

Universidad de Huelva

Departamento de Química y Ciencias de los Materiales



Universidad
de Huelva

Estudio analítico de especies metálicas, biomoléculas y metalobiomoléculas en alimentos como marcadores de calidad y autenticidad

Memoria para optar al grado de doctor
presentada por:

Ana Arias Borrego

Fecha de lectura: 21 de enero de 2008

Bajo la dirección de los doctores:

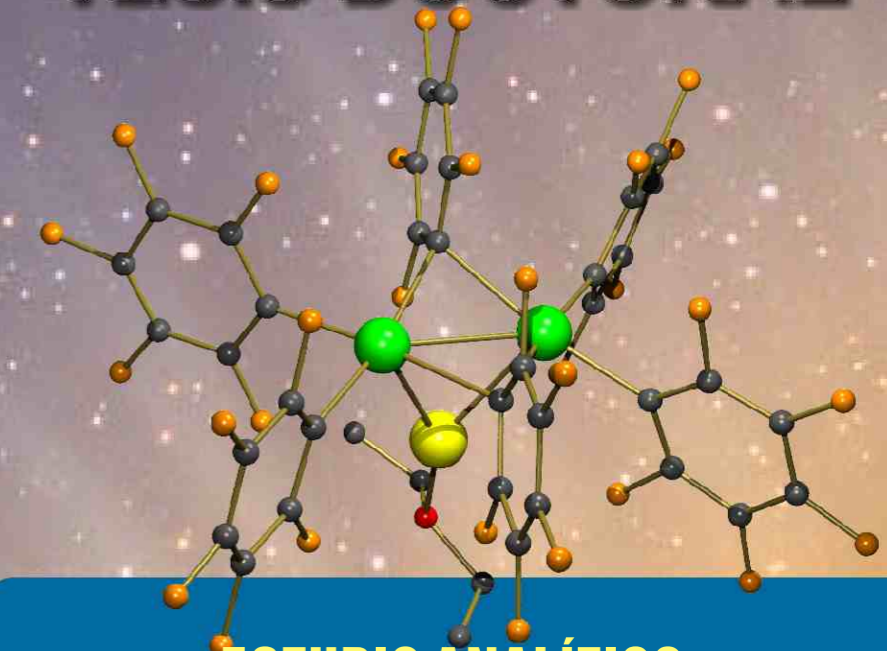
José Luis Gómez Ariza
Tamara García Barrera

Huelva, 2008

ISBN: 978-84-96826-85-4

D.L.: H 238-2008

TESIS DOCTORAL



ESTUDIO ANALÍTICO DE ESPECIES METÁLICAS, BIOMOLÉCULAS Y METALBIOMOLÉCULAS EN ALIMENTOS COMO MARCADORES DE CALIDAD Y AUTENTICIDAD

Ana Arias Borrego
2008



Universidad
de Huelva

Ana
Arias
Borrego

ESTUDIO ANALÍTICO DE ESPECIES METÁLICAS, BIOMOLÉCULAS Y METALBIOMOLÉCULAS
EN ALIMENTOS COMO MARCADORES DE CALIDAD Y AUTENTICIDAD

2008

Esta tesis abordará estudios de aseguramiento de la calidad de diversos alimentos cardiosaludables y en suplementos alimenticios enriquecidos en selenio, que tienen carácter esencial y que desempeñan un importante papel en la prevención de determinadas enfermedades importantes, como el cáncer.

Las metodologías desarrolladas permitirán establecer las características químicas de los mismos, y establecer tanto denominaciones de origen como grado de calidad y autenticidad.

Se aplicará nuevas herramientas analíticas, basadas en el empleo de la espectrometría de masas y la cromatografía líquida, caracterizadas por su multidimensionalidad, con el propósito de poder abordar problemáticas complejas asegurando al mismo tiempo la rapidez y precisión del análisis.

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES
"Profesor José Carlos Martín"



Análisis
Medioambiental
Bioanálisis



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES
«Profesor José Carlos Vilchez Martín»



**Universidad
de Huelva**

**VICERRECTORADO DE
EXTENSIÓN UNIVERSITARIA**

**ESTUDIO ANALÍTICO DE ESPECIES METÁLICAS,
BIOMOLÉCULAS Y METALBIOMOLÉCULAS EN
ALIMENTOS COMO MARCADORES DE CALIDAD Y
AUTENTICIDAD**

Ana Arias Borrego, 2008

**ESTUDIO ANALÍTICO DE ESPECIES METÁLICAS,
BIOMOLÉCULAS Y METALOBIMOLÉCULAS
EN ALIMENTOS COMO MARCADORES
DE CALIDAD Y AUTENTICIDAD**

Directores:

Fdo.: José Luis Gómez Ariza
CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD

Fdo.: Tamara García Barrera
PROFESOR CONTRATADO DOCTOR

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES
«Profesor José Carlos Vilchez Martín»
Universidad de Huelva

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor por la Licenciada:
Fdo.: Ana Arias Borrego

M^a Carmen Nicasio Jaramillo, profesora titular de universidad y directora del Departamento de Química y Ciencia de los Materiales «Profesor José Carlos Vílchez Martín» de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Huelva

HACE CONSTAR

Que el presente trabajo de investigación titulado «**Estudio analítico de especies metálicas, biomoléculas y metalobiomoléculas en alimentos como marcadores de calidad y autenticidad**», ha sido realizado en el Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, bajo la dirección del Dr. José Luis Gómez Ariza y la Dra. Tamara García Barrera, reuniendo los requisitos necesarios para este tipo de trabajos.

Y para que conste,
expido y firmo el presente certificado,
en Huelva a 3 de Enero de 2008

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han dedicado parte de su tiempo y dedicación a la elaboración de esta tesis doctoral:

En primer lugar, mi más amplio agradecimiento al Dr. José Luis Gómez Ariza, director de la presente memoria, nunca he dejado de sentir su confianza y apoyo para guiar el desarrollo de esta investigación, para asistir a cursos, congresos, y para viajar a otras universidades. Sus orientaciones y conocimientos han sido fundamentales para la finalización de esta investigación.

También quisiera hacer patente mi agradecimiento a la Dra. Tamara García Barrera, co-directora de este trabajo, por las valiosas aportaciones que me hizo, para mejorar la presente investigación y por su amistad.

A la Dra. Heidi Goenaga-Infante, por transmitirme todos sus conocimientos y por toda su ayuda incondicional. Con ella he aprendido cuestiones muy importantes que se reflejan en esta memoria.

Ella y todos los compañeros de LGC, hicieron posible que me sintiera en Londres como en mi propia casa, y siempre los recordaré.

A mis compañeros por compartir este tiempo con ellos. A ellos les deseo mucha suerte.

En especial quiero dar mi más profunda gratitud a mi familia. Ellos son los pilares de mi vida, los que me han transmitido siempre la fuerza necesaria para continuar, los que nunca me han fallado, los que me han acompañado en los buenos y malos momentos.

Sería absurdo tratar de medir o concretar mi agradecimiento en especial a mis padres, por su ayuda, cariño y comprensión a lo largo de todos estos años. En cada ejemplo, en cada línea y en cada palabra podría indicar la influencia de su apoyo, de sus sugerencias y de su compañía. Sólo espero ser capaz de devolverles algún día lo mucho que me han ayudado.

Por último, me gustaría resaltar la amistad, paciencia y cariño de Juan Francisco. Llego el final de esta memoria gracias a su apoyo, sin él no lo hubiera conseguido. Gracias por hacer que mis sueños sean tuyos, por animarme siempre más allá de todos los límites, y especialmente gracias, por hacerme reír en los momentos más duros.

A todos mi mayor reconocimiento y gratitud

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

El objetivo general del presente estudio es diseñar y aplicar nuevas herramientas analíticas, basadas en el empleo de la espectrometría de masas y la cromatografía líquida, caracterizadas por su multidimensionalidad, con el propósito de poder abordar problemáticas complejas, asegurando al mismo tiempo la rapidez y precisión del análisis. Este objetivo genérico puede concretarse en los siguientes objetivos concretos:

1.- Estudiar la aplicación de la espectrometría de masas en tandem con dispositivos de elevada resolución, como el triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqTOF-MS) a la resolución de mezclas complejas de analitos de interés alimentario, como son los aceites vegetales y en particular el aceite de oliva. Se pretende probar las posibilidades de distintos tipos de fuentes, como ESI y APPI, y aprovechar la elevada resolución de estos equipos para eliminar la etapa de separación cromatográfica. Asimismo, se pretende diseñar un procedimiento instrumental rápido que permite la identificación rápida de las adulteraciones del aceite de oliva.

2.- Estudiar la aplicación de procedimientos metalómicos basados en el empleo de la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) acoplada en línea con el ICP-MS. Se pretende aprovechar la elevada sensibilidad del detector

ICP-MS y su carácter multielemental para la obtención de perfiles metal-biomoléculas en muestras de alimentos. De esta forma se podrán obtener perfiles que establezcan la presencia de moléculas de una determinada masa molecular unidas de forma estable a metales esenciales o tóxicos. En el presente estudio se estudiará el piñón (*Pinus pinea*) para comprobar las posibilidades que ofrecen estos perfiles para clasificar este alimento en función de su procedencia, la cual influye en el nivel de metales en el piñón.

3.- Abordar un estudio metalómico más profundo en el piñón, en el que se considerará el elemento que según la bibliografía tiene una presencia más destacada como es el manganeso. Se aplicarán técnicas cromatográficas ortogonales o complementarias, que incorporan el dispositivo ICP-MS como detector, para la selección y purificación de fracciones que contengan manganeso unido a determinadas biomoléculas. Las especies de Mn se identificarán con patrones en los casos en que se encuentre una correlación con los picos cromatográficos de dichos patrones. En los casos dudosos o cuando aparezcan picos de sustancias desconocidas, se utilizará la espectrometría de masas para su identificación de los compuestos desconocidos.

4.- Se aplicará un procedimiento metalómico análogo al anterior para la caracterización de las especies de selenio en la piel y pulpa de patata enriquecida con este elemento, para su uso como aditivo alimentario. Se utilizará el acoplamiento HPLC-ICP-MS para separar las especies que contienen selenio y el sistema HPLC-MS/MS para su identificación

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	
1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS	5
1.1. Alimentos Cardiosaludables	7
1.1.1. Aceite de Oliva	7
1.1.2. Frutos Secos	8
1.2. Importancia de los elementos en los alimentos	12
1.3. Suplementos alimenticios enriquecidos en Selenio	14
2. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS	16
2.1. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)	17
2.2. Cromatografía de Intercambio Iónico (IEC)	24
2.3. Cromatografía de Pares Iónicos	26
3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	27
3.1. Fuentes de Ionización Suaves	29
3.1.1. Electropray o Electronebulización (ESI)	29
3.1.2. Fotoionización a presión atmosférico (APPI)	32
3.1.3. Nanospray (n-ESI)	34
3.2. Analizadores de Masas	36
3.2.1. Moleculares	36
3.2.2. Detectores Atómicos	40
BIBLIOGRAFÍA	49
CAPÍTULO II: DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS	
RESUMEN EN INGLÉS	57
RESUMEN EN ESPAÑOL	59
1. INTRODUCCIÓN	60
2. EXPERIMENTAL	63
2.1. Reactivos y preparación de muestra	63
2.2. Instrumentación	63
2.2.1. ESI-QqTOF	63
2.2.2. APPI-QqTOF	65
2.2.3. Estudio estadístico de los resultados	66

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
3.1. Espectros de masas APPI	66
3.1.1. Optimización del DP para la discriminación de los distintos aceites	69
3.2. Estudio Comparativo de los espectros de masas con las fuentes de Ionización ESI y APPI	71
3.2.1. Estudio de mezclas de aceites	79
3.2.1.1. Análisis de componentes principales	82
3.2.1.2. Análisis discriminante	85
4. CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88

CAPÍTULO III: PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A METALES EN EXTRACTOS DE PIÑONES (PINUS PINEA) MEDIANTE SEC-UV

RESUMEN EN INGLÉS	93
RESUMEN EN ESPAÑOL	95
1. INTRODUCCIÓN	97
2. EXPERIMENTAL	99
2.1. Estándar y Reactivos	99
2.2. Muestras	100
2.3. Instrumentación	100
2.4. Procedimiento	104
2.4.1. Presencia de metales en los piñones	104
2.4.2. Tratamiento de muestra para la obtención de perfiles mediante SEC-UV-ICPMS	105
2.4.3. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-UV-ICPMS)	105
2.4.3.1. Condiciones experimentales	105
2.4.3.2. Calibración de las columnas de exclusión de tamaño	106
2.4.3.3. Control de calidad de los análisis	108
2.4.4. Tratamiento de datos	109

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
3.1. Optimización del procedimiento de determinación del contenido de metales en muestras de piñones	109
3.2. Concentración de elementos en las muestras de piñones	111
3.3. Optimización de las condiciones de extracción y análisis mediante SEC-UV-ICP-MS	113
3.4. Perfiles cromatográficos de las muestras mediante SEC-UV ...	114
3.4.1. Perfiles UV con la columna Superdex 30 (< 10 kDa)	114
3.4.2. Perfiles SEC-UV obtenidos con la columna Superdex 75 (3-70 kDa)	116
3.5. Perfiles cromatográficos de las muestras mediante SEC-ICP-MS	117
3.6. Descriptores Químicos para determinar la procedencia de las muestras. Estudio Estadístico	124
3.6.1. Abundancia relativa de Mn	125
3.6.2. Abundancia relativa de Cu, Ni y Zn	125
3.6.3. Análisis estadístico (Análisis de Componentes Principales -ACP)	126
4. CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	136

CAPÍTULO IV: ESPECIACIÓN DE MANGANESO EN METALES DE PIÑONES POR CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL Y DETECCIÓN UV-ICP-MS. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE MANGANESO AISLADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

RESUMEN EN INGLÉS	141
RESUMEN EN ESPAÑOL	143
1. INTRODUCCIÓN	145
2. EXPERIMENTAL	148
2.1. Estándares y Reactivos	148
2.2. Preparación de Muestra	149
2.3. Instrumentación	150
2.4. Procedimiento	151
2.4.1. Análisis elemental de Mn	151

2.4.2. Primera dimensión cromatográfica. Fraccionamiento por cromatografía de exclusión de tamaño	151
2.4.3. Segunda dimensión cromatográfica. Fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico	152
2.4.4. Análisis de las fracciones mediante nano-electrospray Q-TOF.	155
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	157
3.1. Perfil de Mn obtenido por SEC-UV-ICP-MS. Primera Dimensión	157
3.2. Fraccionamiento y cuantificación de Mn por IEC-UV/ICP-MS	158
3.3. Balance de masas de Mn	160
3.4. Identificación del citrato de Manganeso mediante DI-QqTOF	161
3.5. Identificación de una proteína de Mn en las muestras de piñones	162
4. CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA.....	167

**CAPÍTULO V: ESPECIACIÓN DE SELENIO EN PATATAS
ENRIQUECIDAS CON ESTE ELEMENTO
MEDIANTE HPLC-ICP-MS. IDENTIFICACIÓN
DE ESPECIES DE SELENIO CON ESI-MS/MS**

RESUMEN EN INGLÉS	171
RESUMEN EN ESPAÑOL	172
1. INTRODUCCIÓN	174
2. EXPERIMENTAL	176
2.1. Reactivos y Estándares	176
2.2. Preparación de las muestras	177
2.3. Instrumentación	177
2.4. Procedimiento	178

2.4.1. Determinación de Selenio total en las muestras digeridas	178
2.4.2. Extracción de los compuestos de Selenio con líquidos presurizados	179
2.4.3. Hidrólisis Enzimática	180
2.4.4. Especiación de selenio por HPLC-ICP-MS	180
2.4.5. Fraccionamiento y liofilización, de la fracción desconocida	181
2.4.6. Análisis por RP-IP HPLC-ESI-MS/MS	182
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	183
3.1. Evaluación de Se total (digestión con microondas)	183
3.2. Evaluación del Extracto Acuoso	183
3.3. Evaluación de la hidrólisis enzimática	187
3.4. Identificación de compuestos de Se por HPLC-ESI-MS/MS	188
3.4.1. Identificación del compuesto mayoritario (SeMet) en patatas enriquecidas en Se	188
3.4.2. Verificación de la fracción desconocida	190
4. CONCLUSIONES	192
BIBLIOGRAFÍA	195

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. CONCLUSIONES EN INGLÉS	199
2. CONCLUSIONES EN ESPAÑOL	203

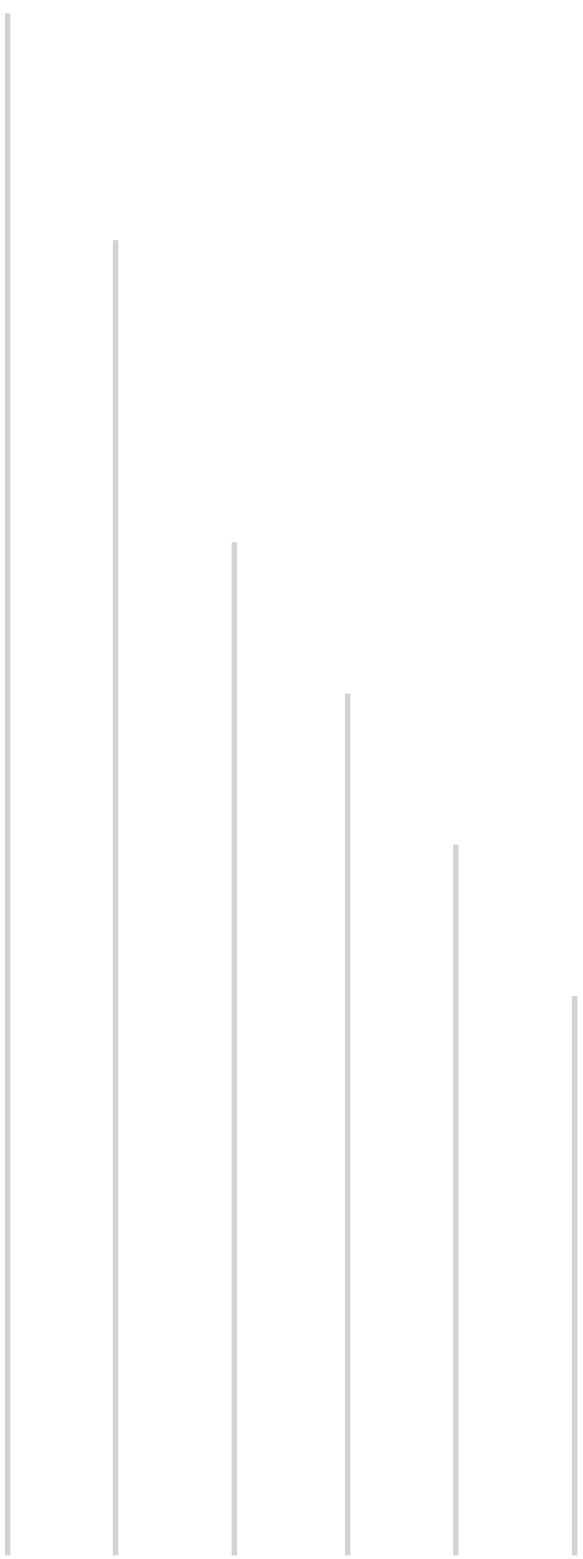
ANEXOS

1. PUBLICACIONES	209
------------------------	-----

Índice de Abreviaturas

- APCI: Ionización química a presión atmosférica
- APPI: Ionización a presión atmosférica fotoionización
- ASE: Extracción acelerada con disolvente
- CA: Análisis cluster
- CE: Electroforesis capilar.
- CID: Colisión inducida
- DAGs: Diglicéridos
- DC: Corriente continua
- DPASV: Voltamperometría diferencial de pulso con redisolución anódica.
- DTT: Ditiotreitól
- ESI-MS: Espectrometría de masas en tándem con ionización por Electrospray
- FIA: Análisis por inyección en flujo
- GC-MS: Cromatógrafo de gases-espectrometría de masas
- HMW: Alto peso molecular
- HLPC: Cromatografía líquida de alta resolución.
- HS-MS: Generador de espacio de cabeza a un espectrómetro de masas
- ICP-AES: Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción.
- IEC: Cromatografía de Líquidos de Intercambio Iónico
- ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción.

- ICP-ORC-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción con celda de colisión.
- IT-MS: Trampa de iones
- LDA: Análisis discriminante lineal
- LMW: Bajo peso molecular
- LQ: Límite de cuantificación
- MS/MS: Espectrometría de masas en tándem
- n-ESI: Nanoelectronebulización
- NMR: Espectroscopía resonancia magnética nuclear
- PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
- QqQ: Triple cuadrupolo
- QqTOF: Cuadrupolo-tiempo-de-vuelo
- RF: Radiofrecuencia
- RP: Cromatografía líquida, fase reversa
- SAX: Cromatografía de intercambio aniónico fuerte
- SEC: Cromatografía de exclusión de tamaño
- SRM Monitorización de la reacción seleccionada
- TAGs: Triglicérido
- TOF: Analizador tiempo-de-vuelo
- TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano
- UV-VIS: Espectrofotometría Ultravioleta-visible



CAPÍTULO I

1. CONTROL DE CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

No es fácil definir con precisión la calidad de un alimento, Kramer y Twigg, en 1962, definían la calidad como: «conjunto de características que diferencian las unidades individuales del producto y determinan el grado de aceptabilidad de estas unidades por el usuario o consumidor» [1].

Juran, en 1982, la define simplemente como: «la aptitud para el consumo» que está determinado por la característica del producto que el usuario o consumidor, y no el proveedor o el vendedor, considera como más beneficioso para él.

Por su parte AENOR define la calidad de un alimento como «la aptitud de un producto o servicio para satisfacer las necesidades de los usuarios o consumidores». Esta calidad está determinada por una serie de características y cualidades como: fiabilidad, posibilidad de conservación...etc.

Todas las definiciones tienen un aspecto común: situar la calidad como algo que se debe proporcionarse al usuario o consumidor. Por tanto las empresas del sector alimentario requieren herramientas analíticas avanzadas que permitan verificar, con la máxima fiabilidad, la calidad y pureza de los productos que comercializan.

La calidad de los alimentos viene condicionada por numerosos factores agronómicos, tecnológicos y comerciales, que determinan las características sensoriales del producto.

La medida de parámetros de calidad (color, aroma, composición química, valor nutritivo, efecto en el metabolismo etc.), permite mejorar los sistemas de control de calidad, monitorizando los procesos industriales.

Un aspecto importante en el control de calidad de los alimentos, es la autenticación de los mismos. Entendiendo por *autenticación*, «la verificación de las características del alimento y su composición en conformidad con su etiqueta». En este sentido, es necesario introducir en los estudios de laboratorio, no sólo la investigación de sus componentes característicos (para detectar posibles adulteraciones), sino también la de aquellos otros que representan una contaminación o modificación negativa de su composición.

En la actualidad la autenticación de los alimentos y sus derivados constituye una demanda prioritaria de los consumidores y compañías productoras, y sobre todo establecer las «denominaciones de origen» e «indicaciones geográficas», que constituyen el sistema utilizado en nuestro país para el reconocimiento de una calidad superior, consecuencia de características propias y diferenciales que determinan el medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos, y la intervención humana, ya que la participación del hombre, con sus connotaciones cultural, es decisivo en la producción de los alimentos.

Esta tesis abordará estudios de aseguramiento de la calidad de diversos alimentos cardiosaludables como el aceite de oliva y diversos frutos secos, así como de suplementos alimentarios enriquecidos en selenio.

Las metodologías desarrolladas permitirán establecer los parámetros químico fundamentales en estos alimentos, los cuales tienen gran importancia al establecer tanto las denominaciones de origen como su grado de calidad y autenticidad.

1.1 ALIMENTOS CARDIOSALUDABLES

1.1.1 ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es uno de los componentes más importantes de la dieta Mediterránea. Es un extracto de la aceituna que conserva el paladar, aroma, vitaminas y todas las propiedades del fruto del que procede, siendo además el único aceite vegetal que puede consumirse directamente virgen y crudo.

Numerosos estudios demuestran que el consumo del aceite de oliva protege frente al desarrollo del cáncer, enfermedades cardiovasculares [1] y diabetes [2], favoreciendo, asimismo, el desarrollo de los huesos y el correcto funcionamiento del sistema nervioso [3]. Además, se ha demostrado que posee propiedades antioxidantes y, como consecuencia de ello retrasa el envejecimiento celular [4], poseyendo una acción general favorable en la nutrición y la dieta.

La detección de la adulteración y caracterización del aceite de oliva están basados en la determinación de la composición del mismo, en la que se distinguen dos importantes fracciones, la fracción *saponificable* y la *insaponificable*. La fracción saponificable (componentes mayoritarios) supone del 98 al 99% del aceite de oliva, y se compone a su vez de triglicéridos, ácidos grasos saturados (mirístico, palmítico, esteárico, aráquico) 8-

23%, monoinsaturados (palmitoléico, oleico) 61-83% y polínsaturados (linoléico, linolénico) 2-19% [1]. Los valores varían según diversos factores como puede ser la variedad de la aceituna, el las características del terreno, la época de recolección, etc.

El alto contenido en ácido oleico es favorable en las propiedades que posee el aceite de oliva para la salud, tanto en crudo como en frituras, porque es mucho más estable que los demás aceites vegetales (girasol, soja, semillas, etc.), casi siempre ricos en polínsaturados, que son menos estables a altas temperaturas, lo que favorece su oxidación y alteración, cosa que ocurre en mucha menor proporción en el aceite de oliva [1].

La fracción insaponificable (componentes minoritarios) supone entre el 1 y el 2% del total del aceite de oliva, y está constituida por; hidrocarburos, terpenos, carotenos (que confiere la coloración amarilla a los aceites), pigmentos no terpénicos (clorofila), tocoferoles, alfa-tocoferol, vitamina E (antioxidante), esteroides (que interfieren en la absorción intestinal del colesterol), polifenoles (antioxidantes y responsables del sabor) y productos volátiles (responsables de los aromas).

En la presente esta tesis se describen dos métodos analíticos rápidos y precisos que permiten detectar la presencia de adulteraciones en el aceite de oliva (Capítulo II) en función del contenido en triacilglicéridos.

1.1.2 FRUTOS SECOS

El interés por los efectos beneficiosos de los frutos secos sobre la salud surge a partir de los datos obtenidos con estudios epidemiológicos, en los que se ha comprobado que el consumo frecuente de frutos secos reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares [5, 6, 7, 8].

Así, la ingesta de frutos secos es una medida fácil para prevenir enfermedades que constituyen la mayor causa de morbilidad y mortalidad del mundo occidental [9, 10, 11].

Tradicionalmente los frutos secos han sido considerados como alimentos de gran valor nutricional por su capacidad de aporte de una extensa variedad de sustancias beneficiosas. Sin embargo, al ser muy energéticos y ricos en grasas, los frutos secos no se consumieron de forma regular durante años ante la creencia de que su consumo implicaba el aumento del peso corporal [12].

No obstante, las últimas investigaciones han dado resultados sorprendentes en este sentido, ya que su empleo como suplemento en la dieta no parece producir cambios de peso en los sujetos.

En los frutos secos, el contenido calórico oscila entre 5,6 y 6,4 Kcal por gramo de alimento. Todos los frutos secos tienen una composición similar en proteínas (13-26%), en azúcares (15-25%) y en lípidos (48-63%). A pesar del elevado contenido en lípidos, los frutos secos poseen una composición muy adecuada desde el punto de vista nutricional, con un predominio en el aporte en ácidos grasos insaturados, donde los ácidos oleicos y linoleicos contribuyen en más del 75% del aporte graso, aunque cada variedad tiene sus propias características [13,14].

Las avellanas, almendras y pistachos son frutos ricos en ácido oleico, y por lo tanto son una fuente importante de ácidos grasos monoinsaturados. Las nueces son ricas en el ácido linoleico, y en consecuencia constituyen un aporte de ácidos grasos poliinsaturados. Asimismo, las nueces aportan ácido linolénico en una proporción de hasta el 6,8% del contenido graso.

Sin embargo, este ácido graso se encuentra en menor cantidad en otros frutos secos, no alcanzando el 1% de los ácidos grasos. Por otro lado, los niveles de ácidos grasos saturados no superan el 7% [13, 14].

La cantidad de fibra, mayoritariamente insoluble, es apreciable, entre 5 y 11 g por cada 100 g de fruto seco, y oscila según las diversas variedades de fruto. Un consumo adecuado de fibra es importante para facilitar y regular el tránsito intestinal, por lo que evita el estreñimiento [15, 16]. No obstante, en los últimos años se han descrito nuevos efectos beneficiosos del consumo de fibra. Por una parte, el consumo de la fibra insoluble de los frutos secos, ejerce protección cardiovascular, por otra, la ingesta de fibra de tipo soluble produce una reducción del colesterol plasmático, mejora el control de la glicemia y es útil en la prevención y el tratamiento de la obesidad.

Además, estos frutos son una buena fuente natural de vitamina E, en especial las almendras y las avellanas, que contienen unos 20 mg por 100 g de producto [16]. En el resto de frutos secos el contenido en vitaminas es inferior, del orden de 3 a 9 mg por 100 g de alimento. La importancia de la vitamina E radica en su acción antioxidante, responsable de la neutralización de radicales libres, disminución de la oxidación lipídica, y protección debido a ello de las membranas celulares. Hay evidencias de que la vitamina E es un agente que reduce el riesgo cardiovascular. La vitamina E también es un importante anticarcinógeno, así ingestas deficientes en vitamina E se han asociado a un incremento del riesgo de diferentes tipos de cáncer.

Otra vitamina que los frutos secos aportan en abundancia es el ácido fólico, con valores alrededor de 60-70 $\mu\text{g}/100\text{g}$, a excepción de los cacahuetes que contienen hasta 240 $\mu\text{g}/100\text{g}$. El ácido fólico desempeña un papel estratégico en el metabolismo de la homocisteína, al reducir sus niveles en el plasma y, en consecuencia, disminuir el riesgo arteriosclerótico.

Además, estos frutos proporcionan minerales como el calcio, el magnesio, el cobre, el potasio, el selenio y el zinc. También es valioso el contenido en fitoesteroles y otras sustancias fotoquímicas [17, 18, 19].

Los fitosteroles, como el β -sitosterol, el estigmasterol y el campesterol, son los esteroides procedentes de las plantas y poseen propiedades hipocolesterolemiantes. Las sustancias fitoquímicas son moléculas bioactivas de las plantas, presentes en cantidades minoritarias, que contribuyen significativamente a la protección frente a las enfermedades cardiovasculares. Los fitoquímicos se encuentran en gran variedad de alimentos. Los frutos secos son una de sus mayores fuentes, así como las frutas y verduras, los cereales, la soja y el té. La mayoría de los alimentos contienen más de un tipo de fitoquímicos. Entre la amplia variedad de agentes fitoquímicos presentes en los frutos secos pueden citarse: ácido elálgico, flavonoides (quercitina, kaempferol y rutina), compuestos fenólicos, luteolina, isoflavonoides, tocotrienoles. El contenido global de isoflavonoides en los frutos secos es de 0,26 mg por 100g de porción comestible. La cocción o el procesado de los alimentos eliminan, en gran parte, la viabilidad de estas sustancias, de manera que sus beneficios quedan reducidos. La ingestión de los frutos secos en forma cruda multiplica el aporte de estos fitoquímicos, por lo que cada vez más se recomienda como medida nutricional.

Los frutos secos son también una interesante fuente de proteínas de origen vegetal, destacando su contenido en arginina, aminoácido que entre otras funciones es precursor del óxido nítrico, el cual actúa como vasodilatador endotelial y tiene una acción antiplaqueta. Un déficit de óxido nítrico se asocia a disfunción endotelial, y por lo tanto, aumenta el riesgo cardiovascular. El contenido en arginina en los frutos secos es de 2 g a 3 g por cien gramos de alimento.

En resumen, diversos componentes de los frutos secos pueden intervenir sobre los mecanismos implicados en el proceso de aparición de arteriosclerosis, antecedente de las enfermedades cardiovasculares.

1.2 IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS EN LOS ALIMENTOS

La presencia de elementos esenciales en los alimentos es crítica debido a varias razones, en particular su influencia en procesos biológicos importantes y su relación con episodios de contaminación, en particular la composición elemental del suelo [20, 21]. Por otra parte, la función de muchas biomoléculas y en particular metaloproteínas depende críticamente de su interacción con los elementos, principalmente los de transición [22].

El cobre, níquel, cinc, manganeso y selenio han sido seleccionados debido a su importancia en el metabolismo, por ejemplo, el manganeso es un cofactor de la enzima piruvato carboxilasa y actúa también como un activador no específico para varias enzimas, como son la superóxido dismutasa, glicosiltransferasas, arginasa y otras. Otras proteínas en las cuales el Mn puede estar presente son, la albúmina y β 1-globulina [23]. Además, el Mn es necesario para el metabolismo de las grasas, el correcto funcionamiento del sistema nervioso e inmunológico, así como para la regulación de azúcares [24]. El cobre a su vez está relacionado con varias proteínas (ej. superóxido dismutasa y citocromo oxidasa), transporta el hierro, participa en la síntesis del tejido conjuntivo, en el metabolismo de los lípidos y tiene propiedades antioxidantes [25]. El níquel, juega un papel importante en el metabolismo del folato [26]. El cinc es un elemento que está asociado a más de 200 enzimas y proteínas, participando en todos los procesos metabólicos importantes [27]. Además, este elemento también interviene en la síntesis de proteínas a través de la expresión génica [25]. Por último el selenio es un elemento traza esencial para la salud [28, 29], que forma parte de las selenoproteínas, las cuales poseen importantes propiedades antioxidantes y previenen el daño celular originado por los radicales libres. Éstos son productos derivados del metabolismo que contribuyen al desarrollo de patologías como el cáncer o las enfermedades coronarias [30, 31]. Por otra parte, las selenoproteínas participan en la regulación de la función tiroidea y representan un papel importante en el sistema inmune [31].

Entre 1979 y 1981 dos equipos de investigadores independientes demostraron la reversibilidad de los síntomas clínicos en dos síndromes presumiblemente atribuidos a carencia de selenio: la enfermedad de Keshan [32] y la distrofia muscular, enfermedad que aparece tras períodos prolongados de nutrición parenteral [33].

Por otra parte, no sólo son importantes los elementos, sino también sus interacciones con moléculas como proteínas, vitaminas, etc. Los metales presentan un papel muy importante en el desarrollo de los seres vivos y en la función de numerosos biomoléculas como las metaloproteínas, básicamente vinculadas a la presencia de un metal, generalmente de transición como Cu, Fe, Zn o Mo. Otras proteínas como las metalotioneínas, se expresan como mecanismo de defensa de los organismos frente a situaciones de estrés ocasionadas por la presencia de metales. Otros metales actúan como transportadores de nutrientes o contaminantes [34]

En este sentido existen varias áreas emergentes en el análisis bioinorgánico: (i) el análisis completo de todas las especies de metales o metaloides en una célula o tejido (metalómica); (ii) el estudio de la parte del metaloma que comprende a los metales o metaloides que actúan como ligandos de proteínas (metalloproteómica); y (iii) el uso de un heteroelemento, que está presente de forma natural en una proteína o que se introduce artificialmente, como marcador, para que a través de su unión se pueda obtener el mapa de proteínas y/o su cuantificación (heteroatom-tagged proteomics) [34]

En el Capítulo III se describe un procedimiento analítico para la obtención de perfiles de peso molecular de las metalomoléculas presentes en muestras de piñones (*Pinus pinea*). Este procedimiento permite discriminar muestras de diferentes orígenes geográficos mediante análisis estadístico de los datos obtenidos.

En el Capítulo IV se describe a partir de los perfiles anteriores la identificación las metalomoléculas mediante espectrometría de masas molecular.

1.3 SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS ENRIQUECIDOS EN SELENIO

La suplementación con selenio de la población es necesaria cuando existe un déficit de este nutriente en la dieta. Se puede llevar a cabo directamente a través del enriquecimiento de algunos alimentos, o indirectamente, por medio de la fertilización previa de los suelos [35]. Así, el gobierno de Finlandia, en el año de 1984, llevo a cabo un programa nacional para adicionar selenito sódico a las tierras de cultivo. Mediante el uso de fertilizantes agrícolas enriquecidos en selenio evitaron enfermedades en animales domésticos y se incrementó en un 50% la concentración de selenio total en sangre de los finlandeses [36]. En China, la suplementación con selenito sódico también fue utilizada para controlar las enfermedades de «Keshan» y «Kashin-Beck» [37]. Adicionalmente, la legislación europea permite la adición de selenito sódico ($0,1 \text{ mg Se Kg}^{-1}$) [37].

El selenito y el selenato de sodio fueron los primeros compuestos de selenio que se utilizaron como suplementos nutricionales en animales, ya que eran los únicos compuestos de selenio disponibles a bajo coste. En la actualidad se ha demostrado que el uso de compuestos orgánicos de selenio (fundamentalmente selenometionina) resulta más adecuado para la suplementación [38, 39]. Las formas inorgánicas se siguen utilizando hoy día en preparados como fórmulas infantiles o la nutrición parenteral [40], lo que ha sido señalado por Schrauzer [41] como una práctica negativa.

Al buscar una fuente o suplemento de selenio orgánico de bajo coste, se probó incrementar el contenido normalmente bajo del elemento en levaduras haciéndolas crecer en un medio rico en el mismo [38]. La levadura (*Saccharomyce cerevisae*) puede acumular hasta $3000 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se, dependiendo de las condiciones de crecimiento [42, 43].

La especie mayoritaria de selenio en las levaduras, es la selenometionina, que se incorpora inespecíficamente a las proteínas [44, 45]. Sin embargo, como la producción comercial de levaduras enriquecidas en selenio no sigue un único protocolo de producción ni normativa de calidad, el contenido total de selenio y de las especies de selenio puede variar considerablemente de un producto a otro.

Los preparados farmacéuticos más utilizados hoy en día se realizan en base de levaduras enriquecidas en selenio, aunque también se utiliza selenometionina sintética. En este último caso, como sólo el isómero L existe de forma natural en los alimentos (y es bioasimilable por los seres vivos), es preferible utilizar dicho isómero en los suplementos para seres humanos, aunque para animales suele usarse la mezcla racémica por razones económicas [38].

Existen diversos factores que afectan a la biodisponibilidad de las formas de selenio en los preparados nutricionales usados para la suplementación humana. Entre estos pueden citarse las interacciones con otros micronutrientes encontrados en el suplemento, tipo de formulaciones que se toman, efectos derivados de la administración simultánea con otros medicamentos y la dosis de suplementación [35]. Por ejemplo, en el caso de multivitamínicos que contienen selenio inorgánico, éste interacciona con otros compuestos nutricionales como la vitamina C, cinc u otros minerales presentes en el preparado, reduciendo así su biodisponibilidad [38].

Se han utilizado también otra forma orgánica de selenio, presente en forma natural en alimentos, para suplementar a la población. Así, en Nueva Zelanda, el gobierno instituyó un programa mediante el cual se suplementaba a la población con alimentos enriquecidos en selenio (trigo enriquecido) importados de Australia [46].

En otros países donde se observan deficiencias de este elemento, ante la falta de legislaciones al respecto, los fabricantes han elaborado y puesto a la venta algunos alimentos enriquecidos en el mismo. Se han descrito alimentos enriquecidos en selenio como setas,

té, cerveza y mejillones [47]. En Inglaterra se venden productos de panadería elaborados con harina importada de Canadá o con nueces de Brasil, que resultan ser fuentes de este elemento [48].

Por todo lo anterior es evidente el interés por disponer de suplementos alimentarios de selenio, para lo que se están poniendo en práctica diversas alternativas. Sin embargo, se debe ser muy cauteloso con la forma de suplementación utilizada, así como con la dosis que se ingiere y el tiempo de administración.

En el Capítulo V se han aplicado varias metodologías analíticas para la especiación de selenio en patatas enriquecidas en este elemento.

2. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICAS

La cromatografía es un método muy utilizado en química analítica y permite la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas. Ningún otro método de separación es tan potente y de aplicación tan general como la cromatografía.

Es difícil definir rigurosamente el término de cromatografía, ya que se ha aplicado ese nombre a varios sistemas y técnicas. Sin embargo, todos esos métodos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se reparten de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos

componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

Entre los diversos criterios de separación cabe citar:

- Aquellos que fraccionan las moléculas basándose en sus tamaños, como la cromatografía de filtración en gel o exclusión de tamaño, y la ultracentrifugación.
- Los que separan las moléculas atendiendo a las diferencias en la carga eléctrica neta del compuesto, como la cromatografía de intercambio iónico y la electroforesis.
- Los que se basan en la retención específica de sólo uno o varios tipos de moléculas, entre los que cabe destacar la cromatografía de afinidad.
- Procedimientos de separación basados en diferencias de solubilidad.
- Métodos basados en la adsorción diferencial a determinadas matrices.

En esta tesis las técnicas cromatográficas utilizadas para la separación de los compuestos estudiados, son la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), la cromatografía de intercambio iónico (IEC) y la cromatografía de pares iónicos, que comentaremos con más detalle en los apartados que siguen.

2.1 CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN DE TAMAÑO (SEC)

La cromatografía de exclusión (SEC) es un tipo de cromatografía sólido-líquido que permite la separación de moléculas en función de su tamaño. En este tipo de

cromatografía la fase estacionaria es un gel, que se introduce en una columna como soporte cromatográfico.

El gel está constituido por un gran número de esferas porosas microscópicas formadas por largas cadenas de polímeros unidas entre si por enlaces químicos, de esta forma se origina una red tridimensional.

El gel, una vez hidratado, se deposita adecuadamente en una columna hueca de vidrio (Fig. 1) quedando listo para su uso.

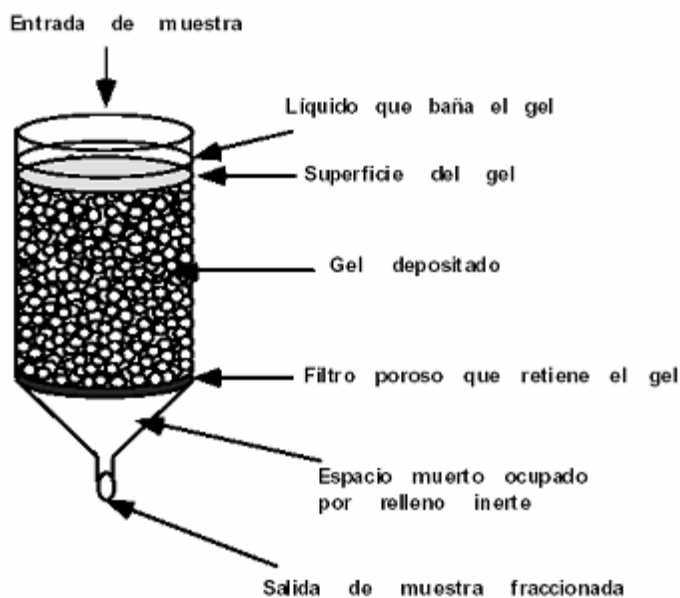


Figura 1 Esquema de una columna de exclusión de tamaño

Las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello su paso por la columna se retarda. Las moléculas de mayor tamaño no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente, en lo que se denomina **volumen muerto** (V_0) de la columna, se dicen que son excluidas por el gel. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular (Fig.2) [49].

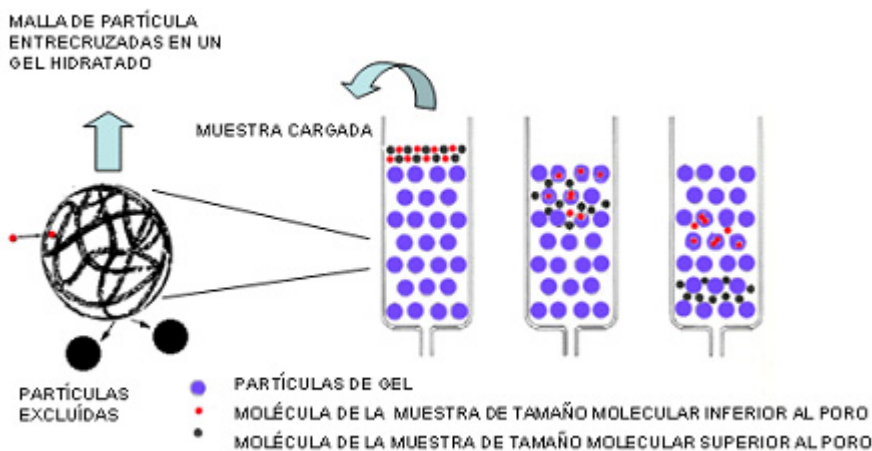


Figura 2 Representación gráfica, de la elución en SEC

De esta forma se puede obtener el **volumen de elución** (V_e) de un soluto, volumen de disolvente que sale de la columna desde que se inyecta la muestra y aparece el pico de un soluto. El V_e de una molécula particular se relaciona con la constante de distribución K_d , que representa la fracción de fase estacionaria que está libre para que se produzca la difusión del soluto.

Por tanto V_e de un soluto es igual a:

$$V_e(\text{soluto}) = V_o + K_d \times (V_s)$$

V_s representa el volumen de disolvente dentro de la fase estacionaria, este valor es difícil de obtener por lo que es sustituido por $V_t - V_o$ donde V_t representa el volumen total de partículas y se puede medir determinando el V_e de una molécula pequeña como la acetona.

$$K_d = K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

K_{av} no es un verdadero coeficiente de distribución, sin embargo, es directamente proporcional a K_d y es independiente de la naturaleza del soluto y de su concentración [50].

El objetivo de la cromatografía de exclusión de tamaño es obtener la mayor resolución posible de las moléculas de soluto. Por tanto, la elección de la columna así como el flujo de elución son muy importantes, cuanto mayor sea la columna y menor el flujo mayor será la resolución. El principal inconveniente es el tiempo de separación y la dilución de la muestra.

En cromatografía por exclusión de tamaño, tiene especial importancia que las especies que han sido inicialmente inyectadas eluyan sin carga y que estas no se generen en la muestra especies que originalmente no estaban. Para ello, es muy importante lograr una estabilidad termodinámica e inercia cinética de las especies. Las uniones entre metal-ligando deben ser más fuertes que las interacciones del metal o del ligando con la fase estacionaria. En caso contrario, los complejos metálicos podrán ser destruidos por la adsorción del metal en la fase estacionaria de la columna; o bien puede ocurrir, que los iones metálicos adsorbidos formen complejos con ligandos libres que puedan hallarse en el tampón, generando así especies que antes no existían en la muestra.

La separación de los analitos mediante SEC debe ser independiente de su carga, pero en la práctica la superficie de la fase estacionaria se halla cargada, lo que condiciona la separación. Esto hace que la elección de la fase estacionaria sea uno de los factores a considerar [51].

Pueden utilizarse con tampones acuosos, que son los más empleados en bioquímica con un rango de pH 3-12, también resisten bases fuertes como el hidróxido de sodio 0,2 M, y ácidos como el clorhídrico y el acético. Las propiedades de separación del gel no se ven afectadas por el uso de disolventes orgánicos.

El volumen máximo de muestra que podemos inyectar en la columna preparativa es de 5 ml. Este tipo de cromatografía nos permite concentrar las muestras al mismo tiempo que eliminar parte de la matriz que pueda interferir en nuestro estudio.

Fases estacionarias

Están a la venta numerosos empaquetamientos de exclusión molecular. Algunos son hidrofílicos, para uso con fases móviles acuosas, y otros son hidrofóbicos, para su utilización con disolventes orgánicos no polares. A la cromatografía basada en empaquetamientos hidrofílicos se le llama en ocasiones **filtración en gel**, mientras que las técnicas basadas en empaquetamientos hidrofóbicos se denominan **permeación en gel**. Se encuentra disponibles muchos diámetros de poros para ambos tipos [52].

Un gel es un sistema heterogéneo en el cual una fase líquida continua, usualmente agua, está contenida dentro de los poros de una fase estacionaria. El material ideal de la matriz en gel filtración debe ser inerte con respecto a las moléculas que queremos separar. Sin embargo pueden producirse interacciones del material empaquetado con las moléculas biológicas con lo cual la molécula eluiría más tarde de lo esperable por su peso molecular. Otras interacciones de naturaleza iónica pueden ser eliminadas incrementando la fuerza iónica del buffer utilizado.

Una de las matrices o geles más utilizada es la Superdex, formada por enlaces entrecruzados de poliacrilamida con agarosa, dextrano o combinaciones de estos. Otro material muy utilizado es el Sephadex, cuya matriz está formada por conexiones cruzadas de dextrano y epíclorohidrina (Fig.3). El gran número de grupos hidroxilo que presenta hace que sea una matriz extremadamente hidrófila.

Los diferentes tipos que existen de una misma matriz, se diferencian entre ellos por el grado de conexiones cruzadas y en su capacidad de hinchamiento, lo cual conlleva a obtener un grado de fraccionamiento diferente [49].

Existen diferentes geles en el mercado según el rango de fraccionamiento, resolución y estabilidad (pH, temperatura y disolventes orgánicos). En la Tabla 1 se incluyen los geles comerciales más utilizados.

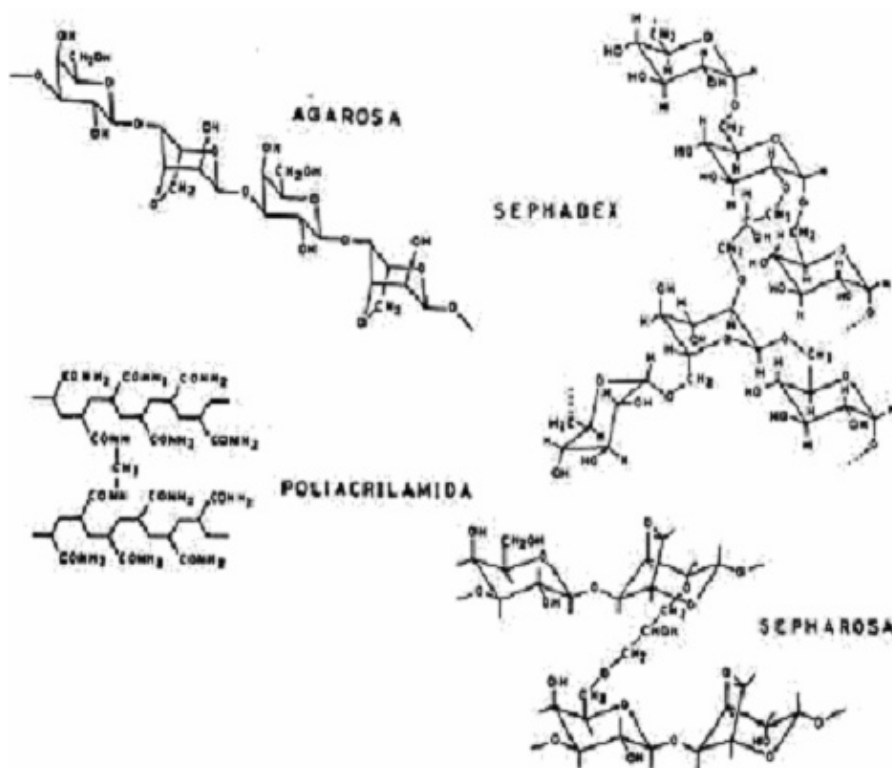


Figura 3 Estructura de geles orgánicos utilizados en cromatografía de exclusión

Tabla 1 Tipos de matrices en gel filtración

Gel	Matriz	Rango de fraccionamiento
Sephadex	Dextrano/epiclorohidrina	700-250.000 Da
Superdex	Agarosa/dextrano	3.000-600.000 Da
Sephacryl	Dextrano/Bisacrilamida	1.000-8 x 10 ⁶ Da
Sepharose	Agarosa	10.000-4 x 10 ⁷ Da
Ultrogel A	Agarosa	10.000-1 x 10 ⁷ Da
Biogel A	Agarosa	50.000- 1 x 10 ⁷ Da
Biogel P	Poliacrilamiamida	100-500.000 Da

Determinación de masas moleculares

La filtración mediante gel se usa principalmente para separar moléculas de masas moleculares significativamente distintas. Para cada fase estacionaria, existe un intervalo dentro del cual se da una relación logarítmica entre la masa molecular y el volumen de elución (Fig.4). Se puede estimar la masa molecular de una sustancia comparando su volumen de elución con el de patrones. Sin embargo, se debe tener cuidado al interpretar los resultados, porque moléculas con la misma masa molecular, pero formas diferentes, presentan características distintas de elución. En el caso de las proteínas, es importante usar una fuerza iónica bastante alta (mayor que 0,05 M), para eliminar la adsorción electrostática del soluto por puntos ocasionalmente cargados que existen en el gel [53].

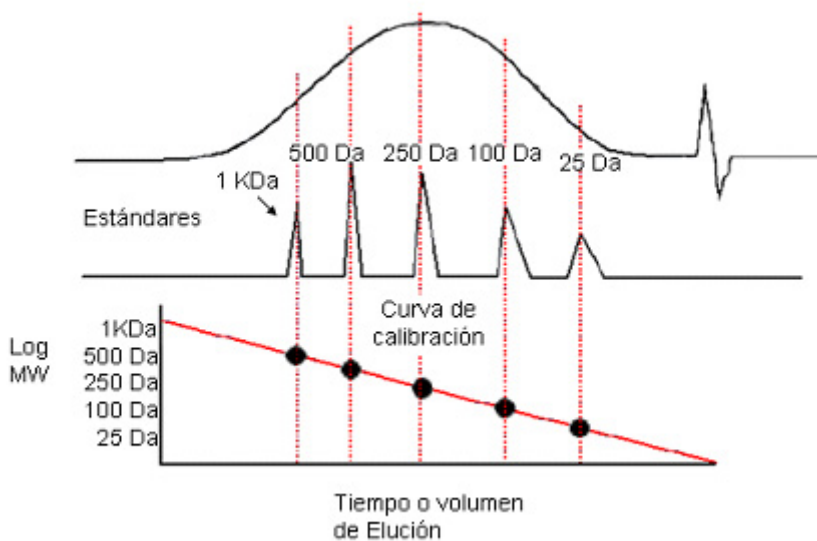


Figura 4 Correlación logarítmica entre el volumen de elución y la masa molecular en SEC

2.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (IEC)

La cromatografía de **intercambio iónico** está basada en la atracción entre los iones del soluto y los centros cargados unidos a la fase estacionaria (Fig.5). En los **intercambiadores aniónicos**, los grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen a los aniones del soluto. Los **intercambiadores catiónicos** contienen puntos cargados negativamente, unidos por enlace covalente a la fase estacionaria, que atraen a los cationes de soluto.



Figura 5 Representación gráfica de la cromatografía de intercambio iónico

Con una fase estacionaria cargada negativamente se retienen sustancias cargadas positivamente (deben competir con los contraiones, del amortiguador).

Las sustancias cargadas negativamente pasan a través de la fase estacionaria sin enlazarse.

Intercambiadores iónicos

Las resinas son partículas amorfas (no cristalinas) de material orgánico. Las resinas de poliéstereno, usadas en intercambiadores iónicos, se obtienen por copolimerización de estireno y divinilbenceno (Fig.6). El contenido de divinilbenceno varía desde 1 al 16%, aumentando así el grado de entrecruzado del hidrocarburo polimérico insoluble. Los anillos de benceno se pueden modificar produciendo una resina de intercambio catiónico, si contienen grupos sulfonato ($-\text{SO}_3^-$), o una resina de intercambio aniónico, si contienen grupos amonio ($-\text{RH}_3^+$). Si usa ácido metacrílico en lugar de estireno, resulta un polímero con grupos carboxilo

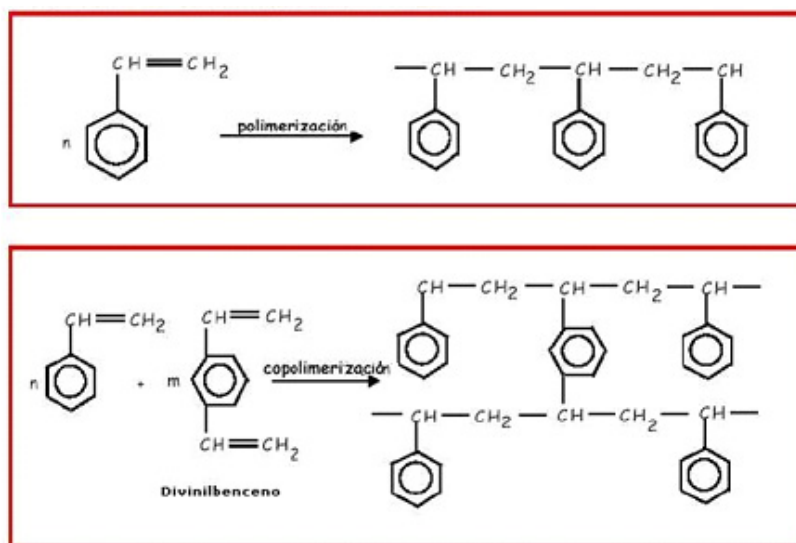


Figura 6 Síntesis de intercambiadores iónicos

Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles. Los grupos sulfonatos ($-\text{SO}_3^-$) de resinas ácidas fuertes siguen ionizadas incluso en disoluciones muy ácidas. Los grupos carboxilo ($-\text{CO}_2^-$) de las resinas ácidas débiles se protonan a un pH próximo a 4, y pierden su capacidad de intercambio catiónico por debajo de este pH. Los grupos muy básicos de amonio cuaternario ($-\text{CH}_2\text{NR}_3^+$) (que en realidad no son básicos) siguen siendo catiónicos a cualquier valor de pH. Los intercambiadores aniónicos básicos débiles de amonio terciario ($-\text{CH}_2\text{NHR}_2^+$) se desprotonan en disoluciones moderadamente básicas, y pierden su capacidad de unirse a aniones por encima de ese pH.

