y después del procedimiento analítico fueron insignificantes.

Tabla 16 Recuperación de magnesio en el procedimiento analítico (digestión ácida, evaporación y reconstitución previos a IC-MC-ICP-MS). La concentración inicial de Mg se fijó en 1 000 g L⁻¹, para las muestras de clorofila-a, el ajuste se basó en la determinación mediante ICP-MS con cuadrupolo (valores medios y RSD basados en cinco réplicas).

Muestra	Área de pico (promedio) $\mu\text{S min}$	RSD, %	Recuperación %
DSM-3 (directa)	1.60	1.04	-
DSM-3	1.39	1.06	85.4
Cambridge-1	1.68	0.06	104
Clorofila-a maíz	1.28	0.23	78.9
Clorofila-a berro	1.50	0.42	92.2

Los perfiles típicos obtenidos en la medición de isótopos de Mg en extractos de clorofila-a utilizando el sistema IC-MC-ICP-MS son presentados en la [Figura 49](#) para berro de jardín (Figura 49a) y para maíz (Figura 49b). En la configuración instrumental, se logró la corrección de sesgo de masa mediante la integración de las relaciones de isótopos de referencia durante la elución de Mg de la columna (pico transitorio en el medio, panel izquierdo en la [Figura 49](#)) a los valores promedios del estándar de bracket DSM-3 (regiones planas integradas de las señales laterales, panel izquierdo en la [Figura 49](#)). El panel derecho de la [Figura 49](#), muestra la relación isotópica $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ adquirida durante la elución del pico cromatográfico; observándose una importante diferencia entre las dos plantas.

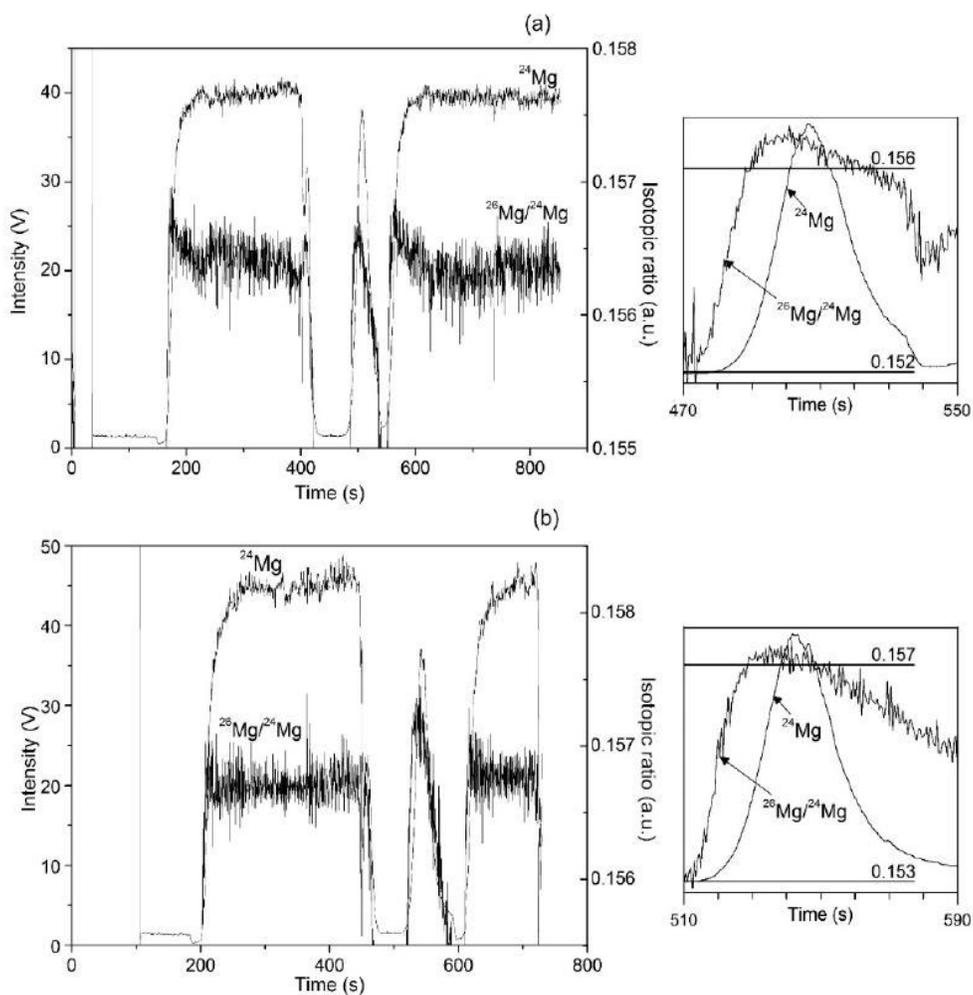


Figura 49 Análisis de isótopos de magnesio en clorofila-a de berro de jardín (a) y de maíz (b). El panel de la izquierda muestra mediciones realizadas por el sistema MC ICP-MS durante la ejecución cromatográfica (las señales planas corresponden al estándar DSM-3 y la señal en forma de pico en el medio corresponde a la elución de Mg de la columna de intercambio catiónico). Relación isotópica $^{26}\text{Mg}/^{24}\text{Mg}$ medida durante la elución del pico cromatográfico se presenta para las dos plantas en el panel derecho [197].

Una vez que los estándares y las muestras fueron analizados, se obtuvo una gráfica tri-isotópica, la cual es presentada en la [Figura 50](#), los promedios con sus respectivos valores de 2SD se basan en cinco réplicas de cada muestra. La línea de tendencia ajustada por el método de mínimos cuadrados lineales arrojó un valor de pendiente de 0.1590 y $R^2 = 0.9967$. La buena concordancia de los valores de la pendiente con los valores reportados para materiales terrestres (0.5163-0.5181) [183, 201] afirma que el fraccionamiento isotópico de Mg medido en los sistemas estudiados fue consistente con la ley de fraccionamiento dependiente de la masa. Los valores respectivos de $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ (relativos a DSM-3) son resumidos en la [Tabla 17](#), junto con varios datos representativos informados en la literatura [180, 185, 187-189]. Primeramente, la congruencia entre los resultados obtenidos para dos réplicas biológicas (experimentos de junio y septiembre) es indicativo de una buena repetibilidad del procedimiento y respalda que los datos obtenidos son representativos para sistemas biológicos bajo estudio. Como también se puede observar en la [Tabla 17](#), el fraccionamiento isotópico medido para los estándares DSM-3 y Cambridge-1 coinciden con los reportados previamente [180, 183, 185], lo cual es una evidencia adicional de la validez de los datos obtenidos en este trabajo. La concentración total de Mg encontrada en la solución nutritiva coincidió con el MgCl_2 agregado (diferencia < 1%), por lo tanto, las mediciones directas en la sal de $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ se consideran válidas para la solución nutritiva; los valores obtenidos fueron $-0.09 \pm 0.06\%$ y $-0.05 \pm 0.05\%$, respectivamente. Para la biomasa de partes verdes y clorofila-a, los valores de $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ fueron positivos en maíz mientras que para el berro estos valores fueron negativos, lo cual es indicativo de la preferencia de plantas C4 para isótopos pesados de Mg. Es de destacar, que valores negativos de $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ fueron reportados en hojas de diferentes plantas terrestres C3, en cianobacterias y algas ([Tabla 17](#)) en consistencia con los resultados obtenidos en este trabajo para el berro de jardín; sin embargo, dentro de nuestro conocimiento no hay datos disponibles para plantas C4.

