

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA BIDIMENSIONAL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE NUCLEÓTIDOS MONOFOSFATO Y RESIDUOS DE FÁRMACOS VETERINARIOS EN LECHE DE OVEJA

Noelia Caballero-Casero^{a,b} (a42caasn@uco.es), Diego García-Gómez^a, Encarnación Rodríguez-Gonzalo^a

^aDpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Salamanca, España

^bDpto. Química Analítica, Universidad de Córdoba, España

Introducción

Los alimentos son la fuente de nutrientes y energía de los seres humanos. Pero, además, los alimentos, que pueden consumirse frescos, procesados o cocinados, ejercen una función lúdica y social. Así, la gastronomía asociada a una población pasa a ser un reflejo cultural, social, religioso e histórico a través de la comida.

Los alimentos, frescos o procesados, presentan una composición muy compleja dado su variado contenido en nutrientes orgánicos (proteínas, fibras, carbohidratos, etc.) e inorgánicos (agua, minerales como los oligoelementos, etc.). Además de los componentes naturales, al analizar alimentos podemos encontrar otras sustancias de origen no natural. Principalmente, estas sustancias xenobióticas provienen de dos tipos de fuentes i) contaminación derivada de los procesos de producción, procesado y/o envasado del alimento; o ii) adición intencionada para mejorar las propiedades del alimento.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), así como otros sistemas nacionales para el control alimentario velan para que los alimentos tengan las características apropiadas para el consumo humano, garantizando la protección de la salud y seguridad de los consumidores y la calidad de los alimentos [1]. Por tanto, el análisis de los productos alimentarios puede estar principalmente dirigido a la evaluación de la calidad y la autenticidad de los alimentos y a la determinación de sustancias con un posible efecto tóxico para la salud humana. En España existe una extensa legislación para el Control y Seguridad Alimentaria, con el fin de asegurar a los consumidores la máxima calidad y seguridad en los alimentos.

En España, en 2020 se produjeron en total unos 527,4 millones de litros de leche de oveja, lo que equivale a un valor económico aproximado de 490 millones de euros [2]. La leche de oveja presenta un extraordinario valor nutritivo, destacando su alto contenido proteico y de nutrientes esenciales como los nucleótidos, compuestos esenciales en procesos vitales. Sin embargo, también puede contener residuos relacionados con el uso de fármacos veterinarios, cuyo

nivel máximo está regulado por la Unión Europea. Por ello, el control de la calidad y seguridad de la leche producida es de vital importancia.

El uso veterinario de los antibióticos está aprobado en animales para producción de alimentos, como prevención de enfermedades. Como consecuencia de su uso, residuos de estas sustancias veterinarias pueden llegar a los alimentos derivados de animales como la leche. La determinación de estos compuestos se lleva a cabo mediante separación en LC basada en interacciones hidrófobas en fase inversa [3]. Por otra parte, los nucleótidos participan en numerosas funciones fisiológicas y deben ser incorporados a través de la alimentación, llegando a determinar la calidad de la leche. Los nucleótidos son preferentemente analizados mediante LC acoplada a UV, aunque la separación se basa en cromatografía de intercambio aniónico o par iónico [4].

En la actual situación de competencia global y dada la complejidad de las muestras, los laboratorios de análisis de alimentos requieren metodologías analíticas que les permitan evaluar de forma simultánea la calidad y seguridad de los alimentos. Para ello es necesario el desarrollo de técnicas y metodologías analíticas rápidas y versátiles, que permitan la determinación de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas de forma simultánea.

La cromatografía de líquidos (LC) ha sido ampliamente utilizada a lo largo de los años para la separación y determinación de una amplia variedad de compuestos en análisis de alimentos [5]. La tendencia actual es de minimización y simplificación de los procesos analíticos, incentivando el desarrollo instrumental para resolver aquellos casos más complejos. La cromatografía líquida bidimensional (2D-LC) se ha convertido en los últimos años en la principal alternativa para el análisis de muestras de alimentos enfocados en la determinación de compuestos con propiedades fisicoquímicas muy

diferentes. Así, la cromatografía bidimensional permite combinar dos separaciones independientes o casi independientes, mejorando cualquier separación de compuestos efectuada en la clásica LC. Existen dos modalidades operacionales diferentes en 2D-LC: *i) Comprehensive*: todo el extracto de muestra es analizado en la primera columna cromatográfica (1D), tras lo cual es introducido en la segunda columna (2D) la cual tiene una selectividad distinta. El empleo de columnas cromatográficas basadas en mecanismos de selectividad diferentes permite la separación eficaz de los compuestos. *ii) Heart-cutting*: igualmente todo el extracto de muestra es introducido en 1D, tras lo cual, solo una fracción del eluido o algunas fracciones (*multiple heart-cutting*) es transferida a 2D mediante una válvula situada entre la columna 2D y el detector de que monitoriza la salida de 1D.