Entre las diferentes modalidades de cromatografía líquida existentes, la cromatografía de líquidos de intercambio iónico (IEC) es empleada comúnmente para recuperar una proteína en su forma biológica activa [54], por este motivo esta técnica se ha seleccionado en este trabajo como modalidad cromatográfica para purificar las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión de tamaño. En IEC los péptidos y proteínas cargadas, que quedan retenidos por interacciones electrostáticas sobre la resina de intercambio iónico, son eluidos mediante variaciones de pH o de fuerza iónica de la fase móvil [54].

2.3 CROMATOGRAFÍA DE PARES IÓNICOS

La cromatografía de pares iónicos utiliza una columna HPLC de fase inversa, en lugar de una columna de intercambio iónico. Para separar una mezcla de cationes (p.ej. de bases orgánicas protonadas) si se añade a la fase móvil un **tensioactivo** aniónico como $n\text{-C}_8\text{H}_{17}\text{SO}_3^-$. El tensioactivo es una molécula que se acumula en la interfaz entre dos fases, y modifica la tensión superficial. El tensioactivo se aloja en la fase estacionaria convirtiéndola eficazmente en un intercambiador iónico (Fig.7). Cuando los cationes del analito pasan a través de la columna, se pueden unir a la fase estacionaria por atracción electrostática con los aniones del tensioactivo. El mecanismo de retención es una mezcla de interacciones con fase inversa y de intercambio iónico. Para separar los analitos aniónicos se pueden añadir a la fase móvil sales de tetrabutilamonio como reactivo de par iónico.

La cromatografía de pares iónicos es más compleja que la cromatografía de fase inversa. Debido a que el equilibrio del tensioactivo con la fase estacionaria es lento, la separación es más sensible a variaciones de temperatura y de pH, y la concentración del tensioactivo afecta a la separación.

Las estrategias para la elaboración de un método consistente dependerán de la variación del pH, la concentración de tensioactivo, para una concentración de metanol y una temperatura fijadas. Dada la lentitud del equilibrio entre el tensioactivo y la fase

estacionaria, no se recomienda una elución en gradiente en cromatografía de pares iónicos [53].

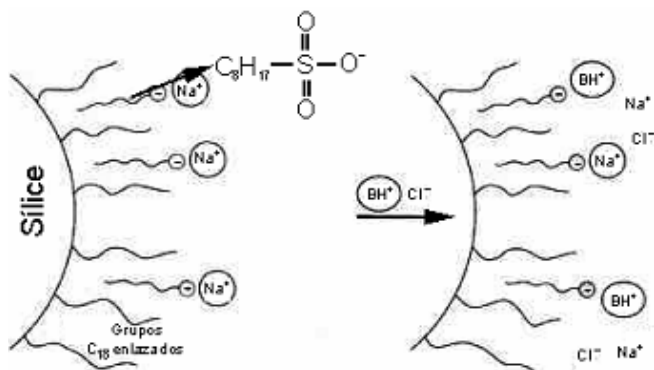


Figura 7 Fundamento de la cromatografía de pares iónicos

Esta técnica cromatográfica es muy utilizada para la separación de péptidos y proteínas, para ello se utilizan columnas de fases estacionarias hidrofóbicas (octilsilano, octadecilsilano, poliméricas, ...) y normalmente fases hidroorgánicas a pH ácido, con elución en modo isocrático [54, 55]. En general, para pH ácido de la fase móvil el grupo carboxilo terminal y el resto de grupos ácidos de las cadenas laterales peptídicas se encuentran protonados, mientras que los grupos amina estarán cargados positivamente, por lo que la adición de un reactivo formador de pares iónicos puede disminuir las interacciones de las moléculas peptídicas con la fase estacionaria, reduciéndose los procesos de adsorción de dichos compuestos sobre ésta y provocando una mejora de la simetría y anchura de los picos cromatográficos [54].

El ácido trifluoroacético (TFA) es el agente de par iónico más comúnmente utilizado, por su acidez, gran solubilidad, transparencia al ultravioleta y adecuada volatilidad (punto de ebullición, 72.4°C). También se suele emplear el ácido heptafluorobutírico (HFBA), el ácido fosfórico, el ácido perclórico, el ácido clorhídrico, el ácido acético, el ácido fórmico y el acetato o el formiato de trietilamonio [54, 56]. El disolvente orgánico más comúnmente empleado es el acetonitrilo (MeCN), debido a su baja viscosidad, alta volatilidad y transparencia al ultravioleta a bajas longitudes de onda. También se utilizan el metanol, el etanol (mayoritariamente en aplicaciones preparativas), el isopropanol (para proteínas hidrofóbicas) y en menor medida el trifluoroetanol [54]. Otra de las ventajas de la cromatografía de pares iónicos, es que las fases móviles hidroorgánicas ácidas de fuerza iónica moderada que generalmente se emplean, son compatibles con el uso de interfases ESI en MS [57].

3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La espectrometría de masas ha sido durante mucho tiempo una herramienta para determinar isótopos y descifrar estructuras orgánicas. Se puede conseguir gran cantidad

de información medioambiental a partir de medidas de isótopos. La espectrometría de masas es actualmente el detector más potente en cromatografía, porque el espectrómetro de masas es capaz de detectar bajas concentraciones de analito, suministrando información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen de una columna, y puede distinguir diferentes sustancias que tienen el mismo tiempo de retención. Actualmente la espectrometría de masas se utiliza para estudiar la secuencia de aminoácidos en proteínas, de ácidos nucleicos en ADN y las estructuras complejas de los hidratos de carbono.

Las características de la espectrometría de masas como técnica analítica, posibilita la determinación de la relación masa/carga (m/z) de un ión en una mezcla y en consecuencia su masa molecular (p.ej. el Pm de un péptido o una proteína). Ofrece información estructural de un ión seleccionando analizando las masas de los fragmentos que se producen en la colisión entre este ión y las moléculas de un gas neutro (p.ej. la secuencia de aminoácidos de un péptido o modificaciones en su estructura primaria).

Además, es una técnica ampliamente utilizada en análisis químico debido a:

- su gran sensibilidad
- la posibilidad de producir información estructural de una molécula
- la rapidez con la que pueden obtenerse los datos

Sin embargo su uso para el análisis de péptidos y proteínas es relativamente reciente.

En un espectrómetro de masas se mide la relación masa/carga de los iones, que deben estar en fase gaseosa. Producir iones en fase gaseosa es fácil para compuestos volátiles de bajo peso molecular. Sin embargo, para compuestos de baja volatilidad y alto peso molecular, como son péptidos y proteínas, la producción de iones en fase gaseosa

no es fácil, siendo necesarias técnicas especiales de ionización, como las que se detallan a continuación.

3.1 FUENTES DE IONIZACIÓN SUAVES

3.1.1 *Electrospray o Electronebulización (ESI)*

En ESI se produce la ionización de los analitos a presión atmosférica, mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre el extremo del capilar por donde fluye la muestra líquida (normalmente a flujos comprendidos entre 1 y 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) y el contraelectrodo situado en la entrada del espectrómetro (Fig.8) [57].

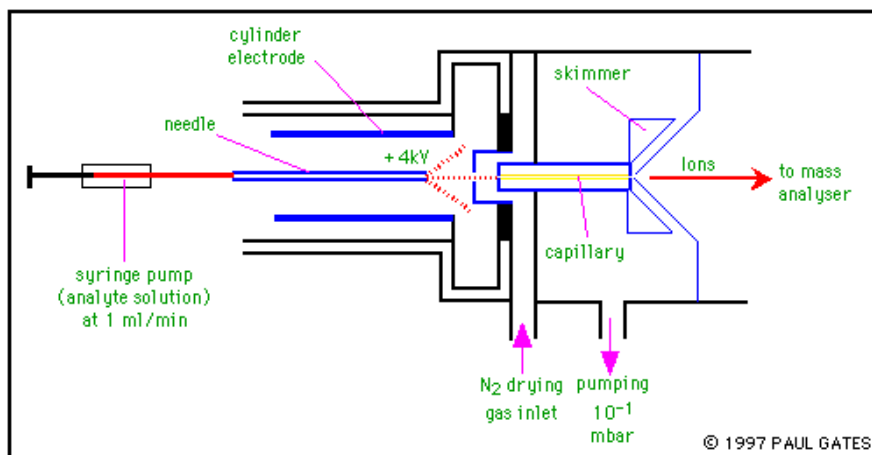


Figura 8 Representación esquemática de la fuente electro spray

Por efecto de este intenso gradiente eléctrico, la muestra emerge del capilar en forma de un aerosol de pequeñas gotas cargadas (Fig.9). A medida que estas gotas avanzan hacia el orificio de entrada del espectrómetro, su tamaño se va reduciendo, se van desolvatando, hasta que las fuerzas coulombianas de repulsión entre los iones con múltiple carga generados en su interior son capaces de vencer la tensión superficial. En ese momento pasan a la fase gaseosa.

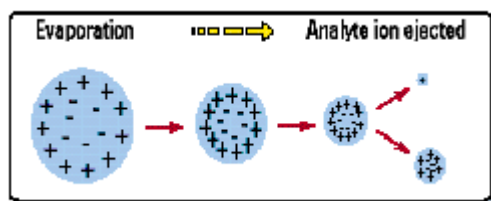


Figura 9 Formación de la muestra en fase gaseosa, en la fuente ESI

En algunas ocasiones se suele favorecer la desolvatación de las gotas y la obtención de iones en fase gas empleando N_2 como gas seco, a alta presión y a temperatura moderada. En general, la nebulización se facilita mediante la introducción de un flujo de nitrógeno, lo que además permite la introducción de flujos mayores de líquido [58]. Globalmente el proceso de ionización genera iones moleculares multicargados, lo que permite el análisis de moléculas de elevada masa molecular empleando analizadores con intervalos de m/z convencionales, siendo los cuadrupolos, las trampas iónicas y los analizadores de tiempo-de-vuelo (TOF) los más empleados [57].

La estructura y las propiedades físico-químicas de cualquier molécula determinan su capacidad intrínseca para ionizarse al pH de la fase móvil o del electrolito donde está disuelta, pero la eficacia de su ionización y, por lo tanto, la sensibilidad en la detección, están íntimamente relacionadas con las propiedades de esta disolución [57].

En ESI se suelen emplear en disoluciones hidroorgánicas ($MeCN-H_2O$ y $MeOH-H_2O$) de tensión superficial y fuerza iónica moderadas, conteniendo tampones o aditivos preferentemente volátiles que aseguren la ionización de los analitos en modo positivo (TFA, ácido fórmico, ácido acético,...) o negativo (trietilamina, hidrogenocarbonato amónico,...) [57, 59]. A medida que disminuye la volatilidad de la fase móvil disminuye la señal y la relación señal/ruido obtenida y, si además la disolución tiene una elevada fuerza iónica, se puede producir la obstrucción del orificio de entrada o la contaminación del espectrómetro de masas.

En la mayoría de las ocasiones, el análisis directo de una muestra compleja mediante ESI-MS no permite la identificación y la cuantificación de los analitos deseados, y es necesaria la separación previa de los componentes de la mezcla [57].

El acoplamiento en línea de la cromatografía líquida (LC) y la electroforesis capilar (CE) a la ESI-MS (LC-ESI-MS y CE-ESI-MS, respectivamente), se lleva a cabo utilizando interfases con el diseño adecuado en cada caso [57, 60].

En cuanto a los analizadores, los cuadrupolos y las trampas iónicas son los de uso más generalizado. Los actuales analizadores TOF, que proporcionan una frecuencia de barrido elevada (0,1 s), constituyen una de las mejores alternativas cuando se obtienen separaciones con picos de elevada eficacia, como el caso de la CE-ESI-MS [61]. En un analizador TOF los iones son separados de acuerdo a sus tiempos de vuelo, que a su vez dependen de sus relaciones m/z : los iones de mayor m/z se desplazarán a lo largo del tubo de vuelo a menor velocidad y serán detectados después de los de menor m/z . Todos los iones que se generan durante la ionización llegan al detector, lo que permite una elevada sensibilidad. El detector es capaz de distinguir las diferentes masas, tanto mejor cuanto mayor es la trayectoria recorrida por los iones y cuanto menor es la dispersión de energías de los iones formados en la fuente. Así, si se dispone de un analizador TOF con reflectrón, éste permitirá reenfoque los iones de la misma masa sobre el detector. Ésta y otras modificaciones instrumentales, como la extracción retardada (DE), han permitido un aumento en la resolución y la exactitud del analizador TOF respecto a otros analizadores. Todo ello, junto con el uso de analizadores que permiten realizar Espectrometría de Masas en Tandem (MS-MS) en línea a la LC o la CE, proporciona herramientas de extraordinaria utilidad a la hora de separar mezclas complejas de péptidos y proteínas y caracterizar exhaustivamente sus estructuras primarias (secuencias de aminoácidos, fosforilaciones, glicosilaciones, oxidaciones, ...) [57, 62]

3.1.2 Fotoionización a presión atmosférica (APPI)

La fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI) ha sido introducida recientemente por Syage y Evans [63] aplicada a compuestos de poca polaridad. Esta fuente representa una alternativa a la APCI y ESI [64, 65].

Cuando se trata del análisis de compuestos polares es conveniente el uso de la fuente ESI, en modo de ionización tanto positivo como negativo, produciendo protones o iones desprotonados con una fragmentación suave. Sin embargo, la ionización de compuestos de una polaridad inferior es más eficiente por APCI, mientras que compuestos con poca o ninguna polaridad se ionizan insuficientemente por estas fuentes.

Para superar este problema se han propuesto otras alternativas, como la ionización disociativa y no-disociativa de captura de electrones con APCI [66], la combinación de una etapa electroquímica con ESI [67, 68], y más recientemente la APPI. [69, 70, 71].

En 2001, Syrage y Evans [72] introdujeron una variante de las fuentes de ionización a presión atmosféricas (API), basada en la ionización de un solo fotón (APPI), en el que se vaporiza la muestra usando un nebulizador con calefacción [73], antes de comenzar la ionización (Fig.10).

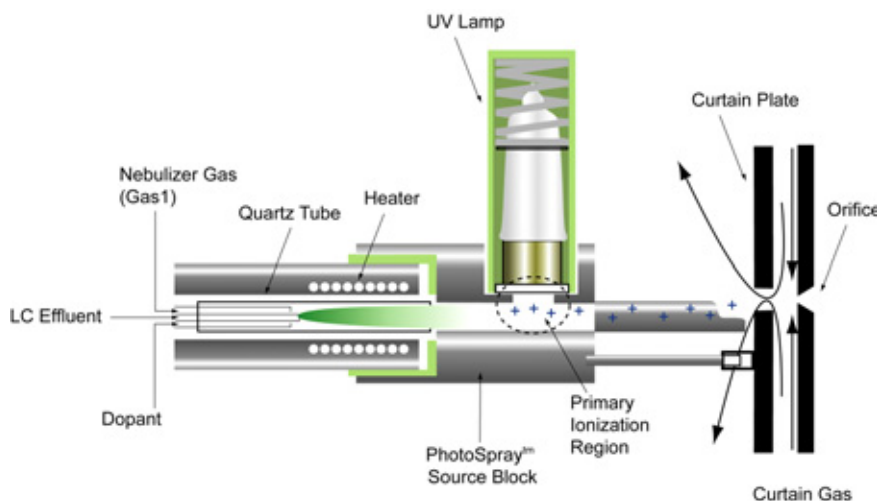


Figura 10 Representación esquemática de la fuente de ionización APPI

El paso de ionización se inicia por una radiación en la región visible/ultravioleta, generalmente producida por descarga de una lámpara. La absorción de un fotón por una molécula M, hace comenzar el proceso de fotoionización. Esta foto-absorción produce una expulsión de electrones para formar el catión correspondiente al radical molecular $[M^+]$ [74]. Otras moléculas presentes en la región de ionización, como son moléculas procedentes de los disolventes, pueden tener un potencial de ionización más alto que la energía del fotón, y cambiar el proceso de fotoionización, siendo no sólo específico para el analito. Por lo que, la presencia de disolventes y otras moléculas en exceso puede producir modificaciones en M^+ . Por tanto, la presencia de vapor de agua o disolventes, el ión M^+ puede obtener átomos H^+ para formar una molécula protonada $[M+H]^+$, cuando M tiene una alta afinidad por el protón (Fig. 11) [74]. Este hecho es la base de la metodología APPI introducido por Robb [73] que usa una cantidad grande de un compuesto directamente fotoionizable (dopante) en una corriente líquida para realizar la ionización de analito.

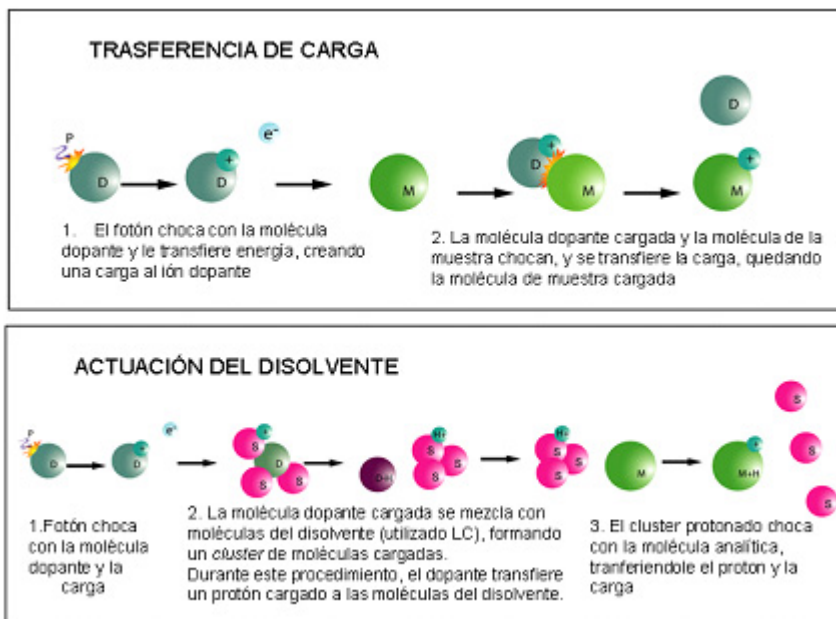


Figura 11 Formación de los iones moleculares en la fuente de ionización APPI

Por lo tanto, el empleo de APPI con el uso del dopante, mejora la sensibilidad de ionización; aunque esto pudiera inducir la formación de aductos que aumenta la complejidad de espectros de masas [72, 75]. Se han propuesto, acetona, tolueno y anisol para este propósito [75].

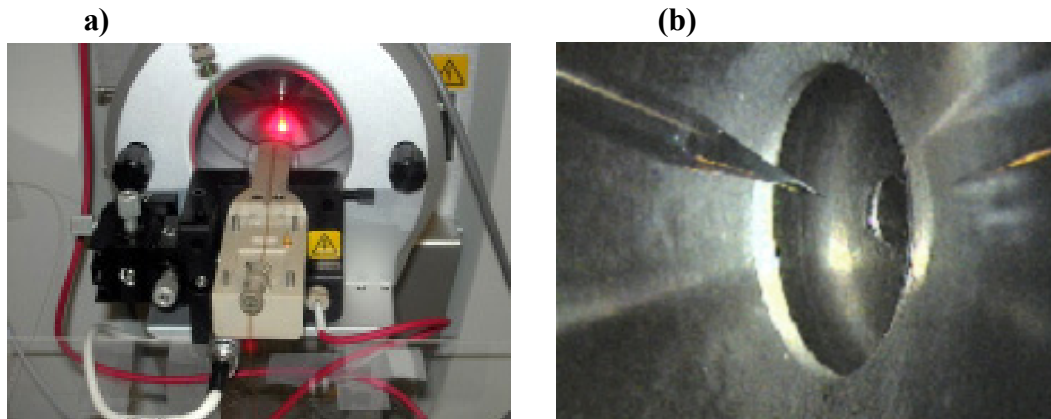
Hasta ahora, se han desarrollado pocas aplicaciones con la fuente APPI. El trabajo inicial relacionado con la metodología APPI descrita por Robb [73] considera dos tipos de grupos funcionales diferentes, que analizan por APPI-MS: hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos [76], flavonoides [77] y esteroides [78], así como varias drogas, y su metabolitos [79, 80]. Además, la fuente de ionización APPI se ha utilizado para el análisis de patulin en el jugo de manzana [74].

3.1.3 Nanospray (n-ESI)

Para la fuente electrospray desarrollada por Fenn en 1980 para moléculas pequeñas [81] existen otras dos variantes que se diferencian en el flujo de disolvente que soportan: las denominadas fuentes de electrospray asistido neumáticamente (ionspray, turbospray) [81] capaces de asumir flujos muy elevados (5-500 $\mu\text{l}/\text{min}$) y desarrolladas con objeto de poder acoplar los espectrómetros de masas a sistemas cromatográficos convencionales y las de nanospray (nESI), que trabajan a flujos por debajo del microlitro por minuto.

Esta última variante desarrollada por Wilm y Mann en 1995 (Wilm 1994) [81] es la más sensible y permite llevar a cabo análisis de muestras de las que se dispone de poco volumen o en las cuales los analitos se encuentran en una concentración muy baja (Fig. 12).

Figura 12 (a) Representación de la fuente nanospray; **(b)** Muestra del capilar próximo al orificio de entrada del espectrómetro de masa



La diferencia de diseño más importante entre las fuentes ESI y nESI reside en el diámetro interno del capilar que contiene la muestra: en ESI el capilar tiene un diámetro interno de 500 μm , mientras que en nESI se utilizan capilares con un diámetro interno a la salida de 1 o 2 μm . Por otro lado, en nESI la carga de muestra se lleva a cabo con un volumen de inyección de 0,2-2 μL , introducidas directamente en las agujas donde se produce el aerosol. Esta diferencia determina las principales características de la fuente nESI:

- Flujo de trabajo entre 20-40 nl/min que implica
 - consumo mínimo de muestra
 - mayor eficiencia en la ionización y en el número de iones sometidos al análisis de masas (los iones se producen con más eficiencia a medida que el tamaño medio de las microgotas del spray disminuye).

En nESI se generan gotas de tamaño inferior a 200 nm, entre 100 y 1000 veces más pequeñas que las producidas en una fuente ESI normal. Además, el pequeño tamaño

de los spray formados en nESI permite la introducción de una fracción mayor de los iones hacia el interior del espectrómetro de masas.

Con relación a una fuente ESI, la n-ESI es más tolerante con la composición y el pH de los medios analizados y permite nebulizar soluciones que contengan hasta 0.1M de sales.

Además, la fuente nESI presenta algunas ventajas respecto a otras fuentes de ionización como la ausencia completa de cualquier contaminación cruzada, pocas oportunidades para la pérdida de la muestra, y la capacidad de escoger y cambiar el disolvente a voluntad, aún durante un análisis [82].

3.2 ANALIZADORES DE MASAS

3.2.1 MOLECULARES

Cuadrupolo-tiempo-de vuelo

El término Q-TOF es utilizado para describir un tipo de sistema híbrido de espectrometría de masas, en el cual un analizador cuadrupolo (Q) se utiliza en conjunto con el analizador tiempo de vuelo (TOF). El uso conjunto de dos analizadores (hibridación) ofrece una serie de ventajas que no pueden ser obtenidas de forma independiente. En este sistema el cuadrupolo se utiliza para seleccionar y guiar los iones examinados, el hexapolo para producir la colisión entre los iones y gas residual introducido y el analizador tiempo de vuelo la detección simultánea de los iones a lo largo de todo el rango de masas y la óptica de iones que permita el sistema utilizado (Fig. 13) [82]

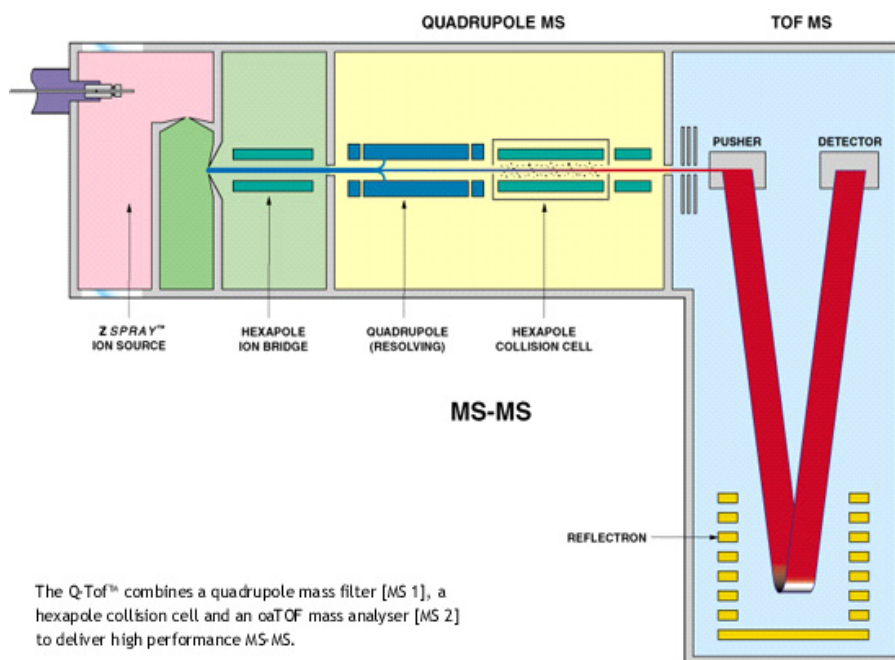


Figura 13 Diagrama esquemático del instrumento ortogonal Q-TOF

El **cuadrupolo** utiliza una combinación de campos de corriente continua (DC) y de radiofrecuencia (RF) como «filtro» de masas. El cuadrupolo consta de cuatro superficies paralelas, idealmente con una sección hiperbólica. El campo eléctrico desvía los iones en trayectorias complejas, a medida que pasan de la cámara de ionización al detector, permitiendo que sólo lleguen al detector aquellos que tienen una relación m/z determinada. Los demás iones (iones no resonantes) chocan con las varillas, y se pierden antes de llegar al detector (Fig. 14). Variando rápidamente el voltaje aplicado, se pueden seleccionar los iones de diferentes masas que llegan al detector. Los cuadrupolos de transmisión pueden registrar de 2 a 8 espectros por segundo, cubriendo un intervalo de m/z hasta 4000 [53].

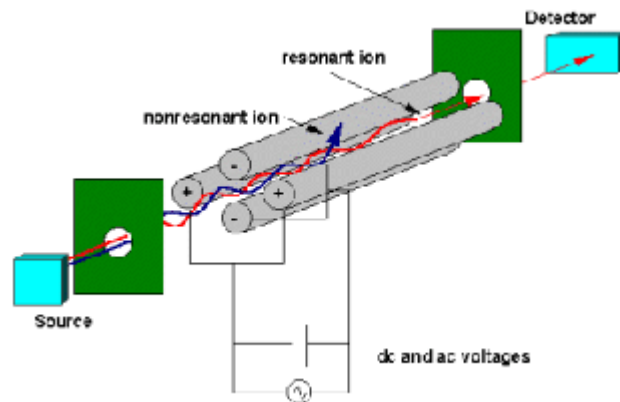


Figura 14 Representación gráfica del cuadrupolo

El **hexapolo** tiene una estructura muy similar al cuadrupolo, pero cuenta con seis barras que interactúan con los iones. Opera sólo con radiofrecuencias, prescindiendo del campo eléctrico. La unidad está sometida a vacío, en el que se introduce un gas neutro (p.ej. nitrógeno) que al aumentar ligeramente la presión contribuye a generar colisiones, y como consecuencia de ello, la fragmentación de los iones. Constituye, por tanto, una célula de colisión, en la que se produce la rotura del ión precursor [82].

El analizador **tiempo-de-vuelo** separa los iones que tienen la misma energía cinética, pero diferente m/z , porque los iones pesados necesitan más tiempo para recorrer una distancia fija. Se aplica a una placa un voltaje de 5000 V, alrededor de 3000 a 20 000 veces por segundo, para acelerar los iones hacia la derecha y rechazarlos de la fuente de ionización a una región de deriva, donde no existe ni campo eléctrico o magnético ni otra fuente de aceleración. Teóricamente, todos los iones tienen la misma energía cinética, $\frac{1}{2}mv^2$, donde m es la masa del ión y v su velocidad. Si los iones tienen la misma energía cinética, pero diferentes masas, los iones más ligeros circularán a más velocidad que los iones pesados. En su forma más simple, el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo es un tubo largo y recto.

Los iones que salen despedidos de la fuente se dirigen al detector en orden creciente de masas, porque los ligeros circulan más deprisa.

Para mejorar el poder de resolución, los iones se hacen sufrir un cambio brusco en su trayectoria que los hace volar en sentido contrario, ello se logra mediante un dispositivo situado al final del tubo de vuelo que recibe el nombre de **reflectrón**. El reflectrón está formado por una serie de anillos huecos sobre los que se establece un potencial cada vez más positivo, y que terminan en una rejilla cuyo potencial es más positivo que el potencial acelerador al que se encuentra la placa repulsora de la fuente. Los iones que entran en el reflectrón se ralentizan, se paran y se reflejan hacia la izquierda. Cuanto mayor energía cinética de un ion al entrar entra en el reflectrón, más penetra en él antes de girar. Los iones reflejados se someten a un nuevo plano de enfoque en la rejilla que se encuentra frente al detector. Todos los iones de la misma masa alcanzan la rejilla al mismo tiempo, independientemente de sus energías cinéticas iniciales [53].

El Q-TOF, ha sido introducido como una alternativa estratégica para la rápida determinación de analitos a concentraciones trazas. La principal ventaja de esta técnica es la rápida adquisición espectral (barrido completo) y la alta sensibilidad con una medida exacta de masas. El hecho de que facilite la medida exacta de masas (0,1-2 mDa) hace que esta técnica sea muy interesante para la identificación de especies «desconocidas» [83, 84]. Este sistema ortogonal recientemente ha sido utilizado por Bobeldijk [85] para la identificación de contaminantes en agua superficial, y por Nielen [86] para la identificación de esteroides anabólicos, así como para llevar a cabo secuenciaciones *de novo* de péptidos y proteínas. En cuanto al empleo del Q-TOF-MS para la cuantificación, hay sólo unas pocas aplicaciones. Una de las primeras aplicaciones fue realizada por Hogenboom (1999) [87] que utiliza el sistema LC-TOF-MS para el análisis de pesticidas en agua superficial.

3.2.2. DETECORES ATÓMICOS

Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Los sistemas de ICP-MS se comercializan por primera vez a principios de la década de los 80 [88] y comienzan a extenderse con rapidez gracias a su capacidad de realizar determinaciones multielementales a nivel de ultratrazas. Este sistema combina dos propiedades analíticas que la convierten en un instrumento de gran potencial en el campo del análisis de trazas multielemental. Por una parte obtienen una matriz libre de interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de Ar y por otra parte presenta una alta relación señal-ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas. El plasma de acoplamiento inductivo de argón se utiliza como una fuente muy eficaz de iones en su estado M^+ .

El espectro de masas de esta fuente de iones se mide utilizando un espectrómetro de masas cuadrupolar. Esto es posible mediante una zona de interfase capaz de introducir los iones del plasma a través de un orificio (cono), utilizando una unidad de vacío diferencial que permite la introducción final de los iones en el filtro cuadrupolar de masas (skimmer) [89] (Fig. 15).

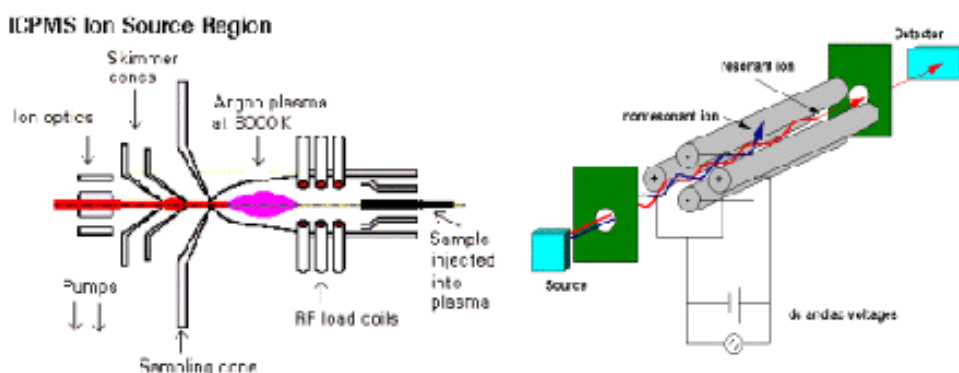


Figura 15 A la izquierda se muestra un esquema del sistema de ionización por plasma (ICP). A la derecha vemos el analizador cuadrupolar (MS).

Componentes del equipo ICP-MS

1. Nebulizador

La introducción de la muestra en el ICP es un proceso crítico en esta técnica. La gran mayoría de los análisis de ICP-MS se realizan sobre muestras líquidas, siendo necesaria una corriente de gas para que la muestra alcance el plasma. La forma más fácil de que la muestra líquida sea introducida en la corriente de gas es en forma de aerosol originado en un **nebulizador**. Después del nebulizador existe una cámara de nebulización para eliminar las gotas de mayor tamaño formadas en el proceso de nebulización.

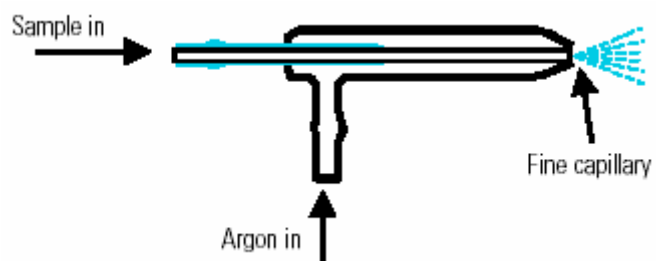
Existen diversos *tipos de nebulizadores* [89]

Nebulizador Cross-Flow (Flujo cruzado)

Son menos susceptibles a procesos de obturación, aunque estos puedan presentarse. Utilizan un nebulizador ascendente donde un chorro horizontal de gas pasa o cruza la parte superior del tubo por donde se inyecta la muestra, rompiéndose en una nube de pequeñas gotas. Esto permite que funcione con bomba peristáltica, que es la encargada de mantener un caudal constante de entrada al nebulizador. Es bueno para todos los propósitos analíticos.

Nebulizador Concéntrico o de Meinhard

Están basados en la pulverización de la muestra líquida introducida a través de un tubo central por medio de un flujo de argón que se desplaza en un tubo externo y concéntrico al de la muestra. La ventaja que ofrecen es que mejoran considerablemente la relación señal/ruido y minimiza el gasto de Ar. Sin embargo, presenta algunas desventajas ligadas a su pobre resistencia al ácido fluorhídrico porque está construido de vidrio, se obtura fácilmente por acumulación de micro-partículas o sólidos disueltos, y su cambio es caro.



Nebulizador Ultrasónico

La muestra alimenta una superficie donde existe un transductor piezoeléctrico que trabaja a una frecuencia entre 0.2 a 10 MHz. La onda longitudinal, que se propaga perpendicular a la superficie del transductor hacia la interfase aire-líquido, produce una presión que rompe la superficie en un aerosol. Este mecanismo aumenta la sensibilidad y límite de detección, pero necesita más tiempo de limpieza y si la matriz es compleja, el fondo aumenta. Aumenta la sensibilidad y mejora los límites de detección. Minimiza la generación de óxidos en el plasma. La desventaja que ofrece es que no es económico y no puede operar con grandes cantidades de sólidos disueltos.

Nebulizador Microconcéntrico

Es del tipo Meinhard pero con una apertura del tubo de muestra mucho más pequeña. Es perfecto para la inyección de volúmenes de muestra pequeños (40-100 $\mu\text{L}/\text{min}$). Pero se obtura con partículas en suspensión de tamaño superior a 10 micras.

Nebulizador Babington

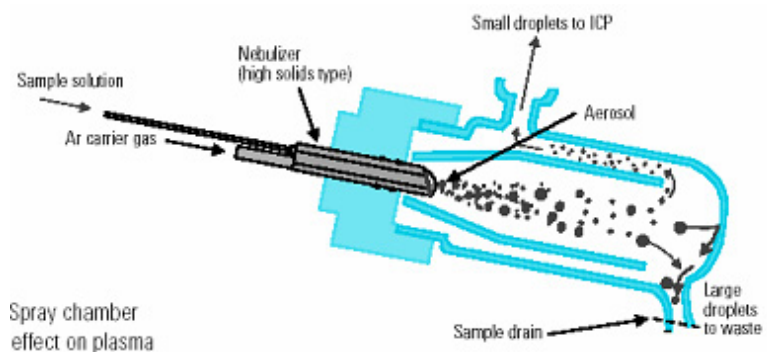
Babington (1973) desarrolló este tipo de nebulizador que permite que una película de líquido fluyera sobre la superficie de una esfera. El gas introducido a presión convierte a la película líquida en aerosol. La característica esencial de este tipo de nebulizador es que el líquido fluye libremente sobre una apertura pequeña en lugar de pasar por un capilar fino. De esta forma se logra una gran tolerancia a los sólidos disueltos. El nebulizador original tuvo grandes problemas de memoria. Una modificación realizada por Suddendorf y Boyers (1978) restringiendo el líquido en un surco en V e introduciendo el gas desde un hueco pequeño en la parte inferior del surco, disminuyó los efectos de memoria. Los surcos en V son resistentes a los bloqueos, sin embargo no es una geometría óptima para la generación de un aerosol.

2. Cámara de Spray nebulización

La eficiencia del transporte del aerosol se define como el porcentaje de masa de solución nebulizada que llega al plasma [89]. Para que este porcentaje sea alto es necesario que el nebulizador produzca gotas inferiores a $10\ \mu\text{m}$ de diámetro. Generalmente la mayoría de los nebulizadores producen aerosoles con una amplia distribución de gotas de diámetros superiores a $100\ \mu\text{m}$. El primer objetivo de la cámara de nebulización es separar las gotas grandes (superiores a $10\ \mu\text{m}$) del gas y desecharlas. Cuando el flujo de gas con el aerosol entra en la cámara de nebulización, sufre cambios profundos en su dirección de modo que las gotas grandes se estrellan sobre las paredes. Estas gotas que chocan con las paredes se desechan mediante drenaje. La cámara de nebulización asegura que solamente las gotas pequeñas permanecen en suspensión en el flujo de gas que llega al plasma. Con esto se pierde un 99 % de muestra en solución.

Se han propuesto y evaluado diversos diseños. El formato más habitual es el que emplea vidrio, polietileno y PTFE. El desalojo de la solución se hace mediante el bombeo que realiza una bomba peristáltica, la misma que lleva la muestra al nebulizador. Ciertos elementos son problemáticos (sobre todo los volátiles) tales como Br y Hg ya que son retenidos en el vidrio, sobre todo en la punta del inyector de la antorcha durante largo tiempo incluso cuando se introducen en bajos niveles. Sin embargo, la mayoría de los elementos no presentan tales problemas y típicamente se limpian entre 60 a 180 segundos.

Durante la ejecución de un análisis es deseable que se monitoree la limpieza, eligiendo un elemento concreto y determinando el



tiempo en el que se produce un decaimiento de la señal hasta valores de fondo aceptables. Esto es importante si se utiliza un automuestreador y el tiempo se puede programar. El aumento de la velocidad de bombeo al máximo entre muestra no mejora el tiempo de limpieza de la cámara de nebulización, pero sí reducirá el tiempo de toma de la disolución de limpieza o el tiempo para que la siguiente muestra alcance el nebulizador [89].

3. Antorcha

La antorcha como sistema de confinamiento del plasma es otra de las partes fundamentales del equipo de ICP-MS [89].

Generalmente las antorchas son parcialmente desmontables. Los tubos de cuarzo son los que se utilizan con mayor frecuencia en las antorchas ya que resisten varios cientos de grados, así como el ataque químico y los altos niveles de radiación electromagnética a longitudes de onda que se extienden a la región ultravioleta.

Estas condiciones causan cambios físicos y químicos en el cuarzo, por lo que con el tiempo se degrada, siendo necesaria su sustitución y ya no solamente su limpieza. Por ello quizás es más recomendable utilizar antorchas desmontables. La distancia entre la antorcha y el cono de muestreo esta entre 10 y 15 mm (Fig. 16).

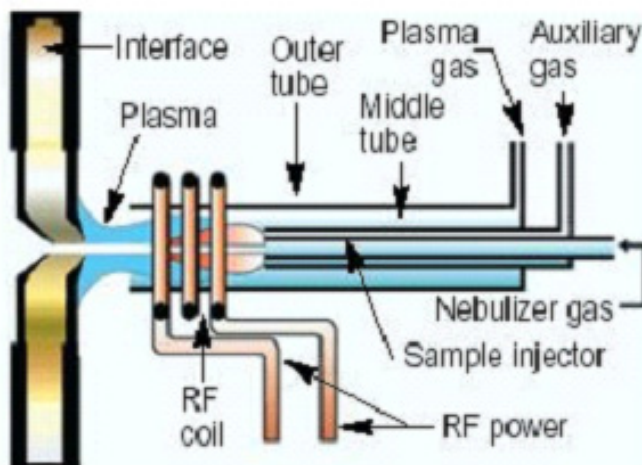


Figura 16 Antorcha con plasma confinado

4. Interfase

La función de la interfase es extraer el gas del plasma que es representativo de la muestra original (Fig.16).

Se utilizan diversos materiales para construir los conos, tales como Al, Cu, Ni y Pt, aunque el Ni es el mejor en la relación calidad/precio [89]. Si se introducen materiales orgánicos, se debe utilizar conos de Pt ya que es menos susceptible de degradación que el Ni. En el caso de que se inyecte agua regia no se deben de utilizar los conos de Pt ya que esta es la única mezcla ácida que ataca al Pt.

5. Lentes Iónicas

La función de las lentes iónicas es transportar los iones procedentes del skimmer al espectrómetro de masas.

6. Cuadrupolo

La función del espectrómetro de masas cuadrupolar es separar los iones en función de su relación carga masa [89]

7. Detector

El más utilizado es el multiplicador de electrones. El efecto es muy parecido al fotomultiplicador. Para la detección de iones positivos, el cono es sometido a un alto potencial negativo (aproximadamente -3kV).

Cuando los iones salen del analizador de masas, son atraídos por el potencial negativo del cono. Cuando los iones chocan con su superficie, se originan uno o más electrones secundarios. El potencial dentro del tubo varía continuamente con la posición, tal que los electrones secundarios se mueven hasta llegar a otra zona donde se originan

otros electrones secundarios, y así sucesivamente. El tubo está cubierto por un material semiconductor.

La vida media del multiplicador está determinada por la carga total acumulada.

8. Sistema de vacío

El plasma se encuentra a presión atmosférica mientras que el espectrómetro de masas requiere el movimiento de iones sin colisión, o bajo un sistema de vacío. La estrategia de vacío para el ICP-MS es reducir gradualmente la presión en estadios separados por una técnica que se le denomina bombeo diferencial. El sistema tiene tres orificios (sampler, skimmer y orificio de bombeo diferencial). En el primer estadio se utiliza un bombeo mecánico. La velocidad de bombeo es baja. En las lentes iónicas, la presión es de 10^{-5} Torr. Virtualmente todo el gas que viene desde el plasma a través del skimmer es evacuado. El tercer estadio es de 10^{-7} Torr o menos para la zona del cuadrupolo y detector [89].

Como ya se ha comentado anteriormente, la técnica de ICP-MS se extiende con rapidez gracias a su capacidad de detección multielemental y los bajos límites de detección que se pueden conseguir. El principal problema que presenta la técnica se debe a las interferencias espectrales que se generan por la aparición de moléculas asociadas al gas usado en el plasma y en el nebulizador [89]. Por ejemplo, en los plasmas de argón el ^{40}Ar interfiere con el ^{40}Ca , y la combinación del ^{40}Ar con el ^{16}O interfiere con el ^{56}Fe . Por otro lado, existen otro tipo de interferencias relacionadas con la matriz, generándose una supresión física de la señal del analito causada por el impacto de la muestra sobre la formación de las gotas en el nebulizador o la selección del tamaño de gota en la cámara de expansión. En el caso de las matrices orgánicas efecto es causado por la diferencia de viscosidad de los disolventes al ser aspirado. En el caso de matrices con alto contenido en sólidos disueltos, se puede generar depósitos sólidos que pueden obstruir el nebulizador o los orificios de la interfase de modo que se produce una disminución en la señal del

analito relacionada con una disminución en la entrada de muestra. Aunque las mejoras técnicas realizadas en los equipos de ICP-MS (plasma frío, celda de colisión, y otras) han conseguido reducir gran parte de las interferencias espectrales existentes, la supresión de la señal ocasionada por la matriz de la muestra debe ser corregida mediante la utilización de patrones internos. Esta técnica se basa en la introducción de uno o varios elementos que se adicionan a las muestras y patrones para corregir cualquier variación en la señal debida a la matriz. Cuando la intensidad de los estándares internos cambia, la respuesta de los elementos es actualizada en el momento del análisis. Los elementos utilizados como estándares internos deben cumplir una serie de requisitos como no estar presentes en las muestras, no interferir espectralmente con la masa del analito, tener un potencial de ionización similar al del analito y utilizarlo para un grupo de analitos dentro de un rango de masas similar.

Algunos de los patrones internos más comunes son: ^9Be , ^{45}Sc , ^{59}Co , ^{74}Ge , ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{169}Tm , ^{175}Lu , ^{187}Re y ^{232}Th [89].

Existen diversos ejemplos sobre la disminución de la señal del analito debido a los problemas de la matriz [90, 91]. Estos trabajos muestran que puede producirse una disminución en las intensidades absolutas de un 30-40% tras seis horas de análisis, aunque el uso de indio como patrón interno permite corregir estas variaciones.

Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente con celda de colisión (ICP-OCR-MS)

Actualmente se está utilizando un nuevo sistema de separación de masas denominado celda de colisión que mejora los límites de detección de determinados elementos afectados por interferencias poliatómicas, fundamentalmente relacionadas con el argón (Fig. 17). Aunque el uso del plasma frío, que se genera a menor temperatura, disminuye en ocasiones la formación de este tipo de interferencias. No obstante se trata de una técnica difícil de

optimizar y no resulta del todo efectiva para algunas de las interferencias. Por ello el uso de la celda de colisión se encuentra cada vez más extendido. Este sistema se ha desarrollado a finales de los años 90, y se basa en la extracción de los iones que atraviesan la interfase de un multipolo (generalmente hexapolo u octapolo) que opera sólo en modo de radiofrecuencia. Aunque la celda mantiene el vacío se introduce en ella una pequeña presión de gas, como H_2 o He, que colisiona con los iones poliatómicos causantes de interferencias. Como consecuencia de ello se producen reacciones de disociación de estos iones poliatómicos en sus átomos o iones [92]. De esta forma se produce una atenuación significativa de las interferencias causadas por iones poliatómicos mientras la transmisión de los iones del analito no se ve afectada.

Una variación de las celdas de colisión lo constituyen las llamadas celdas de reacción, en las que el gas introducido es NH_3 , O_2 o CH_4 , que actúan de catalizadores de las reacciones que tienen lugar en la celda. En estas celdas se produce por tanto de forma conjunta procesos de colisión y reacción entre las distintas especies que entran en el multipolo. No obstante, en este caso se requiere una cuidadosa optimización de los campos eléctricos para evitar la generación de nuevas interferencias.

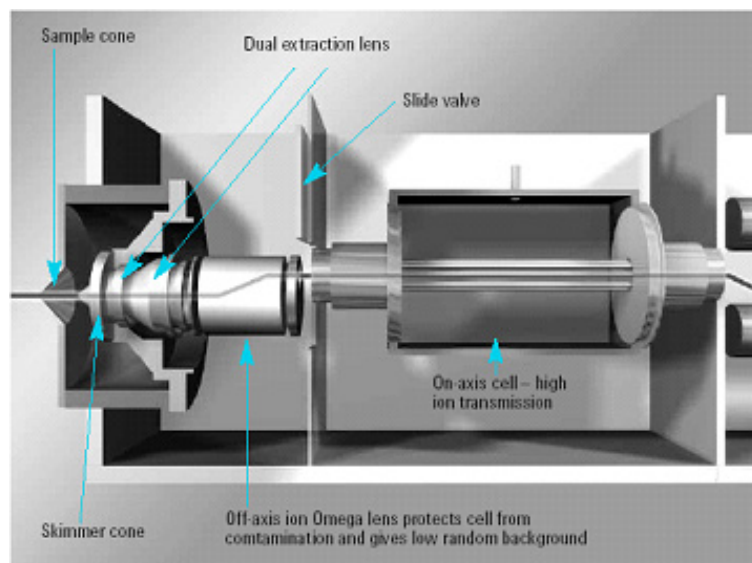


Figura 17 Esquema de la celda de colisión del equipo ICP(ORC)MS

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Aparicio, J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*, Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000
2. C. Rodriguez-Villar, A. Perez-Heras, I. Mercade, E. Casals, E. Ros, *Diabetic Med.* 21 (2004) 142
3. C. Puel, A. Quitin, A. Agalias, J. Mathey, C. Obled, A. Mazur, M. J. Davicco, P. Lebecque, A. L. Skaltsounis, V. Coxam, *Brit. J. Nutr.* 92 (2004) 119
4. K. Tuovinen, *Toxicology* 196 (2004) 31
5. G. E. Fraser, J. Sabaté, W. L. Beeson, T. M. Strahan., *Intern. Med.* 152 (1992)1416
6. G. E. Fraser, K. D. Lindsted, W. L. Beeson. *Am. J. Epidemiol.* 142 (1995)746
7. G. E. Fraser, D. J. Shavlik., *Arch. Intern. Med.* 157 (1997) 2249
8. F. B. Hu, M. J. Stampfer, J. E. Manson, E. B. Rimm, G. A. Colditz, B. A. Rosner, F. E. Speizer, C. H. Hennekens, W. C. Willett., *BMJ* 317 (1998) 1341
9. Ministerio de Sanidad y Consumo, Sociedad Española de cardiología y Sociedad Española de arteriosclerosis. *Clin. Invest. Arteriosclerosis* 12 (2000)125
10. R. M. Krauss, R. H. Eckel, B. Howard, *Circulation* 102 (2000) 2296
11. P. M. Kris-Etherton, G. Zhao, A. E. Biskoski, M. Stacie, B. S. Coval, T. D. Etherton, *Nutr. Reviews* 59 (2001)103
12. K. McManus, L. Antinoro, F. Sacks. *Int. J. Obes.* 25 (2001) 1503
13. J. C. Favier, J. I. Ripert, C. Toque, M. Feinberg. *Répertoire general des aliments. Table de composition.* Paris: Technique & Documentation / Inra / Ciquial-Regal, 1995

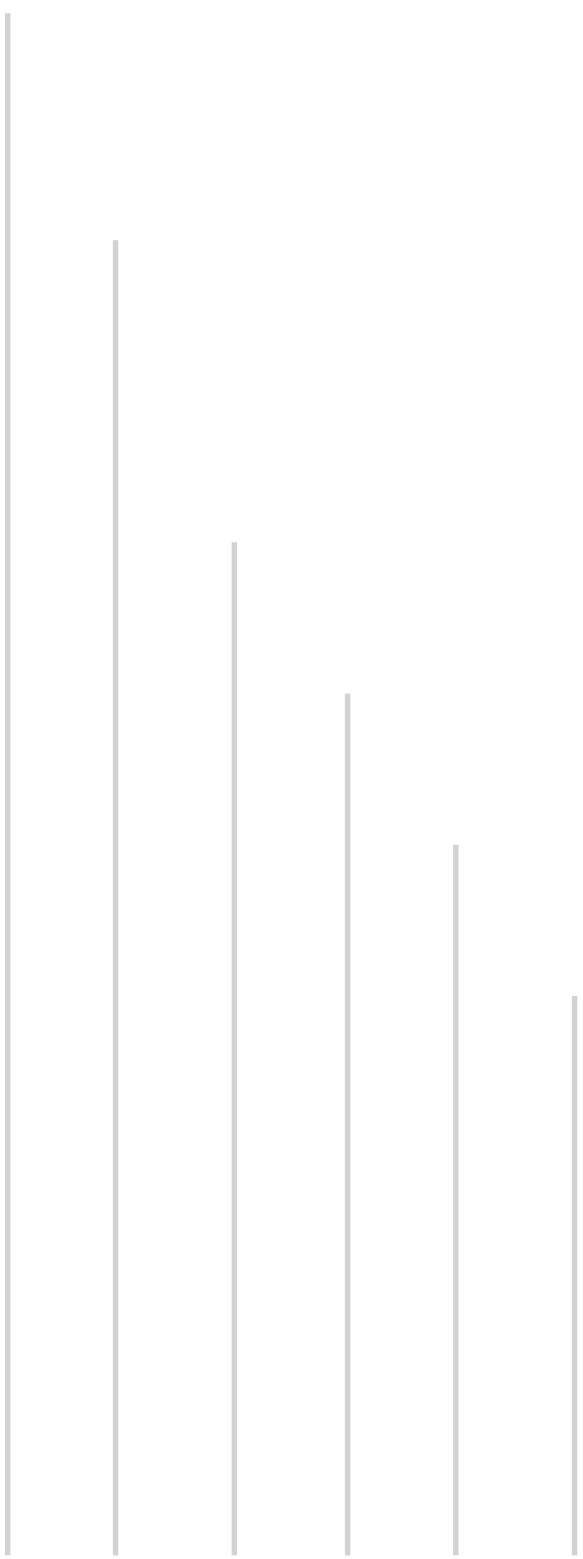
14. USDA U.S Department of Agriculture Research Service Nutrient Database for Standard Reference, 1998
15. M. Cardozo, B. W. Li, *J. Food Comp. An.* 7 (1994) 37
16. M. Plessi, D. Bertelli, A. Monzani, *J. Food Comp. An.* 12 (1999) 91
17. W. Craig, L. Beck, C. J. *Diet. P. Resch* 12 (1999) 729
18. W. Mazur, *B. Clin. Endo. Metab.* 12 (1998) 729
19. Y. T. Van- der-Schouw, *Nutr. Metab. Cardio. Disease* 10 (2000) 154
20. R.S. Schwartz, L.T. Hecking, *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 63
21. B. Koletzko, P. J. Agget, J. G. Bindels, P. Bung, P. Ferre, A. Gil, M. J. Lentze, M. Roberfroid, S. Strobel, *Br. J. Nutr.* 80 (1998) S5
22. R. Kokkinofta, P.V. Petrakis, T. Mavromoustakos, C. R. Theocharis, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 6233
23. M. B. Calle-Gutiñas, G. Bordin, A. R. Rodriguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 369
24. B. Michalke, P. Schramel, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 121
25. L. Thunus, R. Lejeune, in: H.G. Seiler, A. Rigel, H. Riger (Eds.), *Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1994, pp. 333
26. J. R. Encinar, L. Ouerdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3765
27. H. Fingerová, R. Koplíc, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 545
28. C. D. Tohmson, *Eur. J. Clin. Nutr.* 58 (2004) 391
29. S. B. Goldhaber, *Regulatory, Toxicology and Pharmacology* 38 (2003) 232

30. G. F. Combs, *Pharmacol. Ther.*, 79 (1998) 179
31. R. C. McKenzie, T. S. Rafferty, G. J. Beckett., *Immunol. Today* 19 (1998) 342
32. Keshan disease research group of the chinese academy of medical sciences. *Chin. Med. J.* 92 (1979) 471
33. M. F. Robinson, D. R. Campbell, R. D. Steward, *Med. J.* 93 (1981) 289
34. J. Szpunar, *Analyst* 130 (2005) 442
35. M. Navarro-Alarcón, M.C. López-Martín, *Sci. Total Environ.*, 249 (2000) 347
36. P. Varo, G. Alfthan, P. Ekholm, A. Aro, P. Kolvistoine, *Am. J. Clin. Nutr.*, 48 (1988) 324
37. Simonoff M, Simonoff G, editors. *Le selenium et la via*, París, Masson, 1991
38. G. N. Schrauzer, *J. Nutr.*, 130 (2000) 1653
39. A. M. Smith, M. F Picciano, *J. Nutr.*, 117 (1987) 725
40. P. Van Dael, D. L. Avidsson, R. Minoz-Box, L.B.Fay, D. Barclay, *Brit. J. Nutr.*, 85 (2001) 157
41. G. N. Schrauzer., *J. Am. Col. Nutr.*, 20 (2001) 1
42. M. Corola, A. Vainio, K. Edelmann, *Ann. Clin. Res.*, 18 (1986) 65
43. C.A. Ponce León, M. M. Bayón, C. Paquin, J. A. Caruso, *J. App. Microbiol.*, 92 (2002) 602
44. G. N. Schrauzer, *Adv. Food Nutr. Res.*, 47 (2003) 73
45. P.D Whanger, *J. Am. College Nutr.*, 21 (2002) 223
46. Tinggi U., *Toxicol. Lett.*, 137 (2003) 103

47. Jr. G. F. Combs, W.P. Gray, *Brit. J. Nutr.*, 85 (2001) 517
48. M. P. Rayman, *Proc. Nutr. Soc.*, 61 (2002) 203
49. *Principles and Methods*. Pharmacia Fine Chemicals 5^a ed. Upsala, Pharmacia LKB Biotechnology AB (1997)
50. A. Z. Preneta. *Protein purification methods a practical approach*. In: Harris ELV and Angal S (Eds.) UK: IRL Press at Oxford University Press; 1989 p.293
51. A. Makarov, J. Szupnar, *Analisis*, 26 (1998) 44M
52. D.A. SKOOG, *Principios de Análisis Instrumental*, McGraw-Hill, 2000
53. D.C. HARRIS, *Análisis Químico Cuantitativo*, 3^aed, Reverté, 2007
54. L.R. Zinder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method development*, 2^a Edición, Wiley, New York, 1997
55. B. Mehlis, U. Kertscher, *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of Peptides of Biological Samples*, *Anal. Chim. Acta*, 352 (1997) 71
56. P. M. Young, T. E. Wheat, *J. Chromatogr.* 512 (1990) 273
57. W.M.A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, *Chromatographic Science Series*, vol.79, 2nd Edition, New Cork 1999
58. P. Bruñís, T.R. Covey, J.D. Henion, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2642
59. J. Eshraghi, S.K. Chowdhury, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3528
60. A. Von Broche, G. Nicholson, E. Bayer, *Electrophoresis*, 22 (2001) 1251
61. I. M. System, E. D. Lazar, A. L. Lee, M. L. Rockwood, *J. Chromatogr. A*, 829 (1998) 279
62. R. D. Smith, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) S3

63. J. A. Syage, M. D. Evans, *Spectroscopy* 16 (2001)14
64. Cole RB (ed). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. John Wiley: New York, 1997
65. W. M. A. Niessen (ed). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker Inc.: New York, 1999
66. G. Singh, A. Gutierrez, K. Xu, I. A. Blair, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3007
67. C. Zwiener, F. H. Frimmel, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 851
68. G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish, *Anal. Chem.* 63 (1991) 2064
69. T. J. Kauppila, R. Kostiainen, A. P. Bruins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 808
70. C. Rentel, S. Strohschein, K. Albert, E. Bayer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4394
71. A. Marwah, P. Marwah, H. J. Lardy, *Chromatogr. A* 964 (2002)13
72. J. A. Syage, M. D. Evans, *Spectroscopy* 16 (2001)14
73. D. B. Robb, T. R. Covey, A. P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653
74. M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003)1965
75. M. Constapel, M. Schellenträger, O. J. Schmitz, S. Gäb, K. J. Brockmann, R. Giese, Th. Benter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 326
76. H. Moriwaki, M. Ishitake, S. Yoshikawa, H. Miyakoda, *Anal. Sci.* 20 (2004) 375
77. J. P. Rauha, H. Vuorela, R. Kostiainen, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002)1269
78. A. Leinonen, T. Kuuranne, R. Kostiainen, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 693

79. H. Keski-Hynnälä, M. Kurkela, E. Elovaara, L. Antonio, J. Magdalou, L. Luukkanen, J. Taskinen, R. Kostianen, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3449
80. C. Yang, J. Heinion, *J. Chromatogr. A* 970 (2002)155
81. M. Wilm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996)1
82. G. Christopher Herbert, R. A. W. Johnstone, *Mass Spectrometry Basic. Ed.:* CRC Press LLC, Florida, 2000
83. J. C. Wolff, C. Eckers, A. B. Sage, K. Giles, R. Bateman, *Anal. Chem.* 73 (2001)2605
84. I. V. Chernushevich, A. V. Loboda, B. A. Thomson, *J. Mass Spectrom.* 36 (2001)849
85. I. Bobeldijk, J. P. C. Vissers, G. Kearney, H. Major, J. A. Van Leerdam, *J. Chromatogr. A* 929 (2001)63
86. N. W. F. Nielen, J. P. C. Vissers, R. E. M. Fuchs, J. W. Van Velde, *Rapid Commun. Mass Sp* 15 (2001)1577
87. A. C. Hogenboom, W. M. A. Niessen, D. Little, UATH Brinkman *Rapid Commun Mass Sp* 13 (1999)125
88. A. L. Gray, *Analyst* 100 (1975) 289
89. N. Bradshaw, E. F. H. Hall, N. E. Sanderson, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 4 (1989) 801
90. J. L. Fernández-Turiel, J. F. Llorens, F. López-Vera, C. Gómez-Artola, I. Morell, D. Gimeno, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 368 (2000) 601
91. H. Falk, R. Geerling, B. Hattendorf, K. Kregel-Rothense, K. P. Schmidt, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359 (1997) 352
92. J. T. Rowan, R. S. Houk, *Appl. Espectrosc.*, 43 (1989) 976



CAPÍTULO II

DESARROLLO DE MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA AUTENTIFICACIÓN DEL ACEITE DE OLIVA MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Olive oil is considered today at the top quality of other edible oils and fats due to its nutritive properties and healthy action. This is a food of added value with a very high position in the national and international market which demands a constant improvement of its quality and an exquisite care to maintain this privileged situation. Both quality and health effects are critical points to guarantee the survival and development of the olive oil sector, in spite of the high price of this food.