Siguiendo el objetivo principal de este trabajo, se calcularon los cambios entre la composición de isótopos entre la solución nutriente, partes verdes de la planta, y clorofila-a para cada planta y para cada réplica biológica; los valores de $\delta^{26}\text{Mg}$ y $\delta^{25}\text{Mg}$ obtenidos son presentados en la [Tabla 18](#). En la comparación de los datos para la solución nutriente y las partes verdes de la biomasa, se produjo la disminución relativa de isótopos pesados durante los 11 días de crecimiento hidropónico de berro de jardín (valores de $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente}}$ -0.87% y -0.92% , para experimentos en junio y septiembre). En contraste, el enriquecimiento de maíz con isótopos

pesados fue evidente con los valores respectivos $\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente}}$ 0.74‰ y 0.65‰, de acuerdo con estudios anteriores, las plantas cultivadas hidropónicamente incorporan preferentemente isótopos pesados de Mg de la solución nutritiva, pero las partes verdes tienen preferencia por isótopos de Mg más ligeros comparando con las raíces, debido a que se favorece el sistema de transportación de isótopos ligeros por el xilema [172, 184, 185]. Si bien, en este trabajo no fueron analizadas las raíces, los resultados obtenidos sugieren diferencias entre el transporte de raíz -a- brote de isótopos de Mg entre dos plantas en 11 días de plántulas. De forma más relevante, las diferencias en la composición de isótopos entre partes verdes y clorofila-a apuntan a una incorporación de isótopos pesados con una mayor facilidad relativa durante la biosíntesis del pigmento; sin embargo, este efecto es mucho más pronunciado en maíz que con el berro de jardín (Tabla 18).

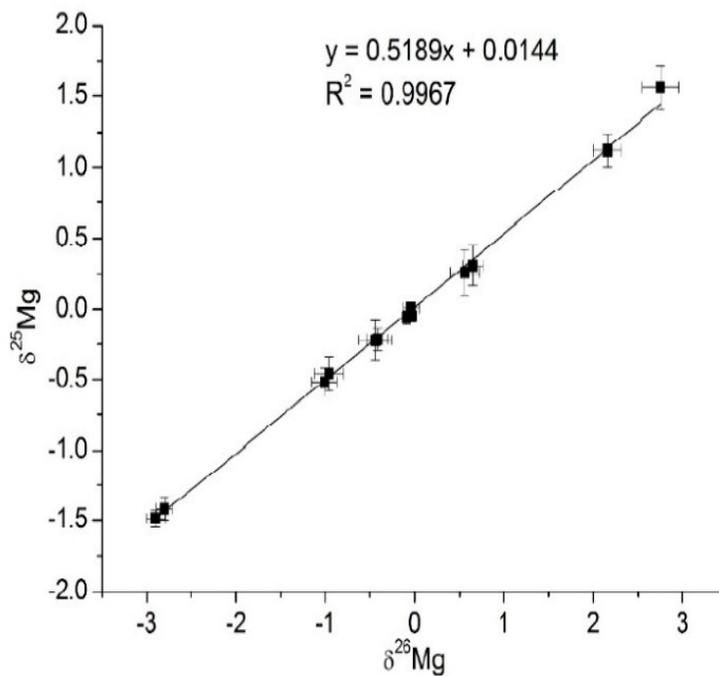


Figura 50 Relaciones de isótopos de magnesio obtenidas para las muestras y patrones analizados en este trabajo; todos los valores se expresan como partes por millón en relación con el DSM-3 y fueron calculados usando la Ecuación (1). Los resultados medios se presentan en base a cinco repeticiones; las barras de error corresponden a 2SD. El ajuste de regresión lineal representa el equilibrio de fraccionamiento dependiente de la masa de isótopo.

Tabla 17 Valores de la relación isótopos-magnesio obtenidos para las muestras analizadas en este trabajo (media 2SD, basada en cinco repeticiones) y valores seleccionados reportados en la literatura.

	Muestra	$\delta^{26}\text{Mg, ‰}$	$\delta^{25}\text{Mg, ‰}$	Ref
Este trabajo	Maíz-junio	0.65 ± 0.12	0.31 ± 0.14	
	Maíz-septiembre	0.56 ± 0.16	0.26 ± 0.10	
	Berro jardín-junio	-0.96 ± 0.6	-0.46 ± 0.12	
	Berro de jardín-septiembre	-1.01 ± 0.14	-0.52 ± 0.10	
	MgCl ₂ (solución nutritiva)	-0.09 ± 0.06	-0.05 ± 0.05	
	Clorofila-a maíz-junio	2.16 ± 0.16	1.12 ± 0.12	
	Clorofila-a maíz-septiembre	2.75 ± 0.20	1.56 ± 0.16	
	Berro de jardín clorofila-a junio	-0.41 ± 0.12	-0.21 ± 0.08	
	Berro de jardín clorofila-a Septiembre	-0.440 ± 0.19	-0.22 ± 0.14	
	DSM-3-junio	-0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.02	
	DSM-3-septiembre	-0.03 ± 0.02	0.05 ± 0.04	
	Cambridge-1-junio	-2.80 ± 0.09	-1.42 ± 0.08	
	Cambridge-1-septiembre	-2.89 ± 0.11	-1.49 ± 0.06	
	Valores reportados	DSM-3	0.01 ± 0.14	0.00 ± 0.009
DSM-3		-0.04 ± 0.17		[180]
Cambridge-1		-2.60 ± 0.14	-1.34 ± 0.07	[185]
Cambridge		-2.71 ± 0.18	-1.39 ± 0.08	[183]
Trébol de hojas		-0.61 ± 0.14	-0.31 ± 0.07	[184]
Hoja de trigo		0.11	0.05	[185]
Clorofila de trigo		$(-0.34)-(-0.58)$	$(-0.18)-(-0.27)$	[185]
Clorofila-a cianobacteria		$(-0.12)-(-2.13)$	$(-0.09)-(-0.62)$	[188]
Hoja hiedra inglesa		$(-0.510)-(-0.644)$	$(-0.277)-(-0.343)$	[187]
Clorofila hiedra inglesa		-0.182 ± 0.145	-0.099 ± 0.082	[187]
Clorofila-a comercial de diferentes plantas y algas		1.82-2.76	0.93-1.72	[189]
Clorofila-a espinaca		-1.451 ± 0.098	-0.741 ± 0.062	[202]

Tabla 18 Fraccionamiento de isótopos de Mg observado durante 11 días de crecimiento de plantas y biosíntesis de clorofila-a.