Por todo lo anteriormente descrito, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el uso de la cromatografía bidimensional *heart-cutting* para el desarrollo de una metodología analítica que permita el análisis simultáneo de antibióticos y nucleótidos en leche de oveja.

Metodología propuesta

Nuestro grupo de investigación ha propuesto por primera vez el uso de la cromatografía líquida bidimensional (2DLC) en modo *heart-cutting* para la separación simultánea de residuos veterinarios y nucleótidos monofosfato. Para el desarrollo de la metodología se han seleccionado 6 antibióticos habitualmente utilizados en ganadería: trimetoprima, sulfóxido de albendazol, sulfona de albendazol, sulfona-2-amino de albendazol, enrofloxacino y ciprofloxacino. Cuyos residuos máximos en leche de oveja están legalmente establecidos. En cuanto a los nucleótidos se seleccionaron la citidina monofosfato, uridina monofosfato, inosina monofosfato, guanosina monofosfato y adenina monofosfato. En cuanto al tratamiento de muestra, la metodología empleada se centró en la eliminación de los potenciales interferentes provenientes de la matriz, proteínas y lípidos, mediante la ultrafiltración asistida por centrifugación (CUF) de la muestra de leche.

El extracto de muestra es introducida en el sistema cromatográfico a través de un automuestreador. En primer lugar se procedió a la separación de los residuos veterinarios, para lo que se eligió una columna de fase reversa modificada con pentafluorofenil (C18-PFP) para aumentar la selectividad. Como fase móvil se empleó una mezcla

hidroorgánica acidificada hasta pH 3. Dada las diferencias fisicoquímicas existentes entre los residuos veterinarios y los nucleótidos, cabía esperar que estos últimos no sean retenidos por esta fase estacionaria, eluyendo al inicio del cromatograma. Con ayuda de un detector UV a la salida de 1D, se optimizó la separación cromatográfica de los residuos veterinarios y se determinó la fracción correspondiente a los nucleótidos monofosfato.

La fracción de eluido de 1D correspondiente a los nucleótidos fue transferida para su análisis cromatográfico a 2D, mediante una válvula de seis canales. La fracción de 1D entra en la válvula transportada por la fase móvil de la primera dimensión, llenando un *loop* de muestra. A continuación se produce un cambio en las conexiones entre canales de la válvula permitiendo que la fase móvil de la segunda dimensión transporte la fracción hasta la columna 2D, donde se produce la separación de los nucleótidos (Figura 1). Para la separación cromatográfica de los nucleótidos se utilizó una fase estacionaria de fase reversa modificada con grupos de par-iónico básicos; y una mezcla hidroorgánica con acetato de sodio (pH 4,5) como fase móvil. La concentración de acetato de sodio fue estudiada para optimizar la separación de los compuestos manteniendo un tiempo de análisis similar al de la primera dimensión.

Una vez desarrollado el método de análisis, se procedió a la validación de la metodología analítica conforme a la Directiva Europea 2002-657-CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados en análisis alimentario [6]. Finalmente, el método fue aplicado a la determinación de los once analitos (6 residuos veterinarios y 5 nucleótidos) en muestras comerciales de leche de oveja. Los resultados obtenidos mostraron la eficiencia de la metodología desarrollada, permitiendo la determinación simultánea de las dos familias de compuestos con eficiencias de extracción de entre 80-108% y valores de precisión (expresado como desviación estándar relativa, RSD) inferiores al 13%; cumpliendo con los requerimientos de la Directiva Europea 2002-657-CE.