Therefore, the use of rapid and unequivocal procedures for the authentication of olive oil is a priority demand due to the great consumption of this product and the need of information from the consumer.

The adulteration of olive oil with other cheaper vegetable oils constitutes at the moment a common practice that have to be detected and controlled. In this chapter, a method based on the use of high resolution mass spectrometry is described. This analytical methodology presents some important advantages for this kind of analysis as the simplification of the sample preparation and the elimination of the chromatographic step. The selection of an ionization source of high precision and reliability is an essential step in this analysis. The possibilities offered by the direct infusion combined with the electrospray (ESI) ionization source, and the more recently introduced atmospheric pressure photoionization source (APPI), both connected to a quadrupole time of flight (QqTOF) spectrometer, constitutes a key aspect for the characterization and evaluation of possible adulterations in the oil. These techniques have high sample throughput (approximately 1 min for sample) and capability for oils key compounds «fingerprinting». This has been applied to the more consumed vegetal edible oils, such as (olive oil, hazelnut, sunflower, corn and so on).

The results obtained in this study have been collected in the following publications, which are reproduced later:

- ❖ *Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera and R. Beltrán. **Talanta** 70 (2006) 859–869.
- ❖ *Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 20 (2006) 1181-1186.

El aceite de oliva está considerado hoy, desde muchos puntos de vista, como un producto de calidad superior a otros aceites y grasas comestibles, no sólo por sus propiedades nutritivas sino también por su peculiar método de obtención que le confiere unas propiedades organolépticas únicas. La imagen y el prestigio de que actualmente goza el aceite de oliva en el mercado nacional e internacional, exigen una mejora constante en su calidad y un exquisito cuidado en el mantenimiento de la misma. Se puede afirmar, sin lugar a duda, que la calidad el sello distintivo de este alimento, el que busca el consumidor, que cada día precisa una información más precisa del alimento que consume, en el que busca no solo cualidades nutritivas, sino salud y efectos beneficiosos para el equilibrio vital. Estas son las señas de identidad del nuevo mercado del aceite, las que aseguran su desarrollo y el futuro de este alimento saludable, una de las claves de nuestra cultura mediterránea.

Por tanto, la posibilidad de disponer de procedimientos analíticos rápidos e inequívocos para la autenticación del aceite de oliva, constituye una demanda prioritaria por el gran consumo de este producto.

La adulteración del aceite de oliva con otros aceites vegetales, constituye en la actualidad una práctica común que debe ser detectada y controlada. En el estudio desarrollado en este capítulo se ha puesto a punto un procedimiento analítico basado en el empleo de la espectrometría de masas en tandem. Esta técnica analítica presenta numerosas ventajas en su aplicación a los estudios de autenticación y control de calidad de productos como el aceite de oliva ya que simplifica bastante el tratamiento de muestra y elimina la etapa de separación por cromatografía. La selección de una fuente de ionización de gran precisión y fiabilidad es una etapa crítica en el análisis. Las posibilidades que ofrece la infusión directa con la fuente de ionización electronebulización (ESI), y la más reciente basada en la fotoionización a presión atmosférica (APPI), acopladas a un espectrómetro de cuadrupolo tiempo de vuelo (QqTOF), han hecho posible el desarrollo

de métodos analíticos robustos y fiables para la caracterización y evaluación de las adulteraciones del aceite. Estas técnicas son muy rápidas (aproximadamente 1 min por muestra) y tienen una gran capacidad para detectar la «huella digital» a través de compuestos claves de los distintos aceites estudiados (aceite de oliva, avellana, girasol, maíz y orujo).

Los resultados obtenidos han dado origen a dos publicaciones cuyos datos se muestran a continuación y cuyas copias se recogen más adelante:

- ❖ *Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera y R. Beltrán. **Talanta** 70 (2006) 859–869.
- ❖ *Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego y T. García-Barrera. **Rapid Commun. Mass Spectrom.** 20 (2006) 1181-1186.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de oliva es uno de los ingredientes más importantes de la dieta Mediterránea. Es un extracto de la aceituna que conserva el paladar, perfume, vitaminas y todas las propiedades del fruto del que procede, siendo además el único aceite vegetal que puede consumirse directamente virgen y crudo.

Numerosos estudios demuestran que el consumo del aceite de oliva protege frente al desarrollo del cáncer, enfermedades cardiovasculares [1] y diabetes [2], favoreciendo,

asimismo el desarrollo de los huesos y el correcto funcionamiento del sistema nervioso [3,4]. Además, se ha demostrado que posee propiedades antioxidantes y, como consecuencia de ello retrasa el envejecimiento celular [5], poseyendo una acción general favorable en la nutrición y la dieta. Por este motivo, el aceite de oliva es uno de los aceites vegetales más consumidos y también de precio más elevado, que puede dar lugar a diferentes adulteraciones con aceites vegetales más baratos de una calidad inferior [6]. La adulteración con aceite de avellana es una de las más frecuentes debido a la dificultad que entraña su detección por la gran semejanza entre su composición química y la del aceite de oliva. Este hecho hace difícil el empleo de triglicéridos (TAGs) como marcadores, aunque tradicionalmente se les consideren buenos marcadores de adulteración y autenticidad del aceite de oliva [7].

Hasta la actualidad, se han descrito métodos para la autenticación y control de calidad del aceite de oliva basados en diversas técnicas analíticas, el NMR [8], Raman [9,10], pirolisis-MS [11], GC-MS [12] o directamente por HS-MS [12]. Sin embargo, el desarrollo de metodologías analíticas más rápidas, precisas, fiables y robustas constituyen en la actualidad una importante demanda.

El intenso desarrollo de la espectrometría de masas en los últimos años, hace posible satisfacer estas exigencias, debido a la alta resolución de masas alcanzada en las técnicas de masas en tandem (triple cuadrupolo QqQ, cuadrupolo de tiempo de vuelo QqTOF y otros), lo que además permite prescindir del uso de técnicas de separación cromatográfica, lo que reduce el tiempo de análisis y la etapa de preparación de muestra. Estas herramientas analíticas permiten establecer la «huella dactilar» de alimentos con matrices complejas como es el aceite de oliva, y proporcionan una información crucial sobre los componentes presentes en la muestra.

Goodacre et al. [13] describieron con anterioridad, el empleo de la técnica de ESI-MS en la autenticación del aceite de oliva, demostrando que los espectros obtenidos

ofrecían gran cantidad de información espectral de aceites vegetales sin la necesidad de utilizar una separación cromatográfica. Esta información espectral permite la discriminación del aceite de oliva de otros comúnmente utilizados en las prácticas de adulteración, en particular el aceite de avellana.

Este capítulo [14] considera además, el uso de la fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI) [15,16] en el estudio de la adulteración del aceite de oliva con avellana. Una característica de esta fuente es su idoneidad para analitos con poca o ninguna polaridad. Además, esta fuente produce menos efectos matriz debido a su especificidad hacia los analitos que forman el ión molecular M^+ . Sin embargo, ambas fuentes ESI y APPI son complementarias, y aportan información valiosa. La ionización en la fuente ESI está basada en la formación de aductos, en los compuestos que se estudian en este apartado es común la formación de aductos de amonio $[M-NH_4]^+$ [13], mientras que en la fuente APPI los iones más importantes son $[M+H]^+$ y $[M]^{++}$ [14], así como el ión $[RiCO-H_2O]^+$ formado por la pérdida de una molécula de agua del ión acilio. Este último no se forma cuando se utiliza electronebulización.

Por lo tanto, es conveniente comparar ambas fuentes considerando su capacidad de discriminación para aceites comestibles y sus mezclas, un caso singularmente interesante es la mezcla de aceites de avellana y oliva dada su gran semejanza en composición. El empleo del sistema ESI-MS para el análisis de varios aceites ha sido considerado previamente por Goodacre y col [13], estudiando varios aceites, de maíz, orujo, oliva, oliva extra virgen, cacahuete, soja, aceites de girasol y una mezcla de aceite de cacahuete, girasol y soja. En este capítulo se describe una metodología analítica que permita no sólo discriminar entre tipos de aceite sino evaluar el grado de adulteración que pueda presentar el aceite de oliva por mezcla con los aceites antes citados. Para ello se estudiaron varias mezclas de estos aceites a través de sus espectros ESI-MS. Al final de este capítulo se describe por primera vez la aplicación de la fuente APPI para la autenticación y control de calidad del aceite de oliva y su comparación con la fuente ESI.

2. EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

Las muestras de aceite [aceite de oliva (O), avellana (H), girasol (S), aceite de maíz (C) y orujo (Or)] fueron suministradas por la cooperativa Olibeas (Huelva, España) y almacenadas a 4 °C.

Los disolventes, todos de una pureza del 99 % (diclorometano, acetonitrilo, metanol y tolueno), fueron suministrados por Teknokroma (Barcelona, España), y el acetato de amonio por Aldrich (Steinheim, Alemania). El agua se purificó con un sistema Milli-Q (Millipore, Watford, Reino Unido).

Todos los aceites se diluyeron mil veces con una mezcla del 60 % (v/v) de dichloromethane: 40 % de acetato de amonio 10mM en metanol, cuando se utilizó la fuente ESI. Para la fuente APPI la dilución se realizó con diclorometano: metanol (60:40, v/v).

2.2. INSTRUMENTACIÓN

2.2.1. ESI-QqTOF

Las muestras se inyectaron directamente por infusión directa en un espectrómetro de masas API QSTAR® XL Hybrid system (Applied, Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando la bomba de infusión del equipo y una jeringa Hamilton con un volumen de 100µl a un flujo de 5µl min⁻¹.

Todos los datos se obtuvieron en modo de ionización positivo (ES⁺). Los TAGs se identificaron por el aducto del ión molecular con amonio [M-NH₄]⁺ (M+18). Los espectros de masas en modo, barrido completo, se acumularon durante un minuto en el rango de 100–2000 *m/z* con un tiempo de barrido de 1,005 s.

Los parámetros del sistema QqTOF se optimizaron para el análisis con la fuente de electronebulización. Las condiciones de detección fueron las siguientes:

- *Voltaje de ionización (IS)*, se optimizó en el rango de trabajo, de 2500-5500 V y finalmente se fijó a 3000 V.
- *Temperatura de la fuente*, el valor óptimo fue de 60°C. La temperatura se utiliza para favorecer la nebulización mejorando de este modo la eficiencia de ionización y por tanto la sensibilidad.
- *Potencial en el orificio de entrada del filtro de masas (Declustering potencial-DP)*, se fijó a 76 V. Del mismo modo el *Focusing potencial (FP)* que dirige a los iones a través de los cuadrupolos, se fijó en 230 V. Ambos parámetros, ayudan a reducir el ruido químico en los espectros, incrementando la sensibilidad y por tanto mejorando la información espectral. Sin embargo, el aumento de estos voltajes, más allá de las condiciones óptimas puede inducir la fragmentación antes de que los iones alcancen los filtros de masas, causando una disminución en la sensibilidad.
- *Gas cortina (CUR)* se fijó a 1,13 L min⁻¹ y el *gas de nebulización* (nitrógeno con un 99,99% de pureza) a 1,56 L min⁻¹ para estabilizar la señal y la sensibilidad.
- *Energía del Ión (IE)* fue optimizada a 2,0 V con un *voltaje en el multiplicador de electrones (CEM)* de 2250 V.

Con objeto de verificar los triglicéridos (TAGs) identificados por sus correspondientes aductos de amonio presentes en las muestras, los iones moleculares se fragmentaron mediante espectrometría de masas en tándem. Para ello se utilizó nitrógeno como gas de colisión y una energía de colisión en el rango de 50-60 eV. Los otros parámetros fueron los mismos que los utilizados para obtener los espectros de MS descritos anteriormente.

2.2.2. APPI-QqTOF

En este estudio la muestra se analizó mediante inyección en flujo (FIA). Se utilizó un cromatógrafo líquido Agilent 1100 series HPLC, provisto de una bomba binaria y un muestreador automático. Para la introducción del dopante se utilizó una bomba de infusión modelo KDS 100 (New Hope, PA, USA). Esta bomba se acopló directamente al sistema API QSTAR® XL Hybrid (Applied Biosystems) con una fuente de fotoionización a presión atmosférica.

Esta fuente requiere para su uso una temperatura de nebulización, que se mantuvo durante las experiencias a 350°C. El nitrógeno se utilizó como gas de nebulización y de transporte del aerosol de muestra al analizador.

Las condiciones de operación fueron las siguientes: el flujo utilizado por la bomba del cromatógrafo líquido, fue 0,5 mL min⁻¹ usando 50 % (v/v) de metanol acuoso como eluyente. Se estudiaron tres eluyentes diferentes, acetonitrilo, metanol y agua, mezclados en diferentes proporciones. La proporción 50% (v/v) agua-acetonitrilo resultó dar buenos resultados de sensibilidad en los espectros de masas, pero la sustitución del acetonitrilo por metanol mejoró la señal significativamente. Estos resultados concuerdan con los datos encontrados en la bibliografía [20]. Por tanto, para las siguientes experiencias se seleccionó una mezcla 50% (v/v) metanol-agua.

Para el muestreador automático, se utilizó un inyector con un loop de 5 µl. Como dopante se utilizó tolueno, a 0,05 mL min⁻¹. Todos los datos fueron obtenidos en modo de ionización positiva. Los espectros de masas de barrido completo se adquirieron en un rango de m/z 100-1100. Los parámetros del sistema QqTOF se optimizaron para el análisis. El voltaje del capilar se fijó en 1500 V, con un DP a 80 V y FP a 300 V. La IE se estableció en 2,0 V con un CEM de 2300 V. Asimismo, el CUR, el gas de nebulización y una corriente de gas adicional, se optimizaron y finalmente se tomaron los siguientes valores: 1,13 L min⁻¹, 1,50 L min⁻¹, 6,0 L min⁻¹, respectivamente. Este último gas, favorece la evaporación del disolvente e incrementa la ionización de la muestra.

2.2.3. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Los estudios estadísticos se realizaron con ayuda del programa STATISTICA Versión 6.0 (2001) (StatSoft, Tulsa, USA). La abundancia relativa de los picos presentes en el espectro de masas de barrido completo obtenidos con ambas fuentes, se utilizaron para el análisis de componentes principales (PCA), análisis cluster (CA) y el análisis discriminante (LDA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESPECTROS DE MASAS APPI

Los espectros de masas utilizando la APPI como fuente de ionización, se obtuvieron a partir de muestras diluidas. Los triglicéridos (TAGs) se identificaron como moléculas protonadas, $[M+H]^+$ (Fig. 1). La Tabla 1 muestra las m/z de las moléculas protonadas de trioleína (OOO), en 885,8 m/z , dioleoil-palmitil-glicerol (POO), en 859,8 m/z y dioleoil-linoleoil-glicerol (LOO) en 883,8 m/z .

Tabla 1 Principales iones observados en los espectros de masas APPI-QqTOF, para los seis aceites estudiados (aceite de oliva, virgen extra, orujo, avellana, maíz y girasol)

TAGs	$[M+H]^+$	$[M+H-R_iCO_2H]^+$		$[M+H-R_iCO_2-R_iCO]^+$	
	m/z	Fragmento 1	m/z	Fragmento 2	m/z
OOO	885,79	OO	603,55	O	339,29
LLL	879,72	OL	601,56	L	337,27
LLO	881,77	LL	599,54	P	313,27
POO	859,79	OP	577,56	Ln	335,26
LOO	883,78	SO	605,56	S	341,31
SOO	887,81	PL	575,54		
PLO	857,79				

OOO, trioleína; POO, dioleil-1-palmitoilglicerol; LOO, 2,3-dioleil-1linoleiglicerol; PLO, 1-palmitoil-2-linoleil-3-oleilglicerol; SOO 1,2-dioleoil-3-estearoilglicerol; LLO, 1,2-dilinoleoil-3-oleilglicerol; LLL, 1,2,3-trilinoleilglicerol

Además de las moléculas protonadas, los espectros de masas presentan fragmentos iónicos característicos que se recogen en la Tabla 1. Estos iones se forman por la pérdida de una molécula ácida (R_1CO_2H) de la molécula protonada $(M+H)^+$, fragmento 1 en la Fig. 2. Otros fragmentos iónicos abundantes en los espectros de masas (Fragmento 2) se forman por la pérdida de molécula ácida a partir del fragmento anterior, quedando también otro fragmento, el ión acilio $[RiCO]^+$ [21]. El ión acilio puede a su vez hidratarse $[RiCO-H_2O]^+$ y el pico correspondiente se observa en el espectro de masas [22] (Tabla 2).

Los diglicéridos (DAG) (Fragmento 1) son los iones dominantes y pueden ser utilizados para la identificación de los TAGs. Estos iones se muestran en la figura 1, en la que podemos observar las diferencias entre el espectro de masas del aceite de oliva y el de avellana.

Tabla 2 Iones $[RCO]^+$ y $[RCO-H_2O]^+$ observados en los espectros de masas APPI-QqTOF de los seis aceites estudiados

Nombre común	Abreviatura	$[RCO]^+$	$[RCO-H_2O]^+$
		<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
Oléico	O	265,25	247,24
Linoléico	L	263,24	245,23
Palmítico	P	239,24	221,23
Linolénico	Ln	261,22	243,21
Esteárico	S	267,27	249,26

Figura 1 Espectro de masa APPI-QqTOF del aceite de oliva y aceite de avellana.

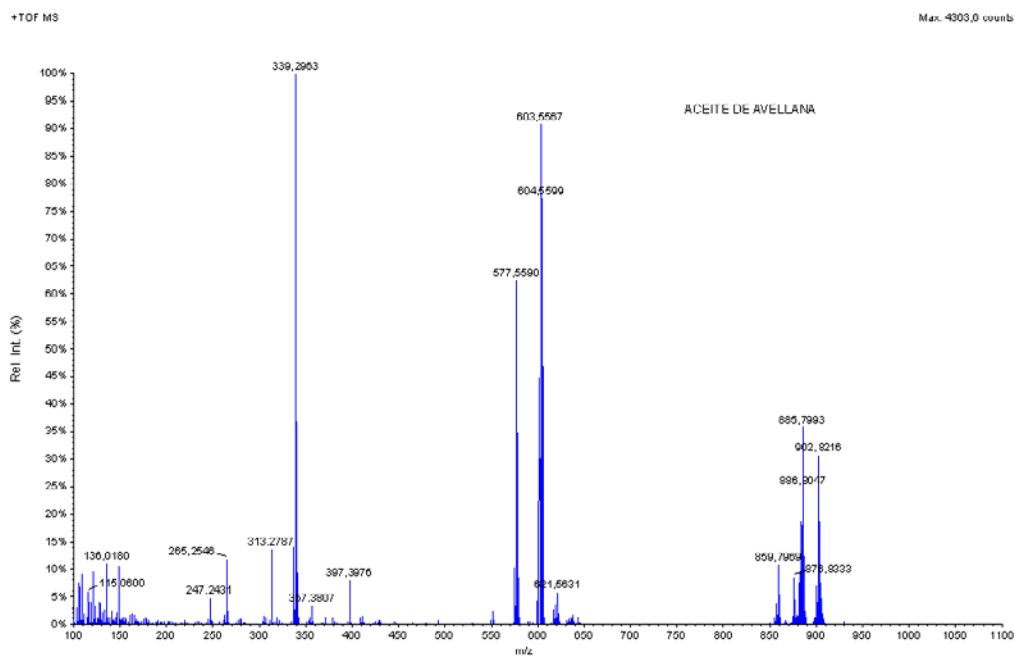
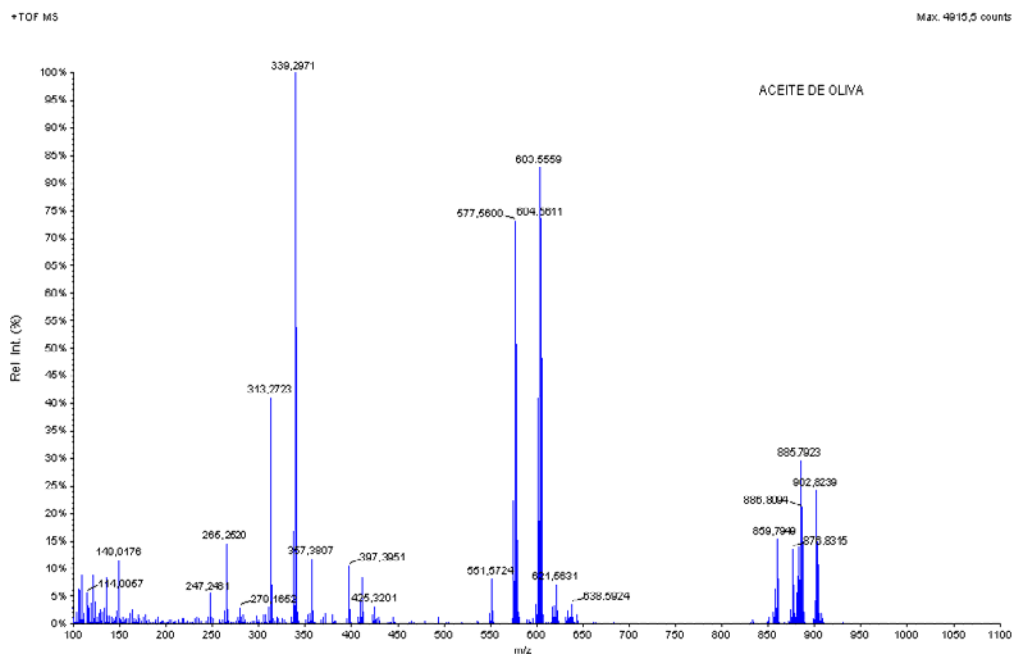
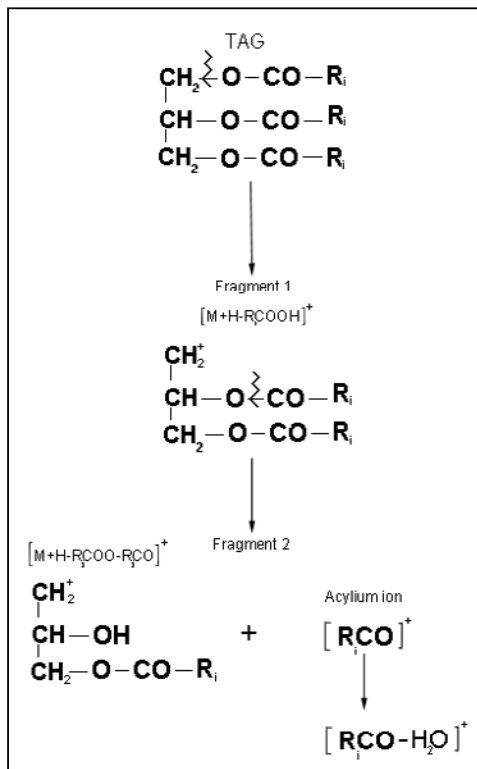


Figura 2 Fragmentos de triglicéridos (TAGs), obtenidos por APPI-QqTOF en modo de ionización positivo

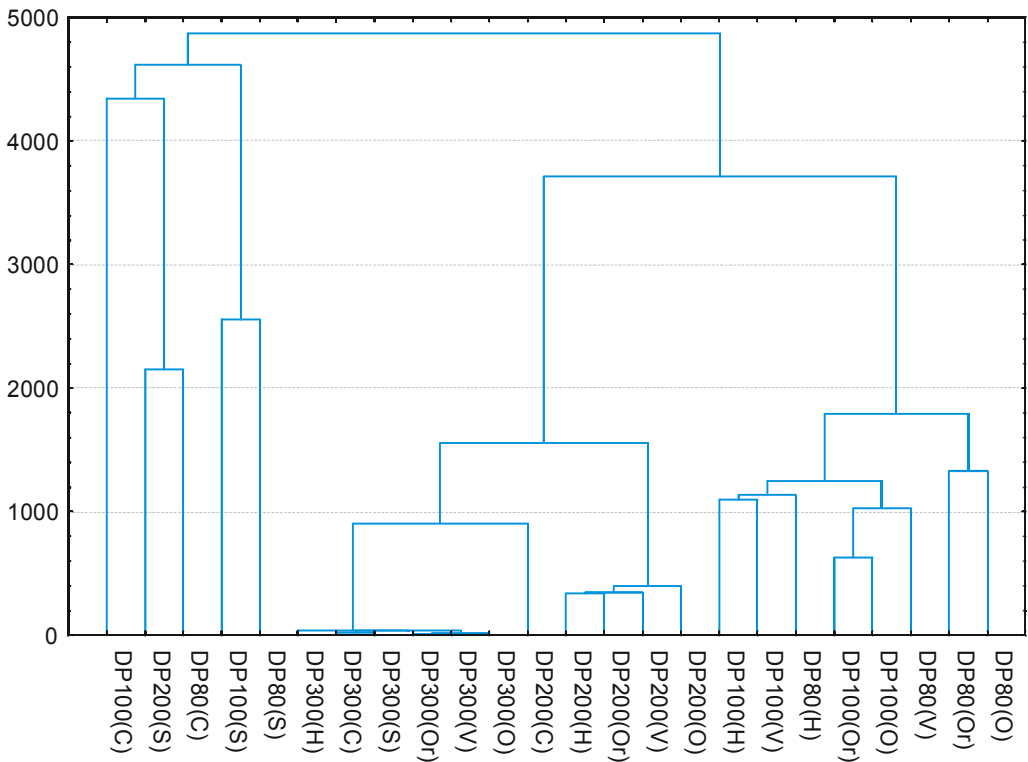


3.1.1. OPTIMIZACIÓN DEL DP PARA LA DISCRIMINACIÓN DE LOS DISTINTOS ACEITES

Para incrementar la capacidad discriminante de la fuente APPI en los distintos aceites objeto de estudio (oliva, oliva extra virgen, orujo, avellana, maíz y girasol), se optimizó el DP, ya que este parámetro afecta a la eficiencia de ionización y a la fragmentación en la fuente mediante disociación inducida por colisión (CID) y por tanto, a la información obtenida en los espectros de masas [23]. Cuando este parámetro se optimiza en un rango 80-300 V (85, 100, 200 y 300 V), se obtienen diferentes abundancias relativas de los iones en los espectros de masas.

Para interpretar mejor los datos obtenidos, realizamos un análisis cluster. Este método divide un grupo de objetos en una serie de clases en función de su similitud, medida por la distancia en el espacio. La Figura 3 muestra el dendograma resultante que permite elegir el mejor DP para discriminar los aceites considerados.

Figura 3 Dendograma en el que se muestran las agrupaciones entre los distintos aceites analizados, a diferentes voltajes de DP (80, 100, 200, 300 V). Código referido al tipo de aceite analizado: Aceite de Oliva (O), extra virgen (V), orujo (Or), avellana (H), girasol (S) y maíz (C)



El valor óptimo es 80 V, ya que con el no se producen muchas agrupaciones de aceites y mezclas y por tanto se alcanza una mayor discriminación. Podemos observar que el aceite de avellana, muy utilizado en la adulteración del aceite de oliva, ya que posee

una composición química muy parecido a este, es discriminado o separado gráficamente del mismo. Los resultados menos satisfactorios se obtienen con valores de DP de 300 V, ya que en este caso los seis aceites estudiados se agrupan en un solo cluster. Por otro lado, a 200 V, se obtienen un cluster en el que se agrupan todos los aceites con la etiqueta común de aceite de oliva (aceite de oliva, extra virgen y orujo) junto con el aceite de avellana, mientras el aceite de girasol y maíz son perfectamente discriminados de este cluster y entre ellos mismos.

3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ESPECTROS DE MASAS CON LAS FUENTES DE IONIZACIÓN ESI Y APPI

Los espectros ESI-MS del aceite de oliva y avellana se destacan por un pico predominante a 903 m/z . Este ión puede corresponder al aducto de amonio $[M+NH_4]^+$ de la trioleína (OOO), que es el triglicérido más abundante en ambos aceites [13]. Los espectros de estos aceites son muy similares (Fig.4), aunque el ión a 897 m/z , correspondiente a la trilinoleína (LLL), se detecta sólo en el aceite de avellana por lo que constituye un buen marcador de posibles adulteraciones en el aceite de oliva [17]. Para el aceite de girasol y de maíz (Fig.5) el pico más abundante es de 899 m/z , originado por el aducto 1,2-dilinoleoil-3-oleoilglicerol (LLO). En la Tabla 3 se muestra un resumen de los triglicéridos más abundantes identificados en este estudio.

La Figura 5 muestra que el aducto de amonio de LLL (897 m/z) es el segundo ión más abundante en el espectro de ESI-MS del aceite de girasol y maíz. Además, estos espectros muestran algunas diferencias entre ellos. Un claro ejemplo es la presencia de 1,2-dilinoleil-3-behenoilglicerol (BLL), 956 m/z (Tabla 3).

Tabla 3 Principales triglicéridos identificados en cuatro aceites vegetales por medio de ESI-QqTOF

TAGs	[M+ NH ₄] ⁺ m/z	Oliva	Avellana	Girasol	Maíz
OOO	902,75	'	'	'	'
POO	876,77	'	'	'	'
LOO	901,75	'	'	'	'
PLO	874,76	'	'	'	'
PPO	850,79	'	n.d	'	'
OOS	904,78	'	'	'	'
LLO	898,74	'	'	'	'
POPo	848,77	'	n.d	'	'
LLL	896,72	n.d	'	'	'
LLP	872,75	'	'	'	'
LLLn	894,72	n.d	n.d	'	'
LnLP	870,74	n.d	n.d	'	'
SOP	878,75	'	'	'	'
BLL	955,78	n.d	n.d	'	n.d

OOO, trioleína; POO, dioleil-1-palmitoilglicerol; LOO, 2,3-dioleil-1-linoleilglicerol; PLO, 1-palmitoil-2-linoleil-3-oleilglicerol; PPO, 1,2-dipalmitoil-3-estearoilglicerol; OOS, 1,2-dioleoil-3-estearoilglicerol; LLO, 1,2-dilinoileil-3-oleilglicerol; POPo, 1-palmitoil-2-oleil-3-palmitoleilglicerol; LLL, 1,2,3-trilinoileilglicerol; LLP, 1,2-dilinoileil-3-palmitoilglicerol; LLLn, 1,2-dilinoileil-3-linolenilglicerol; LnLP, 1-linolenil-2-linoleil-3-palmitoilglicerol; SOP, 2-oleil-3-palmitoil-1-estearoilglicerol y BLL, 1,2-dilinoileil-3-behenoilglicerol.

- «, detectado
- n.d, no detectado

Al igual que en el caso anterior, con ESI-QqTOF se fragmentaron los iones moleculares mediante espectrometría de masas en tándem, para una identificación inequívoca de los TAGs (Tabla 4).

Tabla 4 Masas características de los fragmentos 1 y 2 obtenidos del ión precursor TAG, empleando ESI-MS/MS

TAGs	Fragmento 1	[M-RCO] ⁺ m/z	Fragmento 2	[RCO] ⁺ m/z
OOO	OO	603	O	265
LLL	LL	599	L	263
LLO	OL	601	P	239
PPO	PO	577	Po	237
POP _o	PoO	575	Ln	261
PLO	PL	575	B	323
LLL _n	LL _n	597	S	267
BLL	BL	659	—	—
SOP	SO	605	—	—

Los principales iones producto obtenidos de la fragmentación del ión precursor a 903 m/z (OOO) son los observados a 603 m/z [OO]⁺ y el ión acilio del ácido graso oléico a 265 m/z , presentes tanto en el aceite de oliva como en el de avellana.

Figura 4 Espectro de masas obtenido mediante ESI-QqTOF del aceite de oliva (a) y aceite de avellana (b). La región entre 800-900 m/z está ampliada

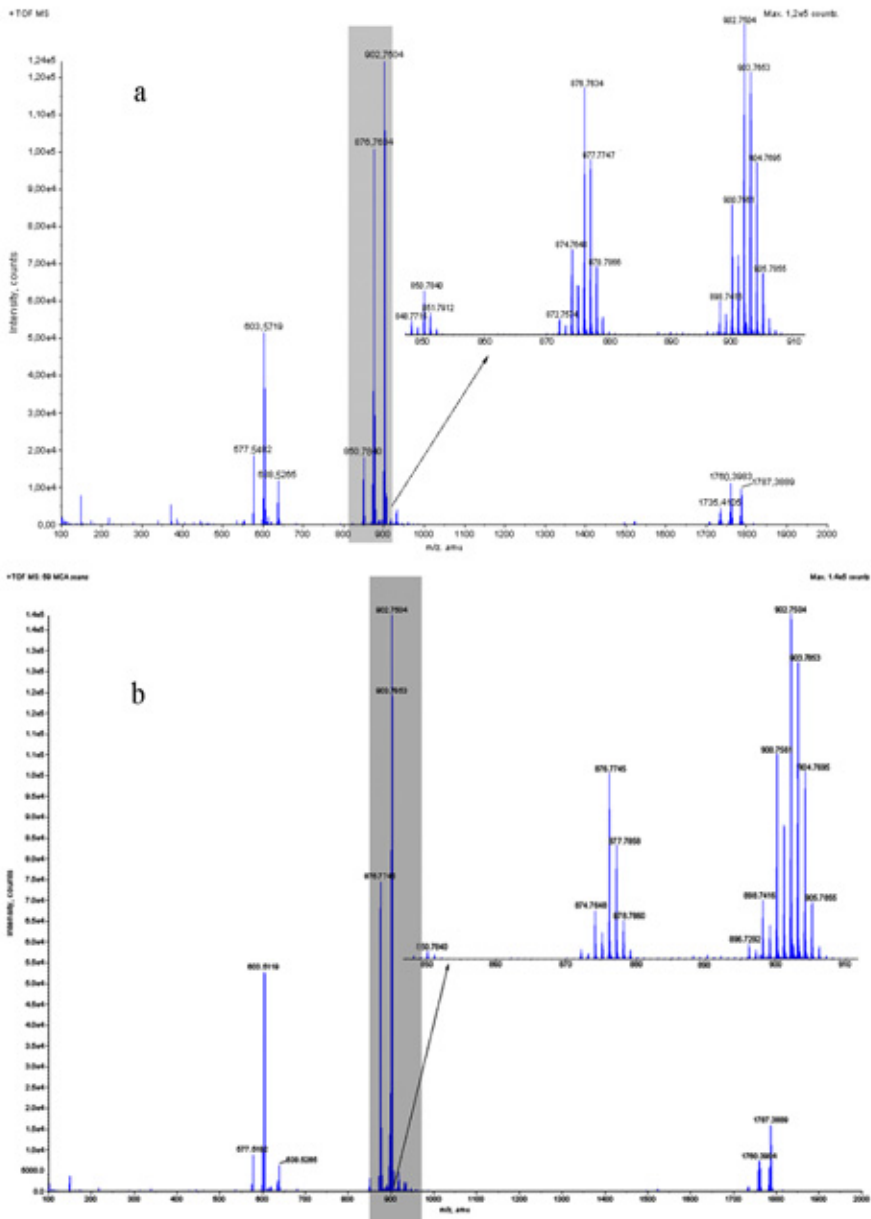
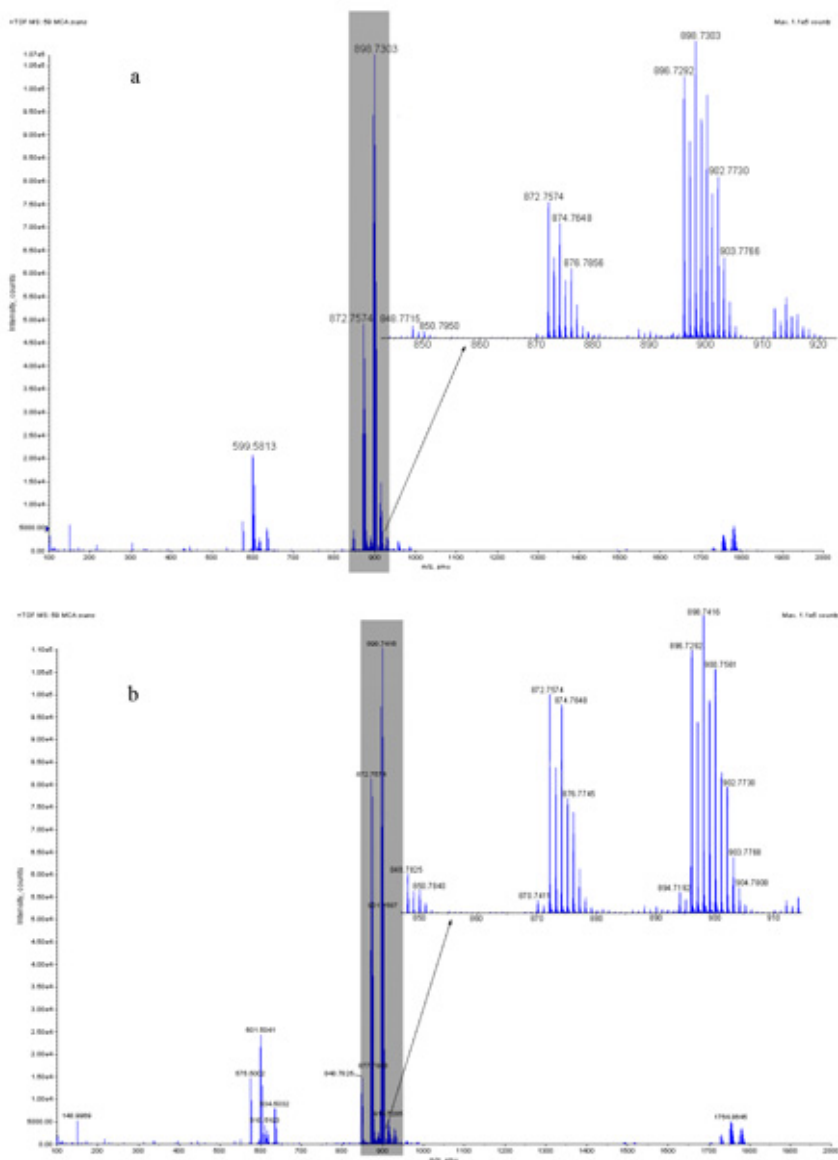


Figura 5: Espectro de masas obtenido mediante ESI-QqTOF del aceite de girasol (a) y aceite de maíz (b). La región entre 800-900 m/z está ampliada



El espectro de MS/MS de LLL presente en el aceite de avellana, da lugar a dos fragmentos característicos, siendo el de mayor intensidad el de 599 m/z , atribuible al ión $[LL]^+$, y el de menor intensidad el fragmento de 263 m/z , correspondiente al ión acilio del ácido graso linoleico.

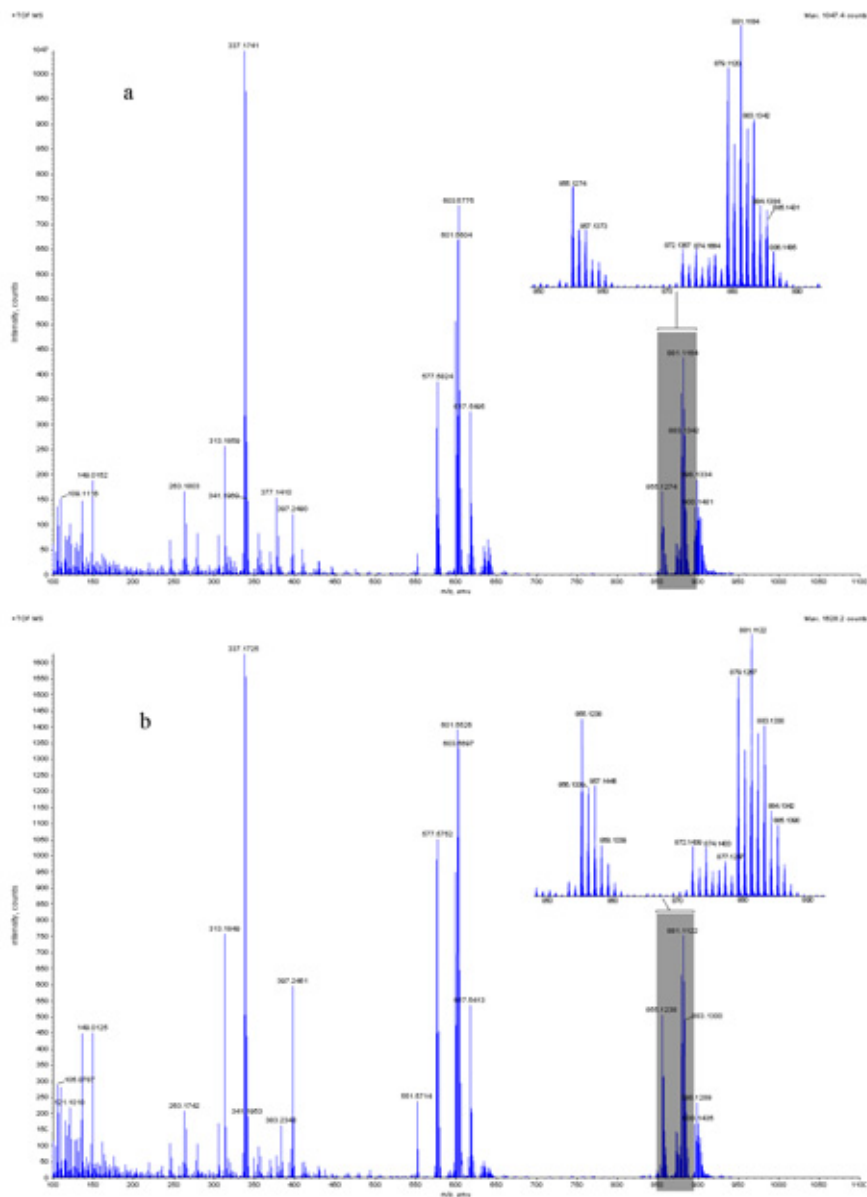
En los aceites de girasol y maíz, el espectro MS/MS del ión precursor LLO de 899 m/z , muestra dos iones producto predominantes de 601 m/z , $[LO]^+$, y 263 m/z , correspondiente este último al ión acilio anteriormente mencionado. Por último, en el aceite de girasol el espectro MS/MS del triglicérido BLL, presenta un patrón de fragmentación con tres iones característicos. Los de mayor intensidad son de 660 m/z $[BL]^+$ y 599 m/z $[LL]^+$ y el de menor intensidad el ión acilio de 263 m/z .

Los resultados obtenidos del barrido completo de masas con ambas fuentes, APPI- y ESI-MS, confirman la presencia de diferentes iones: $[M+H]^+$, $[M]^+$, $[RiCO]^+$, y $[RiCO-H_2O]^+$ con la fuente APPI, y $[M+NH_4]^+$ y $[RiCO]^+$ con la fuente ESI [14,13]. Asimismo, este estudio demuestra que los fragmentos correspondientes a los diacilglicéridos (DAG) y monoacilglicéridos (MAG), son más abundantes en los espectros obtenidos con la fuente APPI. En la Figura 2, se muestran las posibles fragmentaciones que pueden obtenerse con la fuente APPI.

La Figura 6 muestra los espectros de masas con la fuente APPI para los aceites de girasol y maíz, en los que podemos observar diferencias significativas con los correspondientes a los de oliva y avellana.

Asimismo, en los espectros de masas del aceite de girasol y maíz, el ión fragmentado $[L]^+$ de 337 m/z es el más abundante, mientras que en los del aceite de oliva y avellana (Fig.7), es el fragmento 339 m/z $[O]^+$.

Figura 6 Espectros APPI-MS: (a) aceite de girasol y (b) aceite de maíz. La región entre 800-900 m/z está ampliada



3.2.1. ESTUDIO DE MEZCLAS DE ACEITES

Con objeto de comprobar si las metodologías desarrolladas permiten detectar bajos niveles de adulteración, se analizaron varias mezclas de aceites con diferentes composiciones (Sección 2.1). La Tabla 5, indica la presencia de varios triglicéridos y sus abundancias en los espectros de MS que pueden ser utilizados como marcadores de la presencia del aceite de avellana en el aceite de oliva, como son OOO y LOO, cuando utilizamos la fuente ESI. Estos compuestos están presentes en ambos aceites, aunque su abundancia relativa en los espectros de masas es diferente, encontrándose con mayor abundancia en el aceite de oliva (OOO, 26,92%; LOO, 11,76%). A partir del estudio de las mezclas con estos marcadores, se concluye que es posible detectar la presencia de aceite de avellana en el aceite de oliva cuando el primero se encuentra en un porcentaje inferior al 10 % (v/v) (Tabla 5). Además, el LLL, es un marcador de la presencia de aceite de avellana como adulterante en el aceite de oliva, ya que este compuesto está presente tan sólo con una abundancia relativa de 1,44% en los espectros de masas del aceite de oliva puro.

La adulteración del aceite de oliva con aceites de girasol y maíz puede detectarse con el triglicérido LLO, el cual es el más abundante en estos adulterantes que en el aceite de oliva. En este sentido, el triglicérido BLL está en el espectro de MS del aceite de girasol, lo que constituye un segundo marcador de adulteraciones.

Cuando se utiliza la fuente APPI (Tabla 6) hay diferencias significativas entre el espectro de masas del aceite de avellana y el de oliva. El primero presenta una gran abundancia relativa de OOO (6,23%), del fragmento [OO]⁺ (28,88%) y del [O]⁺ (28,31%). Del mismo modo, la presencia de LLL en aceites de girasol y maíz, y su ausencia en el aceite de oliva, también aparece en los espectros obtenidos con la fuente APPI. Análogamente, [LL]⁺ y [L]⁺ aparecen en los espectros de masas de girasol y de maíz con una abundancia relativa más alta. Por último, las mezclas de aceite de oliva con los aceites anteriormente citados muestran resultados análogos a los observados previamente con la fuente ESI.

La fuente APPI permite la detección más sensible de fragmentos mono- y diacilglicéridos que los obtenidos con la fuente ESI, lo que complementa ambas fuentes, ya que esta última es más eficiente para la detección de triglicéridos.

Tabla 5 Abundancia relativa (%) de los TAG en el aceite de avellana, girasol, maíz, oliva y sus mezclas obtenido por ESI- QqTOF

Sample	000	FO0	L00	F10	F20	00S	L10	FO6	L1L	F1F	ILh	SOE	HL
O	26.99±0.52	21.78±0.19	11.76±0.22	7.78±0.18	3.94±0.07	15.32±0.05	3.13±0.09	1.34±0.03	nd	1.52±0.02	0.07±0.05	5.99±0.31	nd
H	31.15±0.03	16.57±0.14	8.25±0.20	4.25±0.13	0.28±0.05	16.91±0.19	5.38±0.13	nd	1.44±0.07	0.83±0.01	0.13±0.01	3.54±0.18	0.15±0.01
S	11.45±0.03	5.01±0.01	17.31±0.04	8.25±0.04	0.24±0.03	2.39±0.02	21.04±0.13	0.88±0.01	8.71±0.09	9.72±0.08	0.41±0.01	0.86±0.07	2.94±0.07
C	7.95±0.23	6.25±0.09	15.12±0.01	12.75±0.14	1.44±0.01	1.66±0.05	8.43±0.20	2.45±0.04	16.32±0.05	15.32±0.10	1.23±0.02	0.93±0.05	0.23±0.06
O(H)	28.69±0.20	19.95±0.48	8.72±0.10	4.69±0.05	2.32±0.02	12.82±0.13	2.13±0.09	0.84±0.01	0.36±0.03	0.92±0.01	nd	4.27±0.01	0.11±0.07
O(H)	29.88±0.28	18.84±0.28	9.32±0.05	4.25±0.03	2.02±0.02	12.93±0.16	2.23±0.04	0.71±0.02	0.44±0.01	0.83±0.01	nd	4.13±0.19	0.13±0.02
O(S)	30.21±0.33	16.73±0.29	10.61±0.03	3.78±0.03	1.58±0.02	13.04±0.14	2.39±0.02	0.41±0.14	0.39±0.02	0.80±0.14	nd	3.46±0.03	0.14±0.02
O(S)	34.59±0.67	18.47±0.07	11.52±0.18	5.29±0.09	2.05±0.02	10.69±0.11	7.09±0.01	0.82±0.04	3.93±0.05	2.22±0.07	nd	3.67±0.01	0.15±0.20
O(S)	28.17±0.11	14.73±0.18	12.37±0.04	5.69±0.03	1.67±0.05	8.31±0.16	12.35±0.03	0.81±0.01	8.08±0.05	3.46±0.04	0.17±0.01	2.88±0.07	1.03±0.03
O(S)	28.23±0.10	11.92±0.31	14.13±0.07	5.78±0.06	1.23±0.04	6.64±0.10	16.43±0.18	0.73±0.01	11.55±0.13	4.47±0.06	0.21±0.01	2.32±0.05	1.33±0.03
O(C)	34.63±0.27	19.41±0.03	9.74±0.11	6.25±0.06	2.28±0.07	11.18±0.04	5.41±0.03	1.07±0.01	2.80±0.02	2.97±0.03	0.23±0.01	3.73±0.10	0.23±0.01
O(C)	26.44±0.11	14.62±0.19	11.63±0.05	8.25±0.05	1.95±0.05	7.56±0.09	11.29±0.14	1.35±0.03	7.29±0.05	6.03±0.05	0.43±0.05	2.17±0.01	0.44±0.12
O(C)	24.12±0.07	13.59±0.12	12.05±0.01	8.25±0.07	1.85±0.01	6.69±0.04	12.41±0.06	1.25±0.01	8.30±0.07	6.67±0.09	0.34±0.01	2.54±0.12	0.43±0.02

ACEITES: Aceite de Oliva (O); avellana(H); girasol (S); maíz (C);
 MEZCLAS % (v/v): (O:H) Oliva-Avellana 90:10; (O:H) Oliva -Avellana 70:30; (O:H) Oliva -Avellana 50:50; (O:S) Oliva - Girasol 90:10;
 (O:S) Oliva-girasol 70:30; (O:S) Oliva -Girasol 50:50; (O:C) Oliva -Maiz 90:10; (O:C) Oliva -Maiz 70:30; (O:C) Oliva-Maiz 50:50.
 Media de la abundancia en tres espectros de MS ± desviación estándar (SD)

Tabla 6 Abundancia relativa (%) de los fragmentos de mono-, di-, triglicéridos e iones acilio, obtenidos por los espectros de masas APPI-QqTOF

Sample	OOO	III	IIO	OO	OL	IL	OP	L	P	O	Ln	[RCQ] ⁺	[RCQ] ⁺	[RCO]	[RCO]
												O	L	HQ ⁺ O	HQ ⁺ L
O	5144045	n.d	1844013	2875417	8624050	1644017	16324070	5014047	6244022	2515402	0284016	3224005	0684004	1214004	0414004
H	6224013	0524001	1454004	2888408	8484009	1054006	11414022	4574012	3404018	2834041	0194002	3234008	0624001	1224001	0524001
S	1954020	4824007	5974016	14554071	12114053	8554048	6484011	17524053	4104043	17324011	0484053	1774015	2224062	0684002	1224002
C	1324009	4844021	5954016	11824042	13640020	8704001	9184006	16924007	6754038	15040018	0654001	1414001	2184001	0524002	1114003
OH	4574015	0524001	1454009	26724017	6174008	1004009	15194038	3684007	5444001	27224009	0304001	2834001	0524003	0654001	0324001
OH	5154012	0524001	1104002	21064053	6754018	0784002	13874006	3984008	5184006	29124021	0244001	3924010	0624002	1404003	0354001
OH	5434003	0604009	0984001	29044019	6984023	0834006	13104035	4104006	5124005	31704035	0224001	4324008	0644001	1584002	0324001
OS	4804024	0444002	1314001	21874024	6624006	1034002	16214011	3574006	5354015	27144036	0274001	3554002	0584001	1284002	0374003
OS	3884009	2074006	3084007	21084054	8534025	3784027	13924008	8554036	5354002	23404024	0584006	2924001	1084001	1124005	0684004
OS	3634035	2974004	4044001	21114070	9244022	5104028	12854010	10204028	5184004	21834031	0484014	2544002	1314001	0684001	0724001
OD	4114001	0524003	1374004	25684008	6884004	1304003	16864004	4104008	6154003	26594010	0314001	3884002	0614002	1354010	0394010
OC	4104006	1864011	2874006	22984031	8744018	3544017	15384002	7144025	5774005	21924029	0344001	2914007	0684002	1084002	0524001
OC	3744009	2454004	3354001	21994024	9724010	4654006	14264007	9244022	5924006	21154017	0384001	2584007	1224004	0664002	0704001

ACEITES Oliva (O); Avellana (H); Girasol (S); Maiz (C);
 MEZCLAS % (v/v): (O:H1) Oliva-Avellana 90:10; (O:H2) Oliva-Avellana 70:30; (O:H3) Oliva-Avellana 50:50; (O:S1) Oliva-Girasol 90:10;
 (O:S2) Oliva-Girasol 70:30; (O:S3) Oliva-Girasol 50:50; (O:C1) Oliva-Maiz 90:10; (O:C2) Oliva-Maiz 70:30; (O:C3) Oliva-Maiz 50:50.
 Abreviaturas ácidos grasos:O= oleico (18:1), L= linoleico (18:2), P= palmítico (16:0), Ln= linolenico (18:3).
 Media de tres determinaciones ± desviación estándar (SD)
 n.d.: no detectado

3.2.1.1. *Análisis de componentes principales*

Finalmente, a los datos obtenidos en los espectros MS con ambas fuentes de ionización, se aplicó un análisis de componentes principales (ACP) con objeto de comprobar la capacidad de clasificación de los métodos para las muestras estudiadas.