Fraccionamiento isotópico	Maíz (C4)		Berro de jardín (C3)	
	Junio	Septiembre	Junio	Septiembre
$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente, ‰}}$	0.74	0.65	-0.87	-0.92
$\Delta^{25}\text{Mg}_{\text{planta-nutriente, ‰}}$	0.36	0.31	-0.41	-0.47
$\Delta^{26}\text{Mg}_{\text{clorofila-nutriente, ‰}}$	1.51	2.19	0.55	0.52
$\Delta^{25}\text{Mg}_{\text{clorofila-nutriente, ‰}}$	0.81	1.30	0.25	0.30

Como se mencionó anteriormente en la sección [introducción](#) y se evidencia en la [Tabla 17](#) que dependiendo de la muestra biológica, así como del tiempo de crecimiento y las condiciones aplicadas, se produce una reducción [172, 185, 186] o enriquecimiento [187, 189] de la clorofila con isótopos pesados de Mg. Dado que, en este trabajo, las dos plantas fueron cultivadas simultáneamente en idénticas condiciones, el enriquecimiento de isótopos pesados de la plántula de maíz y su clorofila-a en comparación al berro de jardín, debe atribuirse a la diferente fisiología de estas dos plantas (C4 y C3, respectivamente). Durante la biosíntesis de clorofila, la incorporación de Mg en la protoporfirina IX es catalizada por la Mg-quelatasa mediante la unión de Mg a los grupos funcionales presentes en la estructura de la proteína; se ha propuesto que la unión de isótopos de Mg más ligeros podría verse favorecida en esta etapa [186]. Por otro lado, la hidrólisis de ATP que proporciona energía para la labilización del agua coordinada con Mg es necesaria durante la internalización del Mg en el centro de coordinación de la protoporfirina. El requerimiento de ATP durante la fijación de CO₂ es mayor en C4 con respecto a C3 [191] y parece posible que un mayor estado energético en C4 podría reducir la barrera cinética durante la incorporación de Mg a la protoporfirina IX. De ahí, el perfil “más pesado” de sus isótopos observado de clorofila-a en el maíz podría atribuirse al fraccionamiento isotópico relacionado con el alcance del estado de equilibrio y no con el régimen cinético de un proceso enzimático. También se debe enfatizar que el rol del Mg en plantas superiores no se limita a su presencia en la clorofila. La homeostasis de Mg es compleja e involucra múltiples procesos enzimáticos y químicos [203] que pueden afectar el fraccionamiento; por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo no pueden ser interpretados exclusivamente en el contexto de las clorofilas. Parece particularmente relevante que el ATP por sí mismo se une con magnesio con alta afinidad y esta unión es un requisito para la actividad biológica del ATP; además, la ATP-sintasa depende del Mg, y la incorporación de ²⁵Mg paramagnético se ha relacionado con una mayor actividad enzimática [204]. En general, se observó en este estudio un fraccionamiento diferente de isótopos de Mg para dos plantas con diferente requerimiento de energía y las velocidades de producción de ATP sugieren que la participación de Mg en los procesos relacionados con el ATP podría ser responsable del fraccionamiento de isótopos en la clorofila y en otros compartimentos de las plantas.

4.4.6 Conclusiones

La idea original de este trabajo era buscar posibles disimilitudes en el fraccionamiento isotópico de Mg en clorofila-a de dos plantas que presentan diferentes vías de fijación de carbono. Para una asociación inequívoca de los efectos observados con la fisiología vegetal específica, ambas plantas fueron cultivadas simultáneamente en condiciones hidropónicas idénticas y dos replicas biológicas fueron preparadas y analizadas. La identidad de las clorofilas en las fracciones separadas de la planta fue confirmada por espectrometría de masas de alta resolución, confirmando al mismo tiempo la viabilidad del sistema FIA para la introducción de muestra a la fuente de ionización. Las mediciones de isótopos de Mg fueron realizadas adoptando el sistema establecido IC-MC-ICP-MS; sin embargo, la eliminación completa de la matriz orgánica ($\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ digestión en microondas) y el ajuste de la concentración de ácido nítrico a 0.02 M (evaporación y reconstitución del digerido) se consideró necesario para lograr la retención deseada de Mg en el proceso cromatográfico. Es de destacar que el fraccionamiento isotópico medido en todas las muestras y estándares obedeció la ley de fraccionamiento dependiente de la masa, lo que afirma la consistencia de los resultados analíticos. En cuanto a la relevancia biológica, los resultados obtenidos revelaron una clara preferencia de las plantas C4 (maíz) por isótopos pesados de Mg en las partes verdes y en la clorofila-a en comparación a las plantas C3 (berro de jardín).

5 Conclusiones

A continuación, se presenta una conclusión general de esta tesis. Por otro lado, las conclusiones específicas para cada uno de los procedimientos desarrollados son las ya formuladas al final de cada sección correspondiente, que aquí serán presentadas de una manera simplificada.

La presente tesis se centró en el desarrollo de distintos procedimientos analíticos para la determinación de compuestos de relevancia biológica, utilizando esquemas de análisis por inyección al flujo y espectrometría de masas, sin separación cromatográfica. Se desarrolló un procedimiento FIA-ESI-Q-TOF-MS para la determinación de ésteres metílicos de ácidos grasos en muestras de aceites de ricino cosméticos, así como un procedimiento FIA-ESI-IT-MS/MS para la determinación de picolinato de cromo en suplementos alimenticios, de igual manera un sistema FIA-ESI-Q-TOF-MS fue utilizado para la confirmación de la identidad de distintas clorofilas. Estos análisis FIA-MS se basan en las capacidades de separación intrínsecas de la espectrometría de masas, ya que tanto la separación como la detección ocurren dentro del

espectrómetro de masas. La identificación y cuantificación de los distintos analitos se basaron en la habilidad del espectrómetro de masas para resolver los analitos de acuerdo con su relación masa-carga (m/z). Dentro de las ventajas que se observaron al comparar los procedimientos desarrollados con las distintas metodologías establecidas utilizadas habitualmente para los distintos analitos analizados en esta tesis, se encuentran que los métodos FIA-MS son técnicas de alto rendimiento debido a que poseen un tiempo de análisis rápido que simplifican el procedimiento analítico, además al no contar con una separación cromatográfica permiten utilizar distintos solventes compatibles con espectrometría de masas. El estudio en la configuración de los distintos parámetros de un sistema FIA como lo son la velocidad de flujo, composición del portador, así como el uso de distintos modificadores de matriz permitieron la optimización de la eficiencia de ionización de los distintos analitos analizados con lo que se obtuvo un aumento en la sensibilidad. De igual manera, distintos procedimientos de limpieza para las muestras se llevaron a cabo como un paso importante para mejorar la sensibilidad al reducir la supresión de la ionización causada por la matriz. Otro aspecto importante para la corrección de efectos de matriz fue la implementación de un adecuado estándar interno, necesario para la realización de análisis cuantitativos. Los procedimientos FIA-MS propuestos en este trabajo lucen atractivos debido a la simplicidad, su dimensión microescala, un alto poder de detección, su reproducibilidad y su alto rendimiento.

Otro procedimiento desarrollado en esta tesis sin la necesidad de un sistema cromatográfico fue la determinación de colorantes azo sulfonados por MALDI-TOF. El procedimiento propuesto contribuyó en la aplicabilidad de MALDI para el análisis cualitativo de moléculas pequeñas, ya que este enfoque es normalmente evitado por las interferencias de la matriz que forman intensos clústeres de iones en el rango de bajos valores m/z , como también la pobre cocrystalización entre la muestra y la matriz. Sin embargo, MALDI presenta ventajas como un pretratamiento de muestra simple, la formación de especies mono-cargadas, alta tolerancia para aditivos y sales, y una alta velocidad de adquisición de datos. En este sentido, al establecer condiciones como un procedimiento de extracción, el uso de un adecuado estándar interno, y la optimización de los parámetros de adquisición de espectros, fue posible la determinación de los colorantes azo sulfonados por MALDI-TOF mostrándose como una alternativa factible en el análisis de moléculas pequeñas.