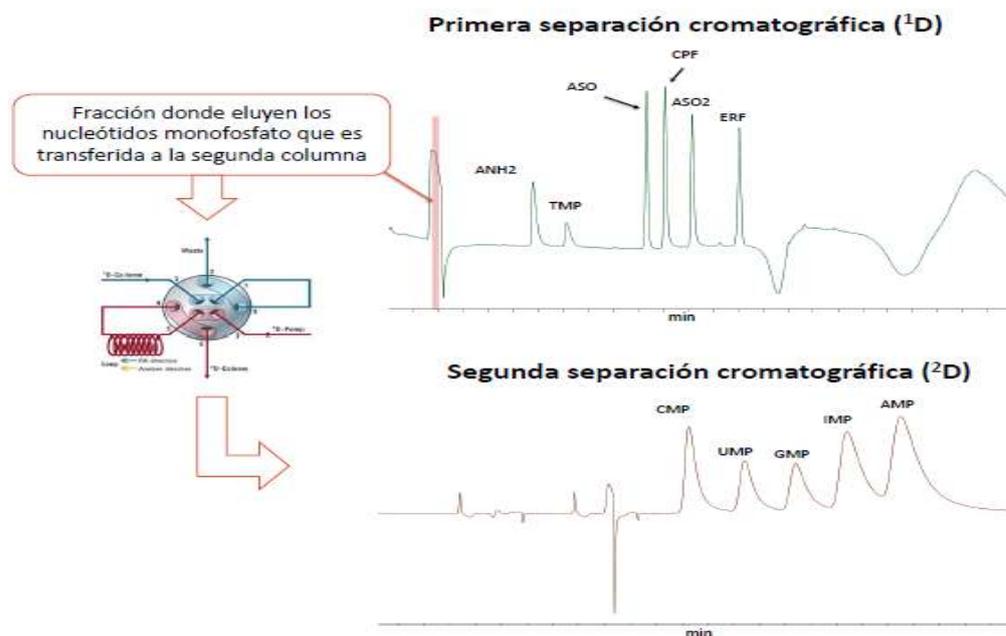


Figura 1. Cromatogramas obtenidos en la separación de residuos veterinarios (1D) y nucleótidos monofosfato (2D); y esquema de trabajo de la válvula en la modalidad de heart-cutting.

Dada la simplicidad del tratamiento de muestra propuesto y el corto tiempo de análisis, gracias al empleo de la cromatografía bidimensional-*heart cutting*, el método analítico propuesto podría ser implementado en laboratorios para el control y seguridad de los alimentos.

Perspectivas futuras

El futuro para esta línea de investigación se basará en dos pilares fundamentales. En primer lugar, la ampliación del estudio a nucleótidos di- y trifosfato, consiguiendo su separación cromatográfica en fase reversa en vez de la habitualmente empleada cromatografía de par-iónico. De esta forma, se reduce el consumo de disolventes y reactivos tóxicos, haciendo la metodología más respetuosa con el medio. En segundo lugar, el desarrollo de metodologías de cromatografía bidimensional basadas en el uso de fases estacionarias ortogonales (ej. fase reversa y HILIC).

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer la financiación recibida a través de la Junta de Castilla y León (SA016G19). Noelia Caballero-Casero agradece la financiación recibida para su contrato postdoctoral en la Universidad de Salamanca.

Referencias

- [1] <https://www.fao.org/home/es/> (15/09/2022)
- [2] Caracterización del sector ovino y caprino de leche en España, Subdirección General de Producciones Ganaderas y Cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. 2020
- [3] J. Peris-Vicente, E. Peris-García, J. Albiol-Chiva, A. Durgbanshi, E. Ochoa-Aranda, S. Carda-Broch, D. Bose, J. Esteve-Romero. *Liquid chromatography, a valuable tool in the determination of antibiotics in biological, food and environmental samples*. *Microchemical Journal*, 177, 2022:107309.
- [4] B. Teixeira, R. Mendes. *Analysis of added phosphates in hake fillets by ion-exchange chromatography: A case study of false positives induced by nucleotides coelution*. *Food Chemistry*, 368, 2022:130841
- [5] C. Soler, J. Mañes, Y. Picó. *The role of the liquid chromatography-mass spectrometry in pesticide residue determination in food*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 38(2) 2008:93-117
- [6] Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002. Diario Oficial de la Unión Europea L 221 de 17 de agosto de 2002.