El análisis de componentes principales es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de las dimensiones (número de variables) con una mínima pérdida de información. Los nuevos componentes principales o factores son una combinación lineal de las variables originales, y además son independientes entre sí. Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, dependiendo del signo y de la magnitud de las correlaciones [18].

En este caso, el ACP se aplicó a los datos de las tablas 5 y 6, que corresponden a las abundancias relativas (%) (variables) de los iones (descriptores) en los espectros de masas obtenidos con las muestras de aceites y sus mezclas (casos).

Para la fuente ESI, la abundancia de los aductos de amonio, de los TAGs (OOO, POO, LOO, PLO, PPO, OOS, LLO, POPo, LLL, LLP, LLLn, LnLP, SOP y BLL) en los espectros de masas se consideraron como variables, y cada tipo de aceite o mezcla como una clase.

En la Tabla 7 se muestran correlaciones de las variables manifiestas en los dos componentes principales con mayor porcentaje de variabilidad. Las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2) representan el 88,6 % de la varianza total y se consideraron suficientes para este estudio. Las variables dominantes en la PC1 son: POO, LLO, LLL, LLP, OOS y OOO y en segundo lugar: PPO, POPo y LOO. Existen asimismo, valores positivos y negativos de las cargas (*loadings*) lo cual indica que las variables suministran distinto tipo de información. La segunda componente principal (PC2) explica el 18,04 % de la varianza total. Examinando las cargas de las variables PPO y POPo observamos que son las más importantes para PC2.

Tabla 7. Cargas de las variables obtenidas en las dos componentes principales utilizando ambas fuentes (ESI y APPI)

ESI			APPI		
variable	PC1	PC2	variable	PC1	PC2
OOO	-0,292	0,047	OOO	-0,255	-0,149
POO	-0,304	-0,159	LLL	0,277	-0,066
LOO	0,195	0,296	LLO	0,279	-0,031
PLO	0,260	-0,340	OO	-0,272	-0,089
PPO	-0,168	-0,462	OL	0,268	-0,033
OOS	-0,295	0,018	LL	0,280	-0,017
LLO	0,302	0,121	OP	-0,216	0,475
POP _o	0,199	-0,483	L	0,279	-0,083
LLL	0,308	0,097	P	0,043	0,793
LLP	0,310	-0,121	O	-0,270	-0,132
LLL _n	0,275	-0,243	Ln	0,262	0,252
LnLP	0,248	-0,289	[RCO] ⁺ ácido oléico	-0,259	-0,041
SOP	-0,288	-0,185	[RCO] ⁺ ácido linoleico	0,277	-0,097
BLL	0,239	0,322	[RCO-H ₂ O] ⁺ ácido oléico	-0,252	-0,030
			[RCO-H ₂ O] ⁺ ácido linoléico	0,277	-0,083

La Figura 8 muestra la representación de las dos componentes principales y las agrupaciones de los aceites y mezclas analizados mediante ESI-QqTOF. Puede observarse una clara separación entre los aceites de avellana, girasol y maíz, que a su vez están bien diferenciados con respecto al aceite de oliva. Además, el ACP indica que las mezclas (90% aceite de oliva con el 10% avellana y 90% oliva con el 10% de aceite de maíz) se

sitúan en el gráfico muy próximos al aceite de oliva.

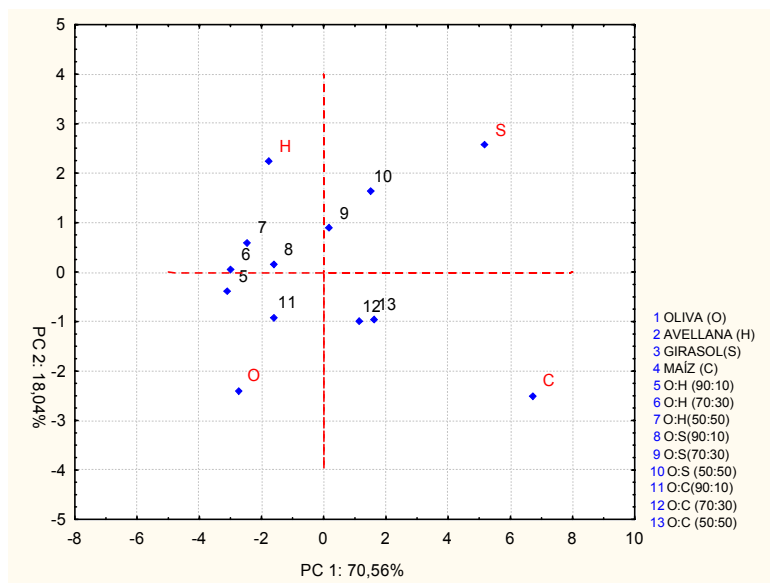
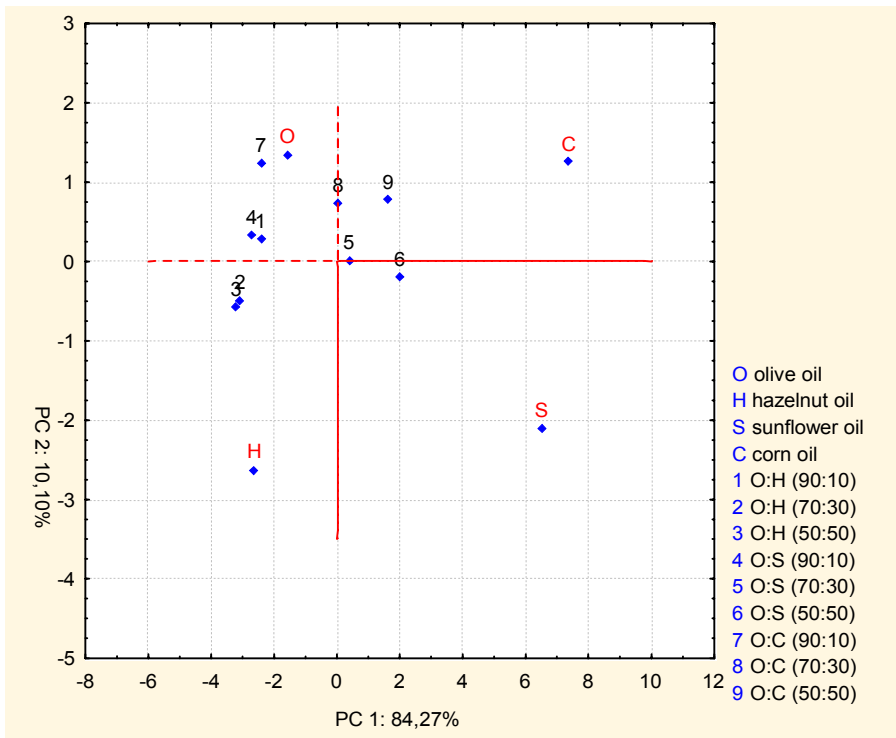


Figura 8 Análisis de componentes principales obtenido con la fuente ESI

La Figura 9 representa los componentes principales y la distribución de los aceites y mezclas analizadas mediante APPI-MS. Para el análisis de componentes principales se utilizaron los datos que se muestran en la Tabla 6.

La Tabla 7 muestra las correlaciones en las dos primeras componentes principales que representan más del 94 % de la varianza total. En la Figura 9 se muestra la separación de los cuatros aceites y sus correspondientes mezclas. Asimismo, podemos observar que existe una graduación en cuanto a la proximidad de las mezclas al aceite de oliva en función del grado de adulteración. Es decir, cerca del aceite de oliva se encuentran las mezclas menos adulteradas (sólo un 10% de otros aceites en el de oliva) y progresivamente las de mayor porcentaje de adulteración.

Figura 9. Análisis de componentes principales obtenido con la fuente APPI



3.2.1.2. *Análisis discriminante*

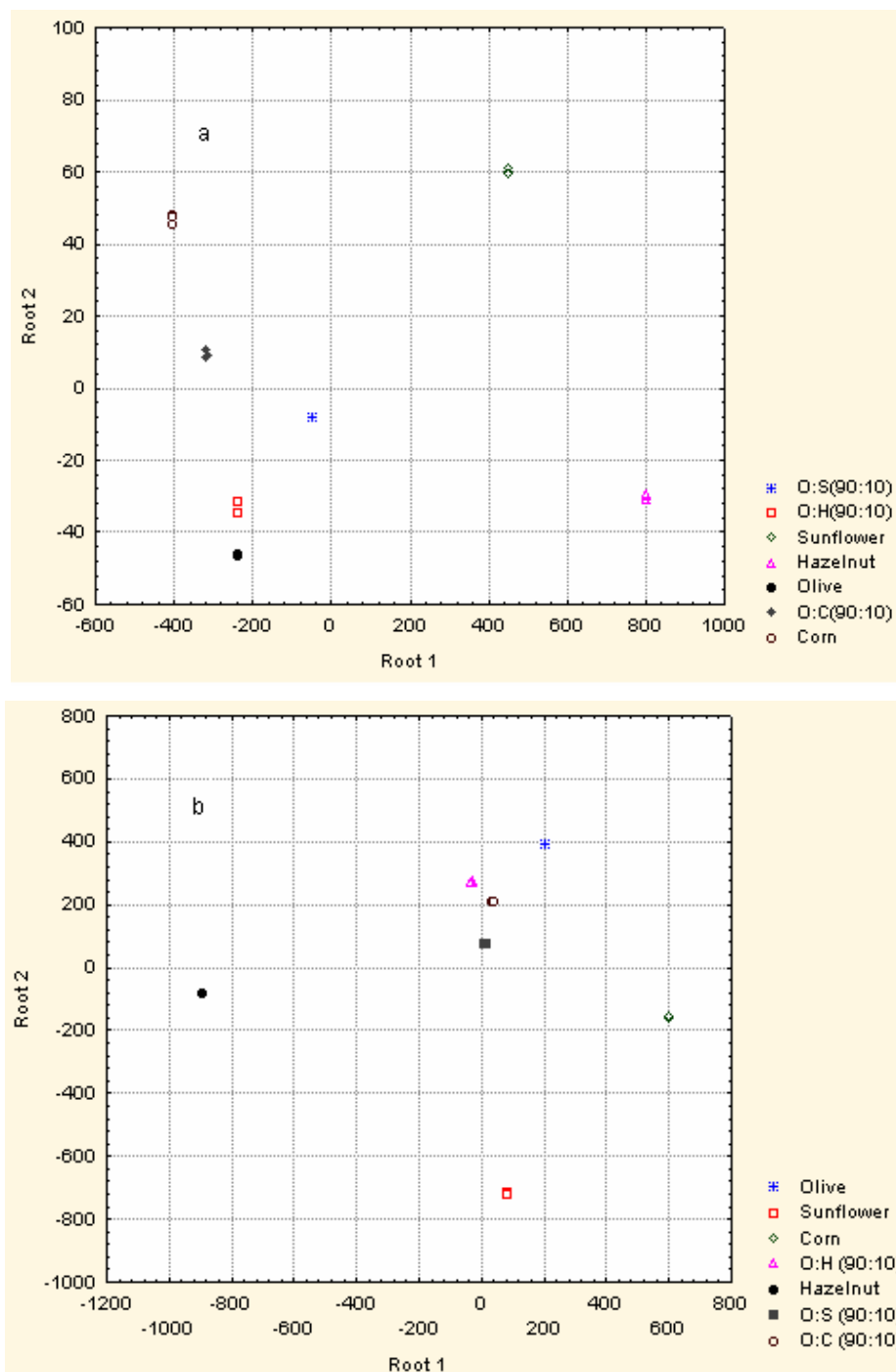
El análisis de componentes principales es una técnica de visualización no supervisada pero no permite una discriminación fiable entre clases.

Por este motivo, se aplicó un análisis discriminante (LDA) a los datos anteriores permitiendo obtener pautas de clasificación para asignar categorías a las muestras en función de la abundancia relativa en sus espectros de los iones descritos previamente. Después de aplicar el LDA, se obtuvieron cuatro funciones discriminantes. La Figura 10 muestra la distribución de las muestras de aceites en el espacio definido por las funciones discriminantes DF_1 y DF_2 a partir de los análisis con ambas fuentes de ionización. Se establecieron siete clases diferentes: aceite de oliva, avellana, girasol, maíz y sus correspondientes mezclas 90:10 (v/v) con el aceite de oliva. Se aplicó el LDA a los aceites junto a esta proporción de mezcla, ya que es la de más difícil detección por la pequeña presencia de adulterante.

Los resultados confirman que empleando la composición de triglicéridos se pueden agrupar con facilidad los aceites y sus mezclas. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por otros autores en estudios similares basados en el uso de la ESI [19].

Por último, el LDA refleja que la reproducibilidad del método analítico es muy alta, especialmente con la fuente APPI en la que los puntos correspondientes a tres muestras distintas dentro de cada clase están completamente superpuestos. Por tanto, el aceite de oliva puede ser claramente diferenciado de otros aceites de composición química muy semejante que podrían ser utilizados como adulterantes.

Figura 10 Análisis Discriminante: (a) fuente ESI y (b) fuente APPI



4. CONCLUSIONES

El uso de las fuentes ESI y APPI acopladas al espectrómetro de masas QqTOF constituye una buena alternativa para obtener espectros de masas que pueden usarse como «huellas dactilares» de los distintos aceites comestibles estudiados. Estos acoplamientos implican fuentes de ionización robustas, y analizadores de masa de gran resolución, como el QqTOF, ya que la resolución es primordial en el estudio de matrices complejas multi-componentes como los aceites vegetales. Estos sistemas instrumentales permiten un tratamiento de muestra muy simple al no requerir separación cromatográfica previa y un tiempo de análisis muy corto (1 minuto por muestra).

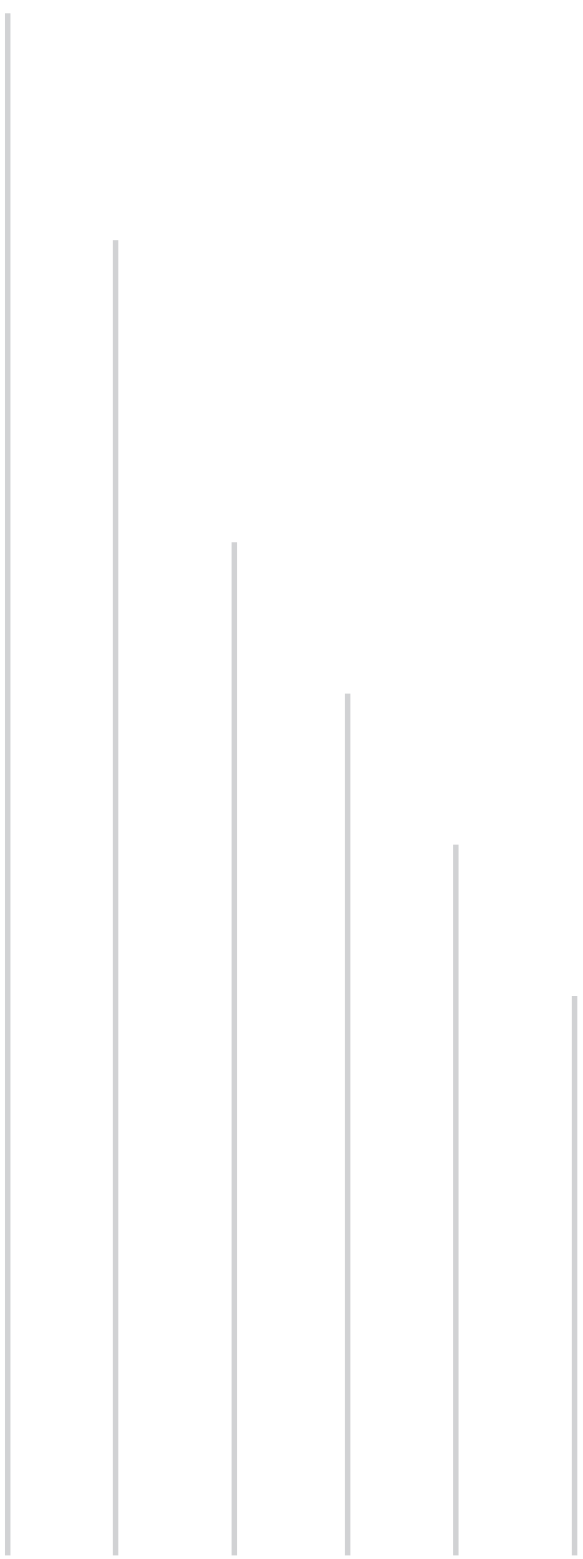
Las fuentes ESI y APPI son complementarias. La ESI es una fuente de ionización «suave» que permite una gran sensibilidad en la detección de aductos de los TAGs, mientras que la APPI ofrece información valiosa de los patrones de fragmentación, ya que los mono- y diglicéridos son los más abundantes en estos espectros. La repetibilidad del análisis es elevada con ambas fuente, pero la APPI proporciona mejores resultados. Además, algunos fragmentos como $[\text{RiCO-H}_2\text{O}]^+$, correspondiente a la pérdida del agua en el ión acilio sólo pueden ser detectados por APPI-MS.

Tanto ESI- como APPI-QqTOF pueden ser usadas para la diagnosis de las posibles adulteraciones de aceite de oliva, porque permiten la discriminación de otros aceites vegetales comúnmente utilizados con esta finalidad. El análisis de componentes principales del aceite de oliva permite a una evaluación inequívoca de su autenticidad y proporciona una clasificación precisa de otros aceites comestibles y sus mezclas. El uso de LDA verifica la repetibilidad del método, sobre todo con la fuente APPI, y proporciona pruebas adicionales de la presencia de adulteraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. R. Aparicio, J. Harwood (Eds.), Handbook of Olive Oil Analysis and Properties, Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000
2. C. Rodriguez-Villar, A. Perez-Heras, I. Mercade, E. Casals, E. Ros, Diabetic. Med. 21 (2004) 142
3. C. Puel, A. Quitin, A. Agalias, J. Mathey, C. Obled, A. Mazur, M.J. Davicco, P. Lebecque, A.L. Skaltsounis, V. Coxam, Brit. J. Nutr. 92 (2004) 119
4. K. Tuovinen, Toxicology 196 (2004) 31
5. J.R. Huertas, E. Martinez-Velasco, S. Ibanez, M. Lopez-Frias, J.J. Ochoa, J. Quiles, G.P. Castelli, J. Mataix, G. Lenaz, Biofactors 9 (1999) 337
6. L. Cercaci, M.T. Rodriguez-Estrada, G. Lercker, J. Chromatogr. A 985 (2003) 211
7. R. Aparicio, R. Aparicio-Ruíz, J. Chromatogr. A 881 (2000) 93
8. A.D. Shaw, A. Di Camillo, G. Vlahov, A. Jones, G. Bianchi, J.J. Rowland, D.B. Kell, Anal. Chim. Acta. 348 (1997) 357
9. V. Baeten, M. Meurens, M.T. Morales, R. Aparicio, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 2225
10. H. Yang, J. Irudayaraj, J. Am. Oil Chem. Soc. 78 (2001) 889
11. G. Vlahov, A.D. Shaw, D.B. Kell, J. Am. Oil Chem. Soc. 76 (1999) 1223
12. I.M. Lorenzo, J.L.P. Pavon, M.E.F. Laespada, C.G. Pinto, B.M. Cordero, J. Chromatogr. A 945 (2002) 221
13. R. Goodacre, S. Vaidyanathan, G. Bianchi, D.B. Kell, Analyst 127 (2002) 1457
14. J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego, T-García-Barrera, Rapid Commun. Mass Spectrom. 20 (2006) 1181

15. D.B. Roob, T.R. Covey, A.P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
16. J.A. Syage, M.D. Evans, *Spectroscopy* 16 (2001) 15.
17. J. Parcerisa, I. Casals, J. Boatella, R. Codony, M. Rafecas, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 149.
18. S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, *Chemom. Intell. Lab. Sys.* 2 (1987) 37.
19. P. Kaufman, *Anal. Chim. Acta* 277 (1993) 467
20. M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1965
21. M. Holcapek, P. Jandera, J. Fischer, Prokes, *J. Chromatogr. A* 858 (1999) 13
22. Wm. Craig Byrdwell, Neff WE., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16(2002) 300
23. M. Takino, K. Yamaguchi, T. Nakahara, *J. Agric. Food Chem.* 52(2004) 727



CAPÍTULO III

PERFILES DE BIOMOLÉCULAS UNIDAS A METALES EN EXTRACTOS DE PIÑONES (PINUS PINEA) MEDIANTE SEC-UV-ICPMS

*D*uring several years, the researches have been studying the healthy effects of the consumption of nuts. The studies in this matter have concluded that this food has important beneficial properties associated with the risk reduction of both coronary heart diseases and non-fatal myocardial infarction.

In addition, the presence of essential elements in this food is critical due to their important biological roles, the potential connection to pollution processes and the influence of soil elemental composition in forestry areas. The function of many biomolecules and in particular metalloproteins, critically depends on their interaction with elements, mainly with transition metals.

In this chapter, four essential elements (Mn, Ni, Zn and Cu) and the size distribution patterns of the metallo-molecules resulting of the bond of these elements with the biomolecules present in pine nuts (*Pinus pinea*) have been determined in twenty four samples, which were collected from eight areas in Spain and Portugal (Huelva, Cádiz, Badajoz, Cataluña, Castilla, Madrid, Faro and Coimbra). These samples were analysed by size exclusion liquid chromatography (SEC) on-line coupled to UV and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detectors. The variability observed in both the total elements content and molecular size profiles of elements in pine nut samples were considered as chemical descriptors for the characterization of the geographic origin. A pattern recognition technique such as Principal Component Analysis was applied as a visualization technique to survey the provenance of the pine nuts from different origins.

The results performed in this study have been described in the following publications:

- ❖ *Multi-elemental fractionation in pine nuts (Pinus Pinea) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J Chromatogr. A** 1121 (2006) 191-199
- ❖ *Combined use of total metal content and size fractionation of metal biomolecules to determine the provenance of pine nuts (Pinus pinea).* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **Anal. Bional. Chem** 388 (2007) 1295–1302.
- ❖ *Characterization of pine nuts (Pinus pinea) from different geographic origin according to their mineral content.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J. Food Compos. Anal.** (submitted)

Desde hace tiempo el efecto beneficioso de los frutos secos, en particular su acción cardiosaludable y beneficio general sobre el sistema cardiovascular, ha sido objeto de numerosos estudios por parte de especialistas de diversas disciplinas. Estos trabajos multidisciplinares revelan que el perfil nutricional único de estos alimentos hace que el consumo regular de frutos secos proteja sobre ciertos tipos de cáncer, ayude a controlar los niveles de colesterol y disminuya la mortalidad causada por enfermedades cardiovasculares, sin provocar exceso de peso u otros efectos colaterales en el consumidor. De esta forma, la apreciación negativa que se tenía sobre estos alimentos ha evolucionado hasta convertir a los frutos secos en productos recomendados por todos los especialistas en nutrición, que reconocen las propiedades funcionales de los mismos.

Los piñones (*Pinus pinea*) son muy comunes en los países mediterráneos. Se caracterizan por su elevado precio en el mercado, debido a los costes de recolección y a su alto valor nutricional siendo fuente importante de proteínas, vitaminas y minerales. Por ello, la investigación de este alimento constituye en la actualidad una cuestión primordial, sobre todo en lo relacionado con el estudio de metabolitos que puede permitir identificar su procedencia, asegurar su calidad y garantizar la autenticación del producto.

El objetivo del trabajo experimental que se describe en el presente capítulo fue desarrollar procedimientos analíticos que permitan conocer la calidad de los frutos secos y en particular los piñones (*Pinus pinea*), dada su elevada producción en diversas áreas de nuestro país. Para ello se han desarrollado metodologías analíticas que permiten la caracterización de metabolitos de forma inequívoca, a través del perfil metalo-biomolecular. Todo ello hace posible el control de la calidad, y la detección de problemas relacionados con el estrés ambiental o la manipulación inadecuada de estos frutos antes de su consumo.

La metodología analítica utilizada se basa en el empleo de en una separación cromatográfica (cromatografía de exclusión de tamaño, SEC) en combinación con una técnica atómica de detección que utiliza la espectrometría de plasma con detector de

masas (ICP-MS). En este estudio se han seleccionado varios elementos importantes desde el punto de vista nutricional y/o toxicológico (Mn, Ni, Cu y Zn) estudiándose tanto su contenido total en las muestras como su interacción con proteínas, péptidos y otras biomoléculas de alto y bajo peso molecular.

Las investigaciones realizadas han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- ❖ *Multi-elemental fractionation in pine nuts (*Pinus Pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J Chromatogr. A** 1121 (2006) 191-199
- ❖ *Combined use of total metal content and size fractionation of metal biomolecules to determine the provenance of pine nuts (*Pinus pinea*).* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **Anal. Biol. Chem** 388 (2007) 1295–1302
- ❖ *Characterization of pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origin according to their mineral content.* J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J. Food Compos. Anal.** (enviado)

1. INTRODUCCIÓN

Los piñones (*Pinus pinea*) constituyen un alimento tradicional de alto valor añadido. Poseen un sabor muy apreciado y un alto contenido de proteínas, que lo hacen idóneos para su uso en la dieta mediterránea, en la preparación de panes especiales, caramelos, salsas y tortas, así como verduras y platos de carne [1, 2]. Además este alimento tiene propiedades saludables muy importantes, asociadas con la reducción del riesgo de enfermedades coronarias e infartos de miocardio [2].

La presencia de elementos esenciales en este alimento es crítica porque influye en procesos biológicos importantes. Hay que tener en cuenta que con frecuencia los niveles de metales están relacionados con la composición elemental del suelo [3,4], y que puede estar afectada por procesos de contaminación. Por otra parte, la función, de muchas biomoléculas y en particular metaloproteínas, depende críticamente de su interacción con elementos, principalmente con los de transición [5].

Algunas proteínas se expresan o su acción se inhibe en función de la presencia de metales pesados en episodios de contaminación (puede citarse el ejemplo clásico de las metalotioneínas), otras proteínas transportan iones esenciales, como la albúmina y la transferrina; finalmente, un gran número de elementos son activadores de enzimas [5]. Por otra parte, muchas biomoléculas de bajo peso molecular, incorporan algún elemento metálico o no metálico, lo que puede ser también crucial para numerosos procesos biológicos que se desarrollan en células y tejidos [5, 6]

La mayor parte de los problemas que surgen en la caracterización analítica de estas metalobiomoléculas en los alimentos, están relacionados con su naturaleza desconocida [7], lo que hace necesario el empleo de técnicas analíticas multidimensionales para obtener información complementaria que permita su identificación.

Generalmente, estos métodos analíticos [7, 8] utilizan varias separaciones cromatográficas ortogonales con algún detector atómico de gran sensibilidad, fundamentalmente el ICP-MS. Este detector permite además el análisis multielemental y no precisa una interfase compleja para lograr el acoplamiento con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). Esta combinación de espectrometría de masas elemental y molecular constituye una herramienta básica en el estudio de alimentos y en general, en la ciencia de la vida [9].

Numerosos estudios han considerado la presencia de elementos totales en productos de alimentación, y la han relacionado con su valor alimenticio, toxicidad, procesos de contaminación, etc. [3, 4, 10]. No obstante, la caracterización de especies químicas de estos elementos, y en particular su unión a biomoléculas es escasa.

En este capítulo, se describe como la concentración total de Mn, Cu, Ni y Zn y la abundancia relativa de diversas especies de estos elementos, en las muestras de piñones analizadas, caracterizadas por SEC-ICP-MS en función de su masa molecular. Los perfiles obtenidos se han utilizado como descriptores químicos de procedencia. La selección de los elementos se ha realizado en función de su importancia en el metabolismo, por ejemplo, el manganeso es un cofactor de la enzima piruvato carboxilasa y actúa también como un activador no específico para varias enzimas, como son la superóxido dismutasa, glicosiltransferasas, arginasa y otras. Otra proteína en las que el Mn puede estar presente son, la albúmina y la β_1 -globulina [11]. Además, el Mn es necesario para el metabolismo de las grasas, el correcto funcionamiento del sistema nervioso e inmunológico y la regulación de azúcares [12]. El cobre a su vez, está relacionado con varias proteínas (ej. superóxido dismutasa y citocromo oxidasa), transporta el hierro, participa en la síntesis del tejido conjuntivo, en el metabolismo de los lípidos y tiene propiedades antioxidantes [13]. El níquel, juega un papel importante en el metabolismo del folato [14]. Finalmente, el cinc es un elemento que está asociado a más de 200 enzimas y proteínas, participando en todos los procesos metabólicos principales [11] y además, afecta a la síntesis de proteínas a través de la expresión genética [13].

El análisis de componentes principales (ACP) se ha aplicado como técnica de visualización, utilizando como descriptores químicos, concentraciones de elementos totales, la abundancia relativa de metalobiomoléculas en las muestras de piñones analizadas por SEC-ICP-MS o una combinación de ambos. De la misma manera, también se ha utilizado el Mn como único descriptor químico al ser el elemento más abundante en estos frutos secos [15].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Las disoluciones de Mn, Cu, Ni y Zn se prepararon a partir de una disolución primaria multielemental (1000 mg l⁻¹ en 1 M HNO₃) suministrada por Merck (Darmstadt, Alemania). Para la mineralización de las muestras se utilizaron ácido clorhídrico (37%), ácido nítrico (65%) y ácido perclórico (70-72 %) de grado Suprapur® (Merck). La fase móvil utilizada en la SEC se preparó diariamente a partir de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y clorhidrato de Tris (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en concentración formal 0,05 M (pH = 8). Durante todo el análisis se utilizó agua ultrapura (18 MΩ·cm) obtenida mediante un sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Watford, UK). Para la sintonía del ICP-MS se utilizó una disolución de Li, Y, Tl y Ce a 10 ppb en ácido nítrico al 2 %.

El cloroformo y metanol (ROMIL-SpS) utilizados como extractantes, fueron adquiridos en Teknokroma (Barcelona, España).

Para la calibración de las columnas de exclusión de tamaño, se utilizaron los siguientes estándares de peso molecular conocido: para la columna Hiload 26/60 Superdex 30 Prep, se empleó, Albúmina (67 kDa), Metalotioneína I (7 kDa), Gastrina I (2126 Da), Vitamina B₁₂ (1352 Da) y hexaglicina (360 Da), y para la Hiload 26/60 Superdex 75

Prep, Albúmina de suero bovino (67kDa), Ovolalbumina (43 kDa), Quimotripsinógeno A (25 kDa), Ribonucleasa A (13,7 kDa) y Azul de Dextrano 2000 (2000 kDa). Los estándares de calibración fueron suministrados por Amersham Biosciences, (Uppsala, Suecia). Las disoluciones de estos estándares se prepararon de forma separada a concentraciones en un rango de 400 - 520 mg L⁻¹ disueltos en TRIS, y se inyectaron dos mililitros en el sistema cromatográfico SEC. Estas disoluciones son estables durante un máximo de tres meses a 4 °C.

2.2 MUESTRAS

Las muestras de piñones (*Pinus pinea*) se obtuvieron de diferentes zonas forestales que constituyen las áreas de mayor producción de España y Portugal. Se analizaron 24 muestras, 3 de cada una de las siguientes localizaciones (códigos entre paréntesis): Huelva (Hu) y Cádiz (Cad) (suroeste), Castilla (Cas), Madrid (Ma) (centro), Badajoz (Ba) (centro-oeste) y Cataluña (Cat) (noreste). Las muestras de Portugal corresponden a zonas de sur, Faro (Fa), y del centro-norte, Coimbra (Co). Todas estas muestras fueron suministradas por Frutos Secos Puig, S.A. (Tarragona, España).

En una aproximación inicial, se analizó mediante SEC-UV y SEC-ICP-MS una muestra de cada provincia: Huelva (Hu) y Cádiz (Cad) (suroeste), Castilla (Cas), Madrid (Ma) (centro), Badajoz (Ba) (centro-oeste) y Cataluña (Cat) (noreste). Posteriormente, para realizar el estudio estadístico el número de muestras se amplió a 24 (descrito en el párrafo anterior).

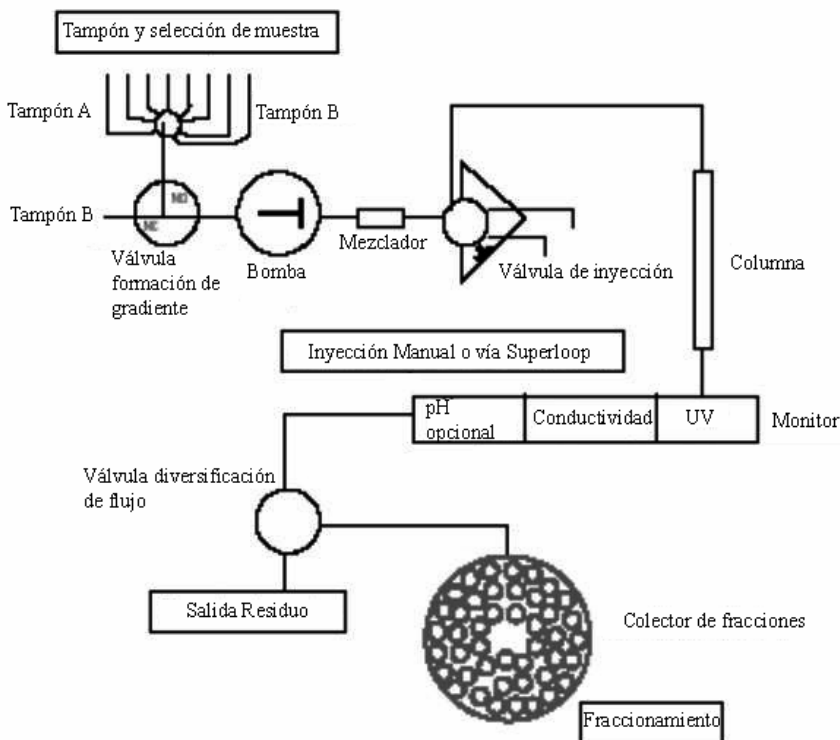
2.3 INSTRUMENTACIÓN

La detección elemental se realizó mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo ICP-MS HP 4500 (Hewlett-Packard, USA). Las medidas se realizaron con un nebulizador estándar «Babington».

La optimización de los diferentes parámetros del ICP-MS: posición de la antorcha, caudal del gas de nebulización, potencia de radiofrecuencia, tensión de las lentes iónicas, se realizó cada día introduciendo una disolución de 10 ppb de Li, Y, Ce y Tl, en 2 % de ácido nítrico. Tras la optimización de los parámetros se comprobó la calibración de las masas, la resolución espectral y los porcentajes de óxidos e iones doblemente cargados, que en todos los casos fueron inferiores al 1 y 2 % , respectivamente.

Para el desarrollo de la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), se utilizó un cromatógrafo líquido de baja presión (AKTA-Prime system, Amersham Biosciences). El sistema AKTA-Prime, está equipado con un colector de fracciones, válvula de inyección y detector ultravioleta visible (280 nm), Fig.1. La adquisición y tratamiento de datos se realizó con el programa del equipo (Primeview 5.0, Amersham Biosciences).

Figura 1 Esquema del sistema cromatográfico Akta-prime

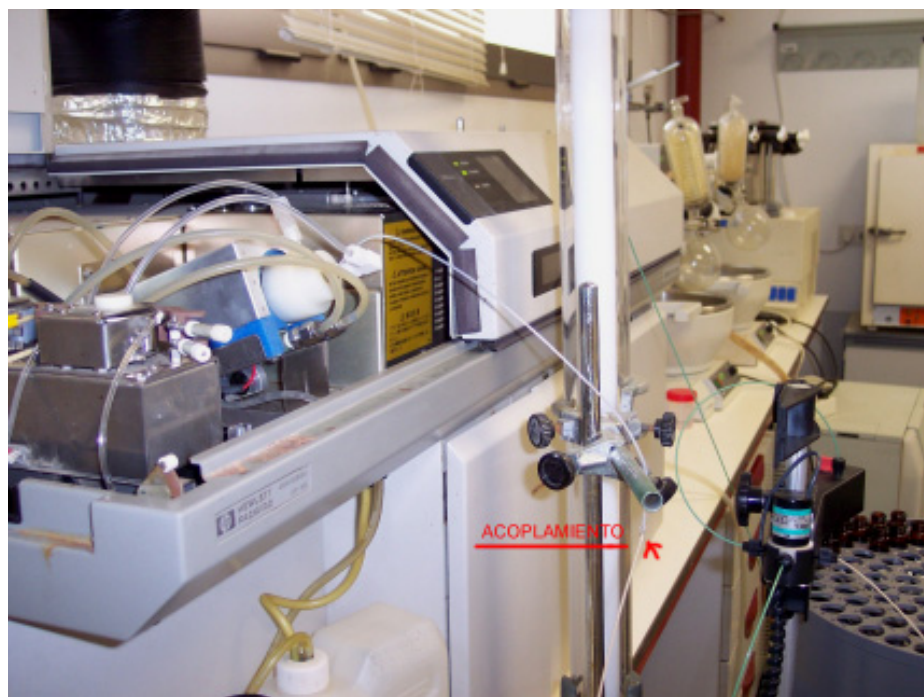
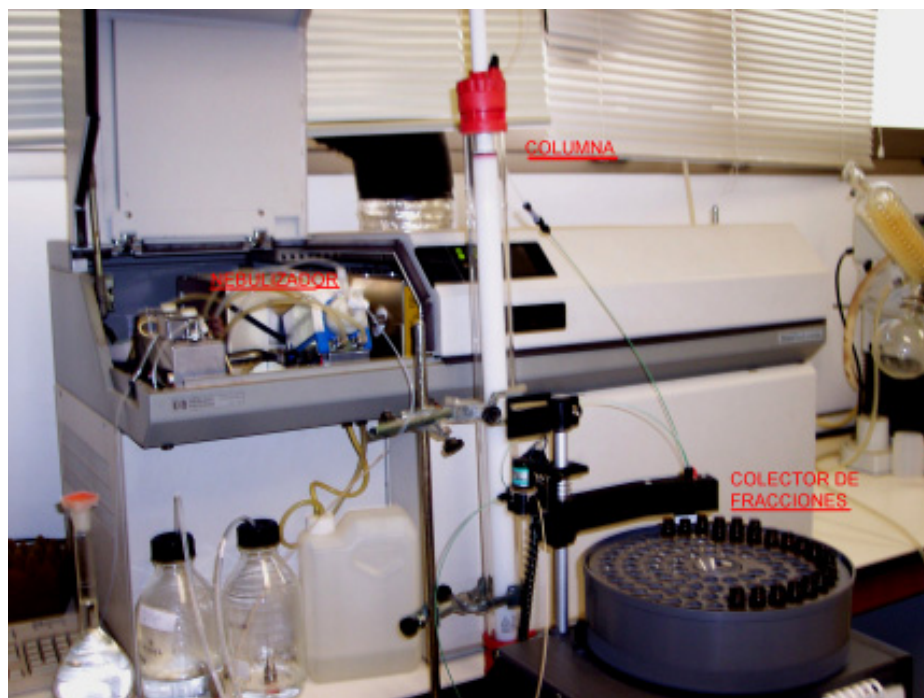


Para la separación cromatográfica mediante exclusión de tamaño se utilizaron dos columnas, Hiloal 26/60 Superdex 30 Prep para un rango de masas <10 kDa (moléculas de bajo peso molecular), y Superdex 75 Prep para un rango de masas de 3-70 kDa (moléculas de peso molecular intermedio). Ambas columnas fueron suministradas por Amersham Biosciences, (Uppsala, Suecia). Estas columnas tienen carácter semi-preparativo, diseñadas para la separación cromatográfica por exclusión de tamaño, utilizando un gel o tamiz molecular. La fase estacionaria consta de moléculas de dextrano unidas covalentemente sobre agarosa fuertemente enlazada.

Para el acoplamiento SEC-UV-ICP-MS, la salida de la columna fue conectada a la entrada del nebulizador del ICP-MS, usando un tubo de PEEK de 0,25 mm de diámetro interno Fig.2

Para acelerar la separación en el proceso de extracción de compuestos se utilizaron, una centrífuga (Sigma modelo 4-10, España) y un agitador orbital de 105 rpm (Heidolph Unimax 1010, Alemania).

Figura 2 Fotografía del acoplamiento real, SEC-UV-ICP-MS



2.4 PROCEDIMIENTOS

2.4.1. *Presencia de metales en los piñones*

La presencia de metales totales en las muestras, se realizó tras disolver las muestras con ácido nítrico.

Inicialmente, se eliminaron los lípidos (para evitar posibles problemas de interferencias de matriz) partiendo de 5 g de muestra previamente liofilizada, mediante extracción con 25 ml de cloroformo/metanol (2:1) durante 30 min en un agitador orbital. Tras la extracción, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min obteniéndose una fase orgánica que se desechó y conservando un residuo que se secó a temperatura ambiente. Las muestras sin lípidos se pesaron exactamente (0,2000 g) en reactores de PTFE. La disolución de las muestras se realizó en estos reactores mediante adición de 10 ml de ácido nítrico (65%) utilizando un microondas convencional. El programa de potencia del microondas utilizó tres pasos: calentamiento a 800 W (3 min), 400 W (3 min) y 100 W (3 min). Entre cada etapa los reactores se dejaron en reposo durante 10 minutos para evitar sobrepresión. La disolución obtenida, se filtró antes de su análisis por ICP-MS a través de filtros de acetato de celulosa de 0,20 μm . Las condiciones de medidas están indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1 *Condiciones de trabajo utilizadas en el ICP-MS*

2.4.2. Tratamiento de muestra para la obtención de perfiles mediante SEC-UV-ICP-MS

Las muestras liofilizadas (sin lípidos) se pesaron exactamente (0.2000 g) en tubos de centrifuga PTFE. La extracción de las especies elementales a partir de estas muestras, se realizó mediante extracción con 4 ml de 0,1 M de hidróxido de sodio, seguida de centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos, después de homogeneizarse durante 10 minutos en un agitador orbital. Se inyectan dos mililitros de extracto en el sistema SEC-UV-ICP-MS utilizando las condiciones experimentales que se detallan en los siguientes apartados.

2.4.3. Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC-UV/ICP-MS)

2.4.3.1. Condiciones experimentales

Para obtener el perfil cromatográfico de los extractos anteriores se estudiaron dos columnas que se seleccionaron por su carácter complementario en el rango de exclusión de tamaños que discriminan:

Superdex 30 Prep, columna de alta resolución con diámetro de 26 mm y longitud de 60 cm, siendo su volumen de 320 ml. El rango efectivo de separación es <10 kDa. Es excelente para separar péptidos, proteínas de bajo peso molecular y polisacáridos.

- Superdex 75 Prep, con un límite de exclusión de 100 kDa y un rango efectivo de separación entre 0,3 y 70 kDa. Presenta buenas propiedades para separar proteínas y péptidos.

La fase móvil para estas separaciones cromatográficas se preparó diariamente a partir de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y clorhidrato de Tris (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en concentración formal 0,05 M (pH=8). Las condiciones cromatográficas se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2 Condiciones de trabajo, para el sistema cromatográfico por exclusión de tamaño (SEC)

CONDICIONES SEC	
Columnas	Hiload 26/60 Superdex 30 Prep; Hiload 26/60 Superdex 75 Prep
Rango de resolución	Mr < 10 000 Da; 3000-70 000Da
Fase móvil	Tris 50 mmol L ⁻¹ (pH 8,0)
Flujo	2 ml min ⁻¹
Volumen de inyección	2 ml
Longitud de onda UV-visible	280 nm

Las condiciones de medida del ICP-MS fueron las mismas que las descritas en la Tabla 1.

2.4.3.2. Calibración de las columnas de exclusión de tamaño

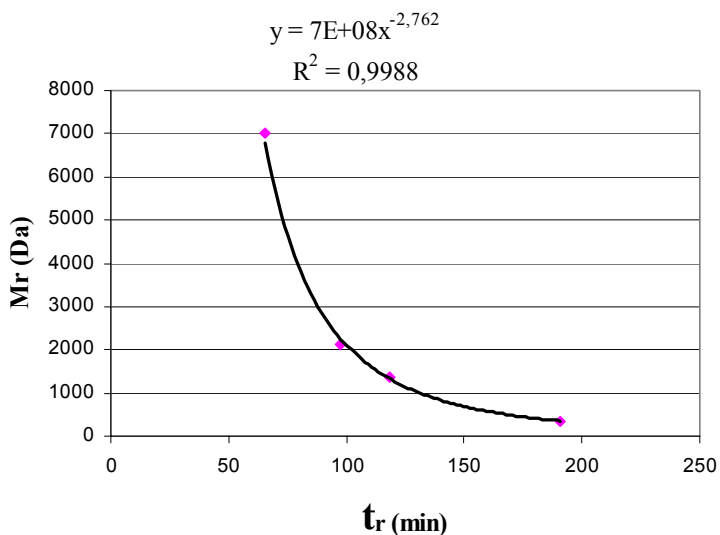
El peso molecular en estas columnas se estima a partir de los datos de la filtración molecular, es decir a partir de los tiempos de retención o volúmenes de elución. Esto sólo es posible hacerlo si previamente se calibran las columnas utilizando moléculas con peso molecular y características físico-químicas similares a las proteínas, péptidos y otros compuestos presentes en las muestras.

Los resultados obtenidos para los estándares utilizados en la calibración pueden extrapolarse a las muestras reales y de esta forma conocer la masa de las moléculas unidas a los elementos estudiados.

- *Hiload Superdex 30 Prep 26/60:*

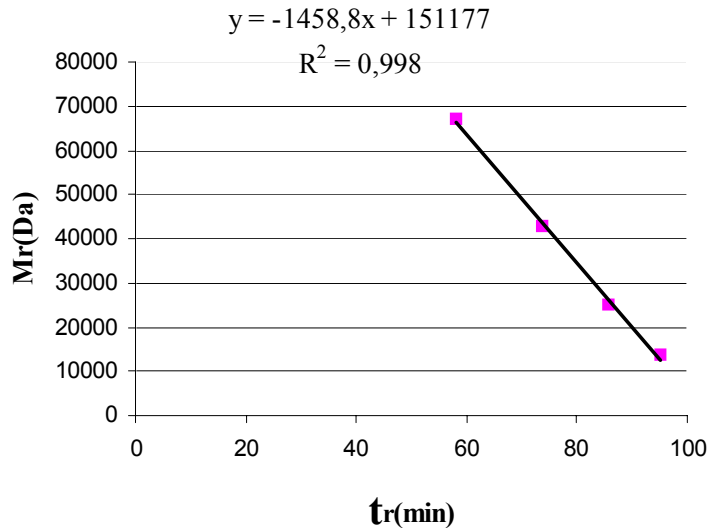
Para la calibración se utilizó la siguiente mezcla de patrones: Albúmina (67 kDa), Metalotioneína I (7 kDa), Gastrina I (2126 Da), Vitamina B₁₂ (1352 Da) y hexaglicina (360 Da). El tiempo muerto (t_0) se determinó con la Albúmina. La curva de calibrado se obtuvo, representando la masa molecular (Da) frente al tiempo de retención de los compuestos estudiados, los resultados se muestran en la Figura 3.

Figura 3 Calibrado de la columna LMW (bajo peso molecular) Superdex 30



- *Hiload Superdex 75 Prep 26/60:*

Los calibrantes utilizados fueron: albúmina de suero bovino (67kDa), ovalalbumina (43 kDa), quimotripsinógeno A (25 kDa) y ribonucleasa A (13,7 kDa). El tiempo muerto (t_0) se determinó con Azul de Dextrano 2000 (2000 kDa). La Figura 4 muestra la curva de calibrado obtenida, así como la ecuación de la recta.

Figura 4 Calibrado de la columna HMW (alto peso molecular) Superdex 75

2.4.3.3. Control de calidad de los análisis

Para evitar problemas relacionados con contaminaciones, pérdidas, estabilidad de las especies durante el análisis así como dificultades de identificación, se tuvo en cuenta lo siguiente:

- El empleo de materiales metálicos (acero inoxidable) como espátulas, jeringuillas de inyección y agujas, se evitó en todo momento ya que su uso aumenta el ruido de la señal y causa problemas de contaminación. Todos los componentes utilizados se lavaron previamente con ácido nítrico al 10 % (v/v) y posteriormente con agua ultra pura (Milli-Q).
- La columna debe limpiarse correctamente, para prevenir la adsorción de proteínas sobre la fase estacionaria debido a interacciones hidrófobas, así como a problemas de contaminación por metales [15]. Para ello, entre cada dos inyecciones consecutivas, se introduce en la columna una disolución 0,002 M de EDTA eluyendo con dos volúmenes de columna. Este lavado con agente complejante elimina los metales que hayan quedado retenidos en la matriz después del análisis.

Seguidamente, se inyectó una disolución 0,5 M de NaOH, eluyendo con medio volumen de columna, para evitar problemas de efecto memoria causados por la adsorción de proteínas. Tras esta etapa de limpieza, las columnas se equilibraron con al menos dos volúmenes de columna de fase móvil hasta que la línea de fondo del detector UV-visible se estabiliza completamente.

- Para una limpieza más exhaustiva, las columnas se lavaron con cuatro volúmenes de columna de una disolución de NaOH 1 M (eliminación de proteínas hidrófobas y lipoproteínas, retenidas en la matriz) seguido de cuatro volúmenes de columna de agua Milli-Q. Finalmente, se utilizó medio volumen de columna de alcohol isopropílico al 30 % (v/v) que elimina lípidos y proteínas muy hidrofóbicas seguido de dos volúmenes de columna de agua Milli-Q.

2.4.4 Tratamiento de datos

El estudio estadístico se realizó con ayuda del programa STATISTICA versión 6.0 (2001) (StatSoft, Tulsa, EE. UU). El análisis de componentes principales se aplicó para evaluar la procedencia de muestras de piñones de diferentes áreas de producción.

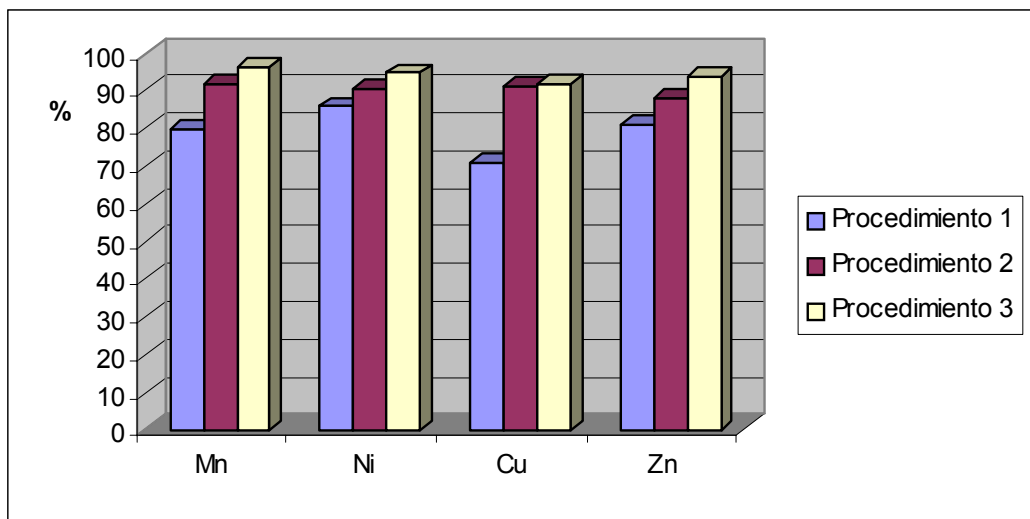
3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METALES EN MUESTRAS DE PIÑONES

Para la disolución con ácidos de las muestras de piñones se estudiaron tres procedimientos. Las recuperaciones se calcularon fortificando las muestras con 1000 $\mu\text{g l}^{-1}$ de cada elemento debido a que no existen materiales de referencia de este tipo de fruto. Para el primer método se han tenido en cuenta estudios previos relacionados con el análisis de metales en miel [16] y muestras de plantas [17], empleándose una digestión húmeda con dos etapas. En la primera etapa se tratan 0,2000 g de muestras con ácido nítrico concentrado en reactores abiertos de PTFE hasta casi sequedad, y posteriormente

con una mezcla 2:1 ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$). El inconveniente de este procedimiento es el tiempo de análisis y las bajas recuperaciones finales, como puede observarse en la Fig.5. Los otros dos procedimientos se aplicaron en reactores cerrados y digestión con microondas. Uno de ellos utiliza un ataque sucesivo con ácido nítrico y perclórico concentrado empleando un programa de potencia del microondas con dos pasos: (i) calentamiento a 70 W (10 min) con 5 mL de ácido nítrico y (ii) empleo de una segunda etapa de ataque a 70 W (5 min) con 1 ml de ácido perclórico. Después de cada tratamiento los reactores se enfriaron durante 10 minutos añadiendo 5 mL de agua Milli-Q. Este procedimiento se ha descrito previamente para el análisis de elementos en hojas de té [18] y permite recuperaciones en torno al 80-91 %. El tercer procedimiento se ha optimizado en el presente estudio para el tipo de muestras considerado. Para ello se tratan las muestras con ácido nítrico empleando un microondas convencional (sección 2.4.3.). Las recuperaciones obtenidas fueron las más altas, del 91-96 %. Además, con este procedimiento se reduce el tiempo de análisis (de 24 h a 29 minutos) en comparación con el primer procedimiento descrito. La Figura 5, muestra los % de recuperación de los tres procedimientos estudiados.

Figura 5 Representación grafica del % de recuperación obtenido en los tres procedimientos estudiados para el análisis elemental.



Los LDs y LQs del procedimiento de análisis se muestran en la Tabla 3 junto con las concentraciones de elementos en las muestras analizadas. La calibración externa se realizó para evaluar las características analíticas del método para cada elemento. Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LQ) se calcularon según el criterio de Miller & Miller [19], que establece como límite de detección (LD) a $+ 3 S_{y/x}$, y como límite de cuantificación a $+ 10 S_{y/x}$, donde «a» es la ordenada en el origen de la recta de calibrado y « $S_{y/x}$ » el parámetro que mide la incertidumbre en la recta de regresión. Tras reordenar las ecuaciones, se calcularon XLD y XLC sustituyendo los valores obtenidos anteriormente.

3.2. CONCENTRACIONES DE ELEMENTOS EN LAS MUESTRAS DE PIÑONES

Se analizó el contenido de elementos en veinticuatro muestras de piñones, tres de cada una de los diferentes orígenes geográficos seleccionados (Huelva, Cádiz, Castilla, Faro, Madrid, Badajoz, Cataluña y Coimbra), Tabla 3

Generalmente, todos los elementos tienen concentraciones mayores en piñones procedentes de Faro, y la situación contraria se da en Cataluña.

La variabilidad en la concentración de algunos elementos es muy marcada (Tabla 3), sobre todo para el manganeso que es el más abundante. Este elemento tiene concentraciones desde $25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña) a $559 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro). El cinc también tiene una presencia marcada, desde $26 \mu\text{g g}^{-1}$ en Cataluña a $113 \mu\text{g g}^{-1}$ en Faro. El análisis de la varianza de un factor (ANOVA) muestra que la media de los triplicados son significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre los resultados obtenidos.