6 Bibliografia

1. Karczewski, K.J. and M.P. Snyder, *Integrative omics for health and disease*. Nature Reviews Genetics, 2018. **19**(5): p. 299-310.
2. Theodoridis, G.A., et al., *Liquid chromatography–mass spectrometry based global metabolite profiling: A review*. Anal Chim Acta, 2012. **711**: p. 7-16.
3. Jones, O.A.H., et al., *The use of metabolomics in the study of metals in biological systems*. Metallomics, 2015. **7**: p. 29-38.
4. Ma, N.L., Z. Rahmat, and S.S. Lam, *A review of the "Omics" approach to biomarkers of oxidative stress in Oryza sativa*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(4): p. 7515-41.
5. Herrero, M., et al., *Foodomics: MS-based strategies in modern food science and nutrition*. Mass Spectrom Rev, 2012. **31**(1): p. 46-69.
6. Shevchenko, A. and K. Simons, *Lipidomics: coming to grips with lipid diversity*. Nature Rev Moll Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 593-598.
7. Armenta, S., S. Garrigues, and M. de la Guardia, *Green Analytical Chemistry*. Trends Anal Chem, 2008. **27**: p. 497-511.
8. Koel, M. and M. Kaljurand, *Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry*. Pure Appl Chem, 2006. **78**: p. 1993-2002.
9. Maher, S., F.P. Jjunju, and S. Taylor, *Colloquium: 100 years of mass spectrometry: Perspectives and future trends*. Rev Modern Phys, 2015. **8**(1): p. 113.
10. Gonzalez Ibarra, A.A., et al., *Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by liquid chromatography - electrospray ionization - ion trap tandem mass spectrometry (LC-ESI-ITMS/MS)*. J Chromatogr B, 2015. **1002**: p. 176'184.
11. Annesley, T.M., *Ion suppression in mass spectrometry*. Clin Chem, 2003. **49**(7): p. 1041-4.
12. Junot, C., et al., *High resolution mass spectrometry based techniques at the crossroads of metabolic pathways*. Mass Spectrom Rev, 2014. **33**(6): p. 471-500.
13. Zeng, I.S.L. and T. Lumley, *Review of Statistical Learning Methods in Integrated Omics Studies (An Integrated Information Science)*. Bioinform Biol Insights, 2018. **12**: p. 1177932218759292.
14. Gorrochategui, E., et al., *Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow*. Trend Anal Chem, 2016. **82**: p. 425-442.
15. Ortmayr, K., et al., *Increasing selectivity and coverage in LC-MS based metabolome analysis*. Trend Anal Chem, 2016. **82**: p. 358-366.
16. Nanita, S.C. and L.G. Kaldon, *Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. **408**(1): p. 23-33.
17. Madalinski, G., et al., *Direct Introduction of Biological Samples into a LTQ-Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer as a Tool for Fast Metabolome Analysis*. Anal Chem, 2008. **80**: p. 3291-3303.
18. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-473.
19. El-Anead, A., A. Cohen, and J. Banoub, *Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers*. Appl Spectrosc Rev, 2009. **44**(3): p. 210-230.
20. Nanita, S.C. and L.G. Kaldon, *Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis*. Anal Bioanal Chem, 2016. **408**: p. 23–33
21. Zhang, K., *Comparison of Flow Injection-MS/MS and LC-MS/MS for the Determination of Ochratoxin A*. Toxins, 2021. **13**(8).
22. Dams, R., et al., *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(11): p. 1290-1294.
23. Ito, Y., et al., *Simple and rapid determination of thiabendazole, imazalil, and o-phenylphenol in citrus fruit using flow-injection electrospray ionization tandem mass spectrometry*. J Agric Food Chem, 2003. **51**: p. 861–866.
24. Kishore, K.G., et al., *Synthesis of unsymmetrical bis-heterocycles containing the imidazo [2,1-b]thiazole framework and their benzo[d]fused analogues by an acid-free Groebke–Blackburn–Bienaymé reaction*. Tetrahedron Lett, 2016. **57**: p. 3556–3560.
25. Wrobel, K., et al., *Mechanistic insight into chromium(VI) reduction by oxalic acid in the presence of manganese(II)*. J Hazard Mater, 2015. **in press**.
26. Guo, H., et al., *ESI-MS Studies on the Mechanism of Pd(0)-Catalyzed Three-Component Tandem Double Addition-Cyclization Reaction*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(37): p. 13060-13064.
27. Ramaley, L., L.C. Herrera, and J.E. Melanson, *Quantitative analysis of TAG in oils using lithium cationization and direct-infusion ESI tandem mass spectrometry*. J Am Oil Chem Soc, 2015. **92**(3): p. 323-334.
28. do Nascimento Silva, F.L., et al., *Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Methods, 2015. **7**(1): p. 53-62.

29. Musharraf, S.G., A.J. Siddiqui, and S. Mazhar, *Direct infusion ESI-MS analysis for metabolite profiling of human plasma using various fractionation techniques*. *Bioanalysis*, 2014. **6**(15): p. 2057-2070.
30. González-Domínguez, R., et al., *Metabolomic screening of regional brain alterations in the APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease by direct infusion mass spectrometry*. *J Pharm Biomed Anal*, 2015. **102**: p. 425-435.
31. Rose, R.E., et al., *Profiling ribonucleotide modifications at full-transcriptome level: a step toward MS-based epitranscriptomics*. *RNA*, 2015. **21**(7): p. 1361-1374.
32. Anand, S., et al., *Detection and confirmation of serum lipid biomarkers for preeclampsia using direct infusion mass spectrometry*. *J Lipid Res*, 2016. **57**: p. 687-696.
33. Casanovas, A., et al., *Shotgun lipidomic analysis of chemically sulfated sterols compromises analytical sensitivity: Recommendation for large-scale global lipidome analysis*. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2014. **116**(12): p. 1618-1620.
34. Ibáñez, C., et al., *The role of direct high-resolution mass spectrometry in foodomics*. *Anal Bioanal Chem*, 2015. **407**(12): p. 6275-6287.
35. Fortunato, F.M., et al., *Standard dilution analysis in flow system: Sodium determination by flame atomic emission spectrometry*. *Microchem J*, 2016. **124**: p. 662-667.
36. Guerrero Esperanza, M., et al., *Determination of total arsenic and speciation analysis in Mexican maize tortilla with the aid of hydride generation - microwave plasma atomic emission spectrometry (HG-MP-AES) and high performance liquid chromatography - inductively coupled plasma - mass spectrometry (HPLC-ICP-MS)*. *Anal Methods*, 2017. **9**: p. 2059-2068.
37. Keay, P.J. and Y. Wang, *Applications of flow injection analysis to analytical biotechnology*. *Trends in Biotechnology*, 1997. **15**(2): p. 76-81.
38. Ruzicka, J. and E.H. Hansen, *Flow injection analysis* Vol. 62. 1988: John Wiley & Sons.
39. Trojanowicz, M., *Flow analysis as advanced branch of flow chemistry*, in *Modern Chemistry & Applications*. 2013.
40. Schug, K.A., C. Serrano, and P. Fryčák, *Controlled band dispersion for quantitative binding determination and analysis with electrospray ionization-mass spectrometry*. *Mass Spectrom Rev*, 2010. **29**(5): p. 806-829.
41. Trojanowicz, M. and K. Kołacińska, *Recent advances in flow injection analysis*. *Analyst*, 2016. **141**(7): p. 2085-2139.
42. Hansen, E.H., *Chapter 1 - Flow Injection Analysis: Its Origins and Progress*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, S.D. Kolev and I.D. McKelvie, Editors. 2008, Elsevier. p. 3-778.
43. Růžička, J. and E.H. Hansen, *Flow injection analysis. principles, applications and trends*. *Analytica Chimica Acta*, 1980. **114**: p. 19-44.
44. Ruiz-Capillas, C. and F. Jimenez-Colmenero, *Determination of preservatives in meat products by flow injection analysis (FIA)*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2008. **25**(10): p. 1167-1178.
45. Cerdà, V., et al., *Chapter 1 - Evolution and Description of the Principal Flow Techniques*, in *Flow Analysis*, V. Cerdà, et al., Editors. 2014, Elsevier: Boston. p. 1-42.
46. Vanderslice, J.T., et al., *LAMINAR DISPERSION IN FLOW-INJECTION ANALYSIS*. *Talanta*, 1981. **28**(1): p. 11-18.
47. Nanita, S.C., *Quantitative Mass Spectrometry Independence from Matrix Effects and Detector Saturation Achieved by Flow Injection Analysis with Real-Time Infinite Dilution*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(24): p. 11866-11875.
48. Aldstadt III, J.H., et al., *Flow and Sequential Injection Analysis Techniques in Process Analysis*, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
49. Ruzicka, J., *Redesigning flow injection after 40 years of development: Flow programming*. *Talanta*, 2018. **176**: p. 437-443.
50. Ramsing, A.U., J. Růžička, and E.H. Hansen, *The principles and theory of high-speed titrations by flow injection analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1981. **129**: p. 1-17.
51. van Staden, J.F. and R.I.S. van Staden, *Flow-injection analysis systems with different detection devices and other related techniques for the in vitro and in vivo determination of dopamine as neurotransmitter. A review*. *Talanta*, 2012. **102**: p. 34-43.
52. Růžička, J. and E.H. Hansen, *Recent developments in flow injection analysis: gradient techniques and hydrodynamic injection*. *Analytica Chimica Acta*, 1983. **145**: p. 1-15.
53. Gerhardt, G. and R.N. Adams, *Determination of diffusion coefficients by flow injection analysis*. *Analytical Chemistry*, 1982. **54**(14): p. 2618-2620.
54. Vanderslice, J.T., G.R. Beecher, and A.G. Rosenfeld, *Dispersion and diffusion coefficients in flow injection analysis*. *Analytical Chemistry*, 1984. **56**(2): p. 292-293.
55. Krug, F.J., H. Bergamin F°, and E.A.G. Zagatto, *Commutation in flow injection analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1986. **179**: p. 103-118.
56. Mol, H.G.J. and R.C.J. van Dam, *Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection-tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. **406**(27): p. 6817-6825.
57. Nanita, S.C., A.M. Pentz, and F.Q. Bramble, *High-Throughput Pesticide Residue Quantitative Analysis Achieved by Tandem Mass Spectrometry with Automated Flow Injection*. *Analytical Chemistry*, 2009. **81**(8): p. 3134-3142.
58. Kaklamanos, G., E. Aprea, and G. Theodoridis, *11 - Mass spectrometry: principles and instrumentation*, in *Chemical Analysis of Food (Second Edition)*, Y. Pico, Editor. 2020, Academic Press. p. 525-552.

59. Ipolyi, I., et al., *Electron impact ionization of alanine: Appearance energies of the ions*. International Journal of Mass Spectrometry, 2006. **252**(3): p. 228-233.
60. Budzikiewicz, H., *J.H. Gross: Mass Spectrometry. A Textbook*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **381**: p. 1319-1320.
61. Munson, M.S.B. and F.H. Field, *Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction*. Journal of the American Chemical Society, 1966. **88**(12): p. 2621-2630.
62. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Analytical Chemistry, 1988. **60**(20): p. 2299-2301.
63. Schiller, J., et al., *Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research*. Progress in Lipid Research, 2004. **43**(5): p. 449-488.
64. Taki, K., et al., *A preliminary study of rapid-fire high-throughput metabolite analysis using nano-flow injection/Q-TOFMS*. Anal Bioanal Chem, 2020. **412**(17): p. 4127-4134.
65. Shinn, S.E., et al., *Using MALDI MS for rapid analysis of food lipids*. Lipid Technology, 2015. **27**(11): p. 255-257.
66. Cohen, L.H. and A.I. Gusev, *Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2002. **373**(7): p. 571-86.
67. Dreisewerd, K., *Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(9): p. 2261-2278.
68. Karas, M., M. Gluckmann, and J. Schafer, *Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(1): p. 1-12.
69. Jaskolla, T.W. and M. Karas, *Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(6): p. 976-988.
70. Krüger, R., et al., *Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(24): p. 5812-5821.
71. Chau, H.T.C., et al., *Development of a comprehensive screening method for more than 300 organic chemicals in water samples using a combination of solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry*. Environmental Science and Pollution Research, 2017. **24**(34): p. 26396-26409.
72. Dally, J.E., et al., *Quantitation of Underivatized Free Amino Acids in Mammalian Cell Culture Media Using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(19): p. 5046-5053.
73. Wang, C.-C., et al., *Critical factors determining the quantification capability of matrix-assisted laser desorption/ionization– time-of-flight mass spectrometry*. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2016. **374**(2079): p. 20150371.
74. March, R.E., *An Introduction to Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(4): p. 351-369.
75. Nanita, S.C., et al., *Fast Extraction and Dilution Flow Injection Mass Spectrometry Method for Quantitative Chemical Residue Screening in Food*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(14): p. 7557-7568.
76. Song, F., et al., *Fast screening of lovastatin in red yeast rice products by flow injection tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 2012. **57**: p. 76–81
77. Song, F., et al., *Screening for multiple weight loss and related drugs in dietary supplement materials by flow injection tandem mass spectrometry and their confirmation by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Pharm Biomed Anal, 2014. **88**: p. 136-143.
78. Niesser, M., B. Koletzko, and W. Peissner, *Determination of creatinine in human urine with flow injection tandem mass spectrometry*. Ann Nutr Metab, 2012. **61**(4): p. 314-321.
79. Sciuto, S., et al., *Rapid Screening Technique To Identify Sudan Dyes (I to IV) in Adulterated Tomato Sauce, Chilli Powder, and Palm Oil by Innovative High-Resolution Mass Spectrometry*. J Food Prot, 2017. **80**(4): p. 640-644.
80. Michel, D., et al., *Development and validation of fast and simple flow injection analysis-tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) for the determination of metformin in dog serum*. J Pharm Biomed Anal, 2015. **107**: p. 229-235.
81. Gonzalez-Dominguez, R., T. Garcia-Barrera, and J.L. Gomez-Ariza, *Application of a novel metabolomic approach based on atmospheric pressure photoionization mass spectrometry using flow injection analysis for the study of Alzheimer's disease*. Talanta, 2015. **131**: p. 480-489.
82. Rathahao-Paris, E., et al., *Identification of xenobiotic metabolites from biological fluids using flow injection analysis high-resolution mass spectrometry and post-acquisition data filtering*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2014. **28**(24): p. 2713-2722.
83. Nanita, S.C., *High-throughput chemical residue analysis by fast extraction and dilution flow injection mass spectrometry*. Analyst, 2011. **136**(285-287).