Tabla 3 Concentración total de elementos * ($\mu\text{g g}^{-1}$) en muestras de piñones (*Pinus pinea*)

Code	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Hu1	500±21	9,2±0,8	41±10	107±19
Hu2	512±23	11±1	39±11	106±17
Hu3	513±26	10,7±0,4	35±4	105±30
Co1	65±6	4,5±0,2	31±6	86±17
Co2	64±9	3,5±0,3	29±2	85±10
Co3	67±10	4,72±0,06	30±5	90±18
Cat1	26±7	2,1±0,3	8±1	25±9
Cat2	28±5	3,05±0,02	8±2	30±12
Cat3	25±4	2,6±0,2	8±1	26±10
Ba1	458±23	8±2	35±9	94±20
Ba2	498±20	7±1	30±10	93±10
Ba3	399±12	9±1	36±8	102±24
Ma1	87±6	7,1±0,2	34±12	97±8
Ma2	90±9	8±1	33±15	100±16
Ma3	88±10	7,8±0,5	34±9	98±10
Fa1	559±38	15±5	41±11	113±30
Fa2	523±35	10±4	38±16	109±20
Fa3	450±17	13±3	40±6	111±28
Cas1	72±9	6,8±0,2	35±9	104±24
Cas2	70±9	8±2	34±20	101±19
Cas3	73±8	6,5±0,7	33±9	104±22
Cad1	414±15	11±1	38±10	101±19
Cad2	398±11	10±1	37±18	100±47
Cad3	400±13	14±2	39±16	106±38
LD	0,023	0,032	0,018	0,037
LQ	0,077	0,107	0,062	0,123

* Media de tres réplicas \pm S.D. (desviación estándar); LD, límite de detección y LQ, límite de cuantificación

3.3. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS MEDIANTE SEC-UV-ICP-MS

Generalmente, las condiciones descritas en la bibliografía para la extracción de elementos unidos a biomoléculas en matrices vegetales se basan en el empleo de NaOH, HCl [20] o agua caliente a 60 °C [21]. El empleo de disoluciones acuosas con carácter básico (NaOH) permite la extracción de compuestos de alto y bajo peso molecular [20, 22, 23], con altos valores de recuperación. Por otra parte, las disoluciones de HCl extraen principalmente los compuestos de bajo peso molecular, debido a la poca solubilidad de las especies protonadas, como las proteínas, en este extractante. Por tanto, se seleccionó el empleo de disoluciones de NaOH como extractante para llevar a cabo este estudio.

Uno de los parámetros más importantes de la cromatografía de exclusión de tamaño es el tampón utilizado para fijar el pH de la fase móvil. La elección del tampón está basada en su capacidad para disolver la muestra, así como en su compatibilidad con la fase estacionaria y en su eficacia para reducir o eliminar las interacciones de la muestra con la fase estacionaria. En la práctica la utilización de un tampón con una fuerza iónica relativamente elevada evita posibles interacciones con el relleno de la columna.

El Tris(hidroximetil)aminometano es uno de los reactivos recomendados en cromatografía de exclusión de tamaño para llevar a cabo la separación de los compuestos multi-elementales presentes en frutos secos [20]. Este tampón evita cambios estructurales, así como la desnaturalización de las proteínas y la destrucción de complejos proteínas-metal. Cuenta además con una fuerza iónica suficiente para evitar interacciones de la muestra con el empaquetado de la columna. Por otro lado, este eluyente, no contiene elementos que puedan provocar interferencias de iones poliatómicos y es compatible con el detector ICP-MS.

El pH de la fase móvil es otro parámetro importante, es necesario trabajar con valores entre 7-8, próximos al pH del organismo humano para evitar la desnaturalización de proteínas durante el análisis, se recomienda un pH débilmente alcalino para evitar disociaciones de los metales. Teniendo en cuenta todas estas recomendaciones y publicaciones anteriores [20], se ha utilizado el tampón Tris, en concentración 50 mmol L⁻¹ con un pH de 8.0, como fase móvil. En estas condiciones se obtiene una óptima resolución en la separación cromatográfica.

Asimismo, se ha optimizado la longitud de onda del detector UV. Este parámetro se estudió en un rango de longitud de onda de 200 a 500 nm. Se observó que la cantidad de información, es decir sensibilidad y resolución, aportada por el detector era mayor utilizando una longitud de onda de 280 nm.

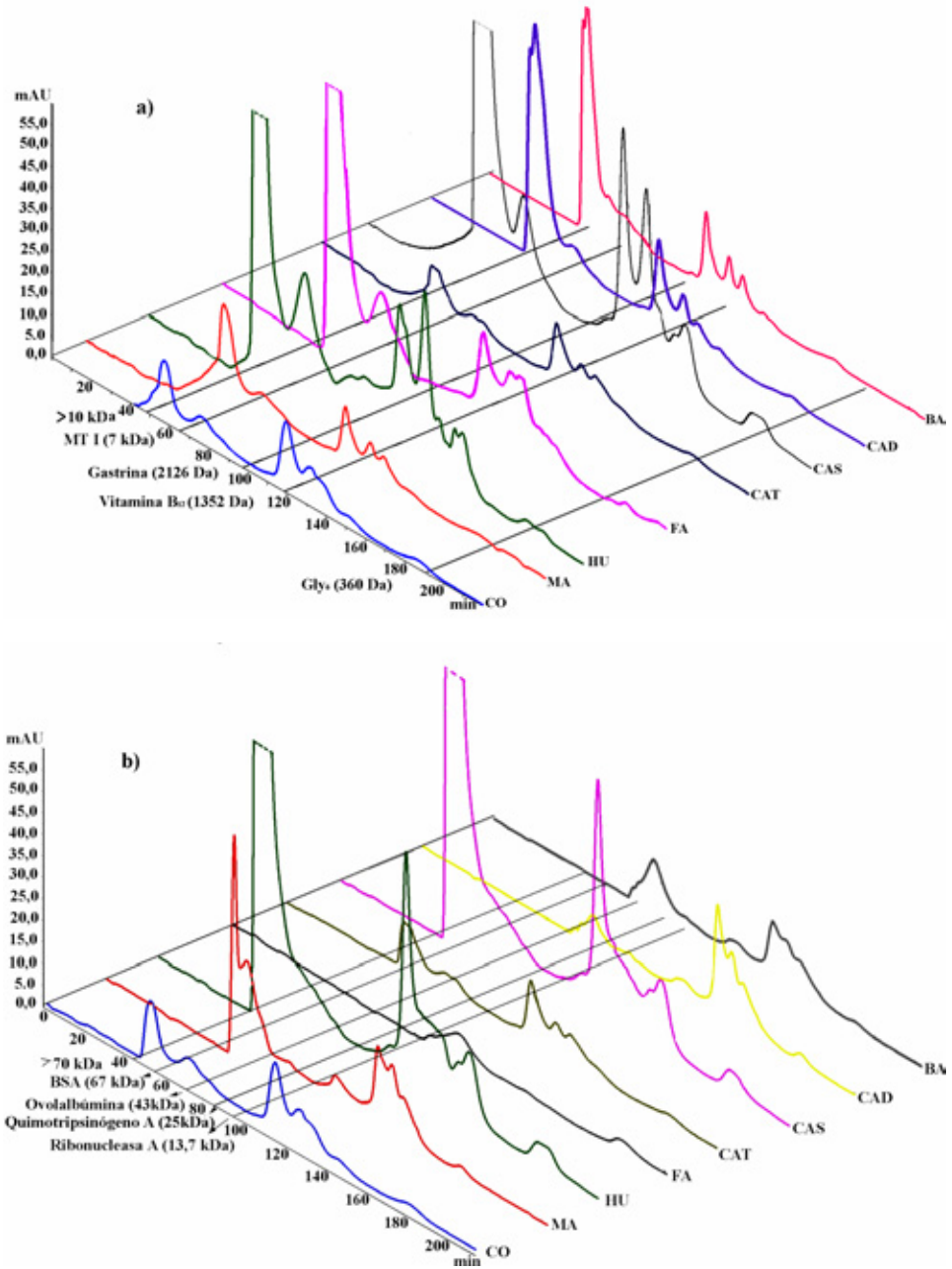
Los perfiles cromatográficos obtenidos a 280 nm para extractos de piñones de distintos orígenes geográficos se muestran en la Figura 6 a (para la columna de bajo peso molecular), y la Figura 6 b (para la columna de alto peso molecular). La combinación de ambas columnas permite una separación de los compuestos, y con ello una buena resolución en todo el rango de masa molecular 360-70.000 Da.

3.4. PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE SEC-UV

3.4.1. Perfiles UV con la columna Superdex 30 (<10 kDa)

El tiempo de análisis requerido para la elución de todos los compuestos es de 4 horas. En ningún caso se obtuvieron tiempos de retención mayores que el de la hexaglicina.

Figura 6 Perfil molecular obtenido mediante SEC-UV (280 nm); (a) utilizando la columna de bajo peso molecular LMW (>10 kDa); (b) utilizando la columna de alto peso molecular HMW (70-3 kDa)



En la Figura 6a, puede observarse que la presencia de compuestos es más reducida en los rangos de 1352-360 Da y 7000-2126 Da. La excepción la presenta la muestra procedente de Huelva en las que en el rango (7000-2126 Da) puede observarse un perfil característico, con dos picos que no aparecen en los cromatogramas de otras muestras. En particular, los piñones procedentes de Huelva y Castilla muestran algunos picos con intensidad baja en el rango de (1352-360 Da).

Por otra parte, los perfiles son muy similares entre las muestras de Coimbra, Madrid y Cataluña en el rango de (2126-1352 Da) y también entre las muestras de Badajoz y Cádiz. Sin embargo, la muestra de Huelva no presentan ningún pico cromatográfico en este rango y en los cromatogramas correspondientes a la muestra procedente de Castilla podemos observar dos picos destacados de elevada intensidad. Finalmente, en todas las muestras (excepto Faro) se observan picos cromatográficos de gran intensidad en la fracción > 7000 Da, que se comentarán con más detalle en el apartado que sigue, debido a la mayor resolución de la columna Superdex 75 en este rango de masas moleculares. Podemos concluir que a pesar de las similitudes encontradas, los perfiles obtenidos mediante SEC-UV en los piñones estudiados están relacionados con su origen geográfico.

3.4.2. Perfiles SEC-UV obtenidos con la columna Superdex 75 (3-70 kDa)

En la Figura 6b, se observan perfiles muy similares en el rango de peso molecular (70-67 kDa), entre las muestras procedentes de Coimbra y Cataluña, Cádiz y Badajoz, y también entre Castilla y Huelva.

Destaca la ausencia de picos cromatográficos en el perfil obtenido en la muestra procedente de Faro, lo cual concuerda con los resultados procedentes de la columna de *Superdex 30* (adecuada para separar especies de bajo peso molecular). En la Figura 6b podemos observar que existen varios picos cromatográficos que diferencian las muestras procedentes de Madrid, Huelva y Castilla. De la misma manera el cromatograma de las

muestra procedentes de Madrid contiene dos pico cromatográficos de elevada intensidad, aproximadamente a 70 kDa y 68 kDa, que distinguen claramente estas muestras del resto. Por otra parte, Huelva y Castilla tienen cromatogramas similares, con un pico cromatográfico aproximadamente a 16 kDa, que también representa una clara diferencia respecto a las restantes muestras. En las muestras de Huelva, Castilla y en menor grado Coimbra, se obtiene baja resolución eluyéndose los compuestos en el volumen muerto (tiempo de retención del Azul Dextrano 2000, 49,7 minutos). Sin embargo, combinando ambas columnas LMW y HMW, es posible obtener una alta resolución en el rango de pesos moleculares en el que se obtienen señales significativas para este tipo de muestras.

3.5. PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LAS MUESTRAS MEDIANTE SEC-ICP-MS

La composición elemental de plantas, frutas, etc., se utiliza frecuentemente para determinar su origen geográfico [3, 4]. Sin embargo, esta aproximación puede resultar insuficiente, y se ha recurrido al uso de información química más completa que permita de manera inequívoca la clasificación de este tipo de muestras. Dentro de este tipo de información puede incluirse la procedente de la caracterización de la especie química de los «heteroelementos» presentes en las muestras que se estudien, esto es, los elementos no vinculados a la composición usual de las moléculas orgánicas, como son los metales, metaloides y no metales. En definitiva los elementos diferentes a C, H, N y O, o sea, la mayor parte de la Tabla Periódica. Esta información, mucho más rica, posee una capacidad de discriminación y clasificación muy superior a la obtenida hasta ahora, en los estudios tradicionales basados en la medida de niveles totales de los diversos elementos. Una forma de abordar este tipo de estudios basados en las especies químicas de los elementos es mediante la obtención de perfiles de metalo-biomoleculares en función de su masa molecular, utilizando como detectores los ya citados UV-visible y atómicos (ICP-MS), y combinando la información que ambos aportan.

La abundancia relativa de los diferentes picos cromatográficos proporciona una información muy valiosa como se verá a lo largo de los apartados que siguen.

En una aproximación inicial, se analizó mediante SEC-UV y SEC-ICP-MS una muestra de cada provincia: Huelva (Hu) y Cádiz (Cad) (suroeste), Castilla (Cas), Madrid (Ma) (centro), Badajoz (Ba) (centro-oeste) y Cataluña (Cat) (noreste).

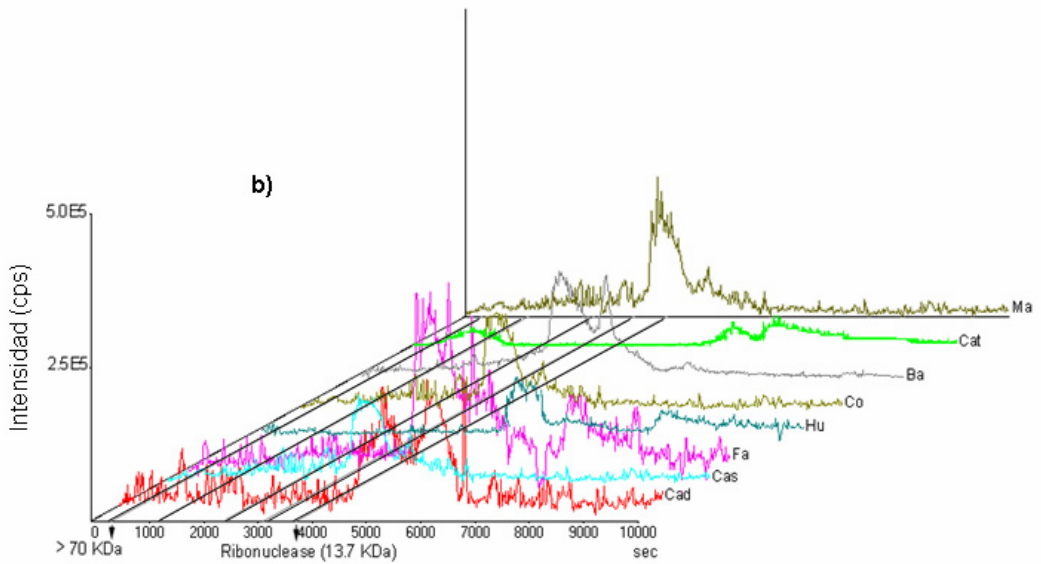
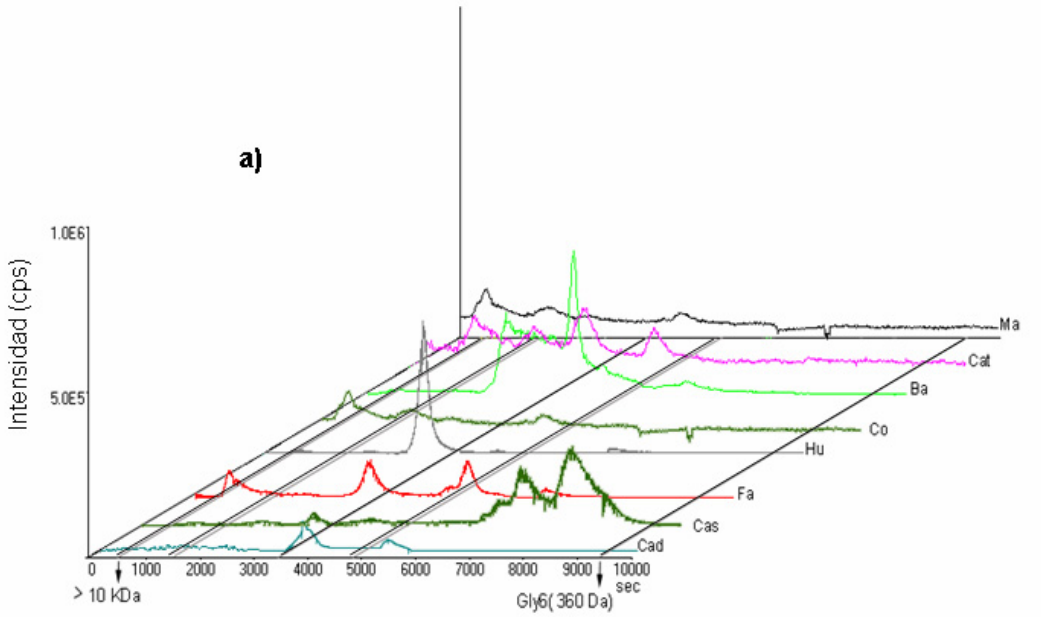
Perfiles elementales (Mn, Cu, Zn y Ni)

Los perfiles elementales se muestran en las Figuras 7-10, a partir de las cuales se pueden establecer las siguientes conclusiones:

Manganeso: La Figura 7a, muestra los perfiles cromatográficos de ^{55}Mn , obtenidos con la columna para especies de bajo peso molecular LMW (<10 kDa). Las muestras procedentes de Cádiz, Cataluña y Madrid no presentan prácticamente picos cromatográficos correspondientes a este elemento. Sin embargo, la situación opuesta se observa en el perfil cromatográfico de la muestra procedente de Huelva, (fracción de 7000 a 2126 Da). En la muestra procedentes de Castilla, el manganeso forma especies de peso molecular en el rango de 1352-360 Da. Finalmente, podemos observar tres picos cromatográficos correspondientes a manganeso en la muestra procedentes de Faro, uno de los cuales es una especie de manganeso de peso molecular > 10 kDa.

La Figura 7b muestra los perfiles cromatográficos de ^{55}Mn , obtenidos con la columna para especies de alto masa molecular, HMW (70-3 kDa). Puede observarse que la intensidad de picos cromatográficos es muy baja. Sin embargo, este elemento permite la discriminación entre muestras, combinando los resultados con los obtenidos con la columna LMW (<10 kDa).

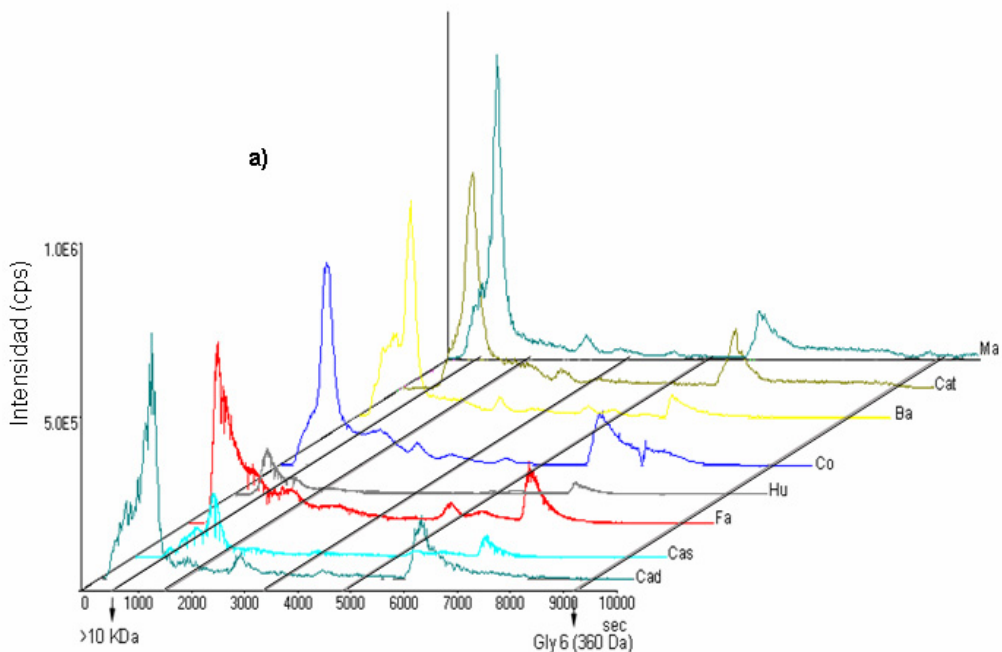
Figura 7 Perfil cromatográfico del ^{55}Mn ; (a) obtenido con la columna LMW (<10 kDa) y (b) columna HMW (70-3 kDa).

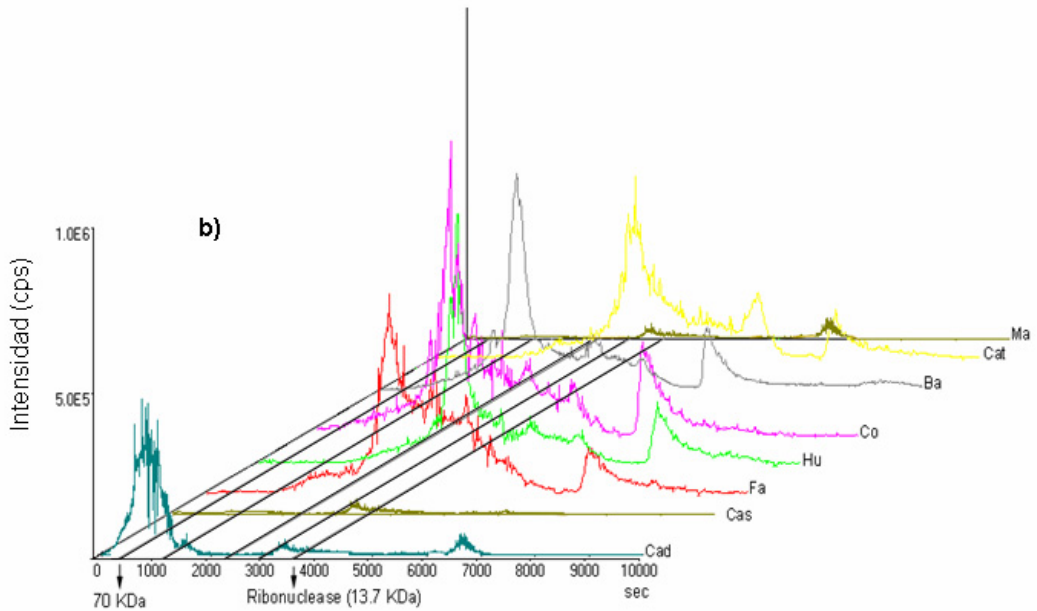


Cobre: Los perfiles cromatográficos de ^{63}Cu (Fig.8a) usando la columna LMW, son muy similares en las muestras estudiadas, con picos cromatográficos de alta intensidad en el volumen muerto. Pueden apreciarse tan sólo ligeras diferencias en los perfiles cromatográficos de las muestras procedentes de Huelva y Castilla, considerando sólo a la intensidad de los picos.

Los resultados más significativos se obtienen con la columna HMW (Fig.8b), en la que se observa que los perfiles cromatográficos del cobre presentan un comportamiento característico. Entre todas las muestras, sólo la de Cádiz presenta una fracción relacionada con el rango de peso molecular >70 kDa. Por esta razón, este elemento puede utilizarse como marcador para distinguir muestras de esta procedencia.

Figura 8: Perfil cromatográfico del ^{63}Cu ; (a) obtenido con la columna LMW (<10 kDa) y (b) columna HMW (70-3 kDa)

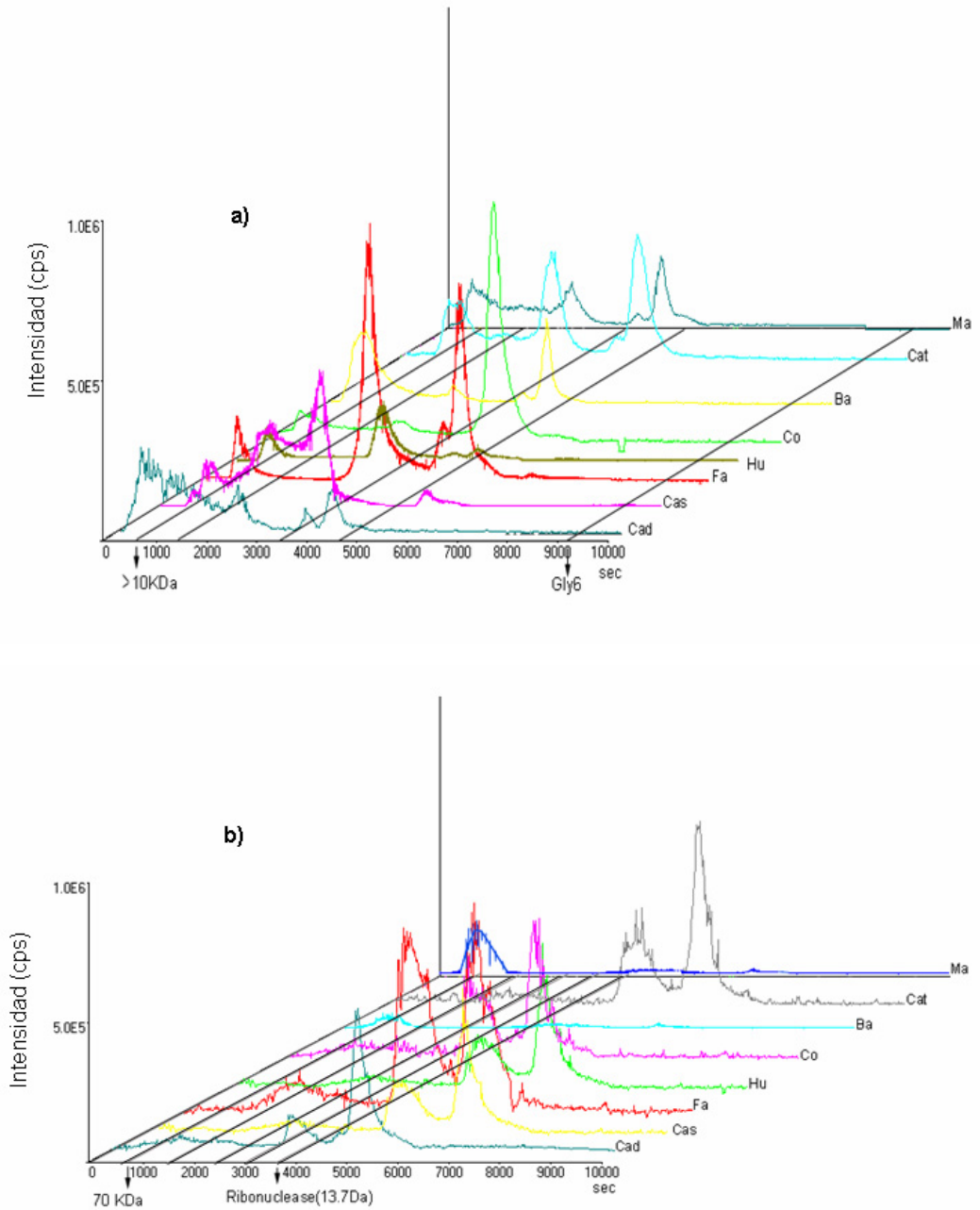




Cinc: El comportamiento de este elemento en la columna LMW, se caracteriza por una presencia limitada en las muestras de piñones procedentes de Cádiz y Madrid, y picos muy importantes en las muestras procedentes de Faro. En estas últimas se observan dos picos cromatográficos correspondientes a especies de cinc de peso molecular próximo a 2.186 Da y 993 Da (Fig.9a). En la muestra procedente de Cataluña se obtiene un perfil cromatográfico para el cinc muy similar al anterior. Por su parte, el perfil cromatográfico de la muestra de Coimbra pone de manifiesto una presencia muy elevada de especies relacionadas con el Zn, aunque inferior a las muestras procedentes de Faro y Cataluña.

Con respecto a la columna HMW, se observa que el ^{66}Zn está asociado a compuestos de peso molecular <10 kDa, donde esta columna no presenta buena resolución. Por esta razón, se consideran únicamente los resultados obtenidos con la columna LMW. No obstante, la muestra procedente de Madrid presenta un perfil cromatográfico característico, destacando un pico prominente de peso molecular aproximado 70 kDa (Fig.9b).

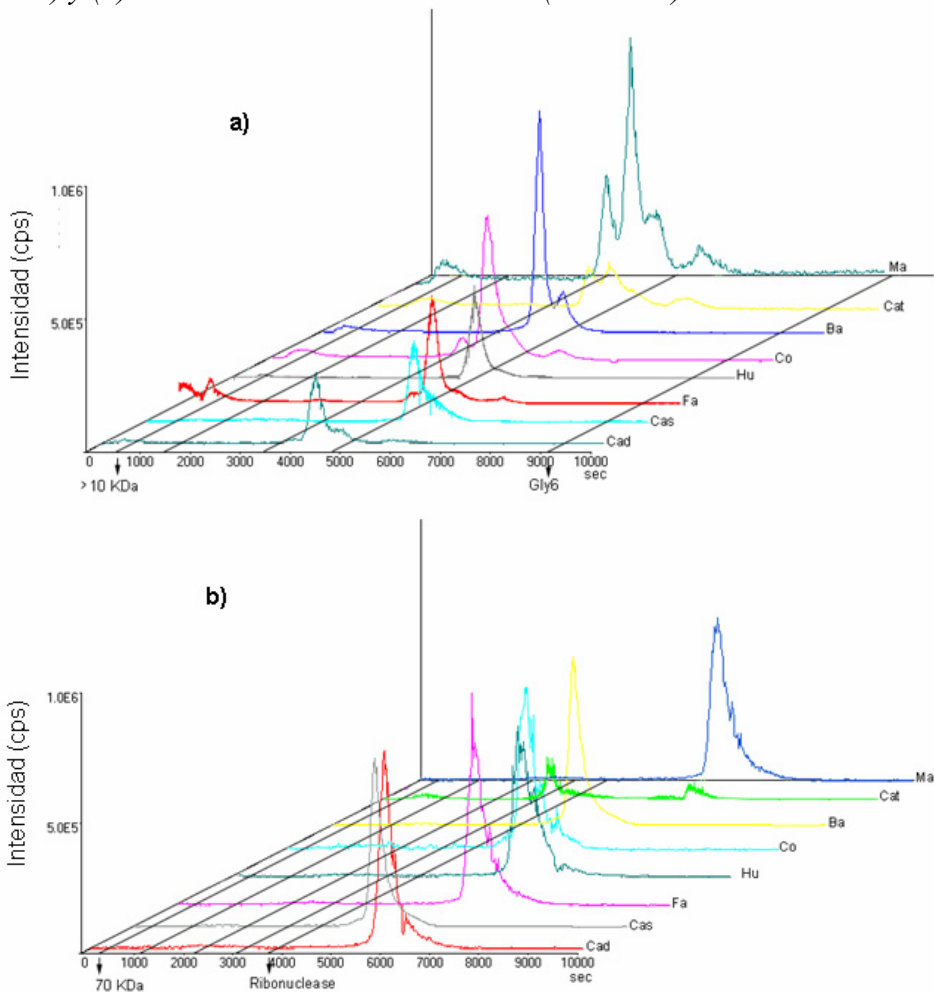
Figura 9: Perfil cromatográfico del ^{66}Zn ; (a) obtenido con la columna LMW (<10 kDa) y (b) columna HMW (70-3 kDa)



Níquel: El ^{58}Ni revela un comportamiento muy similar en todos los piñones analizados, excepto en las muestras de Madrid, dónde se observa claramente la alta abundancia de este elemento (Fig. 10a). El perfil característico de estas muestras con la columna LMW, reflejan la existencia de especies de níquel en torno a 2126-1352 Da.

Los perfiles cromatográficos obtenidos con la columna HMW no aportan mucha información debido a que se observan datos relacionados con moléculas de elevado peso molecular (Fig.10b).

Figura 10: Perfil cromatográfico del ^{58}Ni ; (a) obtenido con la columna LMW (<10 kDa) y (b) obtenido con la columna HMW (70-3 kDa)



3.6. DESCRIPTORES QUÍMICOS PARA DETERMINAR LA PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS. ESTUDIOS ESTADÍSTICOS

En el presente apartado se describen los resultados obtenidos al estudiar la capacidad discriminante de las variables e información obtenidas en los apartados precedentes, con objeto de clasificar las diversas muestras de piñones en función de su origen. En este sentido pueden considerarse varios descriptores químicos, entre los que se pueden enumerar:

- Las concentraciones de elementos
- Las abundancias relativas en los perfiles obtenidos mediante SEC-ICP-MS. La abundancia relativa se calculó como sigue: $100 \times (\text{suma de áreas de pico correspondiente a las especies de un elemento en un rango de peso molecular fijado} / \text{suma de las áreas de pico en todo el cromatograma})$. Se establecieron cinco rangos de peso molecular correspondientes a los patrones de calibración: (i) fracción de peso molecular ≥ 10 kDa (Fracción 1); (ii) fracción de peso molecular en el rango de 10 a 7 kDa (Fracción 2); (iii) fracción entre 7000 y 2126 Da (Fracción 3); (iv) moléculas con masa molecular de 2126 a 1352 Da (Fracción 4); (v) entre 1352 y 360 Da (Fracción 5).
- La concentración de manganeso en las muestras
- Las abundancias relativas de las especies de manganeso en las muestras, calculadas tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

En el estudio estadístico se amplió el número de muestras de forma que se analizaron tres muestras de diferentes zonas dentro de cada provincia (Huelva (Hu) y Cádiz (Cad) (suroeste), Castilla (Cas), Madrid (Ma) (centro), Badajoz (Ba) (centro-oeste) y Cataluña (Cat) (noreste), en total 24 muestras.

Los perfiles cromatográficos de Cu, Zn, Ni y Mn obtenidos mediante SEC-ICP-MS, muestran que las especies químicas de estos elementos más abundantes tienen un peso molecular inferior a 10 kDa. La Tabla 4 muestra la abundancia relativa de cada pico cromatográfico con la columna LMW [24].

3.6.1. ABUNDANCIA RELATIVA DE Mn

La fracción de manganeso más abundante se relaciona generalmente con especies de baja masa molecular, aunque este hecho depende de la localización de la muestra. Un claro ejemplo es la presencia del 90 % de Mn en la fracción de 7 a 10 kDa de las muestras de Coimbra, así como el 80 % de esta fracción de Mn en las muestras de Madrid. Las muestras procedentes de Huelva presentan una abundancia del 100 % de especies de manganeso en el rango de 7 a 2 kDa. Sin embargo, el 75 % de las especies de Mn presentes en las muestras procedentes de Cádiz y el 60 % en las muestras de Badajoz tienen un peso molecular de 2 a 1.5 kDa.

Las fracciones de manganeso de masa molecular más bajo (presentes en el rango 1,3 a 0,3 kDa) sólo se detectan en algunas muestras, como son las procedentes Castilla con el 95 % de abundancia de Mn en este rango de peso molecular. En otros casos (Faro y Cataluña) este elemento se distribuye entre las diferentes fracciones, sin una tendencia evidente (Tabla 4).

3.6.2. ABUNDANCIAS RELATIVAS DE Cu, Ni Y Zn

Para otros elementos (Cu, Ni, Zn) existen varias tendencias: (i) Hay un porcentaje bajo de estos elementos en el volumen muerto de la columna Superdex 30 (fracción molecular > 10 kDa, con el 20 % y el 30 % de Zn en las muestras de Cádiz y Badajoz, respectivamente); (ii) algunas fracciones son más abundantes dependiendo del tipo de elemento, así, el Cu en la fracción de 10 a 7 kDa, desde el 95 % (Huelva) al 50 % (Cataluña). El Ni en la fracción de 2 a 1,3 kDa tiene una abundancia del 99 % (Cádiz) al

90 % (Faro, Coimbra, Badajoz, Cataluña), y el Zn en el rango de 7 a 2 kDa destaca sobre todo en las muestras de Castilla (el 95 %), Huelva (el 80 %), Cataluña (el 60 %) y Faro (el 50 %); y por último (iii) las muestras de Castilla, son las únicas que presentan abundancia significativa en las fracción de menor masa molecular, 1,3 a 0,3 kDa: con el 95 % de Mn y el 100 % de Ni.

Tabla 4 Distribución molecular de Mn, Cu, Ni y Zn, en muestra de piñones (media n=5) de diferentes áreas

Muestra de piñones Número de fracción ^a	Mn Area (%)					Cu Area (%)					Ni Area (%)					Zn Area (%)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cad	-	-	-	75	25	7	70	2,5	0,5	20	0,3	-	-	99	0,7	20	50	10	15	-
Cas	-	-	5	-	95	-	90	-	-	10	-	-	-	100	-	4	95	1	-	-
Fa	-	30	30	5	35	10	70	10	2	8	5	-	-	90	5	-	7	50	40	3
Hu	-	-	100	-	-	-	95	-	-	5	-	-	-	97	3	7	10	80	3	-
Co	-	90	7	2	-	4	60	14	2	20	2,5	2,5	-	90	5	3	-	2	95	-
Ba	-	-	40	60	-	10	70	10	2	8	-	3	-	90	7	30	20	5	45	-
Cat	-	35	40	25	-	-	50	20	5	35	-	2	-	90	7	-	20	60	15	5
Ma	-	80	10	10	-	-	80	5	-	15	-	2	5	90	3	10	30	30	30	-

^a1= Fracción 1 (> 10 kDa); 2= Fracción 2 (10-7 kDa); 3= Fracción 3 (7000-2126 Da); 4= fracción 4 (2126-1352 Da); 5= Fracción 5 (1352-360 Da)

3.6.3 Análisis Estadístico (Análisis de Componentes Principales -ACP)

La variabilidad observada en el contenido de elementos totales, y los perfiles de cada elemento obtenido por exclusión de tamaño en piñones de diferentes zonas forestales (Tablas 3 y 4), pueden utilizarse como descriptores químicos, para establecer diferencias entre estas muestras y garantizar valores de calidad e incluso autenticidad. El tratamiento estadístico de estos datos se ha realizado mediante Análisis de Componentes Principales (ACP), herramienta estadística que permite la clasificación de las muestras estudiadas.

Los datos se integran por casos (muestras de diferentes áreas geográficas) y variables (concentración de elementos o abundancia relativa) recogidos en las Tablas 3 y 4. Se consideraron los siguientes aspectos:

- **Concentración de elementos:** Cuando el ACP se aplica teniendo en cuenta la concentración de los elementos totales (Tabla 3), se obtienen dos componentes principales, PC1 que explica el 60.02 % de la varianza total y PC2 que explica el 15,20 %. Los dos primeros componentes principales representan, por tanto, el 75,22 % de la varianza total y por tanto se consideran suficientes para representar todos los datos. En la Figura 11 se representan las muestras en el espacio definido por los dos componentes principales. Este gráfico revela que no hay el mismo número de clases que de grupos. En este sentido, sólo se consigue diferenciar las muestras procedentes de Cataluña (Cat), que quedan situadas en el gráfico claramente alejadas del resto, sin presentar ninguna tendencia de agrupación con ellas. Las muestras procedentes de Castilla (Cas), Coimbra (Co) y Madrid (Ma) están en el mismo grupo, separado de otro en el que se incluyen las muestras de Huelva (Hu), Badajoz (Ba) y Faro (Fa).

Como indica la Tabla 5, la variable dominante en el PC1 es el Mn. Todas las variables aparecen con valores negativos en PC1, lo que implica que aportan el mismo tipo de información. En PC2 la variable dominante es Zn, seguida por Mn y Cu. En PC2, las variables Mn y Ni aparecen con valores negativos, mientras que Cu y Zn con valores positivos.

Figura 11 Análisis de componentes principales (ACP), considerando la concentración de elementos como variables

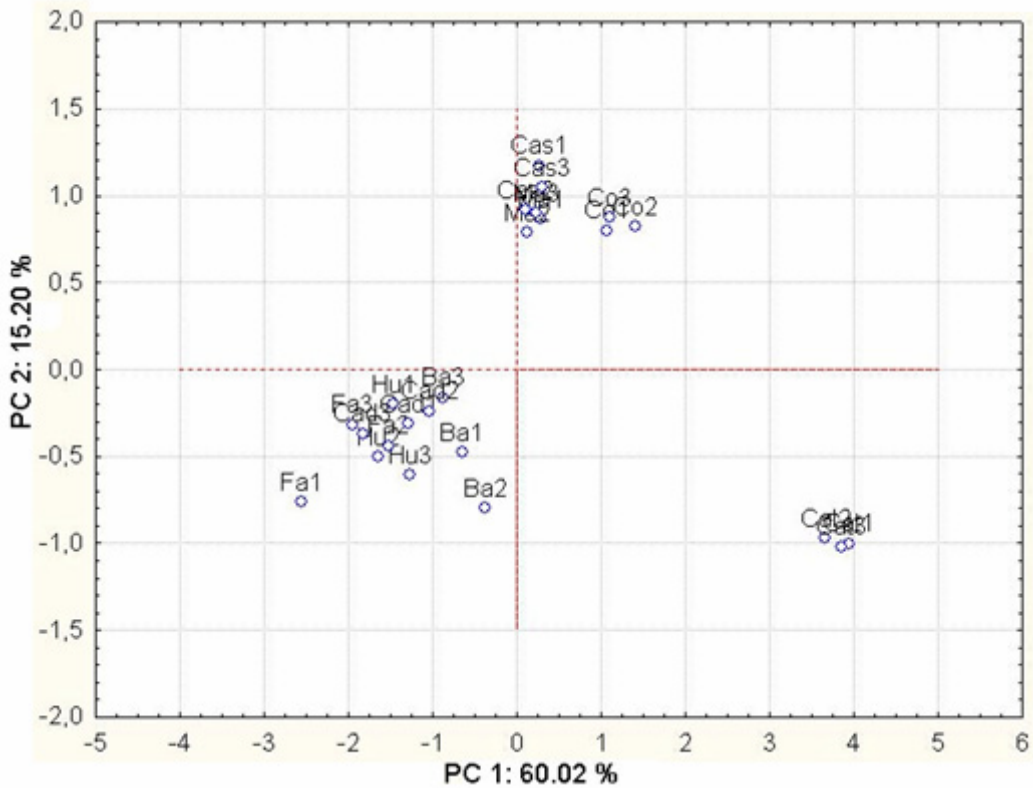


Tabla 5 Cargas de los dos componentes principales, considerando como variable la concentración de elementos

Variable	PC 1	PC 2
Mn	-0,752283	-0,4077
Ni	-0,511151	-0,2885
Cu	-0,524581	0,4027
Zn	-0,508900	0,5036

- **Concentración de metales totales y abundancias relativas en los perfiles obtenidos por SEC-ICP-MS:** El mismo análisis estadístico (ACP) se aplicó utilizando esta vez como descriptores químicos ambas variables, el contenido metálico total (Tabla

3) y la distribución obtenida por SEC-ICP-MS (Tabla 4). En este caso PC1 explica el 80,73 % de la varianza y PC2 hasta el 15,20 %. Ambos componentes representan el 95,93 % de la varianza total, porcentaje mucho mayor que en el caso anterior (Fig. 11). El gráfico obtenido permite reconocer claramente las muestras de acuerdo con su área geográfica (Fig. 12). Las coordenadas de las nuevas variables se muestran en la Tabla 6. La variable más importante para PC1, es la fracción de Mn en el rango de masa molecular de 10 a 7 kDa, seguida de Ni (2126-1352 Da), y muy próximo a la fracción de Mn en el rango (2126-1352 Da). En PC2 las variables más significativas son las fracciones Zn (7000 - 2126 Da) y (> 10000 Da), presentando valores positivos y negativos lo cual indica que aportan distinto tipo de información.

Figura 12 Análisis de componentes principales (ACP), considerando como variables la concentración de elementos y el perfil metalomolecular

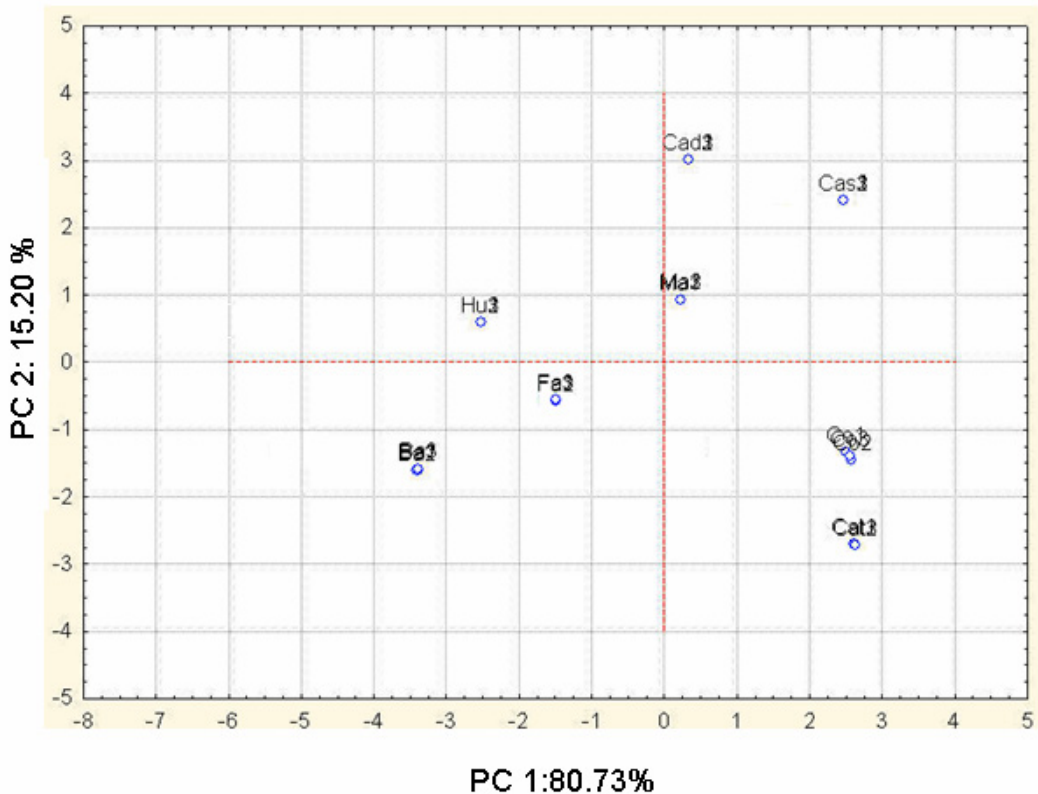


Tabla 6: Cargas de las dos componentes principales, considerando como variables manifiestas la concentración de elementos y el perfil metalomolecular (Mn, Cu, Ni y Zn).

Variable	PC 1	PC 2
Mn	-0,546528	0,278990
Ni	-0,253440	0,212282
Cu	-0,304001	0,176694
Zn	-0,311537	0,141990
Mn-2*	0,701249	-0,018272
Mn-3	-0,053752	0,012429
Mn-4	0,632007	0,292407
Mn-5	-0,500589	-0,248593
Cu-1	-0,020142	0,324850
Cu-2	-0,629966	-0,084319
Cu-3	0,342646	0,012457
Cu-4	0,315120	-0,027215
Cu-5	0,403742	-0,085166
Ni-1	0,019330	0,070549
Ni-2	0,451885	0,105636
Ni-3	0,005847	0,013181
Ni-4	0,643977	0,328712
Ni-5	-0,153474	-0,325539
Zn-1	-0,051018	0,340468
Zn-2	0,002641	0,223551
Zn-3	-0,139560	-0,349636
Zn-4	0,167773	0,158392
Zn-5	0,224124	-0,116536

*Codigos: 1= fracción > 10 kDa 2= fracción 10-7 kDa; 3= fracción 7000-2126 Da; 4= fracción 2126-1352 Da; 5= fracción 1352-360 Da.

- Abundancias relativas en los perfiles obtenidos mediante SEC-ICP-MS:

Cuando el análisis de componentes principales se aplica solamente a los datos de la Tabla 4, puede observarse que las muestras se diferencian también claramente (Fig.13). Como podemos ver, PC1 explica el 73,10 % de la varianza total y PC2 el 20,77 %. Ambos componentes representan el 93,87 % de la varianza total. Las cargas de las variables se muestran en la Tabla 7. Podemos observar que en la PC1, la fracción más significativa es la de Cu de peso molecular entre 10 y 7 kDa y la de 7 a 2,12 kDa. Para

manganeso la fracción preponderante es la de 10 a 7 kDa. Es destacable que la variable más importante tiene un signo negativo contrario a las otras dos variables. En el componente PC2 la variable más importante es la fracción de Zn > 10000 Da, seguida de la de 10 a 7 kDa de Zn y la de 2,12 a 1,35 kDa de Mn, en este caso no hay diferencias significativas en los signos de las cargas.

Una vez realizados estos estudios, las variables relacionadas con el manganeso reflejan gran capacidad para diferenciar muestras de piñones de distinta localización. Por este motivo se realizó un estudio estadístico considerando únicamente la concentración de manganeso y su abundancia relativa en las distintas fracciones y de esta forma, corroborar que es un buen descriptor químico para este tipo de muestras.

Figura 13 Análisis de componentes principales (ACP), considerando como variables las abundancias relativas de los elementos en las fracciones

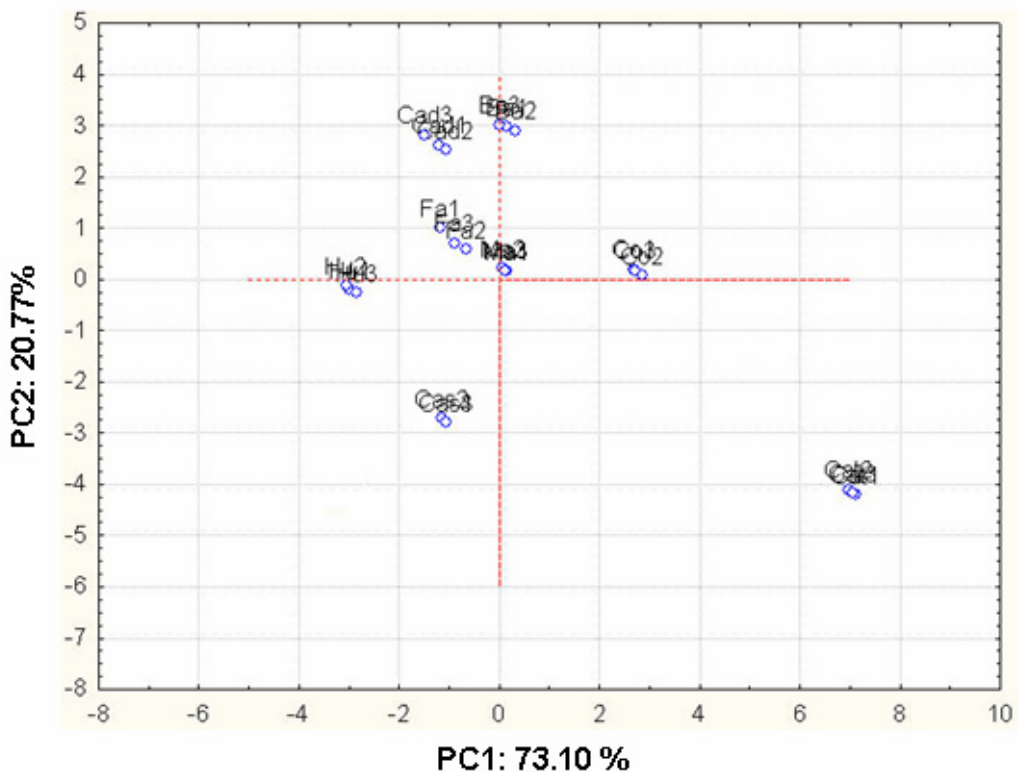


Tabla 7: Cargas de los dos componentes principales obtenidos a partir de los perfiles de metalobiomoléculas de Mn, Cu, Ni y Zn.

Variable	PC 1	PC 2
Mn-2*	0,769290	-0,359546
Mn-3	-0,133723	0,001057
Mn-4	0,359382	0,719853
Mn-5	-0,750536	-0,237565
Cu-1	0,374029	0,396235
Cu-2	-0,879589	0,293333
Cu-3	0,831778	-0,496411
Cu-4	0,699385	-0,511417
Cu-5	0,580446	-0,365502
Ni-1	0,229420	-0,373777
Ni-2	0,702575	0,024913
Ni-3	0,035321	0,180029
Ni-4	0,731124	0,338782
Ni-5	-0,754329	-0,312908
Zn-1	0,231987	0,906299
Zn-2	0,213465	0,688338
Zn-3	-0,752777	-0,503984
Zn-4	0,645059	-0,104193
Zn-5	0,392631	-0,642856

*Codigos: 1= fracción > 10 kDa 2= fracción 10-7 kDa; 3= fracción 7000-2126 Da; 4= fracción 2126-1352 Da; 5= fracción 1352-360 Da.

- Reconocimiento de pautas (Pattern recognition), basado en los datos de Mn como variables: La inspección de los datos correspondiente a Mn en las Tablas 3 y 4, indican que la concentración de este elemento presenta la variabilidad más marcada. Las Figuras 14 y 15 muestran los resultados obtenidos usando como descriptores químicos la abundancia relativa de Mn en las distintas fracciones y la combinación de ésta, con el contenido total de este elemento. En este caso, de modo similar a los resultados anteriores, el empleo combinado de las abundancias relativas de Mn en las distintas fracciones y su

concentración en las muestras permite obtener los mejores resultados, PC1 y PC2 explican el 81,76 % de la varianza total, frente a un 80,06 % que se obtiene utilizando sólo como variable la abundancia relativa de manganeso.

Sin embargo, no podemos afirmar que la concentración de manganeso en combinación con su abundancia relativa, como variable es suficiente, ya que la información aportada por los demás elementos es importante para la discriminación de las muestras. Sin embargo es evidente que al aplicar el ACP utilizando el manganeso como variable, las dos primeras componentes principales explican un porcentaje importante de la varianza total y puede ser un procedimiento simple y rápido para discriminar las muestras en función de su origen geográfico.