84. Santos, I.C., et al., *Determination of noncovalent binding using a continuous stirred tank reactor as a flow injection device coupled to electrospray ionization mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2015. **26**(7): p. 1204-1212.
85. Mol, H.G.J. and R.C.J. van Dam, *Rapid detection of pesticides not amenable to multi-residue methods by flow injection-tandem mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2014. **406**: p. 6817-6825
86. Helmich, F., et al., *Rapid phenotype hemoglobin screening by high-resolution mass spectrometry on intact proteins*. Clin Chim Acta, 2016. **460**: p. 220-226.
87. Cipolla, B.G., R. Havouis, and J.P. Moulinoux, *Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients*. Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 203-212.
88. Schröder, H.F. and R.J. Meesters, *Stability of fluorinated surfactants in advanced oxidation processes—a follow up of degradation products using flow injection-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-multiple stage mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2005. **1082**(1): p. 110-119.
89. La Nasa, J., et al., *Industrial alkyd resins: characterization of pentaerythritol and phthalic acid esters using integrated mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2015. **29**(3): p. 225-237.
90. de Carvalho, L.J., E.C.P. do Rego, and B.C. Garrido, *Quantification of benzoic acid in beverages: the evaluation and validation of direct measurement techniques using mass spectrometry*. Anal Methods, 2016. **8**(14): p. 2955-2960.
91. Chen, P., J. Sun, and P. Ford, *Differentiation of the four major species of Cinnamons (C. burmannii, C. verum, C. cassia, and C. loureiroi) using a flow injection mass spectrometric (FIMS) fingerprinting method*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(12): p. 2516-2521.
92. Delabrière, A., et al., *proFIA: a data preprocessing workflow for flow injection analysis coupled to high-resolution mass spectrometry*. Bioinformatics, 2017. **33**(23): p. 3767-3775.
93. El-Shahat, M.F., N. Burham, and S.A. Azeem, *Flow injection analysis-solid phase extraction (FIA-SPE) method for preconcentration and determination of trace amounts of penicillins using methylene blue grafted polyurethane foam*. J Hazard Mater, 2010. **177**(1-3): p. 1054-1060.
94. Nanita, S.C. and N.L. Padivitage, *Ammonium chloride salting out extraction/cleanup for trace-level quantitative analysis in food and biological matrices by flow injection tandem mass spectrometry*. Anal Chim Acta, 2013. **768**: p. 1-11.
95. Vaňková, K., P. Ačai, and M. Polakovič, *Modelling of fixed-bed adsorption of mono-, di-, and fructooligosaccharides on a cation-exchange resin*. Biochem Eng J, 2010. **49**(1): p. 84-88.
96. Yang, Y.X., et al., *Characterization of phenolic acids binding to thrombin using frontal affinity chromatography and molecular docking*. Anal Methods, 2017. **9**(35): p. 5174-5180.
97. Omari, A., Q. Mgani, and E. Mubofu, *Fatty Acid Profile and Physico-Chemical Parameters of Castor Oils in Tanzania*. Green and Sustainable Chemistry, 2015. **05**: p. 154-163.
98. Sajjadi, B., A.A.A. Raman, and H. Arandiyan, *A comprehensive review on properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: Composition, specifications and prediction models*. Renewable & Sustainable Energy Reviews, 2016. **63**: p. 62-92.
99. Salimon, J., et al., *Fatty Acid Composition and Physicochemical Properties of Malaysian Castor Bean Ricinus communis L. Seed Oil*. Sains Malaysiana, 2010. **39**(5): p. 761-764.
100. Ramamurthi, S., V. Manohar, and V.V.S. Mani, *Characterization of fatty acid isomers in dehydrated castor oil by gas chromatography and gas chromatography mass spectrometry techniques*. Journal of the American Oil Chemists Society, 1998. **75**(10): p. 1297-1303.
101. Catharino, R.R., et al., *Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting*. Energy & Fuels, 2007. **21**(6): p. 3698-3701.
102. Liu, K.-S., *Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1994. **71**(11): p. 1179-1187.
103. Cavalcante, K.S.B., et al., *Optimization of transesterification of castor oil with ethanol using a central composite rotatable design (CCRD)*. Fuel, 2010. **89**(5): p. 1172-1176.
104. Dodds, E.D., et al., *Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: Flame ionization detection vs. Electron impact mass spectrometry*. Lipids, 2005. **40**(4): p. 419-428.
105. Bialek, A., et al., *Fatty acid profile of new promising unconventional plant oils for cosmetic use*. International Journal of Cosmetic Science, 2016. **38**(4): p. 382-388.
106. Murphy, R.C. and P.H. Axelsen, *Mass spectrometric analysis of long-chain lipids*. Mass Spectrometry Reviews, 2011. **30**(4): p. 579-599.
107. Muñoz, R., et al., *Fast determination of oleic acid in pork by flow injection analysis/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(8): p. 1082-1088.
108. Cortese, M., et al., *Qualitative characterization of a transesterification product of coconut oil by FIA-APCI-MS*. International Journal of Cosmetic Science, 2015. **37**(4): p. 379-385.
109. Barrientos, E.Y., C.R. Flores, and K. Wrobel, *Impact of Cadmium and Selenium Exposure on Trace Elements, Fatty Acids and Oxidative stress in Lepidium sativum*. Journal of the Mexican Chemical Society, 2012. **56**(1): p. 3-9.

110. Li, C., Y.L. Wu, and J.Z. Shen, *UPLC-ESI-MS/MS analysis of Sudan dyes and Para Red in food*. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2010. **27**(9): p. 1215-1220.
111. Shibasaki-Kitakawa, N., et al., *Biodiesel production using anionic ion-exchange resin as heterogeneous catalyst*. Bioresource Technology, 2007. **98**(2): p. 416-421.
112. Pala, R., et al., *The effects of chromium picolinate on glucose and lipid metabolism in running rats*. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2020. **58**: p. 126434.
113. Mertz, W., *Chromium in human nutrition: a review*. J Nutr, 1993. **123**(4): p. 626-33.
114. Cefalu, W.T. and F.B. Hu, *Role of chromium in human health and in diabetes*. Diabetes Care, 2004. **27**(11): p. 2741-2751.
115. Anderson, R.A., *Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: chromium*. J Am Coll Nutr, 1997. **16**: p. 404-410.
116. Ricci, A., et al., *Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 8: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2018*. . EFSA Journal, 2018. **16**(7): p. 42pp.
117. Vincent, J.B., *New evidence against chromium as an essential trace element*. J Nutr, 2017. **147**(12): p. 2212-2219.
118. Ding, H., L.K. Olson, and J.A. Caruso, *Elemental speciation for chromium in chromium picolinate products*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 1996. **51**(14): p. 1801-1812.
119. Food, E.P.o.F.A.a.N.S.a.t., *Scientific Opinion on the safety of chromium picolinate as a source of chromium added for nutritional purposes to foodstuff for particular nutritional uses and to foods intended for the general population*. EFSA Journal, 2010. **8**(12): p. 1883.
120. Berner, T.O., M.M. Murphy, and R. Slesinski, *Determining the safety of chromium tripicolinate for addition to foods as a nutrient supplement*. Food and Chemical Toxicology, 2004. **42**(6): p. 1029-1042.
121. Speetjens, J.K., et al., *The Nutritional Supplement Chromium(III) Tris(picolinate) Cleaves DNA*. Chemical Research in Toxicology, 1999. **12**(6): p. 483-487.
122. Koll, M., H. Hoenen, and H.Y. Aboul-Enein, *A validated method for analysis of chromium picolinate in nutraceuticals by reversed phase high performance liquid chromatography*. Biomedical Chromatography, 2005. **19**(2): p. 119-122.
123. Kim, S.I., et al., *Determination of chromium(III) picolinate using high performance liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry*. Bulletin of the Korean Chemical Society, 2003. **24**(10): p. 1517-1520.
124. Han, M.M., et al., *Quantitative determination of chromium picolinate in animal feeds by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2017. **1070**: p. 37-42.
125. Mihai, O., et al., *Determination of chromium picolinate and trace hexavalent chromium in multivitamins and supplements by HPLC-ICP-QQQ-MS*. J Food Contam Anal, 2020. **87**: p. 103421.
126. Chen, Y., et al., *Simultaneous analysis of Cr(III), Cr(VI), and chromium picolinate in foods using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry*. ELECTROPHORESIS, 2015. **36**(9-10): p. 1208-1215.
127. Tamer, Ö., D. Avci, and Y. Atalay, *Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization and nonlinear optical properties of Co(II)-picolinate complex*. Materials Chemistry and Physics, 2015. **168**: p. 138-146.
128. Mihai, O., et al., *Determination of chromium picolinate and trace hexavalent chromium in multivitamins and supplements by HPLC-ICP-QQQ-MS*. Journal of Food Composition and Analysis, 2020. **87**: p. 103421.
129. Wang, P. and R.W. Giese, *Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2017. **1486**: p. 35-41.
130. Picca, R.A., et al., *Mechanisms of Nanophase-Induced Desorption in LDI-MS. A Short Review*. Nanomaterials, 2017. **7**(4).
131. Mandal, A., et al., *Laser desorption ionization mass spectrometry: Recent progress in matrix-free and label-assisted techniques*. Mass Spectrometry Reviews, 2019. **38**(1): p. 3-21.
132. Calvano, C.D., et al., *MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story?* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018. **410**(17): p. 4015-4038.
133. Garcia, J.S., et al., *Bovine milk powder adulteration with vegetable oils or fats revealed by MALDI-QTOF MS*. Food Chemistry, 2012. **131**(2): p. 722-726.
134. Arnold, A., et al., *Fast quantitative determination of melamine and its derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(19): p. 2844-2850.
135. Nicolaou, N., Y. Xu, and R. Goodacre, *MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **399**(10): p. 3491-3502.
136. Su, H.-H., et al., *Micro-scale strategy to detect spermine and spermidine by MALDI-TOF MS in foods and identification of apoptosis-related proteins by nano-flow UPLC-MS/MS after treatment with spermine and spermidine*. Journal of Chromatography B, 2015. **978-979**: p. 131-137.
137. Sivagnanam, K., et al., *Rapid screening of ergot alkaloids in sclerotia by MALDI-TOF mass spectrometry*. J AOAC Int, 2016. **99**(4): p. 895-898.