Figura 14 Análisis de componentes principales (ACP), considerando el perfil metalomolecular de Mn como variable

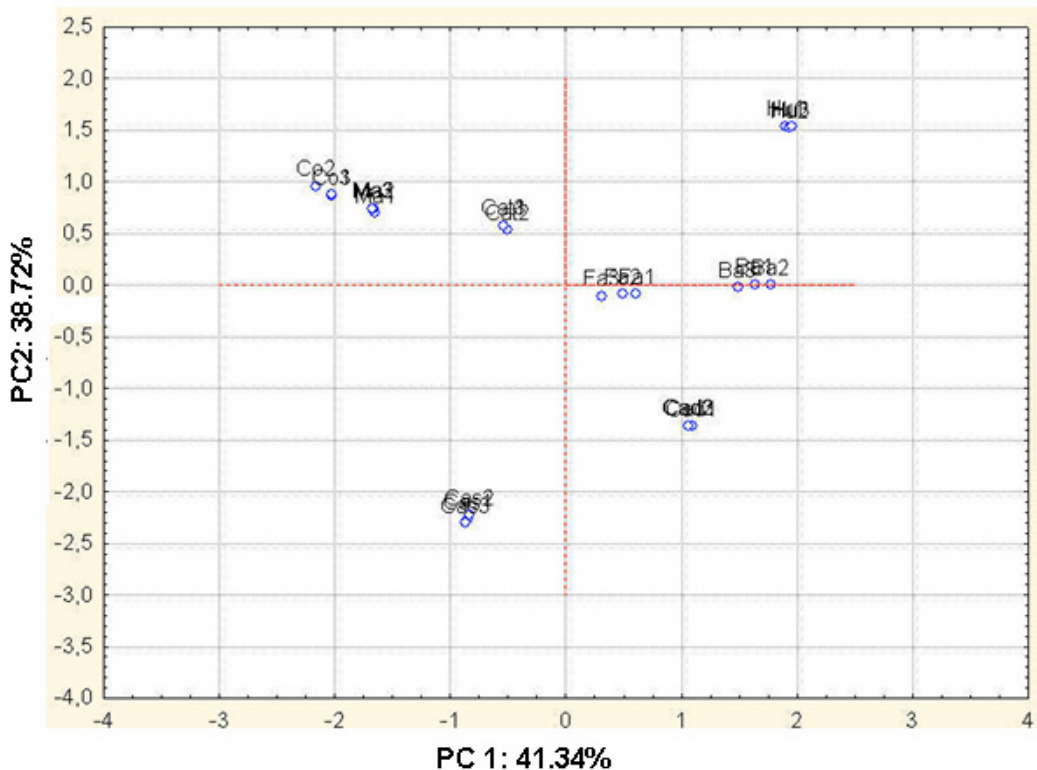
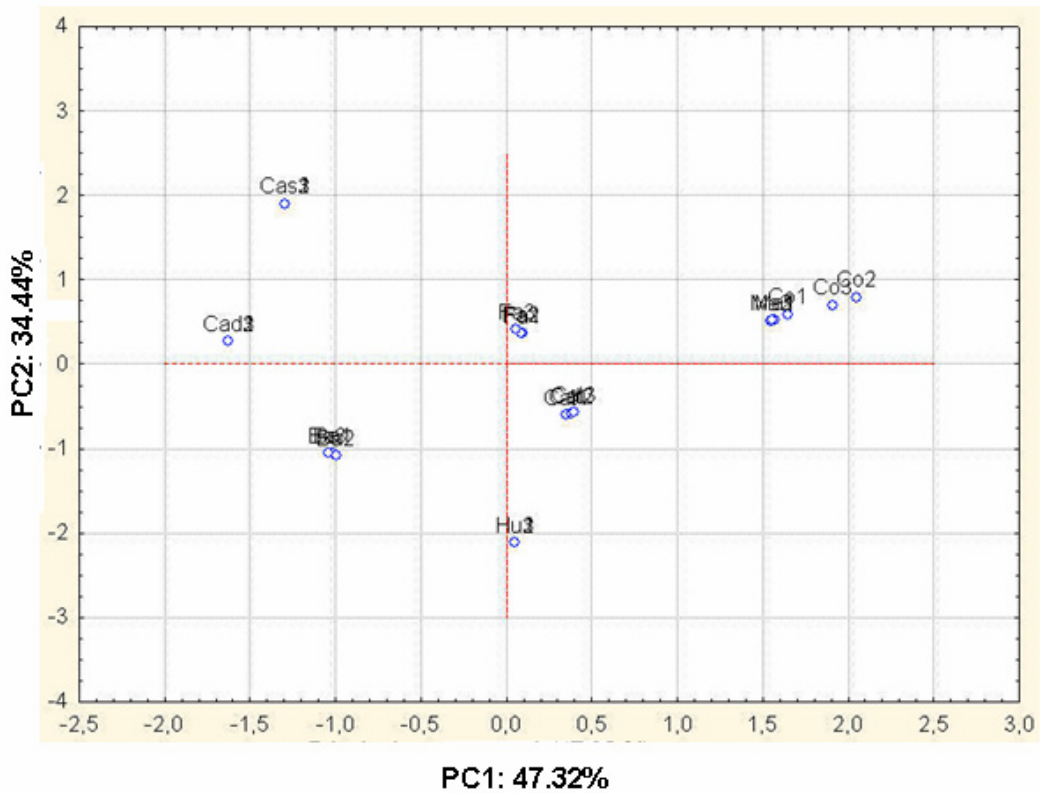


Figura 15 Análisis de componentes principales (ACP), considerando como variables la abundancia relativa de Mn en las distintas fracciones y la concentración total de este elemento.



4. CONCLUSIONES

Se ha optimizado un procedimiento para la extracción de metalobiomoléculas a partir de los piñones (*Pinus pinea*) y la separación posterior de las fracciones que contienen biomoléculas unidas a metales mediante el acoplamiento SEC-UV-ICP-MS.

Se han estudiado muestras de piñones de tres localizaciones en ocho regiones forestales diferentes de la península Ibérica que constituyen las áreas de mayor producción de este fruto en España y Portugal, lo que hace un total de 24 muestras.

Se ha comprobado que los elementos (Mn, Ni, Cu y Zn), con gran importancia metabólica, están estrechamente relacionados con biomoléculas de distinto tamaño molecular. La aplicación del sistema SEC-UV-ICP-MS a las muestras revela la presencia de perfiles cromatográficos diferentes en función de la procedencia de las muestras.

Pueden distinguirse cuatro descriptores químicos que permiten la clasificación de las diversas muestras en función de su procedencia. (i) las concentraciones de elementos; (ii) las abundancias relativas en los perfiles SEC-ICP-MS, en los que se distinguen cinco rangos de peso molecular: fracción 1 ($e \gg 10$ kDa), fracción 2 (de 10 a 7 kDa), fracción 3 (entre 7000 y 2126 Da), fracción 4 (de 2126 a 1352 Da), fracción 5 (entre 1352 y 360 Da); (iii) la concentración de manganeso en las muestras; y (iv) Las abundancias relativas de las especies de manganeso en las muestras.

El estudio estadístico de los resultados obtenidos del análisis mediante el acoplamiento SEC-UV-ICP-MS permite distinguir la procedencia de piñones (*Pinus pinea*). En la mayoría de las muestras analizadas, los elementos están unidos a especies de bajo peso molecular (LMW), lo que indica que podrían tratarse de proteínas de bajo peso molecular o péptidos.

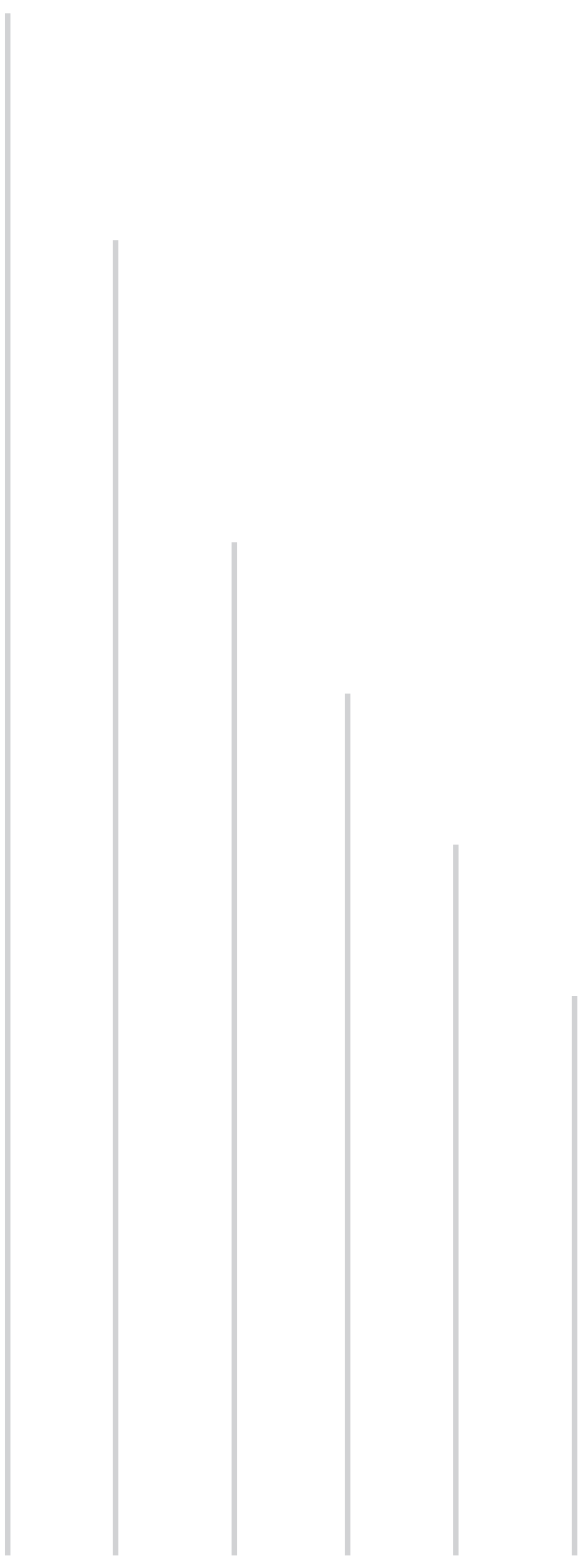
La abundancia relativa de las especies de elementos en los perfiles cromatográficos obtenidos mediante SEC-ICP-MS en combinación con la concentración de Mn, Ni, Cu y Zn, es el mejor descriptor químico para discriminar muestras de orígenes geográficos diferentes.

El Mn es el elemento más abundante en las muestras estudiadas y el uso de este elemento como descriptor químico permite alcanzar resultados muy favorables. Ello constituye un método rápido y simple. No obstante, los resultados son superiores al considerar de todos los elementos en el análisis estadístico por ACP.

BIBLIOGRAFÍA

1. F. Özgüven, K. Vursavus, *J. Food. Eng.* 68 (2005)191
2. C. Nergiz, I. Cönmez, *Food Chem.* 86 (2004) 365
3. R. S. Schwartz, L. T. Hecking, *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 63
4. B. Koletzko, P. J. Agget, J. G. Bindels, P. Bung, P. Ferre, A. Gil, M. J. Lentze, M. Roberfroid, S. Strobel, *Br J Nutr* 80 (1998) S5
5. J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M. J. Villegas, V. Oliveira, *Anal. Chim. Acta.* 524 (2004) 15
6. J. L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, A. Arias-Borrego *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 255
7. A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M. L. Fernández-Sánchez, *Anal Bioanal Chem* 377(2003) 236
8. M. Montes-Bayón, *Anal Bioanal Chem* 376 (2003) 287
9. M. Montes-Bayón, K. DeNicola, J. A. Caruso, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 457
10. F. A. Rivero-Martino, M. L. ,Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *J Anal At Spectrom* 17 (2002)127
11. M. B. Calle-Guntiñas, G. Bordin, A. R. Rodriguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 369
12. B. Michalke, P. Schramel, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 121
13. L. Thunus, R. Lejeune, in: H.G. Seiler, A. Rigel, H. Riger (Eds.), *Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York, Basel, 1994, pp. 333-338

14. L. A. Smolin, M. D. Grosvenor, *Nutrition: Science and Application*, Saunders, Orlando, FL, 3rd (Ed.), 2000
15. J.L. Gómez-Ariza A., Arias-Borrego, T. García-Barrera, J. *Chromatogr. A* 1121 (2006)191
16. R. Fernández-Torres, J. L. Pérez-Bernal, M. A. Bello-López, M. Callejón-Mochón, J. C. Jiménez-Sánchez, A. Guiraúm-Pérez, *Talanta* 65 (2005) 686
17. F. J. Krug, H. B. Fo, E. A. G. Zagatto, S. S. Jorgense, *Analyst* 102 (1977) 503
18. K. Lambie, S. J. Hill, *Analyst* 120 (1995) 413
19. J. N. Miller, J. C. Miller, Capella, I. (Ed.) «Estadística y Quimiometría para Química Analítica», 4ª edición, Prentice may, Madrid, 2002
20. R. G. Wuilloud, S. S. Kannamaumarath, J. A. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 495
21. R. G. Wuilloud, S. S. Kannamaumarath, J. A. Caruso, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1315
22. C. R. Cantor (Ed.), *Protein Purification -Principles and Practice*, Springer, Boston, MA, 3rd ed.,1993
23. S.S. Kannamkumarath, K. Wrobel, A. Vonderheide, J.A.Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 454
24. J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera. *Anal. Bioanal. Chem* 388 (2007) 1295



CAPÍTULO IV

ESPECIACIÓN DE MANGANESO EN MUESTRAS DE PIÑONES POR CROMATOGRAFÍA BIDIMENSIONAL Y DETECCIÓN UV/ICP-MS. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE MANGANESO AISLADAS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

*I*n this chapter, a metallomics analytical approach has been applied for the first time to the study of manganese species in pine nuts (*Pinus pinea*) with the aim of identifying known and unknown Mn-binding biomolecules in this food.

For this purpose, a two-dimensional chromatographic separation combining size exclusion and strong anion exchange chromatography was used to purify and isolate the Mn species that were detected by the ICP-MS system, equipped with an octopole reaction cell (ORC). This approach reduces sample complexity prior to tandem mass spectrometry

analysis for the identification of unknown metallobiomolecules. A rigorous quality control was additionally applied to the ICP-(ORC)MS coupling. Commercial Mn standards were injected in IEC-ICP-MS to match the retention times with the compounds in the fractions previously isolated by SEC. The presence of Mn species was confirmed by nano-electrospray (n-ESI) with direct infusion-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (DI-QqTOF). In addition, a protein containing Mn not correlated with the available standards was sequenced and identified by mass spectrometry.

The obtained results have been described in the following article:

- ❖ ***Speciation of Manganese-binding to biomolecules in pine nuts (*Pinus pinea*) by two dimensional liquid chromatography coupled to UV and ICP-MS detectors followed by ESI-MS identification.*** J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J. Anal. At. Spectrom.** (submitted)

*E*ste capítulo aborda la caracterización metalómica del manganeso presente en los piñones (*Pinus pinea*), considerando especies de bajo y alto peso molecular. El estudio de la totalidad de las especies de un elemento en tejidos biológicos «metalómica», constituye la forma actual de abordar la especiación metálica.

La diferencia fundamental al estudiar la presencia de «heteroelementos» en tejidos biológicos es que estos se encuentran asociados a entidades moleculares completamente desconocidas, de las que no existen patrones o calibrantes y que es necesario identificar. Este es el cambio fundamental de paradigma entre la especiación tradicional (que consideraba especies conocidas de las que se disponía de patrones) y la metalómica.

Los procedimientos metalómicos requieren metodologías analíticas multidimensionales, que integran al menos tres componentes o unidades instrumentales: (i) una unidad de separación, LC o CE, que contribuye al aislamiento de las especies estudiadas de la matriz para su introducción progresivamente en el tiempo en el sistema de detección- componente de selectividad; (ii) una unidad de detección elemental que utiliza un detector de gran sensibilidad, generalmente ICP-MS, para la cuantificación de los elementos – componente de sensibilidad; y (iii) detector específico para moléculas, generalmente basado en el empleo de espectrómetros de masas en tandem, cuadrupolar (Q-MS), de trampa de iones (IT-MS), triple cuadrupolo (QQQ) o cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF) para la caracterización de biomoléculas- componente estructural. Estos procedimientos analíticos multidimensionales (MAA) reúnen a la vez detectores atómicos y moleculares. Estos procedimientos suelen simplificar de forma considerable las etapas de preparación de muestras debido a la selectividad que introduce la presencia del metal en la biomolécula y al uso del detector ICP-MS, que añade una dimensión extra al dispositivo de separación al nivel de detección.

En el estudio de las metalobiomoléculas presentes en piñones (*Pinus pinea*), se han empleado sistemas cromatográficos ortogonales o complementarios, como la cromatografía de exclusión de tamaños para una separación inicial de fracciones que

contienen moléculas de un determinado rango de masa molecular. Posteriormente esas fracciones se purifican mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte.

Ambos sistemas cromatográficos se acoplaron directamente a detectores UV e ICP(OCR)-MS (ICP-MS equipado con una celda de colisión). La presencia de especies de Mn identificadas mediante el tiempo de retención usando el detector ICP-MS por comparación con el de los patrones comerciales, cuando es posible, se ha confirmado mediante espectrometría de masas, utilizando una fuente de ionización de nano-electronebulización (nESI). De la misma forma se ha secuenciado una proteína generalmente asociada a Mn de la que no se disponía de patrón comercial.

Los resultados obtenidos en este capítulo se han descrito en la siguiente publicación.

- ❖ ***Speciation of Manganese-binding to biomolecules in pine nuts (*Pinus pinea*) by two dimensional liquid chromatography coupled to UV and ICP-MS detectors followed by ESI-MS identification.*** J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera. **J. Anal. At. Spectrom.** (submitted)

1. INTRODUCCIÓN

El manganeso (Mn) es un elemento relativamente abundante, que representa aproximadamente el 0,085 % de la corteza terrestre [1]. Este elemento posee toxicidad a muy baja concentración aunque concentraciones mayores, puede producir enfermedades crónicas, tales como el «manganismo» [2]. Este síndrome se produce con concentraciones elevadas de manganeso que provoca en el área cerebral que ayuda a controlar los movimientos. La exposición a altos niveles de manganeso en el aire, puede afectar a la habilidad motora, imposibilitando mantener posiciones en las extremidades, en especial en las manos, la ejecución de movimientos rápidos manuales, y el mantenimiento del equilibrio. La exposición a altos niveles del metal también puede causar problemas respiratorios y alteración en la función sexual [2].

Sin embargo, el manganeso es un oligoelemento, que en concentraciones adecuadas es esencial en la dieta humana. Este elemento, activa numerosas enzimas relacionadas con procesos metabólicos, por ejemplo, la enzima glutamina sintetasa [3]. Además, también es necesario para el funcionamiento de muchas proteínas y el metabolismo de las grasas, el sistema inmunológico y nervioso, así como para la regulación del nivel de azúcar en sangre [4]. Por otra parte, su presencia es crucial para las enzimas relacionadas con la producción de energía y la actividad anti-oxidativa. Un ejemplo claro es la Mn-superóxido dismutasa [5]. Igualmente, el manganeso está implicado en el empleo de vitamina B₁ y vitamina E, y es necesario para el crecimiento adecuado de los huesos a la vez que evita problemas de coagulación en sangre [6].

Por lo tanto, la determinación de manganeso en plantas y alimentos tiene especial interés por varios motivos, como el valor alimenticio de los mismos, su toxicidad, la identificación de procesos contaminación, el estudio de su origen geográfico, etc. [7, 8, 9]. Pero desde un punto de vista alimenticio, la presencia de este elemento tiene un especial interés para asegurar el poder nutritivo de estos alimentos para los seres vivos [10].

En el capítulo anterior, se han determinado los niveles de Mn en piñones (*Pinus pinea*) de distintas áreas geográficas de la Península Ibérica, variando las concentraciones en el rango de 26 a 559 $\mu\text{g g}^{-1}$, [11]. Existen otros alimentos que también contienen Mn en este mismo rango de concentración, como las nueces (Black walnut) (576,2 $\mu\text{g g}^{-1}$), las avellanas (143 $\mu\text{g g}^{-1}$), las pipas de girasol (179 $\mu\text{g g}^{-1}$) [10], la harina de soja (31,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) [12] o (41,7 $\mu\text{g g}^{-1}$) [13], incluso en concentraciones inferiores en el frijol común (18,2 $\mu\text{g g}^{-1}$) [13], la nuez de Brasil (12 $\mu\text{g g}^{-1}$) y el anacardo (9 $\mu\text{g g}^{-1}$) [10]. Se han determinado concentraciones mucho más altas de Mn en almendras (4780 $\mu\text{g g}^{-1}$) y en cacahuetes (2110 $\mu\text{g g}^{-1}$) [10].

Por otra parte, se ha determinado Mn en fluidos y órganos humanos encontrándose valores de 0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ en suero, 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ en orina [2], 2 a 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ en la leche materna [6] y aproximadamente 1,5 mg kg^{-1} en hígado [14].

Se han propuesto numerosos métodos analíticos para la determinación de manganeso, incluyendo la espectrofotometría [15], polarografía [16], análisis por activación neutrónica (NAA) [17], espectrometría de absorción atómica (AAS) [18] y espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) [19]. Del mismo modo, se han desarrollado varios métodos de especiación de Mn, mediante análisis electroquímico como la voltamperometría diferencial de pulsos con redisolución anódica (DPASV) [2], generalmente utilizados en análisis de muestras de agua. Más recientemente, se han aplicado otros métodos como la electroforesis capilar-ICP-MS [14] en hígado porcino, HPLC-ICP-MS en harina de cereal [20] y la espectrometría de absorción atómica después de la extracción por punto de nube [21]. También se han realizado estudios de especiación de Mn en muestras de leche materna y en polvo, usando SEC en combinación con cromatografía de intercambio iónico (IEC) e ICP-MS [6]. Sin embargo, hasta ahora no se han analizado mediante espectrometría de masas molecular las fracciones aisladas por SEC que contienen Mn.

En este trabajo se ha conseguido desarrollar por primera vez un método analítico para el estudio de especies de Mn en piñones (*Pinus pinea*), en especial Mn unido a biomoléculas (péptidos y proteínas) sin necesidad de disponer de los estándares correspondientes. La metodología implica el uso de cromatografía bidimensional que combina SEC con IEC utilizando detectores en serie UV-ICP-MS. Ello permite la obtención de los correspondientes perfiles que permiten identificar la separación de moléculas que contienen elementos característicos. Por otro lado el empleo de una columna semi-preparativa permite el aislamiento de las fracciones que contienen manganeso. Estas fracciones se analizan mediante IEC-ICP-MS y se aíslan de nuevo ya purificadas para la identificación de las especies mediante espectrometría de masas molecular. La identificación mediante MS se realiza utilizando como fuente de ionización provista de nano-electronebulización (n-ESI) y un analizador de masas triple cuadrupolo tiempo de vuelo (QqQ-TOF).

Este procedimiento reduce la complejidad de las muestras antes del análisis por espectrometría de masa en tandem [22,23]. En el sistema IEC-ICP-MS se inyectaron algunos estándares comerciales de Mn de algunas especies de este elemento para su identificación con el sistema instrumental estudiado. Por último, se ha logrado identificar en una de las fracciones que contenía Mn una proteína (isocitrato deshidrogenasa), que la bibliografía relaciona con frecuencia con la presencia de manganeso, para ello se ha utilizado la fracción purificada por IEC-ICP-MS, posteriormente se sometió a digestión con tripsina y se secuenció con los datos de los espectros de masas de los péptidos.

2. EXPERIMENTAL

2.1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Los estándares utilizados para calibrar las columnas de exclusión de tamaño en función del peso molecular, fueron los mismos que los utilizados en el capítulo anterior. Para la columna Hiload 26/60 Superdex 30 Prep (>10 kDa) se inyectaron; Albúmina (67 kDa), Metalotioneína I (7 kDa), Gastrina I (2126 Da), Vitamina B₁₂ (1352 Da) y Hexaglicina (360 Da). El tiempo muerto (t_0) se determinó con Albúmina. En la columna Hiload 26/60 Superdex 75 Prep (70-3 kDa) se inyectaron; Albúmina de suero bovino (67kDa), Ovoalbúmina (43 kDa), Quimotripsinógeno A (25 kDa) y Ribonucleasa A (13,7 kDa). El tiempo muerto (t_0) se determinó con Azul de Dextrano 2000 (2000 kDa). Todos estos reactivos, los suministró Amersham Biosciences, (Uppsala, Suecia).

La fase móvil para la cromatografía de exclusión de tamaño, se preparó diariamente a partir de Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y clorhidrato de Tris (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) en concentración formal 0,05 M (pH = 8).

Los componentes de la fase móvil utilizados en IEC, hidróxido de sodio y acetato de amonio los suministró Merck (Darmstadt, Alemania). La tripsina (EC 3.4.21.4) TPCK se obtuvo en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania) y la urea, iodoacetamida (IDA) y ditiotreitól (DTT) fueron suministrados por Bio-Rad (Madrid, España).

El material para la purificación en el capilar de la n-ESI (PorosTM R2 50 μ m) se obtuvo de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU).

Los estándares de manganeso utilizados en IEC: arginasa, ácido cítrico y cloruro de manganeso, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente, utilizando agua (18 M Ω cm) purificada en un sistema Milli-Q Gradient (Millipore, Watford, Reino Unido).

La disolución primaria de arginasa (proteína que contiene Mn) utilizada en la cromatografía de intercambio aniónico IEC, se preparó pesando 100 mg del compuesto y disolviéndolo en 10 ml de agua Milli-Q. La disolución primaria de Mn-citrato se preparó, mezclando 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico con una solución acuosa de cloruro de manganeso (10 mg L⁻¹ de manganeso).

Todos los estándares se almacenaron en oscuridad a -20°C. No se observó degradación de los compuestos en los tiempos de almacenamiento mencionados anteriormente.

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRA

Las muestras de piñones (*Pinus pinea*) fueron suministradas por Frutos Secos Puig, (Tarragona, España). Para el análisis, se lavaron con agua de alta pureza (Milli-Q), se molieron (Moulinex, España) y se liofilizaron con un sistema Benchtop (Hucoa-Erlöss, España). Las muestras seleccionadas en el estudio proceden de Coimbra (Portugal).

En primer lugar, y siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo anterior, los lípidos se extrajeron de la muestras para evitar posibles problemas de interferencias de matriz. Para ello, se partió de cinco gramos, exactamente pesados, de muestra liofilizada y se realizó una extracción sólido-líquido con 25 ml de una mezcla de cloroformo/metanol (2:1), durante 30 min en un agitador orbital. Tras la extracción, la mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min, obteniéndose una fase orgánica que se desechó. El residuo sólido se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad.

La extracción de los metales a partir de la fracción sólida se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo anterior. Se parten de 0,2000 g de la fracción sólida obtenida anteriormente, que se tratan con 4 ml de una disolución 0,1 M de hidróxido sódico, se separa el extracto mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos tras homogeneizarse durante 10 minutos en un agitador orbital [11].

2.3 INSTRUMENTACIÓN

La detección elemental se realizó mediante plasma de acoplamiento inductivo con detector de masas, ICP-MS, de Agilent, Modelo 7500 ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japón). Este modelo dispone de la innovadora tecnología de la celda de colisión.

El instrumento consta de un nebulizador concéntrico Micromist con una cámara de spray ciclónica típica de los nebulizadores concéntricos. Esta cámara se refrigeró a -2°C , con el fin de mejorar su capacidad de separación cuando se acopla a un flujo de líquido procedente de un sistema HPLC o SEC. La sensibilidad del ICP-MS se optimizó utilizando una disolución que contiene ^{59}Co , ^{89}Y y ^{205}Tl (cada uno de ellos en concentración de $1\ \mu\text{g L}^{-1}$) en 2% de HNO_3 . El ruido de fondo se redujo al máximo mediante la optimización de los parámetros, monitoreando la señal de agua ultrapura (Milli-Q) hasta comprobar que la señal del ión poliatómico de $m/z\ 56$ (ArO^+) estaba por debajo de 1800 cps (cuentas por segundo).

El análisis de las fracciones aisladas por SEC y purificadas por IEC se realizó mediante espectrometría de masas utilizando una fuente de ionización de nano-electronebulización y un sistema triple cuadrupolo-tiempo de vuelo, API QSTAR[®] XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU).

La cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), se describió con detalle en el capítulo anterior. Se utilizó la columna, Hiloadd 26/60 Superdex 30 Prep para un rango de masas $<10\ \text{kDa}$ con objeto de estudiar las moléculas de bajo peso molecular, que se comprobó adecuado para este tipo de muestras, ya que se alcanza mejor resolución que en columnas con rango de peso molecular más elevado. Esta columna fue suministrada por Amersham Biosciences, (Uppsala, Suecia). Se utilizó un cromatógrafo líquido de baja presión (AKTA-Prime system, Amersham Biosciences), y un volumen de inyección de 2 mL.

Para purificar las fracciones que contenían manganeso aisladas por SEC se utilizó un sistema cromatográfico que complementara el principio separador de la SEC. Se eligió la cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna Dionex AS11-HC (Dionex, Indstein, Alemania) y un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) modelo Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) con un volumen de inyección de muestra de 75 μ l.

Para acelerar la separación en el proceso de extracción se utilizó una centrífuga (Sigma modelo 4-10, España) y un agitador orbital de 105 rpm (Heidolph Unimax 1010, Alemania).

2.4 PROCEDIMIENTO

2.4.1 *Análisis elemental de Mn*

El análisis de Mn en las muestras se realizó, mineralizando las mismas con ácido nítrico. Se utilizó un microondas convencional optimizando el programa de potencias, como se ha descrito en el capítulo anterior.

2.4.2 *Primera dimensión cromatográfica. Fraccionamiento por cromatografía de exclusión de tamaño*

El acoplamiento SEC-UV-ICP-(ORC)MS se realizó conectando la salida del detector UV del sistema cromatográfico a la entrada del nebulizador del ICP-MS. El hidrógeno se seleccionó como gas de reacción para la celda de colisión. Las condiciones de trabajo óptimas se describen en la Tabla 1. Se obtuvieron los perfiles de fraccionamiento de las moléculas que contenían Mn mediante el detector UV y el atómico en las muestras de piñones, usando las columnas descritas en la Sección 2.3. y el acoplamiento SEC-UV-ICP-(ORC)MS. Una vez obtenidos los perfiles UV e ICP-MS, se aislaron las fracciones que contenían Mn a la salida del detector UV.

Para eliminar impurezas retenidas en las columnas de SEC, fundamentalmente relacionadas con otros elementos presentes en las muestras, se utilizó una disolución 0,002 M de AEDT. Se realizó una limpieza adicional con NaOH que asegura la eliminación de posibles proteínas retenidas en la columna (descrito previamente en el capítulo anterior) [11]. Para estandarizar el rango de separación cromatográfica en función del peso molecular, se utilizaron los mismos estándares descritos en el capítulo anterior. Éstos se disolvieron en la fase móvil y sus perfiles cromatográficos se obtuvieron mediante detección por UV a 232 nm.

Tabla 1 Condiciones de trabajo para ICP-(ORC)MS y SEC

Condiciones SEC	
Columnas	Hiload 26/60 Superdex 30 Prep; Hiload 26/60 Superdex 75 Prep
Rango de resolución	Mr < 10 000 Da; 70 000-3000Da
Fase móvil	Tris 50 mmol L ⁻¹ (pH 8.0)
Flujo	2 ml min ⁻¹
Volumen de inyección	2ml
Longitud de onda UV	232 nm
Condiciones ICP-(ORC)MS	
Potencia de RF	1350W
Flujo de gas plasmógeno	15,0 L min ⁻¹
Flujo del gas auxiliar	0,87 L min ⁻¹
Flujo del gas nebulizador	0,975 L min ⁻¹
Distancia al cono de muestreo	6 mm
Conos de la Interfase “sampler” y “skimmer”	Níquel
Flujo de H ₂	4 mL min ⁻¹
Q _{oct}	-13 V
Q _p	-11,5V
Tiempo de permanencia	0,3 s
Isótopo estudiado	⁵⁵ Mn

2.4.3 Segunda dimensión cromatográfica. Fraccionamiento por cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones de diferente peso molecular que contienen Mn y que se aislaron mediante SEC se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico fuerte (SAX). Las condiciones instrumentales de acoplamiento están resumidas en la Tabla 2. La elución

del sistema IEC-UV/ICP-MS, se realizó con 10 mM NH_4 -acetato/ácido acético a pH 6,3 (fase móvil A), 0,8 mM NaOH (fase móvil B) y 10 mM NaOH (fase móvil C). El programa de gradiente comenzó usando el eluyente A al 100% los primeros 3 minutos, 100 % del B desde 3 a los 14 minutos y 100 % del eluyente C entre 14 y 22 minutos.

Tabla 2 Condiciones de trabajo para IEC

Condiciones IEC	
Columna	Dionex AS11-HC
Fase móvil	A=10 mM NH_4 -acetato/ácido acético (pH 6,3), B=0,5 mM NaOH, C=10mM NaOH
Flujo	0,5 ml min^{-1}
Volumen de inyección	75 μl
Longitud de onda UV	232 nm

La identificación de algunos picos cromatográficos se realizó mediante la inyección de estándares: Cloruro de Manganeso, Citrato de manganeso y Arginasa, seleccionados teniendo en cuenta la información contenida en la bibliografía. Finalmente, se aislaron las fracciones de Mn de nuevo, esta vez a la salida de la columna de intercambio aniónico para identificación o confirmación de las especies de manganeso mediante espectrometría de masas.

Las fracciones se congelaron, liofilizaron y almacenaron a -20°C , durante un tiempo no superior a dos semanas. En caso de fracciones de elevado peso molecular, si son proteínas, es necesario realizar una digestión enzimática para su identificación mediante espectrometría de masas. El procedimiento de digestión de proteínas se llevó a cabo con tripsina, optimizando la metodología previamente con albúmina de suero bovino. En la digestión se emplean inicialmente tres reactivos para eliminar la estructura terciaria de la proteína permanentemente y facilitar la acción de la tripsina:

- Urea: desnaturaliza las proteínas.
- DTT: rompe los puentes disulfuro establecidos entre las cisteínas.
- Iodoacetamida: bloquea los grupos $-\text{SH}$ de las cisteína (Cys) para evitar que se formen de nuevo los puentes disulfuro.

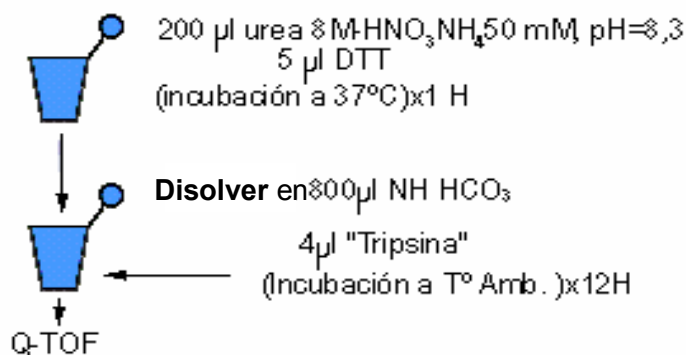
La digestión con tripsina en disolución se inicia haciendo reaccionar una alícuota, previamente liofilizada, de la fracción aislada mediante IEC (100 mg) con 200 μl de una disolución de urea 8M y bicarbonato amónico 1M, seguido de la adición de 5 μl de DTT (180M) e incubación de la mezcla de reacción 1h en un baño termostatzado a 37°C.

Pasado este tiempo se deja enfriar la muestra, se añaden 5 μl de iodoacetamida (400mM) y posteriormente se incuba 1h a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Finalmente, se diluye la muestra con 800 μl de bicarbonato amónico 50mM, de forma que la concentración de urea durante la digestión sea 2M y el pH se sitúe alrededor de 8. Se añaden 4 μg de Tripsina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), dejándolo transcurrir la digestión de la muestra durante 12h a 30°C. Posteriormente la reacción se detiene bajando el pH a 5 con una disolución al 0,1% de ácido fórmico en agua.

El procedimiento descrito se resume en el siguiente esquema (Fig.1):

Figura 1 Procedimiento, digestión triptica



Las sales y otras impurezas se eliminaron con el fin de mejorar la calidad de los espectros de masas. Para ello, se utilizaron capilares de purificación Proxeon™ de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE. UU) similares a los de la fuente de ionización de nano-electronebulización pero sin la punta de grafito (necesaria para el contacto eléctrico en la fuente de ionización), ya que la purificación se realiza fuera de la fuente. Se preparó una fase estacionaria mezclando el material Poros R2 (100 μl) con 5 ml de metanol al 50 % en

agua, posteriormente se tomaron 5 μl de dicha suspensión y se introdujeron en el tubo capilar. El empaquetado se realizó hasta la mitad del capilar. La punta del capilar se recortó ligeramente para permitir la elución y se centrifugó la fase durante 10-20s. Posteriormente se pasaron por el capilar relleno de 5-10 μl de una disolución acuosa de ácido fórmico/metanol 3:70 (v/v) con ayuda de la centrífuga. Posteriormente, se repitió el procedimiento dos veces más con 5-10 μl de una disolución acuosa de ácido fórmico/metanol 3:5 (v/v) con objeto de preparar a la fase estacionaria para la adsorción de péptidos. La muestra se diluyó con una disolución de ácido fórmico/metanol 3:5 (v/v) y se introdujo en el capilar. Sobre el capilar se eliminan impurezas mediante el paso de 5-10 μl , dos veces, de una disolución acuosa de ácido fórmico/metanol 3:5 (v/v). Finalmente, se eluyen los analitos con 2 μl de una disolución acuosa de ácido fórmico/metanol 3:70 (v/v). Los péptidos eluidos se recogen con otro capilar con el que se introduce en el capilar de la fuente de nano-electronebulización.

2.4.4 Análisis de las fracciones mediante nano-electrospray Q-TOF

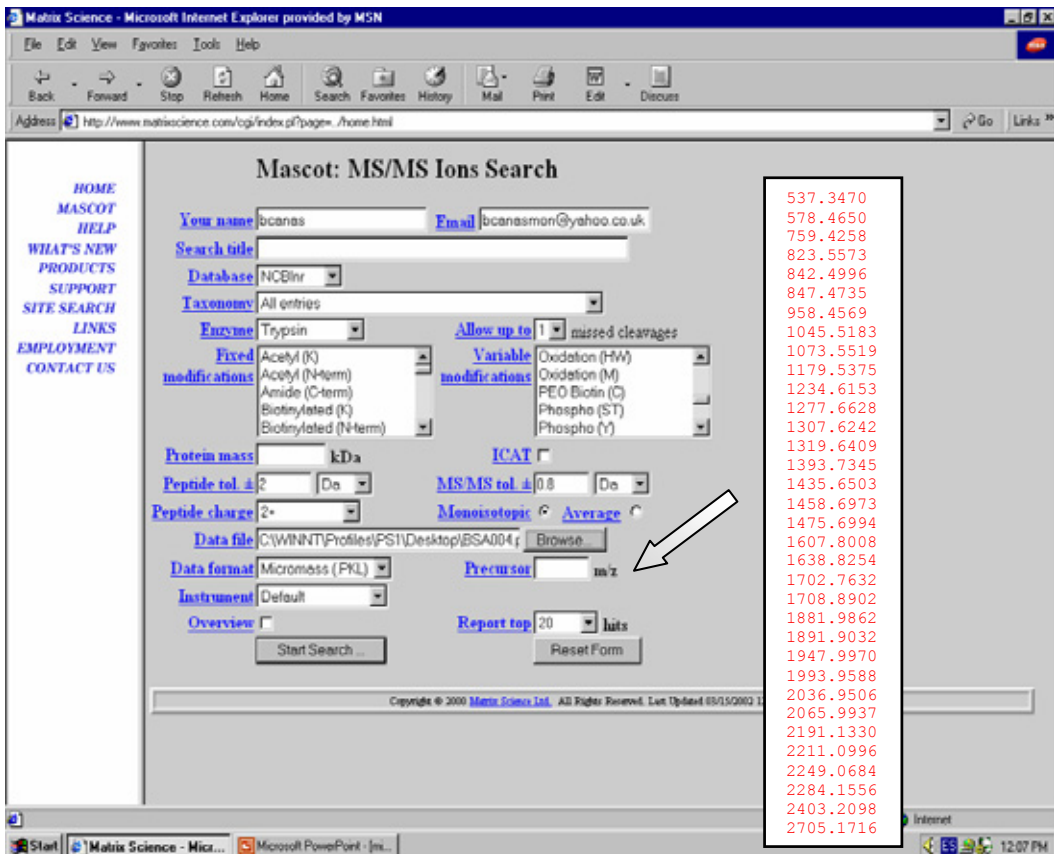
El espectrómetro de masas se calibró inmediatamente antes del análisis de muestra, para lo que se utilizó glu-fibrinopéptido B. Se utilizaron dos fragmentos obtenidos por MS/MS de glu-fibrinopéptido B: $[\text{M}+\text{H}]^+=175,1190$ y $1285,5444$ Da. La ionización se realizó en modo positivo (ES^+) en un rango de masas de 400-1700 m/z. En el cuadrupolo (Q1), se fijó la resolución ($R = m/\Delta m$, entre dos picos) sobre $0,7\pm 0,1$ unidades de masas (uma) y los valores para el voltaje de ionización, gas cortina, posición del spray, y el voltaje en el multiplicador de electrones se fijaron en: 700-900 V, 1,13 L min^{-1} , 3 mm y 2300 V, respectivamente. La adquisición y tratamiento de datos se realizó utilizando el programa Analyst QS (Applied Biosystems).

En los espectros de masas obtenidos a partir de proteínas digeridas con enzimas, las masas de los péptidos conforman la «huella peptídica» de la misma, que generalmente tienen carga +2. Los iones peptídicos doblemente cargados se seleccionaron para su

fragmentación mediante MS/MS, incrementando la energía de colisión. Con los datos de las masas de todos los fragmentos de los péptidos y sus abundancias, se realizó una secuenciación manual con ayuda del programa Bioanalyst™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU).

Posteriormente, se realizó una búsqueda de las secuencias de los péptidos utilizando una base de datos diseñada específicamente para ácidos nucleicos y proteínas no identificadas (NCBI). Esta base de datos es, quizá, la más completa en la actualidad y con mayor frecuencia de actualización. El motor de búsqueda utilizado fue el Mascot (http://www.matrixscience.com). La Figura 2 muestra como se realizó la búsqueda.

Figura 2 Búsqueda en Mascot, para la secuenciación de proteínas.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PERFIL DE Mn OBTENIDO POR SEC-UV-ICP-MS. PRIMERA DIMENSIÓN

La absorbancia del detector UV se estudió a varias longitudes de onda en el rango de 200-500 nm para obtener una respuesta óptima, se seleccionó finalmente la de 232 nm. El cromatograma obtenido con la detección en serie UV e ICP-MS se muestra en la Figura 3.

El perfil de fraccionamiento del manganeso presenta tres picos en los que está presente el elemento que detecta el sistema ICP-(ORC)-MS. Estos picos están asociados a moléculas con un rango de pesos moleculares: 10-7 kDa, 7000-2126 Da y 2126-1352 Da, valores que establece el calibrado previo realizado con el sistema con patrones de masa conocida. Por su rango de pesos moleculares estas moléculas podrían ser proteínas de bajo peso moléculas o péptidos que contengan manganeso. Sin embargo, la confirmación concreta de especies de este elemento no es posible con la separación realizada por SEC. Por ello es necesario otro método cromatográfico complementario que permita la purificación de las fracciones obtenidas por SEC. Con este propósito se aplicó una segunda separación cromatográfica basada en intercambio aniónico.

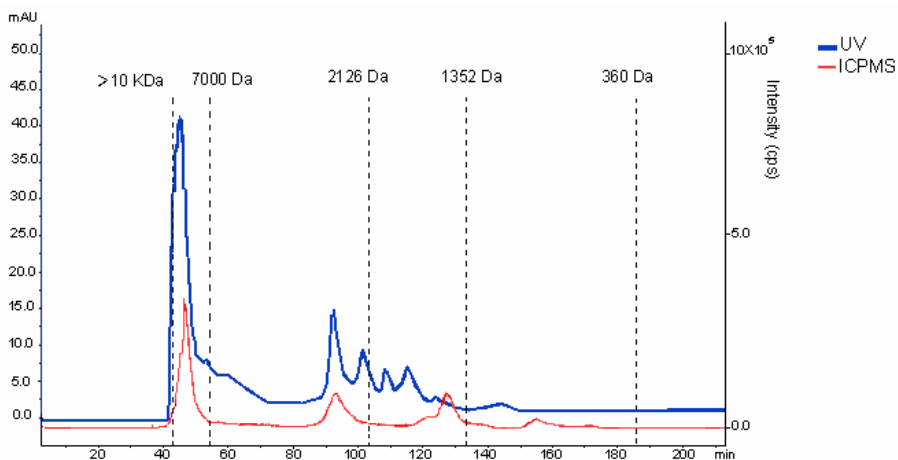
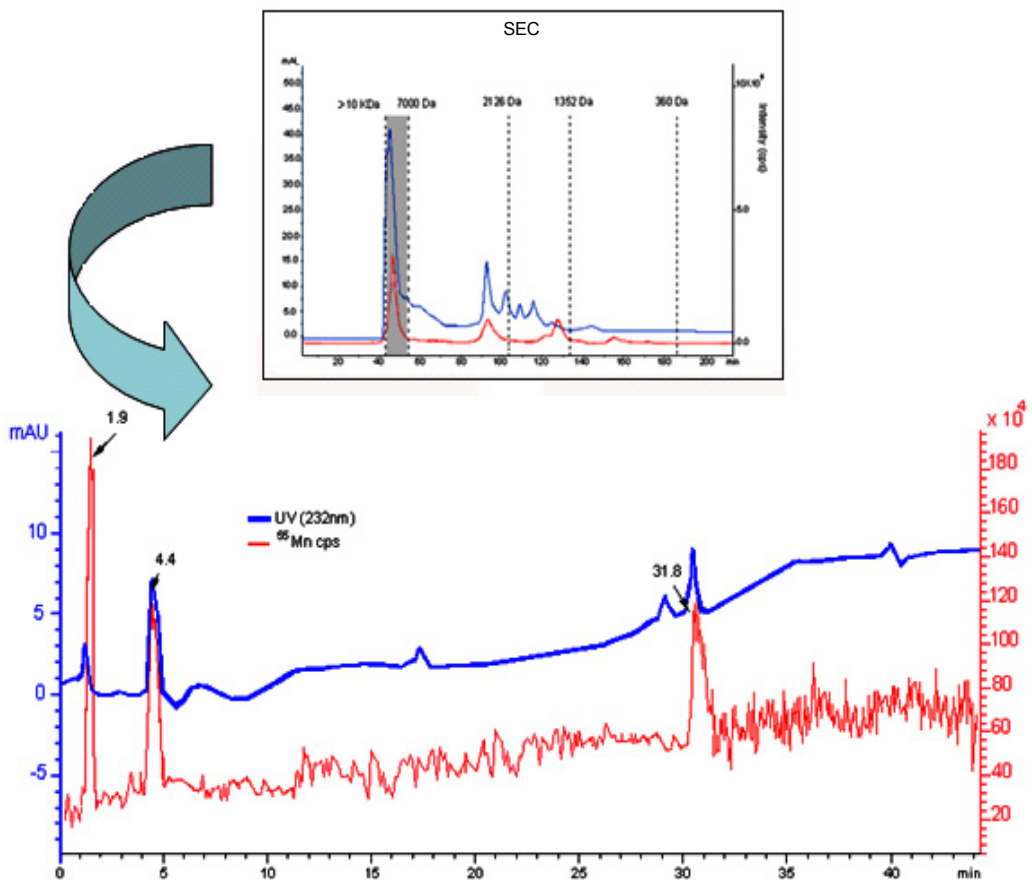


Figura 3 Separación de compuestos de Mn por SEC-UV/ICP(OCR)MS. Línea azul detección UV(232nm). Línea roja detección por ICP-MS (isótopo monitorizado ^{55}Mn)

3.2 FRACCIONAMIENTO Y CUANTIFICACIÓN DE Mn POR IEC-UV/ICP-MS

El pico de Mn de mayor intensidad, detectado por SEC-ICP-MS, corresponde a la fracción de peso molecular 10-7 kDa. Este pico se aisló partiendo de los eluidos de SEC y se separó con cromatografía de intercambio aniónico con detección por ICP-MS (Fig. 4).

Figura 4 Cromatograma IEC-UV/ICP-MS, de la fracción (10-7 KDa) aislada en SEC



El cromatograma IEC presenta tres picos con tiempos de retención de 1,9, 4,4 y 31,8 minutos. Los dos primeros picos coinciden con los tiempos de retención del MnCl_2 y el complejo Mn-citrato, respectivamente. Aunque el pico correspondiente a MnCl_2 eluye en el volumen muerto (V_0) de la columna y su coincidencia con el patrón de este compuesto no indica inequívocamente la presencia de la sustancia en la muestra. Por ello esta se confirmó monitoreando la presencia de ^{55}Mn y ^{35}Cl por ICP-MS, que origina picos cromatográficos para ambos elementos (Fig.5).

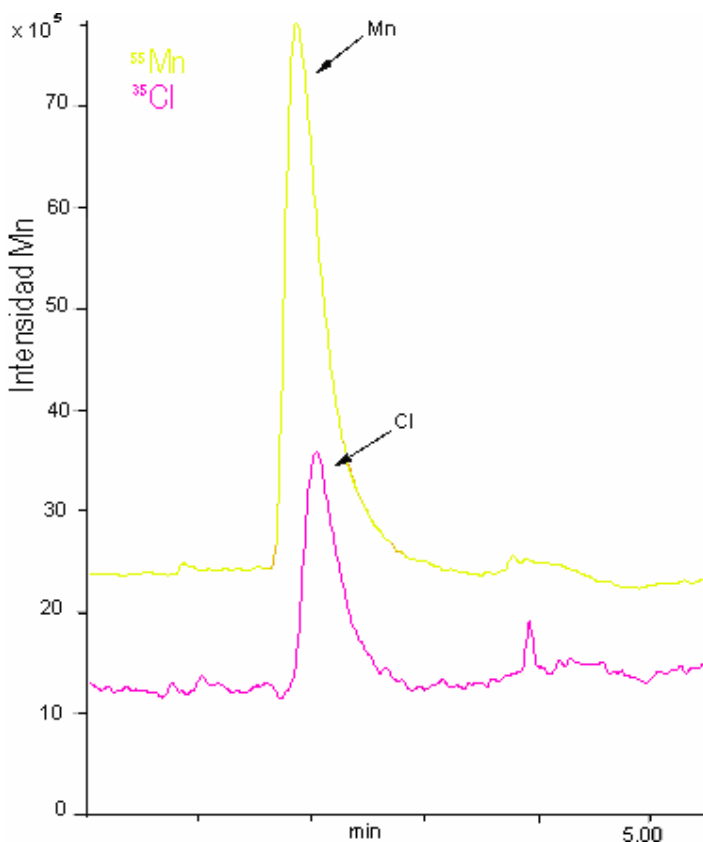


Figura 5
*Cromatograma
obtenido por IEC-
ICP(OCR)MS (isótopos
monitorizado: ^{55}Mn y ^{35}Cl).
Tiempo de retención
1,9 min.*

El tercer pico cromatográfico no coincidió con ningún estándar de Mn de los que se disponía, por tanto este pico se aisló para su identificación por espectrometría de masas.

Por otro lado la cuantificación de los compuestos de Mn, identificados con los tiempos de retención de los estándares, se realizó mediante calibración externa, representando la cantidad absoluta en $\mu\text{g Kg}^{-1}$ frente el área de analito en IEC-ICP-MS. Junto a los patrones de MnCl_2 y citrato de Mn se incluyó uno de arginasa.

Los límites de detección (Tabla 3) se determinan según el criterio de Miller & Miller descrito en el capítulo anterior. Las curvas de calibrado son lineales desde el límite de cuantificación hasta 1 mg/L (volumen de inyección de 75 μl) para todos los analitos. La repetibilidad (% desviación estándar relativa, $n=6$) del tiempo de retención en ICP-MS es inferior al 1,9 % para todas las especies de Mn.

Tabla 3 *Parámetros de calidad del método IEC-ICP-MS*

Especie de Mn	$t_r(\text{min})$	$\text{LD}/\mu\text{g Kg}^{-1}$	Identificación (t_r relacionado con estándar)	Concentración (como Mn) en $\mu\text{g Kg}^{-1}$
MnCl_2	1,9	26	detectado	75
Mn-citrato	4,4	96	detectado	125
Arginasa	22,2	150	No detectado	—
Pico 3 ^a	31,8	—	desconocido	65

Pico 3^a. Identificado posteriormente como Isocitrato dehidrogenasa por n-ESI-MS. Siendo el tiempo de retención (t_r) y el Límite de detección (LD).

3.3 BALANCE DE MASAS DE Mn

Para realizar el control de calidad del procedimiento analítico, la concentración de Mn se determinó en cada paso del procedimiento. La concentración total Mn de la muestra estudiada es de 65 $\mu\text{g g}^{-1}$ (15,24 $\mu\text{g Mn}$ en la alícuota utilizada). El extracto acuoso de la muestra contiene el 71 % del total de Mn de la muestra original. La eficiencia de la columna de SEC para Mn, es del 53 % (Mn eluido/Mn inyectado). La fracción de mayor abundancia de Mn (Fig.3) representa el 25 % del Mn inyectado en la columna SEC. La eficiencia de la columna IEC para Mn es del 86 % (Mn eluido/Mn inyectado) y los picos

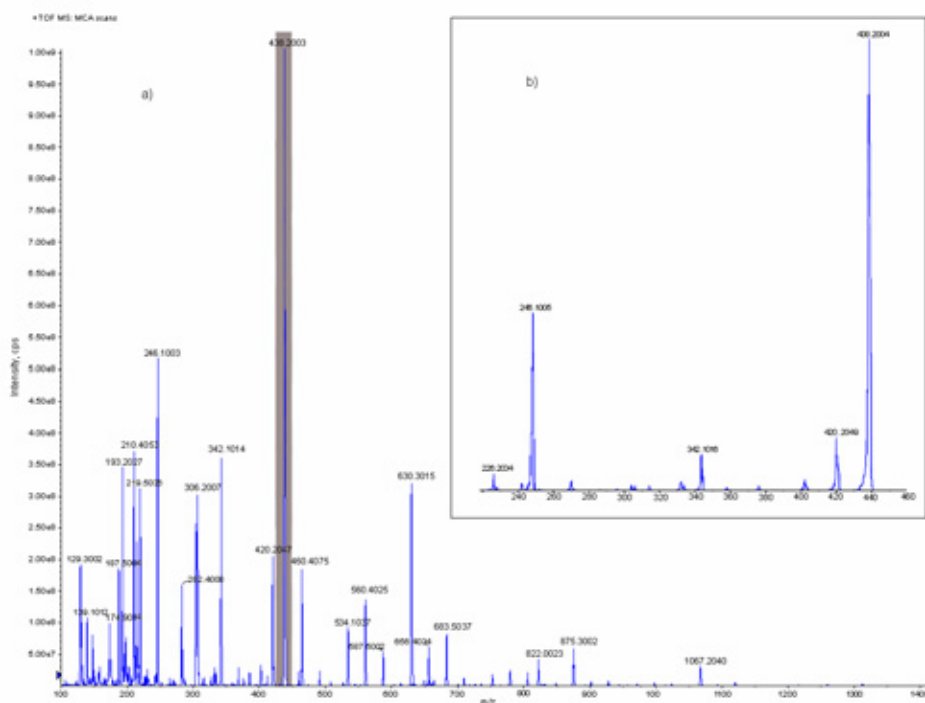
cromatográficos aislados en IEC, con tiempos de retención de 4,4 y 31,8 minutos, contienen 0,6256 y 0,3215 μg de Mn, respectivamente.

3.4 IDENTIFICACIÓN DEL CITRATO DE MANGANESO MEDIANTE DI-QqTOF

Se realizó un estudio en paralelo, con el objetivo de confirmar la presencia de Mn-citrato en la muestra por espectrometría de masas. Para ello, el pico cromatográfico obtenido en IEC-ICP-MS, previamente identificado por el tiempo de retención del estándar, se analiza mediante infusión directa en un sistema QqTOF. Esta fracción eluye con fase móvil de 10 mM NH_4 -acetato/ácido acético a pH 6,3 que es compatible para la ionización con la fuente de electronebulización, por lo que es posible el análisis directo sin ningún tratamiento previo [6].

El espectro de masas n-ESI-MS (barrido completo) se muestra en la Fig. 6a. El espectro presenta el pico base a 438 m/z, que está relacionado con el ión molecular protonado del complejo Mn-citrato $[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)_2 + \text{H}]^+$. El espectro MS/MS del ión 438 m/z (Fig. 6b) confirma la existencia de este complejo en la muestra, que al fragmentarse da lugar a un ión producto de 246 m/z, indicando la pérdida de 191 unidades, que pueden atribuirse a una molécula de ácido cítrico $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7]^+$. El ión producto a 246 m/z indica que la estequiometría del complejo es 1:2.

Figura 6 (a) nano-ESI-MS del pico cromatográfico (t_r 4,43 min.) aislado de la separación cromatográfica IEC; (b) MS/MS del pico base del espectro, 438 m/z (Mn-citrato)



3.5 IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE Mn EN LAS MUESTRAS DE PIÑONES

El pico desconocido que contiene Mn, eluido con tiempo de retención de 31,8 min en el cromatograma IEC-ICP-MS, se aisló y se liofilizó para su identificación mediante espectrometría de masas. Debido a que se trata de un compuesto de elevado peso molecular, su identificación se realizó en el extracto resultante tras proteolisis con tripsina. Para ello, la fracción correspondiente al pico cromatográfico se aisló tres veces, y los extractos reunieron y se liofilizaron. La digestión con tripsina se realizó como se ha descrito previamente, Apartado 2.4.3.

La Figura 7a muestra el espectro de masas (barrido completo) de los péptidos obtenidos después de la digestión triptica. La sensibilidad no es muy elevada debido a la complejidad de la matriz.

Para establecer la secuencia de la proteína se fragmentaron mediante MS/MS los iones peptídicos doblemente cargados localizados en el rango de m/z 530-572 (537,3, 537,8, 560,8, 560,3, 571,3 y 571,8 m/z) (Fig.7b). La Figura 7c muestra el espectro MS/MS del ión 537,3 m/z , que se seleccionó por su elevada intensidad en el espectro de masas, en comparación con los otros iones peptídicos doblemente cargados.