138. Ricci, A., et al., *Spectroscopy analysis of phenolic and sugar patterns in a food grade chestnut tannin*. Food Chemistry, 2016. **203**: p. 425-429.
139. Bolling, B.W., *Almond Polyphenols: Methods of Analysis, Contribution to Food Quality, and Health Promotion*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017. **16**(3): p. 346-368.
140. Huang, Y.-S., T.-J. Hsieh, and C.-Y. Lu, *Simple analytical strategy for MALDI-TOF-MS and nanoUPLC-MS/MS: Quantitating curcumin in food condiments and dietary supplements and screening of acrylamide-induced ROS protein indicators reduced by curcumin*. Food Chemistry, 2015. **174**: p. 571-576.
141. Wang, X., S. Wang, and Z. Cai, *The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **52**: p. 170-185.
142. Garcia, M.M., et al., *Determination of copper and lead in tequila by conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and partial least squares regression*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM, 2018. **32**(24): p. 2174-2184.
143. Garcia, M.M., et al., *Application of MALDI-TOFMS Combined with Partial Least Square Regression for the Determination of Mercury and Copper in Canned Tuna, Using Dithizone as the Complexing Agent and Ag(I) as Internal Standard*. Food Analytical Methods, 2018. **11**(10): p. 2835-2846.
144. Chung, K.-T., *Azo dyes and human health: A review*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2016. **34**(4): p. 233-261.
145. Lehto, S., et al., *Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions (vol 34, pg 335, 2017)*. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2017. **34**(5): p. 882-882.
146. Yamjala, K., M.S. Nainar, and N.R. Ramiseti, *Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry - A review*. Food Chemistry, 2016. **192**: p. 813-824.
147. Kucharska, M. and J. Grabka, *A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes*. Talanta, 2010. **80**(3): p. 1045-1051.
148. Lipskikh, O.I., et al., *Sensors for voltammetric determination of food azo dyes - A critical review*. Electrochimica Acta, 2018. **260**: p. 974-985.
149. Rovina, K., et al., *Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **85**: p. 47-56.
150. Sullivan, A.G. and S.J. Gaskell, *The Analysis of Polysulfonated Azo Dyestuffs by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization and Electrospray Mass Spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1997. **11**(7): p. 803-809.
151. Arica, M.Y., et al., *Immobilization of laccase on the fibrous polymer-grafted film and study of textile dye degradation by MALDI-ToF-MS*. Chemical Engineering Research and Design, 2017. **128**: p. 107-119.
152. Lovejoy, K.S., et al., *Tetraalkylphosphonium-Based Ionic Liquids for a Single-Step Dye Extraction/MALDI MS Analysis Platform*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(8): p. 2921-2930.
153. Ji, W., et al., *Molecularly imprinted solid-phase extraction method based on SH-Au modified silica gel for the detection of six Sudan dyes in chili powder samples*. Talanta, 2017. **165**: p. 18-26.
154. Bazregar, M., et al., *Centrifugeless dispersive liquid-liquid microextraction based on salting-out phenomenon followed by high performance liquid chromatography for determination of Sudan dyes in different species*. Food Chemistry, 2018. **244**: p. 1-6.
155. Tsai, C.F., C.H. Kuo, and D.Y. Shih, *Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. J Food Drug Anal, 2015. **23**(3): p. 453-462.
156. Grant, D.C. and R.J. Helleur, *Simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(8): p. 2811-2818.
157. Minioti, K.S., C.F. Sakellariou, and N.S. Thomaidis, *Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector*. Analytica Chimica Acta, 2007. **583**(1): p. 103-110.
158. Fuh, M.R. and K.J. Chia, *Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection*. Talanta, 2002. **56**(4): p. 663-671.
159. Grant, D.C. and R.J. Helleur, *Surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007. **21**(6): p. 837-45.
160. Wróbel, K., P.L. López-de-Alba, and L. López-Martínez, *Enhanced spectrophotometric determination of chromium (VI) with diphenylcarbazide using internal standard and derivative spectrophotometry*. Talanta, 1997. **44**(11): p. 2129-36.
161. Fujisawa, K., et al., *Ion Pair- π Interactions*. Journal of the American Chemical Society, 2015. **137**(34): p. 11047-11056.
162. Lou, X., et al., *Matrix suppression and analyte suppression effects of quaternary ammonium salts in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: an investigation of suppression mechanism*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(19): p. 3077-3082.
163. Grant, C.A., W.T. Buckley, and R. Wu, *Effect of selenium fertilizer source and rate on grain yield and selenium and cadmium concentration of durum wheat*. Canadian Journal of Plant Science, 2007. **87**(4): p. 703-708.