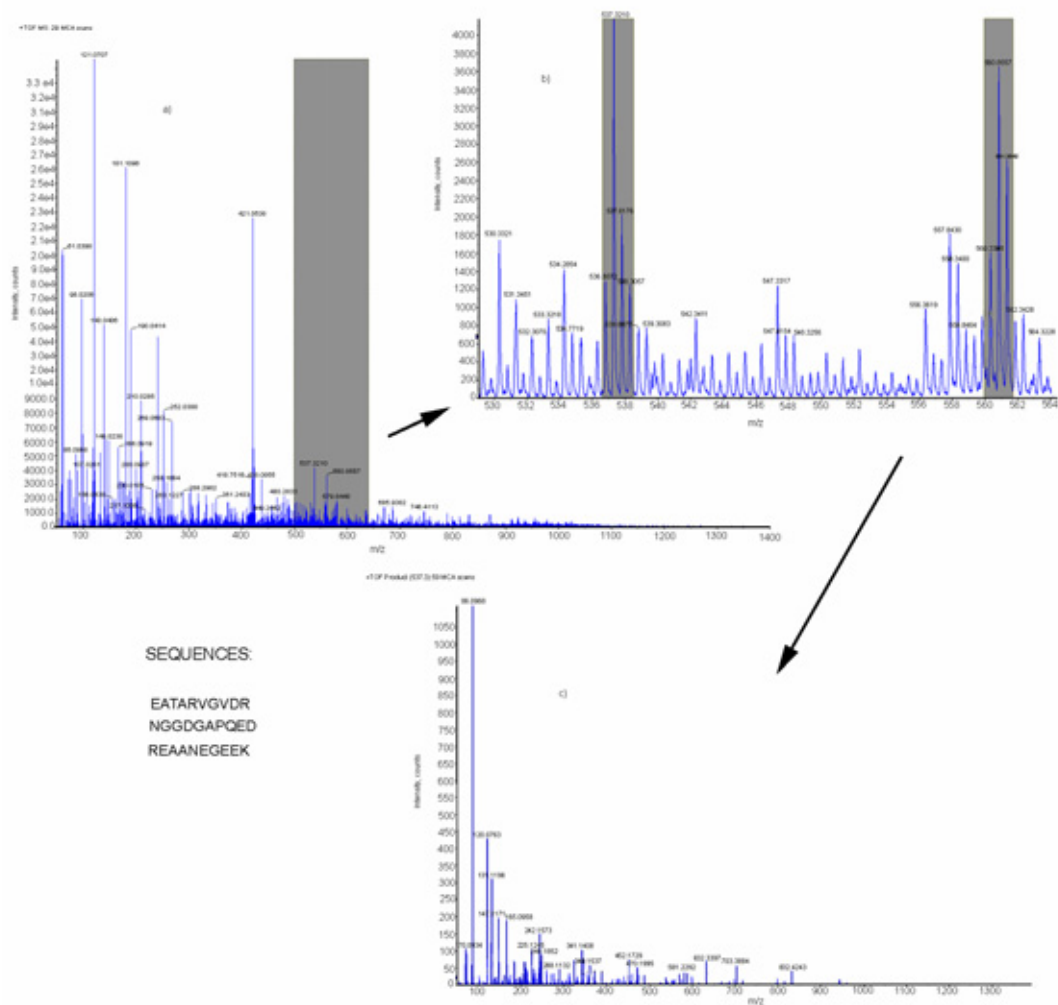
Los datos obtenidos por nano-ESI-MS y nano-ESI-MS/MS se introdujeron en el motor de búsqueda MASCOT, utilizando como base de datos (NCBI y SwissProt), para la identificación de proteínas.

Las secuencias obtenidas son: EATARVGVDR, REAANEGEEK y NGGDGAPQED, que corresponden a la proteína Isocitrato deshidrogenasa (SwissProt N° catalogado, Q40658) con una coincidencia entre la secuencia experimental y la de dicha proteína del 51 %.

La isocitrato deshidrogenasa, está registrada en la base de datos como proteína típica del arroz (*Oryza sativa*). Tiene un peso molecular de aproximadamente 7.204 Da y nunca se había detectado en el piñon (*Pinus pinea*). Sin embargo, su presencia se ha confirmado en otro fruto seco, la castaña (*Castanea sativa*) [24].

En este capítulo, el manganeso y la proteína isocitrato dehidrogenasa, se han detectado por ICP-MS y ESI-MS, respectivamente, en la misma fracción, tras aplicar un procedimiento cromatográfico bidimensional (SEC e IEC), indicando alguna posible interacción de ambos, la cual ha sido descrito otros autores previamente [25].

Figura 7 (a) nano-ESI-MS del producto de la digestión triptica; (b) región ampliada del espectro en el rango 530-560 m/z; (c) MS/MS del ion 537,3 m/z para la secuenciación de la proteína



4 CONCLUSIONES

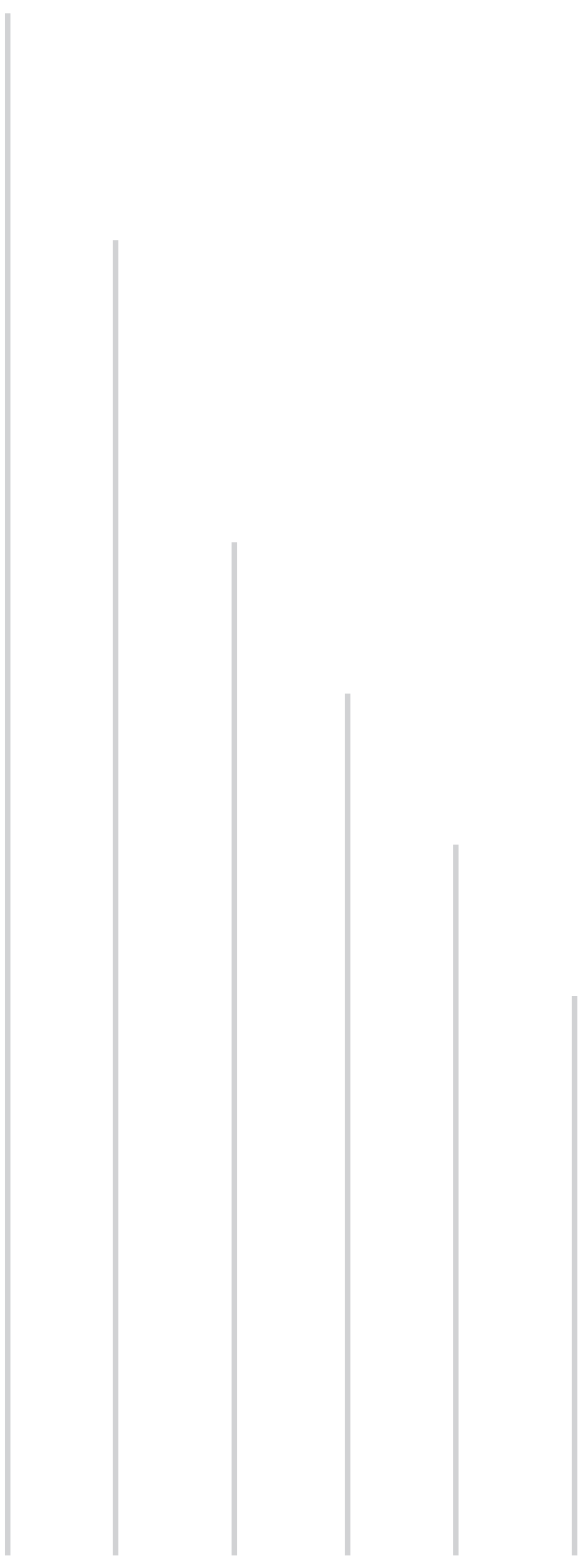
El empleo de sistemas ortogonales cromatográficos, SEC e IEC, permite la purificación de especies de Mn, requisito imprescindible para su identificación por espectrometría de masas molecular. Se ha desarrollado una tercera etapa de purificación basada en la eliminación de sales con una fase reversa que rellena un tubo capilar. Esta purificación ha mejorado la calidad del espectro de MS obtenido y por tanto ha facilitado la identificación de las especies de Mn. Además, el empleo de un detector elemental sensible y específico como el ICP-MS asegura la presencia de este elemento en las fracciones obtenidas mediante SEC y, en el caso específico del sistema ICP-(OCR)MS, elimina cualquier interferencia poliatómica facilitando la detección de este elemento monoisotópico. Por otro lado, el empleo de la fuente de ionización, nano-electronebulización, permite un menor consumo de muestra, y disminuye el tiempo de análisis. Por último, la utilización de espectrómetros de masas de última generación como, QqTOF permite obtener la medida de masas de elevada exactitud.

Con este estudio se ha conseguido probar la asociación de Mn con la proteína isocitrato dehidrogenasa en piñones, que se ha aislado mediante cromatografía bidimensional (SEC e IEC). Los datos de cuantificación del contenido de las especies de Mn en piñones se han publicado por primera vez utilizando el acoplamiento IEC-ICP-MS.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 S. B. Khoo, M. K. Soh, Q. Cai, M. R. Khan, S. X. Guo, *Electroanal.*, 9 (1997) 45
- 2 G. F. Pearson and G. M. Greenway, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 803
- 3 J. S. Crossgrove, D. D. Allen, B. L. Bukaveckas, S. S. Rhineheimer, R. A. Yokel, *NeuroToxicology.*, 24 (2003) 3
- 4 M. Quintana, A. D. Klouda, M. Ochsenkühn-Petropoulou, B. Michalke, *Anal. Chim. Acta.*, 554 (2005)130
- 5 M. Ashner, K. E. Vrana, W. Zheng, *Neurotoxicology*, 20 (1999) 173
- 6 B. Michalke and P. Schramel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004)121
- 7 R. S. Schwartz, L. T. Hecking, *J. Anal. At. Spectrom.*, 6 (1991) 637.
- 8 J. Sadecka, J. Polonsky, *J. Chromatogr. A*, 834 (1999) 401
- 9 B. Koletzko, P. J. Aggett, J. G. Bindels, P. Bung, P. Ferre, A. Gil, M. J. Lentze, M. Roberfroid, S. Strobel, *Br. J. Nutr.*, 80 (1998) S5
- 10 R. G. Wuilloud, S. S. Kannamkumarath, J. A. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379 (2004) 495
- 11 J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera, *J. Chromatogr. A.*, 1121 (2006)191
- 12 H. Fingerová and R. Koplík, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 545
- 13 R. Koplýk, H. Pavelkova, J. Cincibuchova, O. Mestek, F. Kvasnicka, M. Suchanek, *J. Chromatogr. B.*, 770 (2002) 261
- 14 B. Michalke, *J. Chromatogr. A*, 1050 (2004) 69
- 15 M. Kamburova, *Anal. Lett.*, 27 (1994)1999

- 16 M. X. Li and H. Yuan, *Phys. Test. Chem. Anal.*, 34 (1998) 30
- 17 M. D. Bordas and H. A. Das, *J. Radional. Nucl. Chem.*, 207(1996) 325
- 18 N. J. Miller-Ihli, *J. Anal. At. Spectrom.*, 9 (1994) 1129
- 19 K. Danzer and K. Venth, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 350(1994) 339
- 20 R. Koplík, M. Borková, B. Bicanová, J. Polák, O. Mestek and J. Komínková, *Food Chemistry*, 99 (2006)158
- 21 K. C. Teo and J. Chen, *Analyst*, 126 (2001) 534
- 22 M. Gilar, P. Olivova, A. E. Daly, J. C. Gebler, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 6426
- 23 J. Szpunar, *Analyst*, 130 (2005) 442
- 24 S. Pereira-Lorenzo and J. Fernández-lópez, *Fruit Varieties Journal*, 51 (1997)13
- 25 R. S. Ehrlich and R. F. Colman, *The Journal of biological Chemistry*, 256 (1981)1276



CAPÍTULO V

ESPECIACIÓN DE SELENIO EN PATATAS ENRIQUECIDAS CON ESTE ELEMENTO MEDIANTE HPLC-IPC-MS. IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE SELENIO CON ESI-MS/MS.

*T*he chemical speciation of inorganic and organoselenium compounds in food supplements is needed to define their biological roles and cancer prevention efficiency. This requires the development of «state of the art» hyphenated techniques. Successful methods will allow the identification and quantification selenium species in Se enriched food matrices and samples, which is essential to produce better and more efficient fortified food.

In this chapter, a speciation analytical approach has been applied for the first time to selenium species in particular potatoes grown in presence of Se-containing fertilisers with the aim of quantifying and identifying selenium compounds in this food.

For this purpose, reversed phased ion-pairing chromatography (RP-IP-HPLC) coupled to ICP-MS for separation of the selenium species was employed after different extraction procedures, based on the hydrolysis with proteolytic enzymes (which mimics the physiological conditions in the body) or in leaching with water (which mimics food cooking in real life). Extraction of the Se compounds from the bulk and skin potatoes in water were achieved using accelerated solvent extraction (ASE). Identification of selenium compounds was performed by matching the retention time with chromatographic peaks of standards containing different selenium species. RP-HPLC-MS combination with ICP-MS detection was used for the identification de unknown selenium species obtained from the sample. Moreover, the verification of the presence of SeMet and SeMC in the extracts was addressed by reversed-phase HPLC-ESI tandem MS without any pre-treatment of the potatoes extract.

The obtained results have been described in the following article:

- j *Comparison of extraction methodologies for the determination and identification of methyl-Se compounds in selenised potatoes using HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS.* A. Arias-Borrego, E. Warburton, H. Goenaga-Infante and J.L. Gómez-Ariza, **Anal. Bional. Chem.** (submitted).

Actualmente está claramente establecida la necesidad de la determinación, no sólo de la cantidad total de un elemento en una muestra, sino de las distintas especies químicas en que se encuentra distribuido ese elemento en dicha muestra (especiación). La especiación química permite establecer la distribución geoquímica del elemento en el medioambiente, su biodisponibilidad y/o toxicidad en los distintos organismos vivos y seres humanos.

El análisis de especies inorgánicas y orgánicas en suplementos alimenticios es de gran interés para definir rutas metabólicas y prevenir enfermedades muy extendidas. Estos procedimientos analíticos requieren la aplicación de técnicas analíticas de última generación para la identificación y cuantificación de especies elementales.

En este capítulo, se describe por primera vez un método analítico para la especiación de selenio en patatas cultivadas en presencia de fertilizantes que contienen Se, y que son comercializadas en Reino Unido. El objetivo principal es identificar y cuantificar compuestos de este elemento. Para este propósito, se han separado las especies de selenio por cromatografía en fase reversa con pares iónicos (RP-IP-HPLC) acoplados al detector ICP-MS, después de aplicar diferentes procedimientos de extracción, basados en el uso de la hidrólisis enzimática o bien la extracción soluble en agua.

La extracción soluble en agua de los compuestos de Se en la pulpa y piel de las patatas, se llevó a cabo utilizando la extracción acelerada con disolventes (ASE). La identificación de los compuestos de selenio se realizó relacionando el tiempo de retención de los estándares de selenio. Los espectros de masas obtenidos con la fuente electronebulización (ESI-MS/MS) se empleó para confirmar la presencia de especies de selenio.

Los resultados obtenidos en este capítulo se han descrito en la siguiente publicación.

- j *Comparison of extraction methodologies for the determination and identification of methyl-Se compounds in selenised potatoes using HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS/MS.* A. Arias-Borrego, E. Warburton, H. Goenaga-Infante and J.L. Gómez-Ariza, **Anal. Biol. Chem.** (submitted).

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un componente fundamental en más de 30 selenoproteínas funcionales, es un elemento esencial para el hombre, los animales y los microorganismos [1]. Además, este elemento posee un poderoso efecto protector frente a diversas patologías. Tal es el caso de las enfermedades coronarias, en las que se ha observado una correlación inversa entre su desarrollo y los niveles de selenio en sangre [2]. El selenio reduce también el dolor en los enfermos afectados por artritis reumatoide y pancreatitis [3]. Además, este elemento es un potente inhibidor de la replicación del VIH/SIDA *in vitro* [4]. Se han publicado numerosos trabajos que relacionan la deficiencia de selenio con el desarrollo de algunas enfermedades neurodegenerativas como senectud, decadencia cognoscitiva acelerada, Alzheimer, Parkinson o ataques epilépticos en niños [5]. Pero sin lugar a dudas, la característica más importante del Se es su poder anticancerígeno [6, 7].

La principal fuente de este elemento son los alimentos. La ingesta diaria recomendada para un adulto sano, según el Instituto Americano de Medicina «Recommended Dietary Allowance», RDA, debe situarse en un intervalo de 55- 200 μg de Se, cuando se sobrepasan estos valores se pueden presentar tanto estados carenciales como procesos de intoxicación [8]. Por otro lado, tiene especial importancia la biodisponibilidad y toxicidad del elemento, que al igual que otros muchos metales y metaloides depende no sólo de su concentración total sino también de las formas físico-químicas en que se encuentra. De ahí el interés creciente por identificar y cuantificar las especies de selenio presentes en todo tipo de matrices biológicas [9,10], siendo generalmente las especies orgánicas las que presentan una mayor biodisponibilidad [8].

En los últimos años, debido al carácter quimiopreventivo que tiene el selenio, se está utilizando como suplemento nutricional integrado en numerosos alimentos enriquecidos en este elemento. Entre los estudios realizados, los más destacados son en levaduras enriquecidas en selenio, con las que se ha observado una reducción significativa en la

incidencia del cáncer [11]. Otras fuentes nutricionales de Se son las nueces de Brasil que contienen niveles muy altos ($35 \mu\text{g g}^{-1}$) de Se de forma natural [12]. Más recientemente, diversas especies vegetales del género *Allium* (ajo y cebolla) enriquecidas en Se también se han investigado como suplementos dietéticos para la prevención del cáncer y las enfermedades cardiovasculares [12].

Como consecuencia de todo lo anterior, los estudios de especiación de selenio y la puesta a punto de procedimientos analíticos para su determinación en suplementos dietéticos se ha convertido en una prioridad. Ello requiere el desarrollo de técnicas analíticas avanzadas y procedimientos que permitan cuantificar e identificar especies de selenio en muestras y matrices alimenticias enriquecidas, siendo la asimilación de selenio mucho más efectiva que en matrices fortificadas.

En este capítulo se ha desarrollado, por primera vez, un procedimiento analítico para estudiar la especiación de selenio en patatas cultivadas en presencia de fertilizantes que contienen Se, y que son comercializadas en el Reino Unido. El objetivo principal es identificar y cuantificar los compuestos de selenio que son relevantes para la salud humana. Para este propósito, se han separado las especies de selenio por cromatografía en fase reversa por pares iónicos (RP-IP-HPLC) acoplada al detector ICP-MS. Se compararon diferentes métodos de extracción de especies de selenio a partir de muestras sólidas considerando la eficiencia de la extracción y la preservación o no modificación de especies de selenio de interés originalmente presentes en la muestra. Se ha estudiado las posibilidades de la hidrólisis enzimática con proteasa (la cuál reproduce las condiciones fisiológicas en el cuerpo) para liberar compuestos unidos a proteínas como la selenometionina (SeMet). Para compuestos de selenio «libres» o no incorporados a proteínas, como la metilselenocisteína, se ha ensayado la extracción con agua (SeMC). Finalmente, se ha comprobado la extracción de selenometionina soluble en agua empleando dos procedimientos de extracción alternativos: (i) uno que mimetiza la forma usual de cocinar

la patata en el Reino Unido (ebullición de piel y pulpa durante media hora); y (ii) extracción acelerada con disolventes (ASE), empleando agua como extractante.

La identificación preliminar de los compuestos de selenio se realizó por HPLC-ICP-MS utilizando el tiempo de retención de los estándares de selenio como referencia. La confirmación de la presencia de compuestos de Se detectados en las fracciones de patata (pulpa y piel) se realizó por HPLC acoplado a ESI-MS/MS (espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con trampa lineal e ionización por electronebulización a presión atmosférica). Del mismo modo se utilizó esta técnica, para confirmar la presencia de SeMet y SeMC en la fracción desconocida detectada en la piel de la patata, comparando los resultados con los obtenidos por HPLC-ICP-MS. El tiempo de retención de esta fracción no se relaciona con ninguno de los estándares utilizados en el estudio.

2. EXPERIMENTAL

2.1 ESTÁNDAR Y REACTIVOS

Todos los estándares de selenio, Selenato de sodio, Metilselenocisteína (SeMC), Selenometionina (SeMet) y otras sustancias químicas se compraron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), excepto α -glutamil-metilselenocisteína (α -glutamil-SeMC) que fue suministrada por PharmaSe (Lubbock, TX, USA). Las disoluciones primarias de los estándares (1 mg ml^{-1}) se prepararon disolviendo el estándar correspondiente de Se en agua ultra-pura. Estas disoluciones primarias se almacenaron a 4°C en la oscuridad [13].

Las fases móviles utilizadas en RP-IP-HPLC, se prepararon al 2% de metanol (Fisher Scientific, Loughborough, Reino Unido) y 0,1 % de ácido trifluoracético ó ácido fórmico. En la cromatografía de intercambio aniónico, la fase móvil, amonio hidrógeno citrato es suministrada por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

Todos los ácidos (trifluoroacético, nítrico, fórmico) y el peróxido de hidrógeno utilizado en las experiencias, fueron suministrados por Romil (Cambridge, Reino Unido). Todos los reactivos empleados fueron de gran pureza y utilizados sin previa purificación. Las disoluciones se realizaron con agua ultra-pura (18 M&! cm) del sistema de purificación Elga (Elga, Marlow, Buckingham-shire, Reino Unido).

Las disoluciones primarias de Selenio (1000 mg l^{-1}), fueron suministradas por Romil. Para la cuantificación del contenido de Se total se trabajó preparando disoluciones a distintas concentraciones, diluyendo la disolución primaria de 1000 mg l^{-1} Se con una disolución de nítrico al 1% (v/v) en agua y, utilizando germanio como patrón interno en la calibración.

2.2 PREPARACIÓN DE MUESTRA

Las muestras de patatas se pelaron y la pulpa se cortó en pedazos pequeños. La pulpa y la piel se trataron y analizaron como muestras independientes. Posteriormente, todas las muestras se lavaron con agua ultra-pura, se liofilizaron y se molieron utilizando un molinillo convencional. Las muestras se homogeneizaron y se almacenaron en oscuridad a -80°C antes de que se realizara la extracción de los compuestos de Se.

2.3 INSTRUMENTACIÓN

El extracto acuoso de compuestos de selenio (pulpa y piel) se obtuvo por extracción acelerada por disolvente (ASE) utilizando el sistema ASE 200 (Sunnyvale, CA, USA). El fundamento de esta técnica, se basa en el uso de presión y temperatura elevada que activa la lixiviación de las especies a partir de la muestra y modifica la interacción de la muestra con el disolvente. Finalmente, el extracto se centrifuga con centrífuga modelo CENTAUR 2 (Fisher Scientific, Loughborough, Leicestershire, Reino Unido). La hidrólisis enzimática se realizó en un horno de hibridación Modelan HB-2 (Techne, Duxford, Cambridge, Reino Unido) en el cual las muestras se homogenizan y la enzima actúa durante la incubación. El sobrenadante obtenido en la extracción se separa por centrifugación.

Para la digestión ácida de las muestras se utilizó un microondas modelo Multiwave 3000 (Antón Par, Graz, Austria). El liofilizador empleado fue un Super Modulyo (BOC Edwards, Wilmington, MA, EE.UU).

La cromatografía HPLC-ICP-MS, se realizó en un sistema 1100 HPLC Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.) para la separación cromatográfica y un detector ICP-MS Agilent, Modelo 7500i (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) con un nebulizador concéntrico, para la detección elemental. El sistema HPLC estaba equipado con una bomba cuaternaria, desgasificador, muestreador automático y termostatizador de columna.

La separación cromatográfica RP-IPHPLC se llevó a cabo en una columna Agilent Zorbax R_x-C₈ (250 mm x 4.6 mm diámetro interno x 5µm tamaño de partícula). La separación cromatográfica por intercambio aniónico se realizó en una columna Hamilton PRP-X100 (250 mm x 4.1 mm diámetro interno x 10 mm tamaño de partícula) (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA). La columna se acopló directamente al nebulizador concéntrico del ICP-MS, utilizando un tubo de PEEK (30 cm x 0.1 mm diámetro interno) como conector.

Se utilizó El programa cromatográfico Agilent Technologies ICP-MS (G1824C Versión C.01.00) para la integración de la señal cromatográfica obtenida durante el análisis.

Para las experiencias HPLC-ESI-MS y MS/MS, se utilizaron, un espectrómetro de masas 4000 QTRAP™ y un sistema 1100 HPLC Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE.UU.). La adquisición de datos se realizó con el programa ABI Analyst® software versión 1. 4.1.

2.4 PROCEDIMIENTO

2.4.1 Determinación de Selenio total en las muestras digeridas

La determinación de Se total en las muestras digeridas se realizó con el detector ICP-MS, monitoreando los isótopos de ⁷⁷Se y ⁸²Se, y utilizando germanio como estándar interno.

Para la digestión ácida se tomó una alícuota de 0,5000 g de muestra, y se realizó la digestión en un microondas con reactores cerrados con 10 ml de la mezcla $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (50/50, v/v). El programa de potencia del microondas utilizado constaba de cinco pasos: calentamiento a 250 W (1 min.), 250 W (2 min.) y 700 W (7,5 min.). Entre cada paso los reactores se dejaron en reposo, para evitar sobrepresión [14, 15].

Para evaluar la calidad de la determinación de selenio se utilizó un material de referencia de músculo de bacalao CRM 422 (IRMM, Geel, Bélgica) con un valor de concentración certificado Se de $1,63 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ de Se, para evaluar la exactitud del procedimiento. Se obtuvo una recuperación de $99 \pm 2 \%$.

2.4.2 Extracción de los compuestos de Selenio con líquidos presurizados

Para la extracción de los compuestos de selenio se pesaron exactamente 0,2000 g de pulpa y 0,3000 g de piel y se introdujeron en las celdas de extracción ASE (11 ml), las cuales se cargaron previamente con un material inerte adsorbente (hydromatrix®), con objeto de no dispersar la muestra. Para evitar la posible salida de la parte de relleno de la celda, se dispusieron dos filtros de vidrio (GF/B, Whatman) uno en la parte inferior y otro en la parte superior. El disolvente utilizado en la extracción fue 0,1 mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y 0,01 % ditiotreitól (DTT) en agua. El proceso de extracción se repitió dos veces en ciclos de 5 min a 100°C y a 1500 psi.

El DTT se usó como antioxidante y PMSF como inhibidor de la proteasa [16].

Después de la extracción, las celdas se purgaron con nitrógeno durante 200 segundos para facilitar la completa recuperación en la extracción. Este procedimiento se repitió dos veces, utilizando cada vez disolvente nuevo (dos extracciones por cada muestra durante 25 min).

Para determinar el Se total, se diluyó el extracto obtenido en una proporción 1:100 y se analizó por ICP-MS. Para el análisis de especies de Se, el extracto se filtró justo antes de su inyección en la columna HPLC, con filtros de 0,45 μm de acetato de celulosa.

2.4.3 Hidrólisis enzimática

Se añadieron 40 mg de proteasa y 20 mg de lipasa en 5 ml del tampón Tris-HCl a 30 mM (pH 7,5), mezclándose con 0,4000 g de muestra (piel y pulpa). La incubación se realizó a 37 °C en oscuridad durante 16 horas.

Durante la enzimólisis, la muestra se mezcló constantemente con las enzimas en el interior de un incubador. Posteriormente, la muestra hidrolizada se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min y el sobrenadante se filtró, utilizando filtros de 0,45 µm de acetato de celulosa, y se almacenó en el congelador a -20 °C durante no más de tres semanas. A continuación, se realizaron las diluciones apropiadas del extracto obtenido para llevar a cabo el análisis de Se total y de especiación

2.4.4 Especiación de selenio por HPLC-ICP-MS

La separación y elución de los diferentes compuestos de selenio se realizó por RP-HPLC-ICP-MS a un flujo de 0,9 ml min⁻¹, utilizando una fase móvil con un 2 % de metanol y 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA) en agua, en modo isocrático y con un volumen de inyección de 100 µl. Las condiciones de medida se indican en la Tabla 1. La cuantificación de SeMet y SeMC en los extractos de patata se llevó a cabo mediante RP-HPLC acoplado en línea con el detector ICP-MS. La calibración se llevó a cabo por adición estándar, fortificando a tres niveles de concentración.

La cuantificación de selenato no retenido en la columna de fase reversa en el extracto enzimático de patata se llevó a cabo utilizando cromatografía líquida de intercambio aniónico acoplada al ICP-MS (Tabla 1). La fase móvil utilizada fue de amonio hidrogeno citrato (5 mM) a pH 5,9 empleando un flujo de 0,9 ml min⁻¹. La calibración se llevó a cabo por adición estándar, fortificando a tres niveles de concentración.

La identificación preliminar de picos detectados (en piel y pulpa) por HPLC-ICP-MS se llevó a cabo relacionando los tiempos de retención con los estándares utilizados.

Tabla 1 Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC-ICP-MS

Condiciones instrumentales ICP-MS	
Potencia RF	1200
Distancia al cono de muestreo	8,0
Flujo del gas plasmógeno	15 l min ⁻¹
Flujo del gas auxiliar	0,29 l min ⁻¹
Flujo del gas nebulizador	0.89 l min ⁻¹
Tiempo de permanencia	0,1 s por isótopo
S/C Temperatura	2 °C
Isótopos monitoreados	⁷⁷ Se, ⁸² Se
Condiciones instrumentales RP-IP-HPLC acoplado a ICP-MS	
Columna	Zorbax Rx-C ₈ (250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μm)
Fase móvil	0,1% ácido TFA, 2% (v/v) MeOH
Flujo	0,9 ml min ⁻¹
Volumen de Inyección	50 μl
Condiciones instrumentales para el intercambio aniónico HPLC-ICP-MS	
Columna	Hamilton PRP-X100 (250 × 4.6 mm, 5 μm)
Fase móvil	Amonio hidrogeno citrato de (5 mM) a pH 5.9
Flujo	0,9 ml min ⁻¹
Volumen de inyección	50 μl

2.4.5 Fraccionamiento y liofilización, de la fracción desconocida

En la piel de la patata se obtuvo un pico cromatográfico de Se cuyo tiempo de retención (16,7 min) no coincide con ninguno de los dos estándares inyectados (SeMC y SeMet). Esta fracción se aisló desde 16,4 a 17,2 minutos. El fraccionamiento se repitió 17 veces aunque en viales diferentes. Posteriormente se liofilizaron y se homogeneizó el «pool» resultante. La muestra liofilizada se disolvió con 100 μl de agua ultra-pura antes del análisis por RP-IP HPLC-ESI-MS/MS.

2.4.6 *Análisis por RP-IP HPLC-ESI-MS/MS*

Para los experimentos HPLC-ESIMS/MS, se utilizaron un espectrómetro de masas 4000 QTRAP™ (ABI/MDS Sciex) y un sistema 1100 HPLC Agilent Technologies.

La separación y detección por RP-HPLC-ICP-MS se realizó con un flujo de 0,5 ml min⁻¹ utilizando una fase móvil de metanol al 2 % y ácido fórmico al 0,1 % en agua (compatible con la fuente de ionización ESI) [16]. La separación se realizó en modo isocrático con un volumen de inyección de 100 µl, conectado directamente con la fuente electronebulización, como interfase se utilizó un tubo de PEEK (50 cm × 0,1 mm diámetro interno).

En los espectros de masas, los espectros de iones producto se adquirieron en el modo «disociación inducida por colisión» (CID) para todos aquellos iones que contenían selenio, tomando como modelo isotópico característico del Se el observado con el pico cromatográfico de Se de una disolución estándar de SeMet (m/z 198) y SeMC (m/z 184). La confirmación de la presencia de SeMet y SeMC, se realizó en base al tiempo de retención cromatográfico mientras se operaba con el espectro de MS en el modo «monitorización de la reacción seleccionada» (SRM). Este es el modo más sensible ya que solo se detectan transiciones específicas del ión precursor a los iones fragmentos más abundantes obtenidos por CID. La adquisición y tratamiento de datos, se generaron utilizando el programa ABI Analyst® versión 1.4.1.

Los parámetros instrumentales óptimos para las medidas ESIMS/MS en línea con HPLC son los siguientes:

- Voltaje del capilar: 3.2 kV
- Temperatura: 700 grados centígrado
- Gas de nebulización: 80 psi
- Gas cortina: 35 psi
- Potencial *declustering* (DP): 30 V
- Energía de colisión: 24 eV
- Gas de colisión: nitrógeno

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EVALUACIÓN DE Se TOTAL (DIGESTIÓN CON MICROONDAS)

La cuantificación de Se total por ICP-MS después de una digestión asistida por microondas con una mezcla de HNO_3 - H_2O_2 (sección 2.4.1.) (Tabla 2), muestra que el contenido de Se total en la piel de la patata es mucho mayor que en la pulpa. Sin embargo, el porcentaje de selenio orgánico (SeMet) es mayor en la pulpa que en la piel como se muestra en la Tabla 2. Esto puede atribuirse a la presencia en la piel de especies orgánicas de selenio «desconocidas» a priori, que no están relacionadas con ningún estándar utilizado en el estudio, por lo cuál no pueden ser cuantificadas. También la concentración de selenio inorgánico (selenato) es mayor en la piel que en la pulpa.

Tabla 2 Resultados (en base a peso seco de muestra) de Se total y análisis de especiación en patatas. La media y desviación estándar se calcularon para $n=3$

Patata	Se total (ng g^{-1})	SeMet (como Se) (ng g^{-1})
Piel	1990 \pm 40	420 \pm 20 (21%)
Pulpa	670 \pm 20	490 \pm 30 (73%)

3.2 EVALUACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Se compararon dos procedimientos de extracción en términos de recuperación de Se total y SeMet, tanto en la piel como en la pulpa. El primero, se basó en un procedimiento muy simple que reproduce el tratamiento culinario de este alimento en el Reino Unido, generalmente hirviéndolo con agua, se pesa exactamente 0,2000 g de piel y 0,3000 g de pulpa y se hierven en 30 ml de agua durante 30 min. El segundo procedimiento utiliza una técnica mucho más sofisticada y precisa, el uso de la extracción acelerada con disolventes

(ASE), empleando agua con 0,1mM fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y 0,01 % ditionitrotol (DTT) (sección 2.4.2). Este método es una técnica de alto rendimiento de operación, que permite su automatización, y que está especialmente indicado utilizado para la extracción de muestras sólidas y matrices semisólidas. Permite además, el uso de disolventes a elevadas temperaturas y presiones, y una importante reducción de la muestra reducida. En relación al presente estudio puede citarse el empleo para la extracción de compuestos de Se en levaduras [16].

Ambos procedimientos muestran resultados muy semejantes (Tabla 3), con diferencias de concentración de las especies de Se en pulpa y piel. Además, los niveles de selenio obtenidos en la extracción son inferiores, en un 59% y 41%, del Se total evaluado previamente en pulpa y piel, como puede comprobarse al comparar las Tablas 2 y 3. Por otro lado, el selenio extraído, unido a la SeMet representa sólo el 48% y 9% del Se total como SeMet, respectivamente. Es interesante el hecho de que el 42% de la SeMet presente en la piel de la patata puede extraerse con agua. El porcentaje de SeMet que se extrae en agua de la pulpa es aún mayor (aproximadamente 65% del contenido de SeMet total).

Como puede observarse, los resultados obtenidos en ambos procedimientos de extracción son idénticos. Sin embargo, la técnica ASE es más eficiente respecto a la purificación de la muestra para el estudio de especiación.

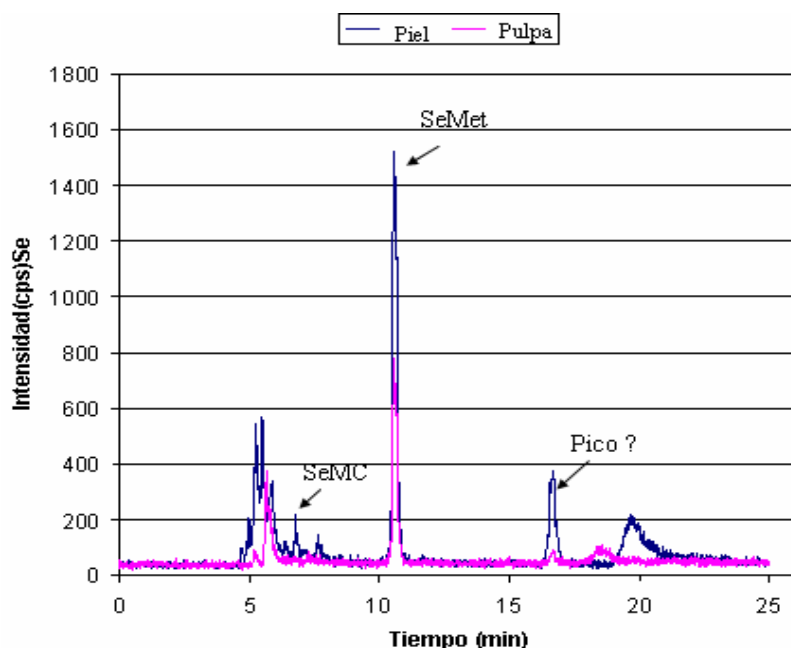
Tabla 3 Concentración (en base a peso seco de muestra) de Se total y de SeMet (ng g^{-1}) extraídos en agua de patatas enriquecidas. La media y la desviación estándar se calcularon para $n=3$

Muestra patata	Concentración de Se total		Concentración de selenometionina (SeMet) (como Se)	
	Agua hervida (ng g^{-1})	ASE (ng g^{-1})	Agua hervida (ng g^{-1})	ASE (ng g^{-1})
Piel	814,1 ± 25.4	815,3 ± 23.8	176,1 ± 7.5	183,1 ± 7.3
Pulpa	397,9 ± 15.9	402,0 ± 12,9	321,4 ± 12.8	321,7 ± 15.4

La Figura 1 indica el perfil de elución de Se (en piel y pulpa de la patata), obtenido por RP-IP-HPLC-ICPMS para la primera extracción realizada por ASE (a 100°C durante 25 min). Se realizó una segunda extracción con ASE, recuperando tan sólo un 10% respecto de la primera. A pesar de este porcentaje de Se tan bajo en el segundo extracto, los dos extractos se mezclaron para la cuantificación por ASE.

Las especies de selenio (Fig.1) son identificadas tentativamente por RP-IP-HPLC-ICP-MS en relación a los tiempos de retención de los estándares estudiados, siendo los tiempos de retención los siguientes: SeMC ($t_r=6,7 \text{ min}$) y SeMet ($t_r=11,6 \text{ min}$) [16]. El extracto parece contener SeMC y SeMet.

Figura 1 Cromatograma RP-IP HPLC-ICPMS ^{82}Se de la extracción acuosa en la piel y pulpa de la patata

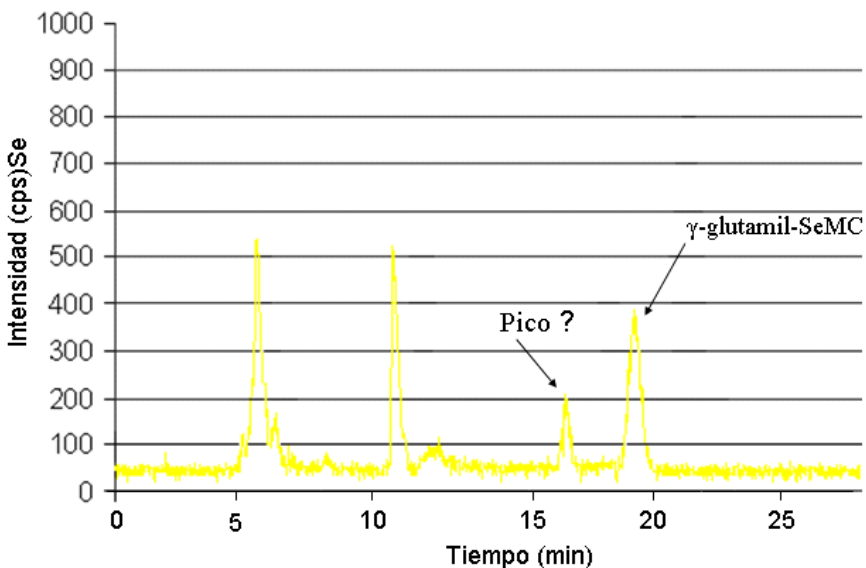


La especiación se destaca porque, el compuesto orgánico principal tanto en la piel como en la pulpa, es la SeMet (Fig.1). Este compuesto tiene especial importancia, porque existen evidencias de que el consumo de alimentos enriquecidos en selenio (ej. trigo),

contiene este elemento de forma mayoritaria como SeMet, que resulta ser una forma química muy efectiva para reducir la probabilidad de aparición de tumores de colon [17]. En general, todas las especies metiladas de selenio de bajo peso molecular, son las que presentan una mayor actividad quimiopreventiva. La metilselenocisteína (SeMC), es otro de los compuestos de selenio que presenta mayor actividad anticancerígena [18]. La Figura 1, muestra la presencia de este compuesto en la piel pero no en la pulpa, en el extracto soluble de este alimento.

El cromatograma obtenido en el extracto de piel de patata, también revela la presencia de un compuesto de Se «desconocido», con un tiempo de retención de 16,7 min. Con el objetivo de establecer la identidad de este compuesto, se añadió al extracto el estándar peptídico γ -glutamil-SeMC (97,3% pureza) y la disolución resultante se analizó por RP-IP-HPLC-ICPMS (Fig.2). Existen publicaciones previas [16], que demuestran la presencia de esta especie en alimentos con suplementos de selenio.

Figura 2 Cromatograma RP-IP-HPLC-ICPMS ^{82}Se , en el extracto acuoso de la piel junto con el estándar peptídico γ -glutamil-SeMC



El cromatograma obteniendo sugiere que el compuesto de Se «desconocido» obtenido en el extracto soluble de la piel de la patata, no se trata del péptido α -glutamyl-SeMC ($t_r = 19,9 \text{ min}$). Por lo que se aisló este pico cromatográfico (sección 2.4.5) para realizar un estudio más exhaustivo por espectrometría de masas.

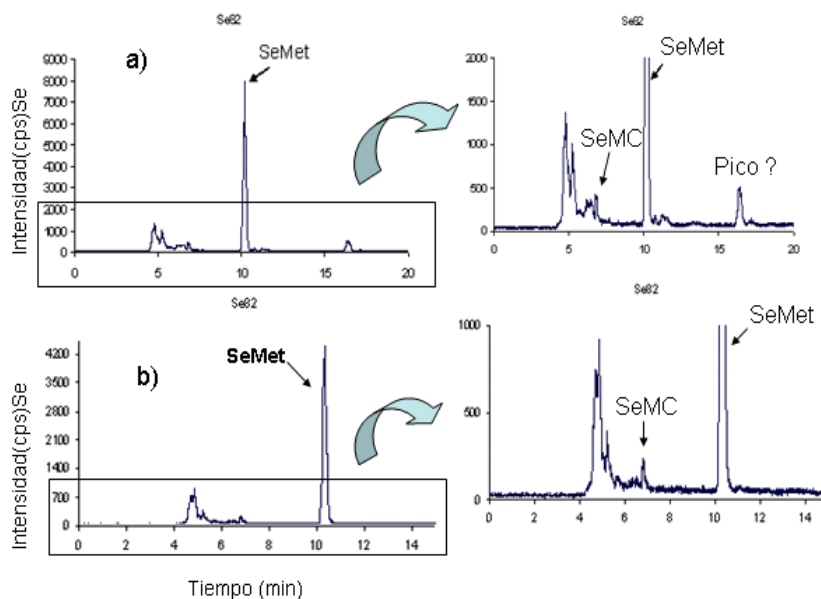
3.3 EVALUACIÓN DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Uno de los métodos más efectivos de extracción de compuestos de Se en muestras biológicas es la hidrólisis enzimática, utilizando Pronasa XIV, este método ya ha sido propuesto en el estudio de especiación de Se en levaduras [16]. Esta enzima permite romper los enlaces peptídicos liberando selenoaminoácidos (mayoritariamente SeMet) y selenio inorgánico.

El uso de enzimas proteolíticas (Pronasa) para la liberación de especies reproduce las condiciones fisiológicas en el intestino humano [16] y permite aumentar el campo de extracción, liberando Se incorporado a proteínas.

En este capítulo la enzimólisis se realizó en la piel y la pulpa de la patata (sección 2.4.3) y se analizó por RP-IP-HPLC-ICPMS. La Figura 3 muestra el perfil cromatográfico obtenido en la extracción enzimática de la piel y la pulpa. Los resultados conseguidos verifican los obtenidos con la extracción soluble. La SeMet sigue siendo el compuesto mayoritario en la patata. Por otro lado, con este procedimiento, es posible detectar la presencia de SeMC en la pulpa y se confirma la existencia del compuesto de Se «desconocido» en la piel. Sin embargo, en esta ocasión el procedimiento no aporta más información, teniendo en cuenta que hay un 44 % y 65 % de SeMet en piel y pulpa, respectivamente, que se ha extraído de la fracción soluble en agua, por lo que más de la mitad de este selenoaminoácido no está incorporado a proteínas.

Figura 3 Cromatograma RP-IP HPLC-ICPMS ^{82}Se de la extracción enzimática, en la piel (a) y pulpa (b) de la patata. A la derecha de la figura se muestra el eje Y ampliado



3.4 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE Se POR HPLC-ESI-MS/MS

3.4.1 Identificación del compuesto mayoritario (SeMet) en patatas enriquecidas en Se

Se utilizó la combinación de una cromatografía de pares iónicos en línea con ESI-MS/MS, para obtener una identificación inequívoca de los picos cromatográficos que contienen selenio. Para ello se empleó la columna Zorbax Rx-C8 (250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μm) (sección 2.4.6), que se acopló directamente al detector ESI-MS/MS en modo SRM.

Las transiciones específicas del ión precursor a iones productos (obtenidos por disociación inducida por colisión) se seleccionan para ser supervisadas por MS/MS, en base a los iones productos obtenidos con el estándar de SeMet, tal como se ha descrito en publicaciones previas [16]. El ión precursor de la SeMet se encuentra protonado

($[M+H]^+$ ión ^{80}Se), y se observa a 198 m/z . Después de aplicar la «disociación inducida por colisión» (CID), los iones producto observados son: 181 m/z (pérdida de OH), 152 (pérdida de CO y H_2O), 135 (pérdida de NH_3 , H_2O y CO), 109 (formación del ión fragmentado $\text{CH}_3\text{SeCH}_2^+$) y 102 (formación del fragmentado $\text{NH}_2\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2^+$).

Este método permite la detección molecular en línea con la fracción cromatográfica, sin la necesidad de dividir el flujo (*split*). Ello mejora la capacidad de detección para identificar las especies de selenio en muestras con matrices verdaderamente complejas, como es el caso investigado en este capítulo.

La Figura 4 muestra el SRMs obtenido para las transiciones más abundantes $198\text{ m/z} > 181\text{ m/z}$ y $198\text{ m/z} > 109\text{ m/z}$, para la disolución estándar de SeMet (Figura 4a) y para el extracto acuosa de la patata (Figura 4b), lo cual ocurre al tiempo de retención de la SeMet ($11,6\text{ min}$). De igual forma se procedió con la extracción obtenida mediante hidrólisis enzimática (Fig.5)

Figura 4 Cromatograma RP HPLC-ESI-MS/MS (SRMs de dos transiciones):
(a) estándar SeMet, (b) extracto acuoso en la patata

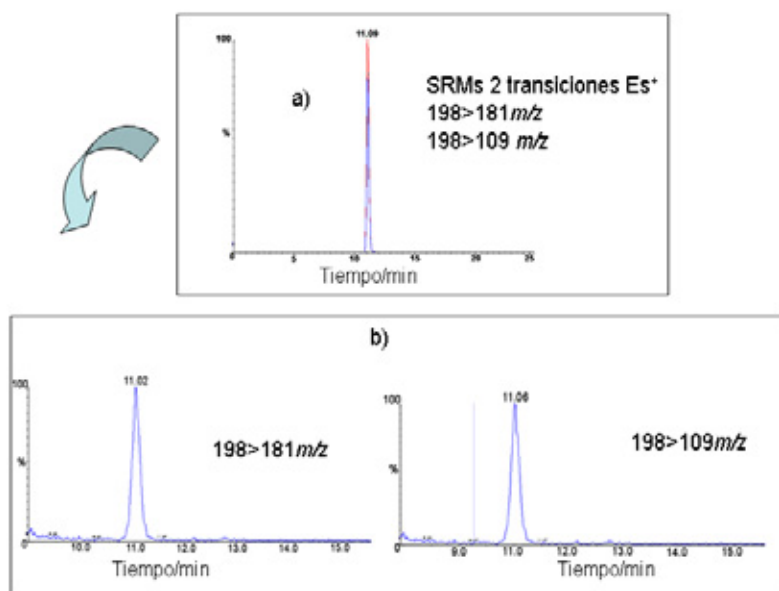
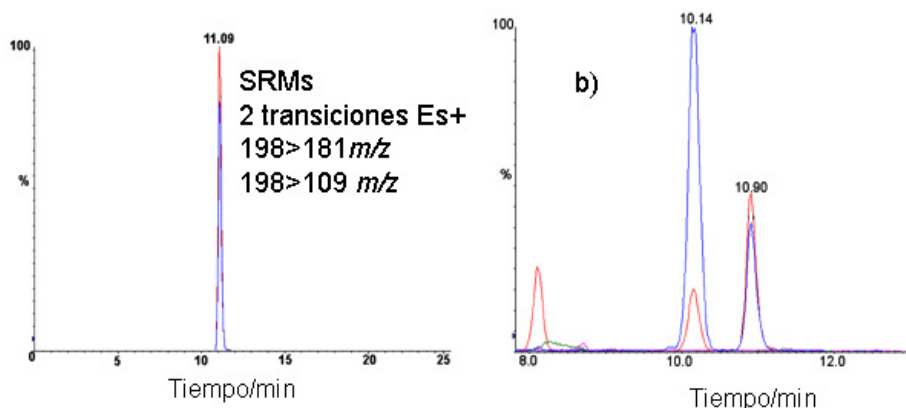


Figura 5 Cromatograma RP HPLC-ESI-MS/MS (SRMs de dos transiciones):
 (a) estándar Semen; (b) extracto enzimático en la patata



La abundancia relativa obtenida en las dos transiciones en los dos extractos de la patata, se relacionaron comparativamente con el estándar, admitiendo un $\pm 4\%$ de diferencia ($100 \cdot \text{área pico } m/z \text{ en extracto} / \text{área pico } m/z \text{ en estándar}$). Esto se considera, una prueba de identidad de SeMet en los extractos.

3.4.2 Verificación de la fracción desconocida

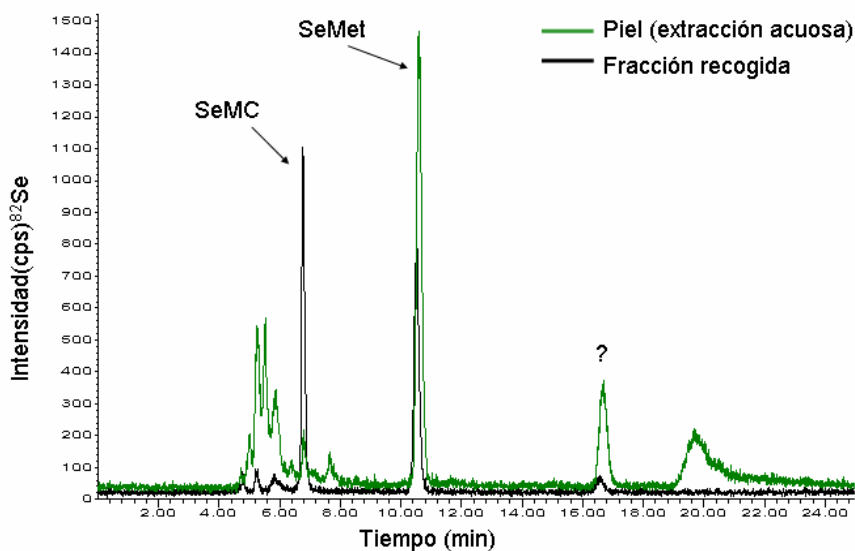
El pico del compuesto de Se «desconocido» ($t_r = 16,7 \text{ min}$), se aisló y se trató específicamente como se ha descrito en la sección 2.4.5, antes de su estudio.

Una vez realizado el «pool», se inyectaron $20 \mu\text{l}$ al sistema IP-HPLC-ICP-MS con un flujo de $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, utilizando las mismas condiciones cromatográficas desarrolladas en HPLC-ESI-MS/MS.

La Figura 6 muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPLC-ICP-MS para la fracción desconocida, revelando una posible degradación fruto de algún proceso de

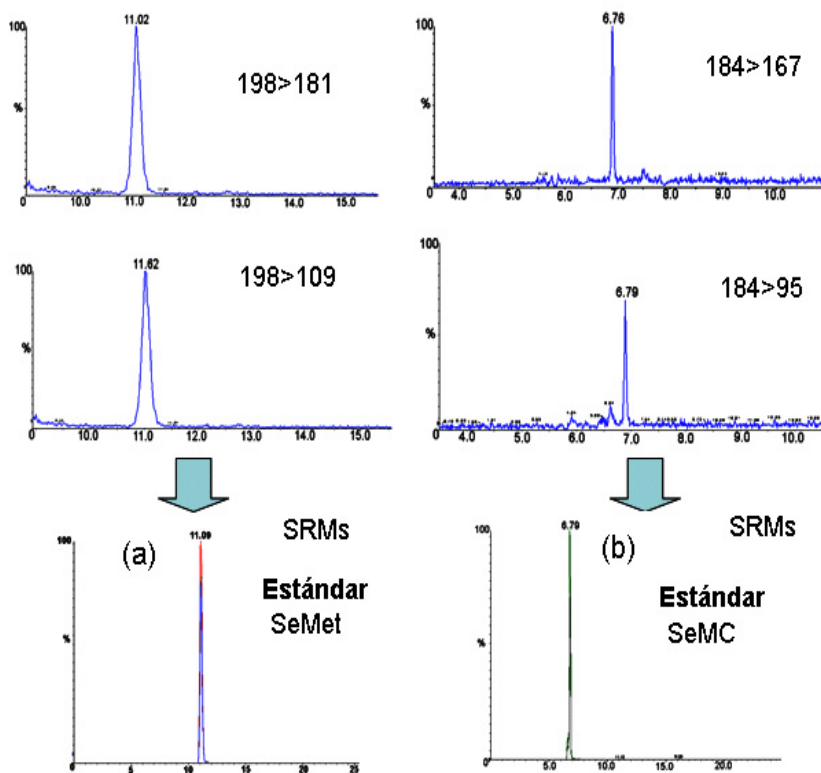
oxidación del compuesto, dando lugar dos subproductos (SeMet y SeMC). El nuevo tiempo de retención en el cual aparecen los compuestos de interés, se comprobaron por comparación con los tiempos de retención de los estándares. Adicionalmente, se realizó un estudio por espectrometría de masas por ESI-MS/MS en modo SRM.

Figura 6 Cromatograma RP HPLC-ICP-MS; Línea negra corresponde al perfil obtenido con la fracción recogida y la línea verde al perfil obtenido en la extracción acuosa en la piel



La Figura 7 muestra el SRMs obtenido para las transiciones; $198\ m/z > 181\ m/z$ y $198\ m/z > 109\ m/z$ para la disolución estándar de SeMet (Figura 4a). Las transiciones más abundantes $184\ m/z > 167\ m/z$ y $184\ m/z > 95\ m/z$ para la disolución estándar de SeMC (Figura 7a) y para la fracción recogida (Figura 7b), lo cual ocurre a un tiempo de retención de SeMet (11,6 min) y SMC (6,7 min). Estos resultados sugieren que SeMet y SeMC están presentes en la fracción desconocida, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por IP-HPLC-ICP-MS.

Figura 7 Cromatograma RP HPLC-ESI-MS/MS (SRMs de dos transiciones, en el estándar SeMet y SeMC, en la fracción recogida



4. CONCLUSIONES

El acoplamiento en línea de la cromatografía en fase reversa con ICP-MS y electronebulización con espectrometría de MS en tandem, hace posible la cuantificación e identificación de SeMet (como especie mayoritaria) y SeMC (como especie minoritaria) en patatas enriquecidas en selenio. Este alimento está siendo comercializado en la actualidad en el Reino Unido como suplemento alimenticio en selenio.