164. Lehto, S., et al., *Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2017. **34**(3): p. 335-355.
165. Yamjala, K., M.S. Nainar, and N.R. Ramiseti, *Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry – A review*. Food Chemistry, 2016. **192**: p. 813-824.
166. Tsai, C.F., C.H. Kuo, and D.Y.C. Shih, *Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Food and Drug Analysis, 2015. **23**(3): p. 453-462.
167. Chen, J.H., et al., *Organic solvent-free matrix solid phase dispersion (MSPD) for determination of synthetic colorants in chilli powder by high-performance liquid chromatography (HPLC-UV)*. Analytical Methods, 2015. **7**(16): p. 6537-6544.
168. Chai, W., et al., *Preparation of polydopamine-coated magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction of water-soluble synthetic colorants in beverage samples with HPLC analysis*. Talanta, 2016. **149**: p. 13-20.
169. Bazregar, M., et al., *In-tube electro-membrane extraction with a sub-microliter organic solvent consumption as an efficient technique for synthetic food dyes determination in foodstuff samples*. Journal of Chromatography A, 2015. **1410**: p. 35-43.
170. López-de-Alba, P.L., et al., *Spectrophotometric determination of Allura Red (R40) in soft drink powders using the universal calibration matrix for partial least squares multivariate method*. Analytica Chimica Acta, 1996. **330**(1): p. 19-29.
171. Dinç, E., et al., *Spectrophotometric multicomponent determination of sunset yellow, tartrazine and allura red in soft drink powder by double divisor-ratio spectra derivative, inverse least-squares and principal component regression methods*. Talanta, 2002. **58**(3): p. 579-594.
172. Schmitt, A.-D., et al., *Processes controlling the stable isotope compositions of Li, B, Mg and Ca in plants, soils and waters: A review*. Comptes Rendus Geoscience, 2012. **344**(11): p. 704-722.
173. Caldelas, C. and D.J. Weiss, *Zinc Homeostasis and isotopic fractionation in plants: a review*. Plant and Soil, 2017. **411**(1): p. 17-46.
174. Albarède, F., P. Télouk, and V. Balter, *Medical Applications of Isotope Metallomics*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2017. **82**(1): p. 851-885.
175. Hajji, F., et al., *Radiogenic and “stable” strontium isotopes in provenance studies: A review and first results on archaeological wood from shipwrecks*. Journal of Archaeological Science, 2017. **86**: p. 24-49.
176. Teng, F.-Z., *Magnesium Isotope Geochemistry*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2017. **82**(1): p. 219-287.
177. Irrgeher, J. and T. Prohaska, *Application of non-traditional stable isotopes in analytical ecogeochemistry assessed by MC ICP-MS - A critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016. **408**(2): p. 369-385.
178. Lu, D., et al., *Recent advances in the analysis of non-traditional stable isotopes by multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2017. **32**(10): p. 1848-1861.
179. Karasinski, J., et al., *On-line separation of strontium from a matrix and determination of the 87Sr/86Sr ratio by Ion Chromatography/Multicollector-ICPMS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2016. **31**(7): p. 1459-1463.
180. Karasinski, J., et al., *High precision direct analysis of magnesium isotope ratio by ion chromatography/multicollector-ICPMS using wet and dry plasma conditions*. Talanta, 2017. **165**: p. 64-68.
181. Karasinski, J., et al., *Direct determination of $\delta^{44}/^{42}\text{Ca}$ isotope ratio by ion chromatography/low-resolution multicollector ICPMS*. Journal of Mass Spectrometry, 2018. **53**(1): p. 78-82.
182. Berglund, M. and M.E. Wieser, *Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report)*. Pure and Applied Chemistry, 2011. **83**(2): p. 397-410.
183. Bolou-Bi, E.B., et al., *Magnesium Isotope Compositions of Natural Reference Materials*. Geostandards and Geoanalytical Research, 2009. **33**(1): p. 95-109.
184. Bolou-Bi, E.B., et al., *Experimental determination of magnesium isotope fractionation during higher plant growth*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2010. **74**(9): p. 2523-2537.
185. Black, J.R., et al., *Magnesium-Isotope Fractionation During Plant Growth*. Environmental Science & Technology, 2008. **42**(21): p. 7831-7836.
186. Black, J.R., Q.-z. Yin, and W.H. Casey, *An experimental study of magnesium-isotope fractionation in chlorophyll-a photosynthesis*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2006. **70**(16): p. 4072-4079.
187. Black, J.R., et al., *Magnesium Isotopic Equilibrium in Chlorophylls*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(28): p. 8690-8691.
188. Isaji, Y., et al., *Magnesium Isotope Fractionation during Synthesis of Chlorophyll a and Bacteriochlorophyll a of Benthic Phototrophs in Hypersaline Environments*. ACS Earth and Space Chemistry, 2019. **3**(6): p. 1073-1079.
189. Ra, K. and H. Kitagawa, *Magnesium isotope analysis of different chlorophyll forms in marine phytoplankton using multi-collector ICP-MS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2007. **22**(7): p. 817-821.
190. Moynier, F. and T. Fujii, *Theoretical isotopic fractionation of magnesium between chlorophylls*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 6973.
191. Gowik, U. and P. Westhoff, *The Path from C3 to C4 Photosynthesis*. Plant Physiology, 2011. **155**(1): p. 56-63.
192. Zhu, X.-G., S.P. Long, and D.R. Ort, *What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? Current Opinion in Biotechnology, 2008. 19(2): p. 153-159.*

193. Zhao, Q., S. Chen, and S. Dai, *C4 photosynthetic machinery: insights from maize chloroplast proteomics*. *Frontiers in Plant Science*, 2013. **4**: p. 85.
194. Torres Elguera, J.C., et al., *Effect of cadmium (Cd(II)), selenium (Se(IV)) and their mixtures on phenolic compounds and antioxidant capacity in *Lepidium sativum**. *Acta Physiol Plant*, 2013. **35**: p. 431-441.
195. Galy, A., et al., *Magnesium isotope heterogeneity of the isotopic standard SRM980 and new reference materials for magnesium-isotope-ratio measurements*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003. **18**(11): p. 1352-1356.
196. Bidigare, R.R., et al., *Isolation and purification of chlorophylls a and b for the determination of stable carbon and nitrogen isotope compositions*. *Analytical Chemistry*, 1991. **63**(2): p. 130-133.
197. Wrobel, K., et al., *Magnesium–Isotope Fractionation in Chlorophyll-a Extracted from Two Plants with Different Pathways of Carbon Fixation (C3, C4)*. *Molecules*, 2020. **25**(7).
198. Milenković, S.M., et al., *The identification of chlorophyll and its derivatives in the pigment mixtures : HPLC-chromatography, visible and mass spectroscopy studies*. *Savremene tehnologije / Advanced Technologies*, 2012. **1**(1): p. 16-24.
199. Khalyfa, A., S. Kermasha, and I. Alli, *Extraction, purification, and characterization of chlorophylls from spinach leaves*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992. **40**(2): p. 215-220.
200. Daughtry, C.S.T., et al., *Estimating Corn Leaf Chlorophyll Concentration from Leaf and Canopy Reflectance*. *Remote Sensing of Environment*, 2000. **74**(2): p. 229-239.
201. Galy, A., et al., *High-precision measurement of magnesium isotopes by multiple-collector inductively coupled plasma mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001. **208**(1): p. 89-98.
202. Young, E.D. and A. Galy, *The Isotope Geochemistry and Cosmochemistry of Magnesium*. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 2004. **55**(1): p. 197-230.
203. Hermans, C., et al., *An update on magnesium homeostasis mechanisms in plants*. *Metallomics*, 2013. **5**(9): p. 1170-1183.
204. Buchachenko, A.L., D.A. Kuznetsov, and N.N. Breslavskaya, *Chemistry of Enzymatic ATP Synthesis: An Insight through the Isotope Window*. *Chemical Reviews*, 2012. **112**(4): p. 2042-2058.

7 Anexos

- 7.1 Determination of fatty acid methyl esters in cosmetic castor oils by flow injection–electrospray ionization–high-resolution mass spectrometry
- 7.1.1 Determination of chromium(III) picolinate in dietary supplements by flow injection - electrospray ionization - tandem mass spectrometry, using cobalt (II) picolinate as internal standard Electronic supplementary material
- 7.2 Determination of sulfonated azo dyes in chili powders by MALDI-TOF MS
- 7.3 Magnesium–Isotope Fractionation in Chlorophyll-a Extracted from Two Plants with Different Pathways of Carbon Fixation (C3, C4)