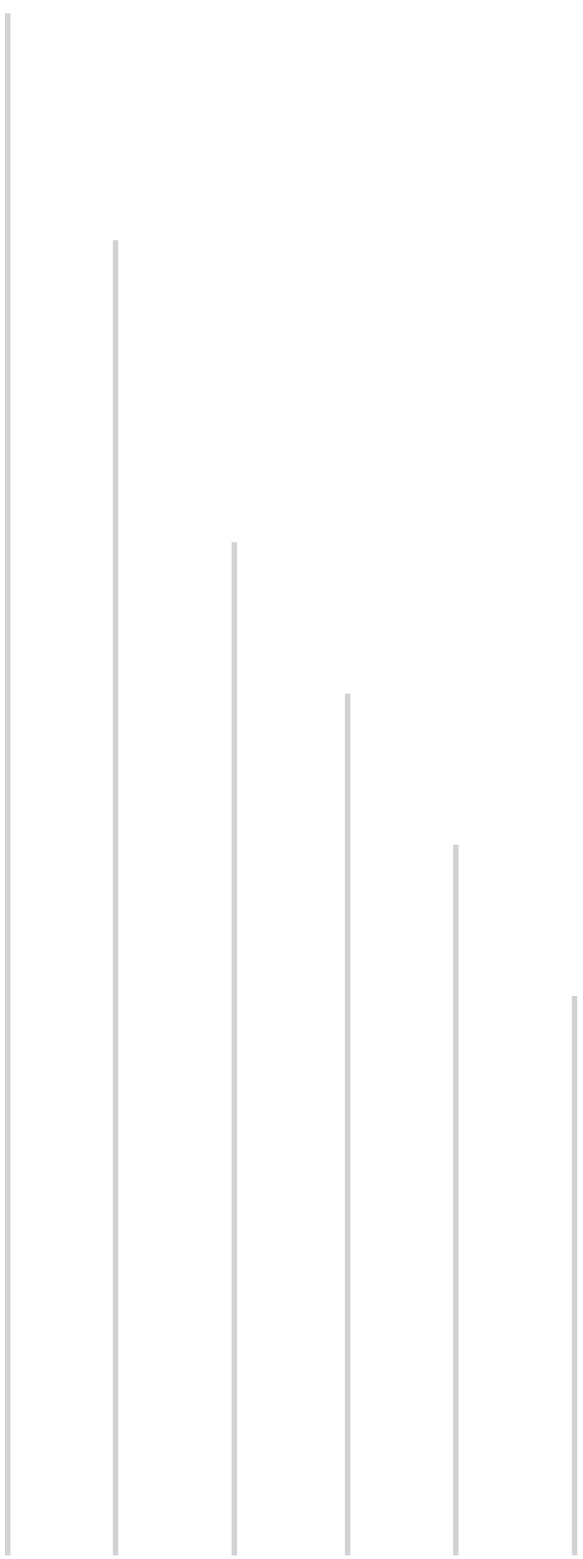
La especiación revela claras diferencias entre la piel y la pulpa de la patata, identificándose un alto porcentaje de SeMet (principalmente incorporada en proteínas), y bajo porcentaje de selenato (selenio inorgánico tóxico) en la pulpa en comparación con la piel.

Por último, se ha detectado en la piel una especie de selenio desconocida (minoritaria) relacionada con la SeMet y la SeMC, siendo necesario continuar en estudios futuros el desarrollo de métodos para la identificación de este compuesto, con ayuda de procedimientos de purificación muy eficientes para matrices reales y complejas.

BIBLIOGRAFÍA

1. K. M. Brown, J. M. Arthur, *Public Health Nutr.*, 4 (2001) 593
2. M. Navarro-Alarcón, H. López-G de la Serrana, V. Pérez Valero, M. C. López Martínez., *Ann. Nutr. Metab.*, 43 (1999) 30
3. U. Tarp, *Analyst*, 120 (1995) 877
4. H. Tapiero, D. M. Townsend, K. D. Tew, *Biomed. Pharmacother.*, 57(2003) 134
5. M. P. Rayman, *Proc. Nutr. Soc.*, 61 (2002) 203
6. P. D. Whanger, *Br. J. Nutr.*, 91 (2004) 11
7. M. P. Rayman, *Proc. Nutr. Soc.*, 64 (2005) 527
8. M. P. Rayman, *Lancet*, 356 (2000) 233
9. B. Michalke, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 670
10. M. G. Cobo-Fernandez, M. A. Palacios, D. Chakraborti, Ph. Quevauviller, C. Camara, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 438
11. S. Y. Yu, Y. J. Zhu, W. G. Li, *Biol. Trace Elem. Res.*, 56 (1997) 117
12. H. Goenaga-Infante, R. Hearn, T. Catterick, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 957
13. O. A. Levander *Ann. Rev. Nutr.*, 7(1987) 22

14. V. Díaz Huerta, L. Hinojosa Reyes, J. M. Marchante Gayón, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 1243
15. F. A. Rivero, M. L. Fernández Sánchez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta*, 442 (2001) 191
16. H. Goenaga-Infante, G. O'Conor, M. Rayman, W. Raimund, J. Entwisle, P. Norris, R. Eran, T. Catterick, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 1529
17. J. W. Finley, C. D. Davis, *Biofactors*, 14 (2001) 191
18. P. D. Whanger, *J. Am. College Nutr.*, 21 (2002) 2



CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

The results obtained in this study can be summarized in the following general conclusions:

1. The use of both instrumental systems ESI-QqTOF and APPI-QqTOF represents a good alternative for edible oils fingerprinting. These couplings involving powerful ionization sources and highly discriminant mass analyzers, namely QqTOF-MS, provide a high resolution for multi-component matrices such as vegetable oils. These instrumental systems enable a very simple sample handling and high sample throughput, because no chromatographic separation is required.
2. The QqTOF system allows the unequivocal identification of the compounds on the basis of exact mass measurement. In addition, the method is rapid, reliable and precise. The equipment is robust, with low the maintenance and allows information-rich mass spectra.

3. ESI and APPI sources are complementary on the basis of the higher sensitivity of ESI for triacylglycerols and APPI for monoacyl- and diacylglycerol fragment ions. Reproducibility of the analysis is very high but APPI provides better results. In addition, some fragments such as $[R_1CO-H_2O]^+$, corresponding to the lost of water from the acylium ion only can be detected by APPI-MS.
4. Both ESI- and APPI-QqTOF can be used for olive oil adulteration diagnosis, because the discrimination from commonly used adulterants is allowed. The PCA of olive oil allows a safe evaluation of authenticity and provides a precise classification of other edible oils and their mixtures. The application of LDA verifies methods reproducibility, especially with the APPI source, and gives additional evidences of the presence of adulterants.
5. The multielemental fractionation in pine nuts from *P. pinea* allows a good discrimination between samples from different geographic origins. The use of SEC-UV-ICP-MS represents a powerful tool to distinguish them using the fractionation patterns of elements. Two chemical descriptors, multielemental fractionation and total metal concentration in pine nuts can be used to survey samples from different geographic origins, which have been confirmed by applying unsupervised pattern recognition techniques to samples from a number of areas from Spain and Portugal. However, the best choice to survey pine nuts provenance is the combined use of the total elements concentration and their multielemental fractionation profiles.
6. The analyzed elements (Mn, Ni, Cu y Zn) are associated to LMW fractions, indicating the possible linkage of these elements to proteins. Manganese is the most abundant element in these samples, for this reason this element is studied separately. Results obtained show that this element explains a higher percentage of the total variance in the PCA. Therefore, the use of Mn as chemical descriptor is enough to survey the provenance of the samples and represent a simpler

alternative, although better results are obtained when all the elements are considered.

7. Advances in analytical methodology for speciation of manganese in pine nuts are developed. The approach was based on the use of orthogonal chromatographic systems namely size exclusion chromatography of the extracts and ion exchange separation of the fractions collected by the previous column.
8. The use of orthogonal chromatographic systems, SEC and IEC, allows the purification of Mn species, which is mandatory for molecular mass spectrometry identification.
9. A third purification step based on a reversed phase desalting onto a nano capillary is developed to improve the identification of these species.
10. The use of a sensitive elemental specific detector as ICP-MS for Mn elution monitoring ensures the presence of this element in SEC fractions and, when an octopole reaction cell is used, any polyatomic interference is eliminated.
11. The use of the nanoelectrospray probe allows low sample consumption, permitting the fragmentation of all the ion in the mass spectra, and an accurate mass measurement is attained by means of TOF-MS.
12. The approach applied (SEC/IEC-ICP-MS with ESI-MS/MS) allows the identification of manganese and dehydrogenase, in the same fraction after two-dimensional SEC plus IEC chromatography. Quantification data of some Mn containing species in pine nuts are reported for the first time by using IEC-ICP-MS.
13. The selenium (Se) composition of white British potatoes grown in the presence of Se-containing fertilisers has been studied by high performance liquid chromatography (reverse phase ion pairing and anion-exchange) combined with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)

14. The combination of reversed-phase ion-pair chromatography with ICP-MS and electrospray tandem MS detectors allow identification of SeMet and SeMC in food supplements.
15. Preliminary identification of Se-methionine (SeMet) and Se-methyl-Se-cysteine (SeMC) (thought to have beneficial health effects) and of toxic species such as selenate, in potato skin and bulk has been achieved.
16. The speciation data reveal clear differences between potato skin and bulk; a higher percentage of SeMet and a lower percentage of selenate can be found in potato bulk in comparison with skin.
17. ASE is more efficient than boiling with respect to sample clean-up for speciation analysis. Both methods led to losses of about 59 and 41% of total Se from bulk and skin, respectively, owing to leaching with water.
18. This approach permit detects unknown Se species in extracts of skin.

A partir de los resultados obtenidos en los estudios realizados que se recopilan en esta memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

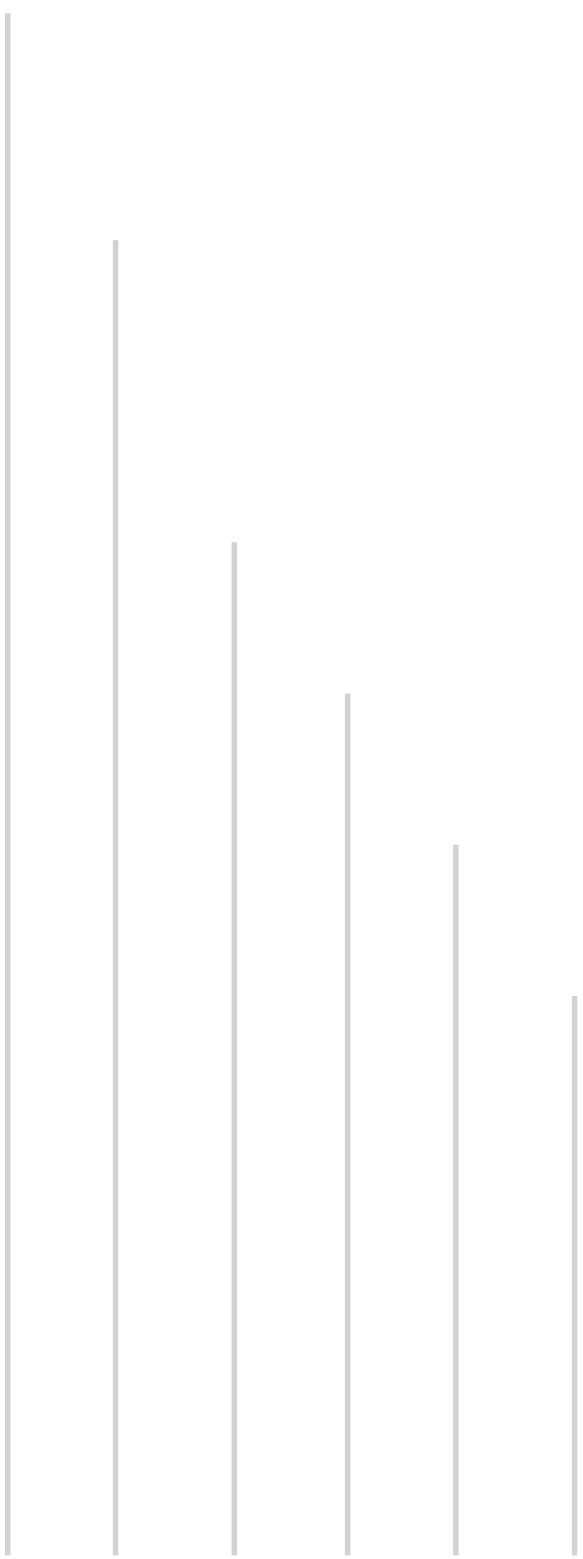
1. Se han desarrollado métodos rápidos para la autenticación del aceite de oliva mediante espectrometría de masas, con el uso de fuentes de ionización (ESI y APPI) acopladas a cuadrupolo-tiempo-de vuelo QqTOF.
2. Las fuentes de ionización ESI y APPI acopladas al sistema QqTOF constituye una buena alternativa para obtener espectros de masas que podemos considerar «huellas dactilares» de los distintos aceites comestibles estudiados.
3. Estos sistemas instrumentales (ESI-QqTOF y APPI-QqTOF) permiten un tratamiento de muestra muy simple al no requerir separación cromatográfica previa y un tiempo de análisis muy corto (1 minuto por muestra).
4. Las fuentes ESI y APPI aportan información analítica complementaria. ESI es una fuente de ionización que ofrece gran sensibilidad en la detección de aductos de los TAGs (compuestos mayoritarios), mientras la APPI facilita información valiosa de los patrones de fragmentación.
5. Se han aplicado herramientas estadísticas, como el ACP, que permite una evaluación inequívoca de la autenticidad del aceite de oliva y proporciona una clasificación precisa de otros aceites comestibles y sus mezclas. El uso de LDA verifica la repetibilidad del método, sobre todo con la fuente APPI, y proporciona pruebas adicionales de la presencia de adulteraciones.
6. Se ha desarrollado un procedimiento para la extracción de metalobiomoléculas a partir de los piñones (*Pinus pinea*) y la separación posterior de las fracciones que contienen biomoléculas unidas a metales mediante el acoplamiento SEC-UV-ICP-MS.

7. Se han estudiado muestras de piñones de tres localizaciones en ocho regiones forestales diferentes de la península Ibérica que constituyen las áreas de mayor producción de este fruto en España y Portugal, lo que representa un total de 24 muestras.
8. Se ha comprobado que los elementos (Mn, Ni, Cu y Zn), con gran importancia metabólica, están estrechamente relacionados con biomoléculas de distinto tamaño molecular. La aplicación del sistema SEC-UV-ICP-MS a las muestras revela la presencia de perfiles cromatográficos diferentes en función de la procedencia de las muestras.
9. Se han identificado cuatro descriptores químicos que permiten la clasificación de las diversas muestras en función de su procedencia. (i) las concentraciones de elementos; (ii) las abundancias relativas en los perfiles SEC-ICP-MS; (iii) la concentración de manganeso en las muestras; y (iv) Las abundancias relativas de las especies de manganeso en las muestras.
10. Se han estudiado estadísticamente los resultados obtenidos mediante el acoplamiento SEC-UV-ICP-MS, permitiendo distinguir la procedencia de piñones (*Pinus pinea*). En la mayoría de las muestras analizadas, los elementos están unidos a especies de bajo peso molecular (LMW), lo que indica que podrían tratarse de proteínas de bajo peso molecular o péptidos.
11. La abundancia relativa de las especies de elementos en los perfiles cromatográficos obtenidos mediante SEC-ICP-MS en combinación con la concentración de Mn, Ni, Cu y Zn, es el mejor descriptor químico para discriminar muestras de orígenes geográficos diferentes.
12. El Mn es el elemento más abundante en las muestras estudiadas y el uso de este elemento como descriptor químico permite alcanzar resultados muy

valiosos. Lográndose un método rápido y simple para establecer el origen geográfico. No obstante, los resultados son superiores al considerar todos los demás elementos en el análisis estadístico por ACP.

13. Se han desarrollado métodos de especiación de manganeso en piñones por cromatografía bidimensional con detección UV/ICP-MS, e identificación mediante espectrometría de masas.
14. El empleo de sistemas ortogonales cromatográficos, SEC e IEC, permite la separación de especies de Mn, lo cual es imprescindible para la identificación por espectrometría de masas molecular.
15. Se ha desarrollado un procedimiento de purificación, basado en la eliminación de sales con fase reversa en un capilar, lo cual ha mejorado la calidad del espectro de MS obtenido y por tanto ha facilitado la identificación de las especies de Mn.
16. Se han utilizado detectores elementales muy sensibles y específicos, como el ICP-MS, que asegura la presencia de este elemento en las fracciones obtenidas mediante SEC y, en el caso específico del sistema ICP-(OCR)MS, se elimina cualquier interferencia poliatómica facilitando la detección de este elemento monoisotópico. Por otro lado, se han empleado una fuente de nanonebulización para lograr la ionización de las muestras, de esta forma se reduce considerablemente el consumo de muestra, y disminuye el tiempo de análisis.
17. Se han utilización espectrómetros de masas de última generación como, QqTOF, que permite obtener la medida de masas de elevada exactitud
18. Se ha demostrado la asociación de Mn con la proteína isocitrato dehidrogenasa en piñones, después de una cromatografía bidimensional (SEC e IEC).

19. Se ha desarrollado un método de especiación de selenio en suplementos alimenticios (patatas enriquecidas con selenio) por HPLC-ICP-MS con identificación por ESI-MS/MS. El acoplamiento en línea de la cromatografía de fase reversa con ICP-MS y ESI-MS en tandem, hace posible la cuantificación e identificación de SeMet y SeMC en patatas enriquecidas en selenio, que están siendo comercializadas en Reino Unido.
20. Se han identificado grandes diferencias entre la piel y la pulpa de la patata, encontrándose un alto porcentaje de SeMet (principalmente incorporada a proteínas) y bajo porcentaje de selenato (selenio inorgánico, el cual es tóxico) en la pulpa en comparación con la piel.
21. Se ha identificado una especie de selenio desconocida (minoritaria) en la piel de la patata, demostrándose su estrecha relación con SeMet y SeMC, siendo necesario continuar en estudios futuros el desarrollo de métodos para la identificación de este compuesto, con ayuda de procedimientos de purificación de alto nivel de eficiencia para matrices reales y complejas.



ANEXOS

Use of flow injection atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry for fast olive oil fingerprinting

J. L. Gómez-Ariza*, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera

Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain

Received 17 December 2005; Revised 10 February 2006; Accepted 14 February 2006

The recently introduced technique of an atmospheric pressure photoionization (APPI) source coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QqTOFMS) has been applied to fast olive oil fingerprinting on the basis of the accurate mass measurements obtained with this instrumentation. The key compounds can be characterized as $[M+H]^+$ (produced by proton transfer) or as $[M]^+$ (by charge transfer) ions in the mass spectra. $[M+H]^+$ ions, however, show higher abundance, especially for triacylglycerols. Other ions present in APPI-MS are the acylium ion $[R_1CO]^+$ and $[R_1CO-H_2O]^+$. This latter ion is absent in the electrospray ionization (ESI-MS) spectra, and this represents valuable complementary information. Several critical parameters in the APPI source were optimized such as LC eluent composition, ion spray voltage and, especially, declustering potential. APPI-QqTOFMS allows easy discrimination among different edible oils: olive, extra virgin olive, olive-pomace, hazelnut, sunflower, corn and several mixed oils, with high throughput (approximately 1 min per sample). Cluster analysis was applied to obtain the best experimental conditions for oil discrimination on the basis of declustering potential. Principal components analyses of these APPI-MS spectra show that the approach can be used for studies of olive oil adulteration with other oils, even in the case of hazelnut oil that exhibits a high chemical similarity with olive oil. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

Food quality control and authenticity are of great economical and social importance for food producers and consumers. Authenticity studies help to guarantee the quality of food products, preventing both the overpayment caused by adulteration and consumers being misled as a result of ambiguous or improper product labeling.¹ Olive oil is one of the most important constituents of the Mediterranean diet due to its potential health benefits.² Olive oil is particularly expensive and this may present the opportunity for producers to adulterate it with cheaper vegetable oils of lower quality. This is critical because the healthy properties of olive oil are strongly related to its composition, and the levels of triacylglycerols (TAGs) have been established as an indicator of the quality and purity of fats and oils.³ For this reason these compounds are considered to be good fingerprints for the detection of adulteration.⁴ Rapid and reliable analytical procedures for the measurements of TAGs are therefore necessary to assure the quality of this food.

A number of analytical techniques have been proposed for the fast authentication of the quality of olive oil, such as

pyrolysis-mass spectrometry,⁵ nuclear magnetic resonance (NMR),⁶ Raman spectroscopy,⁷ gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)⁸ and direct head-space mass spectrometry (HS-MS).⁹ These techniques are now being almost totally replaced by high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) coupled to MS in combination with either electrospray ionization (ESI) or atmospheric pressure chemical ionization (APCI).¹⁰

Atmospheric pressure photoionization (APPI) has been recently introduced by Syage and Evans¹¹ for non-polar compounds prior to their analysis by MS. This source represents an alternative to APCI and ESI.^{12,13} The commonly used mass analyzers for this purpose are quadrupole, ion trap and time-of-flight as well as tandem mass analyzers with higher resolution, especially, triple-quadrupole and quadrupole time-of-flight (QqTOF).¹⁴ The ESI source is suitable for polar compounds either in positive and negative ionization mode, producing ions for protonated or deprotonated molecules with little fragmentation. Ionization of lower polarity compounds is better performed by APCI, but compounds with little or no polarity are insufficiently ionized by either of these sources. To overcome this problem alternatives have been proposed, such as dissociative and

*Correspondence to: J. L. Gómez-Ariza, Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain.

E-mail: ariza@uhu.es

Contract/grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT); contract/grant number: REN2002-04366-C02-02.



1182 J. L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera

non-dissociative electron-capture ionization with APCI,^{15,16} the combination of an electrochemical stage with ESI,^{17,18} coordination ionspray,^{19,20} and, more recently, APPI.

In 2001, Syage and Evans¹¹ introduced an API approach based on single-photon ionization (APPI), which vaporizes the sample using a heated nebulizer²¹ prior to ionization being induced. The ionization step is initiated by radiation in the visible/ultraviolet range, generally produced by a discharge lamp. Photon absorption by a molecule *M* starts the photoionization process. This photoabsorption produces ejection of an electron to form the corresponding molecular radical cation, $[M^{\cdot+}]$.²² Other molecules present in the ionization region, i.e. LC solvents, have ionization energies higher than the photon energy and the photoionization process should be specific towards the analyte. However, the presence of protic solvents and other molecules in large excess can produce further modifications in the $M^{\cdot+}$. Likewise, in the presence of water vapor or protic solvents, $M^{\cdot+}$ can extract a H atom to form a protonated molecule $[M+H]^+$, when *M* has a high proton affinity.²² This fact is the basis of dopant-assisted APPI introduced by Robb *et al.*²¹ that uses a large quantity of a directly photoinizable compound (dopant) in the liquid stream to enhance the analyte ionization. Therefore, the use of dopant-assisted APPI improves ionization sensitivity, although it could induce adduct formation thereby increasing the complexity of the mass spectra.^{22,23} Acetone, toluene and anisole have been proposed for this purpose.²³

Until now, only a few applications based on the use of APPI have been reported. The initial work on dopant-assisted APPI from Robb *et al.*²¹ considered two series of test compounds with different functional groups. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments,²⁴ flavonoids²⁵ and steroids,²⁶ and several drugs, and their metabolites,^{27,28} have been analyzed using this source. In addition, APPI has been used for residue analysis (patuline) in apple juice.²²

This paper is focused on the optimization of the declustering potential to study its capability in combination with a QqTOF mass spectrometer for the authentication of complex food matrices such as olive oil. The approach avoids the use of chromatographic techniques and allows olive oil fingerprinting for fast adulteration assessment.

EXPERIMENTAL

Reagents and sample preparation

The solvents, HPLC-grade dichloromethane, methanol, acetonitrile and toluene, were purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain). Water was purified with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Watford, UK).

Oil samples (olive oil, extra virgin olive oil, olive-pomace, hazelnut oil, sunflower oil and corn oil) were supplied by Olivas Cooperative (Huelva, Spain) and stored at 4°C.

All oils were 1000-fold diluted with a mixture of 60% dichloromethane/40% methanol (v/v). Any further sample preparation was not needed prior to analysis.

Instrumentation

All experiments were performed with an API QSTAR[®] XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

using an APPI source. A model KDS 100 syringe pump from KD Scientific (New Hope, PA, USA) was used to deliver the dopant to the APPI source. The samples were introduced using an autosampler module and the eluent was fluxed with a binary pump (Agilent 1100 series).

The operating conditions for the flow injection analysis were as follows: samples were injected into a 5- μ L loop at a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ provided by the LC pump using 50% aqueous methanol as mobile phase. The dopant (toluene) was delivered at 0.05 mL min⁻¹ by the syringe pump. Three different eluents, acetonitrile, methanol and water, were studied mixed in different proportions. The 50% (v/v) aqueous acetonitrile provided good sensitivity for the peaks in the mass spectra but, when this solvent was substituted by methanol, the signal was improved significantly. These results are in agreement with others previously reported²² and methanol/water mixtures were selected for further experiences.

The ion spray voltage in the APPI source was fixed at 1500 V with a declustering potential (DP) of 80 V and the instrument operated in the positive ion mode. Full-scan spectra were acquired in multiple channel acquisition (MCA) for 1 min scanning the range *m/z* 100–1100. The ion energy (IE) was fixed at 2.0 V with a channel electron multiplier (CEM) of 2300 V. The collision energy in the product ion mode varied between the experiments and therefore was optimized as appropriate.

The ion-block temperature was maintained at 350°C to ensure that the liquid dopant was vaporized immediately and then swept by the auxiliary gas through the heated quartz tube up to the photoionization unit, together with the LC eluent.²¹

High-purity nitrogen was used as nebulizer, curtain gas and heater gas, at flow rates about 1.50, 1.13 and 6 L min⁻¹, respectively.

Chemometrics

Computations were performed by using the statistical package STATISTICA version 6.0 (2001) (StatSoft, Tulsa, USA). Pattern recognition methods (cluster analysis and principal components analysis) were applied to APPI-MS spectra.

RESULTS AND DISCUSSION

APPI mass spectra

Full-scan APPI mass spectra were obtained from the diluted samples using toluene as dopant. The triacylglycerols (TAGs) were identified as protonated molecules, $[M+H]^+$ (Fig. 1). Table 1 shows the peaks for triolein (OOO), at *m/z* 885.8, dioleoyl-palmitoyl-glycerol (POO), at *m/z* 859.8, and dioleoyl-linoleoyl-glycerol (LOO), at *m/z* 883.8. Characteristic fragment ions are formed by the loss of an acid molecule from the $[M+H]^+$ ion of TAGs, fragment 1 in Fig. 2. Other abundant fragment ions in the mass spectra of TAGs (fragment 2) are formed by subsequent losses of an acid molecule and a fragment that forms the acylium ion, $[R_1CO]^+$.²⁹ In addition, other important ions³⁰ are $[R_1CO]^+$ and $[R_1CO-H_2O]^+$ at *m/z* 265 and 247 for oleic acid, respectively (Table 2). Diacylglycerol (DAG) fragments (fragment 1) are the predominant ions and can be used for

RCM

Fast olive oil fingerprinting by APPI-MS 1183

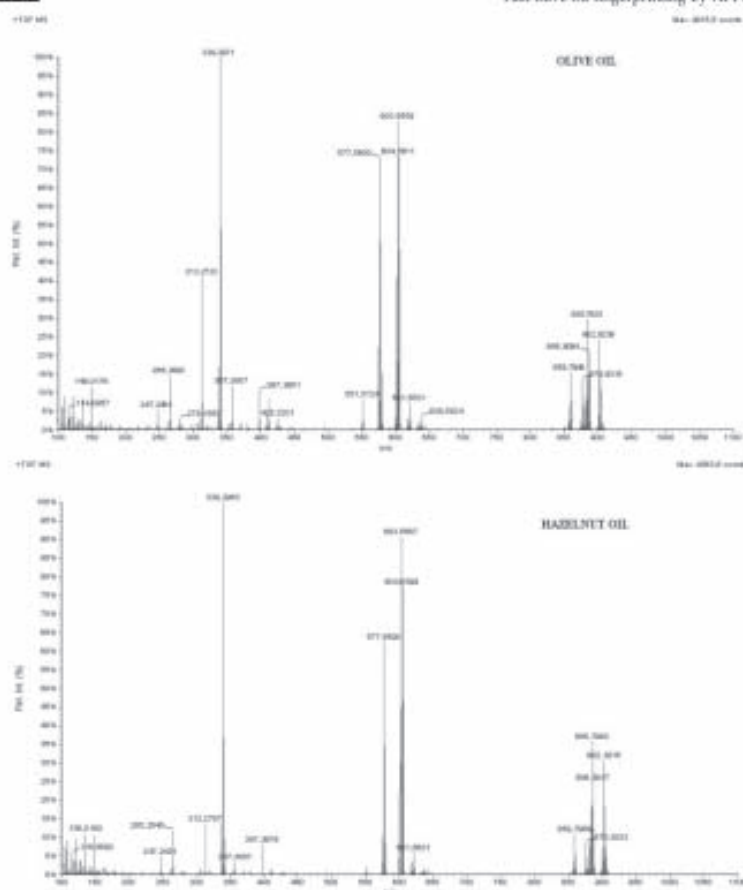


Figure 1. APPI mass spectra for the olive oil (top) and hazelnut oil (bottom).

the identification of TAG molecular species. These peaks can be observed in Fig. 1, which also shows that the relative abundance of analytes varies significantly between hazelnut and olive oils.

Optimization of DP for discrimination of edible oils

To increase the capability of the APPI source to discriminate edible oils such as olive, virgin, olive-pomace, hazelnut, corn and sunflower oils, the declustering potential (DP) was modified, since it affects the ionization efficiency and mass spectrum. The DP is very critical in the transmission efficiency and fragmentation process of sample ions by in-source collision-induced dissociation (CID).²³ In general, the

Table 1. Main ions observed in the APPI-CqTQF mass spectra of six vegetable oils (olive, extra virgin olive, olive-pomace, hazelnut, sunflower and corn oils)

TAGs	[M+H] ⁺		[M+H-R(CO) ₂ H] ⁺	
	m/z	Fragment 1	m/z	Fragment 2
OOO	885.79	OO	603.55	O
LLL	879.72	OL	601.56	L
LLO	883.77	LL	599.54	P
POO	859.79	OP	577.56	Lo
LOO	883.76	SO	605.56	S
SOO	887.81	PL	575.54	
PLO	857.79			

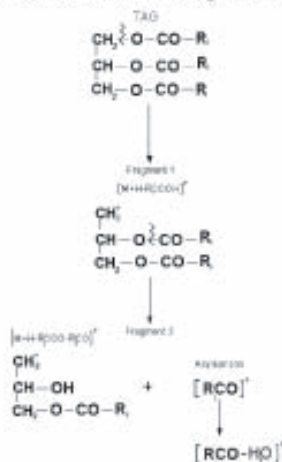


Figure 2. Fragmentation of triacylglycerols (TAGs) by positive ion mode APPI-MS.

optimum DP is compound-dependent,²⁰ and its effect on the mass spectra peaks and analyte discrimination is crucial. When this parameter changes in the range 80–300 V (85, 100, 200 and 300 V), different values in the intensity for the six edible oils under study were obtained depending on voltage. Analysis of these data was by simple cluster analysis, resulting in the dendrogram shown in Fig. 3, which can help to choose the best DP for oils discrimination. The optimum was achieved at 80 V which permitted the detection of olive oil adulteration even in the case of hazelnut. The worse

Table 2. $[\text{RCO}]^+$ and $[\text{RCO}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ions observed in the APPI-QqTOF mass spectra of various vegetable oils

Trivial name	Abbreviation	$[\text{RCO}]^+$ / $[\text{RCO}-\text{H}_2\text{O}]^+$	
		m/z	m/z
Oleic	O	265.26	247.24
Linoleic	L	263.24	245.23
Palmitic	P	239.24	221.23
Linolenic	Ln	261.22	243.21
Stearic	S	267.27	249.26

results were found at 300 V, because the six oils were grouped in the same cluster. On the other hand, at 200 V, there is one cluster that comprises all the olive oil samples (extra virgin, olive-pomace and olive) together with hazelnut, while sunflower and corn oils are perfectly discriminated between them and with others oils.

Capability of APPI-QqTOF for discrimination of edible oils

To explore the ability of the non-chromatographic APPI-QqTOF system to generate information-rich mass spectra the procedure described in the previous section was applied to hazelnut, olive, sunflower and corn oils, as well as several mixtures in different proportions. A study based on principal components analysis (PCA) was carried out, despite *a priori* knowledge about the class membership of the oil samples. PCA finds the maximum variations in the data set and forms new variables known as principal components (PCs),²² such that each successive PC accounts for as much of the remaining variability as possible and each new variable must be totally independent of all other variables. In this case, PCA was applied to our data calculated according to the relative abundance (percentage) of each peak in the total ion chromatogram (TIC), as a semi-quantitative method.

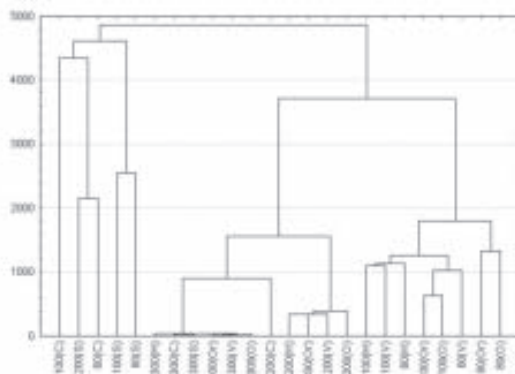


Figure 3. Dendrogram showing the relationships between the oils analyzed, and the effect of different declustering potentials (80, 100, 200, 300 V). The code refers to the type of oil analyzed [olive oil (O), extra virgin olive oil (V), olive-pomace of (Or), hazelnut oil (H), sunflower of (S) and corn oil (C)].

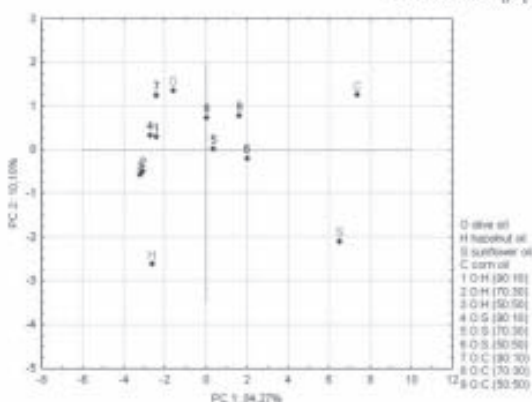


Figure 4. Principal components analysis of the analyzed oils (code in parentheses); olive oil (O); hazelnut oil (H); sunflower oil (S); corn oil (C); 1 (O:H) olive oil/hazelnut oil (90:10); 2 (O:H) olive oil/hazelnut oil (70:30); 3 (O:H) olive oil/hazelnut oil (50:50); 4 (O:S) olive oil/sunflower oil (90:10); 5 (O:S) olive oil/sunflower oil (70:30); 6 (O:S) olive oil/sunflower oil (50:50); 7 (O:C) olive oil/corn oil (90:10); 8 (O:C) olive oil/corn oil (70:30); 9 (O:C) olive oil/corn oil (50:50).

The resulting ordination plot from PCA on these oils and their mixtures with APPI is shown in Fig. 4. It can be seen even from this simple PCA that a clear separation in PCA space occurs between the oils which are undoubtedly separated from olive oil. The first two PCs accounted for >94% of the overall variance.

CONCLUSIONS

APPI represents a powerful ionization source that coupled to a highly discriminant mass analyzer, namely QqTOF-MS, provides information-rich spectra. The approach is suitable for characterization of multi-component matrices, such as edible oils, and it allows unequivocal olive oil authentication, in particular hazelnut oil adulteration. In addition, the absence of chromatographic separation increases sample throughput.

The APPI source presents several important differences with respect to the most used ESI source in relation to the fragmentation pattern. For example, the production of $[M+H]^+$ and $[M]^+$ ions of key compounds by APPI against the ammonium adducts $[M-NH_4]^+$ in ESI. In addition, the $[R_2CO-H_2O]^+$ ion, that corresponds to loss of water by the acylium ion, can be observed in APPI-MS but is absent in ESI-MS.

Method performance, especially the capability to discriminate between oils, can be improved by careful optimization of the declustering potential that allows an easy classification of oils. Likewise, olive oils (extra virgin, olive-pomace and olive) can be easily distinguished from adulterants such as hazelnut, corn and sunflower oils, as well as their mixtures.

The main advantages of the methodology are the absence of both chromatographic separation and sample treatment. This is possible due to the high resolution of the QqTOF equipment that allows the unequivocal identification of the compounds on the basis of exact mass measurement. In addition, the method is rapid, reliable and precise. The equipment is robust, the maintenance is reduced, and information-rich mass spectra are obtained.

Acknowledgements

The authors are indebted to 'Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT)' for the Grant REN2002-04366-C02-02. We thank Applied Biosystems for technical assistance with APPI-MS.

REFERENCES

- Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Bello-López MA, Callejo-Mochón M, Jiménez-Sánchez JC, Guzmán-Pérez A. *Talanta* 2005; **65**: 656.
- Goodacre R, Vaidyanathan S, Bianchi G, Kell DB. *Analyst* 2002; **127**: 1457.
- Aparicio R, Harwood J (eds). *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*. Aspen Publishers: Gaithersburg, Maryland, 2000.
- Aparicio R, Aparicio-Ruiz R. *J. Chromatogr. A* 2000; **93**: 881.
- Salter GJ, Lazzari M, Gianzante L, Goodacre R, Jones A, Surriceho G, Kell DB, Bianchi G. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 1997; **40**(4): 179.
- Vlahov G, Shaw AD, Kell DB. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1999; **76**: 1223.
- Baeten V, Meunens M, Morales MT, Aparicio R. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 2225.
- Bianchi G, Gianzante L, Shaw AD, Kell DB. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 2001; **102**: 141.
- Lozano IM, Pavon JLP, Laespada MEF, Pinto CG, Cordem M. *J. Chromatogr. A* 2002; **948**: 221.



1186 J. L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera

10. Dong-Sun L, Eun-Sung L, Hyun-Jung K, Chin-Ok K, Kim K. *Anal. Chem. Acta* 2003; **429**: 321.
11. Syage JA, Evans MD. *Spectroscopy* 2001; **14**: 14.
12. Cole RB (ed). *Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications*. John Wiley: New York, 1997.
13. Niessen WMA (ed). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. Marcel Dekker: New York, 1999.
14. Standing KG. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000; **200**: 597.
15. Singh G, Gutierrez A, Xu K, Blair IA. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 3007.
16. Zwiener C, Frimmel FH. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; **378**: 851.
17. Van Berkel GJ, McLuckey SA, Glush CL. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 2084.
18. Kauppila TJ, Kostainen R, Bruins AP. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004; **18**: 808.
19. Rönald C, Stroschtein S, Albert K, Bayer E. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 4394.
20. Marwah A, Marwah P, Lardy H. *J. Chromatogr. A* 2002; **964**: 13.
21. Robb DB, Covey TR, Bruins AP. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 3653.
22. Tokino M, Doishima S, Nakahara T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 1965.
23. Cmatapel M, Schollenträger M, Schmitz CJ, Güb S, Brockmann KJ, Giese R, Benter Th. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; **19**: 326.
24. Moriwaki H, Ishitake M, Yoshikawa S, Miyakoda H. *Anal. Sci.* 2004; **20**: 375.
25. Rauh JP, Vuorola H, Kostainen R. *J. Mass Spectrom.* 2002; **37**: 1269.
26. Leiminen A, Kuuranne T, Kostainen R. *J. Mass Spectrom.* 2002; **37**: 693.
27. Keski-Hynnä H, Karkela M, Eloväärä E, Anttonen L, Magdalen J, Luukkanen L, Taskinen J, Kostainen R. *Anal. Chem.* 2002; **74**: 3449.
28. Yang C, Heinon J. *J. Chromatogr. A* 2002; **970**: 155.
29. Holcapek M, Jandera P, Fischer J, Prokes B. *J. Chromatogr. A* 1999; **858**: 13.
30. Craig Byrdwell Wm, Neff WE. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16**: 300.
31. Tokino M, Yamaguchi K, Nakahara T. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **52**: 727.
32. Yang H, Indrayan J. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2001; **78**: 889.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Talanta 70 (2006) 859–869

Talanta

www.elsevier.com/locate/talanta

Comparative study of electrospray and photospray ionization sources coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometer for olive oil authentication

J.L. Gómez-Ariza*, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera, R. Beltran

*Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus de El Carmen, 21007-Huelva, Spain*Received 15 September 2005; received in revised form 24 January 2006; accepted 7 February 2006
Available online 24 March 2006

Abstract

The use of fast and reliable analytical procedures for olive oil authentication is a priority demand due to its wide consumption and healthy benefits. Olive oil adulteration with other cheaper vegetable oils is a common practice that has to be detected and controlled. Rapid screening methods based on high resolution tandem mass spectrometry constitute today the option of choice due to sample handling simplicity and the elimination of the chromatographic step. The selection of the ionization source is critical and the comparison of their reliability necessary. The possibilities of the direct infusion electrospray ionization (ESI) and the recently introduced atmospheric pressure photospray ionization source (APPI), coupled to quadrupole time-of-flight (QqTOF), have been critically studied and compared to control olive oil adulteration. These techniques are very rapid (approximately 1 min per sample) and have high discrimination power to elucidate key components in the edible oils studied (olive, hazelnut, sunflower and corn). Nevertheless, both sources are complementary, being APPI more sensitive for monoacyl- and diacylglycerol fragment ions and ESI for triacylglycerols. In addition, methods reproducibility's are very high, especially for APPI source. Mixtures of olive oil with the others vegetable oils can be easily discriminated which has been tested by using principal components analysis (PCA) with both ESI-MS and APPI-MS spectra. Analogously, linear discriminant analysis (LDA) confirms methods reproducibility and detection of other oils used as adulterants, in particular hazelnut oil, which is especially difficult given its chemical similarity with olive oil.

© 2006 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Atmospheric pressure photoionization; Electrospray ionization; Quadrupole time-of-flight; Olive oil authentication; Fingerprinting

1. Introduction

Olive oil is one of the most important ingredients of the so-called Mediterranean diet, used for frying, roasting and seasoning. Medical and epidemiological research conducted under the auspices of the International Olive Oil Council have demonstrated the benefits of eating olive oil in cardiovascular [1] and diabetes [2] diseases, as well as in bone and nervous system development [3,4]. In addition, it has been proved its antioxidant and anti-aging properties at cell and mitochondrial levels [5], as well as the general favorable action of this food-stuff on the nutrition and diet. For these reasons, olive oil is one of the most consumed edible vegetable oils and it is

particularly expensive, which may present the opportunity for producers to stretch their merchandise by adulterating it with cheaper vegetable oils of lower quality [6]. The situation is especially critical for hazelnut oil adulteration due to its high similitude in chemical composition with olive oil. This fact makes difficult the use of triacylglycerols (TAGs), which are considered to be good fingerprints for adulteration detection purposes [7].

Olive oil fingerprinting is usually accomplished by NMR [8], Raman [9,10], pyrolysis-MS [11], GC-MS [12] or direct HS-MS techniques [12]. However, more rapid, accurate, reliable and robust analytical methodologies are being requested for olive oil authentication, to be suitable for routine analysis.

Recent developments in mass spectrometry makes possible to fulfill these requirements, because of the high resolution reached with tandem mass spectrometry (triple quadrupole QqQ, quadrupole time-of-flight QqTOF and others) avoids chromato-

* Corresponding author. Fax: +34 959219942.
E-mail address: ariza@uh.es (J.L. Gómez-Ariza).

graphic separation and reduces the analysis time and sample preparation significantly. These analytical tools allow fingerprinting in complex food matrixes as olive oil and provide useful information about all the components present in the sample. Goodacre et al. [13] reported the use of ESI-MS technique in olive oil authentication, showing that information-rich spectra from vegetable and nut oils can be generated without chromatographic separation. This spectral information allows the discrimination of olive oil from others commonly used as adulterants, particularly hazelnut oil. Latterly, Gómez-Ariza et al. [14] described the employ of the atmospheric pressure photoionization (APPI) [15,16] source for this purpose, considering its suitability to ionize analytes with little or no polarity. In addition, the APPI source can suffer less matrix effects because of its specificity towards the analytes which form the molecular radical ion M^{*+} . However, both sources are complementary, because the ionization pattern of ESI based in the formation of ammonium adducts $[M-NH_4]^+$ [13] changes in APPI to the production of $[M+H]^+$ and $[M]^{*+}$ ions of key compounds [14], as well as the ion $[R_2CO-H_2O]^+$ formed by the loss of water from the acylium ion. This latter ion is absent in the ESI-MS spectra.

Therefore, a comparison of both sources considering their discrimination capability on several highly consumed edible oils and their mixtures is necessary, especially for olive and hazelnut oils. The use of ESI-MS for the analysis of several oils including corn, grapeseed, pomace, olive, extra virgin olive, peanut, soya, sunflower oils and a mixed oil comprising peanut, sunflower and soya oils has been previously considered [13]. However, the analysis of mixtures including olive oil which could provide information about the adulteration level of this food remains unknown. In addition, under our knowledge the system APPI-MS has not been used for this purpose.

The aim of the present work is the application of ESI-MS and APPI-MS systems for the discrimination of edible oils and mixtures to deep insight into the complementary use of both sources.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and sample preparation

Oil samples (olive oil (O), hazelnut oil (H), sunflower oil (S) and corn oil (C)) were supplied by Olibeas cooperative (Huelva, Spain) and stored at 4 °C.

The solvents, HPLC-grade, dichloromethane, methanol and toluene, were purchased from Teknokroma (Barcelona, Spain), and the ammonium acetate was supplied by Aldrich (Steinheim, Germany). Water was purified with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Watford, UK).

All oils were 1000-fold diluted with a mixture of 60% dichloromethane: 40% 10 mM ammonium acetate in methanol when the ESI source was used. For APPI dilution was performed with dichloromethane/methanol (60:40, v/v).

Oil mixtures were prepared at 90, 70 and 50 (v/v) of olive oil with hazelnut, sunflower and corn oils, separately. Prior to infusion these mixtures were dissolved in the solution described above.

2.2. Instrumentation

2.2.1. ESI-QqTOF

The samples were loaded into a 100 μ L volume Hamilton gastight syringe mounted into an integrated apparatus pump operating at a flow rate of 5 μ L min^{-1} and introduced directly into an API QSTAR[®] XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

All data were obtained in positive ion mode (ES⁺). The TAGs were identified by the molecular ion mass spectra. Averaged spectra in full-scan mode were acquired for 1 min in the m/z range 100–2000 with 1.005 s scan time. The resolution for the Q1 region was fixed at unit mass resolution.

The parameters of the QqTOF system were optimized for analysis with the source electrospray ionization (ESI). The ion-spray voltage (IS) was finally set at 3000 V, the source and desolvation temperatures were both 60 °C with a declustering potential (DP) fixed at 76 V and focusing potential (FP) at 230 V (the orifice (OR) and focusing ring (RNG) voltages control the amount of declustering and fragmentation in the orifice-skimmer region of the vacuum interface). The curtain gas (CUR) was set at 1.13 L min^{-1} and the nebulizer gas (UHP 99.999% nitrogen) was finally optimized at 1.56 L min^{-1} for signal stability and sensitivity.

The ion energy (IE) was fixed at 2.0 V with a channel electron multiplier (CEM) of 2250 V.

ESI-MS-MS spectra were acquired by using nitrogen as the collision gas, the collision energy was set at 50–60 eV, and both the quadrupole (Q) and TOF analyzers were employed. Other conditions were the same as for the MS analysis described above.

2.2.2. APPI-QqTOF

The instrumental conditions used with this system were described elsewhere [14]. Briefly in this study was used, flow injection analysis (FIA) for sample introduction in the APPI-QqTOF. It was performed using an Agilent 1100 series HPLC provided with a binary pump and autosampler. A model KDS 100 syringe pump from KD scientific (New Hope, PA, USA) was used to deliver the dopant to the APPI ion source. This instrument was connected to an API QSTAR[®] XL Hybrid system (Applied Biosystems) fitted with an atmospheric pressure photoionization source. This ion source made use of a heated nebulizer (HN), whose heater was maintained at 350 °C for all these experiments. Nitrogen was used to nebulize the liquid eluant (nebulizer gas) and also to transport the finely dispersed sample drops through the heated quartz tube in which they were vaporized (auxiliary gas).

The operation conditions were the following: the flow rate provided by LC pumps was fixed at 0.5 mL min^{-1} using 50% (v/v) aqueous methanol as LC eluant. A 5 μ L loop was used in the injector of the autosampler. The dopant (toluene) was delivered at 0.05 mL min^{-1} .

All data were obtained in positive ion mode. Averaged spectra in full-scan mode were acquired in the m/z range 100–1100.

The parameters of the QqTOF system were optimized for the analysis with the source APPI. The capillary voltage was finally set at 1500 V, with a DP fixed at 85 V and FP at 300 V. The

analysis (LDA) were applied to the relative abundance of peaks in the mass spectra obtained from both ESI- and APPI-QqTOF.

3. Results and discussion

3.1. ESI and APPI mass spectra

ESI-MS spectrum (Fig. 1) of olive oil is dominated by a peak at m/z 903 that can be matched with a similar peak in the hazelnut oil spectrum. This peak can be attributed to the ammonium adduct $[M+NH_4]^+$ of triolein (trioleoylglycerol, OOO), which is the most abundant triacylglycerol in both olive and hazelnut oils [13]. The spectra of both edible oils are very similar (Fig. 1), although the peak at m/z 897, caused by trilinoleoylglycerol (LLL), is only detected in hazelnut oil and can be used as marker for olive oil adulteration assessment [17]. For sunflower and corn oils (Fig. 2) the most abundant peak lies at m/z 899 originated by the ammonium adduct of 1,2-dilinoleoyl-3-oleoylglycerol (LLO). Table 1 summarizes the most abundant triacylglycerols in the different oils under study.

Fig. 2 shows that LLL ammonium adducts (m/z 897) are the second prominent peak in the APPI-MS spectra of sunflower and corn oils. An additional difference between these oils is the presence in sunflower of 1,2-dilinoleoyl-3-behenoylglycerol (BLL), m/z 957, Table 1.

The m/z values of significant peaks in the MS/MS spectra from above mentioned ions are shown in Table 2. The major daughter ions from the precursor ion at m/z 903 (OOO) are observed at m/z 603 $[OO]^+$ and m/z 265 acylium ion of the oleic acid fatty acyl, in both olive and hazelnut oils. The MS/MS spectrum of LLL, characteristic in hazelnut oil shows two peaks at m/z 599 $[LL]^+$ and m/z 263 acylium ion of the linoleic acid

Table 2
Masses of the characteristic fragment ions A and fragment ion C of triacylglycerols using the ESI-MS/MS

TAGs	Ion A	$[M-RCO]^+$ (m/z)	Ion C	$[RCO]^+$ (m/z)
OOO	OO	603	O	265
LLL	LL	599	L	263
LLO	OL	601	P	239
PPO	PO	577	Po	237
POPo	PoO	575	Ln	261
PLO	PL	575	B	323
LLLn	LLn	597	S	267
BLL	BL	659	–	–
SOP	SO	605	–	–

fatty acyl. In sunflower and corn oils the MS/MS spectrum of the precursor ion m/z 899 LLO shows two daughter ions at m/z 601 $[LO]^+$ and m/z 263 acylium ion previously mentioned. The MS/MS spectrum of BLL in sunflower oil exhibits ions at m/z 660 $[BL]^+$, m/z 599 $[LL]^+$ and m/z 263 this latter above mentioned.

Results from the full-scan APPI- and ESI-MS confirm the presence of $[M+H]^+$, $[M]^{*+}$, $[R_1CO]^+$ and $[R_1CO-H_2O]^+$ ions in the former [14] and $[M+NH_4]^+$ adducts in the later [13]. The higher abundance of diacylglycerol (DAG) and monoacylglycerol (MAG) in the APPI-MS [14] than in ESI-MS (Fig. 3) is also remarkable.

Fig. 4 shows the full-scan APPI mass spectra for the sunflower and corn oils, which exhibit significant differences with those corresponding to olive and hazelnut oils. The most abundant peak from sunflower and corn oils using the APPI source is that from monoacylglycerol at m/z 337 $[L]^+$, while in olive and hazelnut oils (Fig. 5), is the m/z 339 $[O]^+$.

Table 1
Main TAGs identified in the ESI-QqTOF mass spectra of four vegetable oils

TAGs	$[M+NH_4]^+$ (m/z)	Olive	Hazelnut	Sunflower	Corn
OOO	903	✓	✓	✓	✓
POO	877	✓	✓	✓	✓
LOO	901	✓	✓	✓	✓
PLO	875	✓	✓	✓	✓
PPO	851	✓	n.d.	✓	✓
OOS	905	✓	✓	✓	✓
LLO	899	✓	✓	✓	✓
POPo	848	✓	n.d.	✓	✓
LLL	897	n.d.	✓	✓	✓
LLP	873	✓	✓	✓	✓
LLLn	895	n.d.	n.d.	✓	✓
LaLP	871	n.d.	n.d.	✓	✓
SOP	879	✓	✓	✓	✓
BLL	956	n.d.	n.d.	✓	n.d.

OOO, 1,2,3-trioleoylglycerol; POO, dioleoyl-1-palmitoylglycerol; LOO, 2,3-dioleoyl-1-linoleoylglycerol; PLO, 1-palmitoyl-2-linoleoyl-3-oleoylglycerol; PPO, 1,2-dipalmitoyl-3-stearoylglycerol; OOS, 1,2-dioleoyl-3-stearoylglycerol; LLO, 1,2-dilinoleoyl-3-oleoylglycerol; POPo, 1-palmitoyl-2-oleoyl-3-palmitoylglycerol; LLL, 1,2,3-trilinoleoylglycerol; LLP, 1,2-dilinoleoyl-3-palmitoylglycerol; LLLn, 1,2-dilinoleoyl-3-linoleoylglycerol; LaLP, 1-linoleoyl-2-linoleoyl-3-palmitoylglycerol; SOP, 2-oleoyl-3-palmitoyl-1-stearoylglycerol and BLL, 1,2-dilinoleoyl-3-behenoylglycerol. ✓, detected; n.d., not detected.

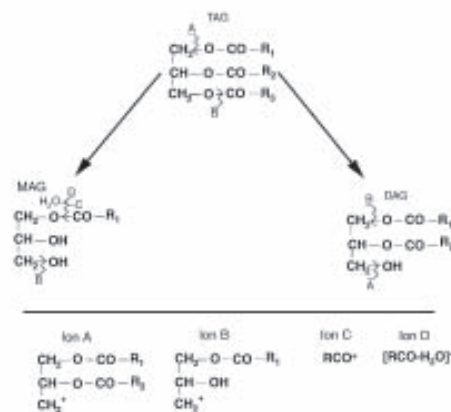


Fig. 3. Fragmentation of triacylglycerols (TAGs), diacylglycerols (DAGs) and monoacylglycerols (MAGs), using positive ion APPI. A–D are the most important fragment ions.

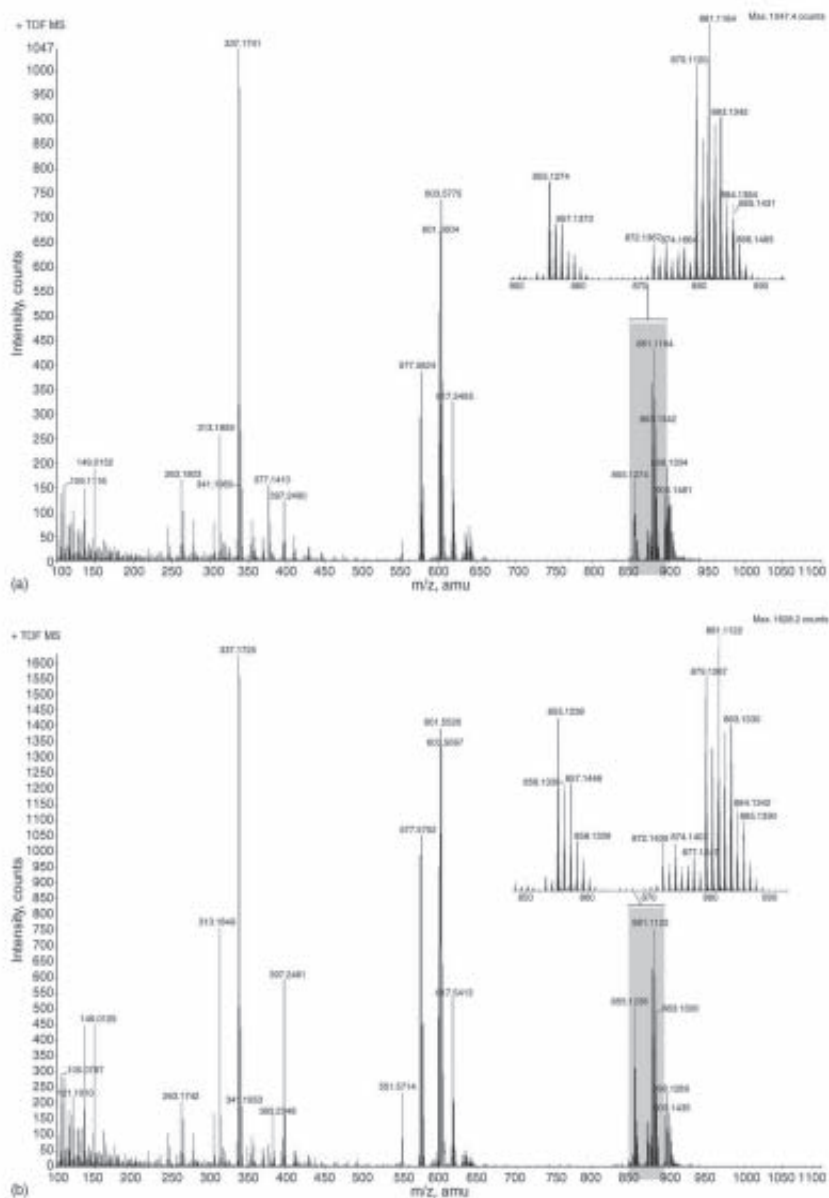


Fig. 4. Full-scan APPI-MS: (a) sunflower oil and (b) corn oil. The region between m/z : 800 and 900 is magnified.

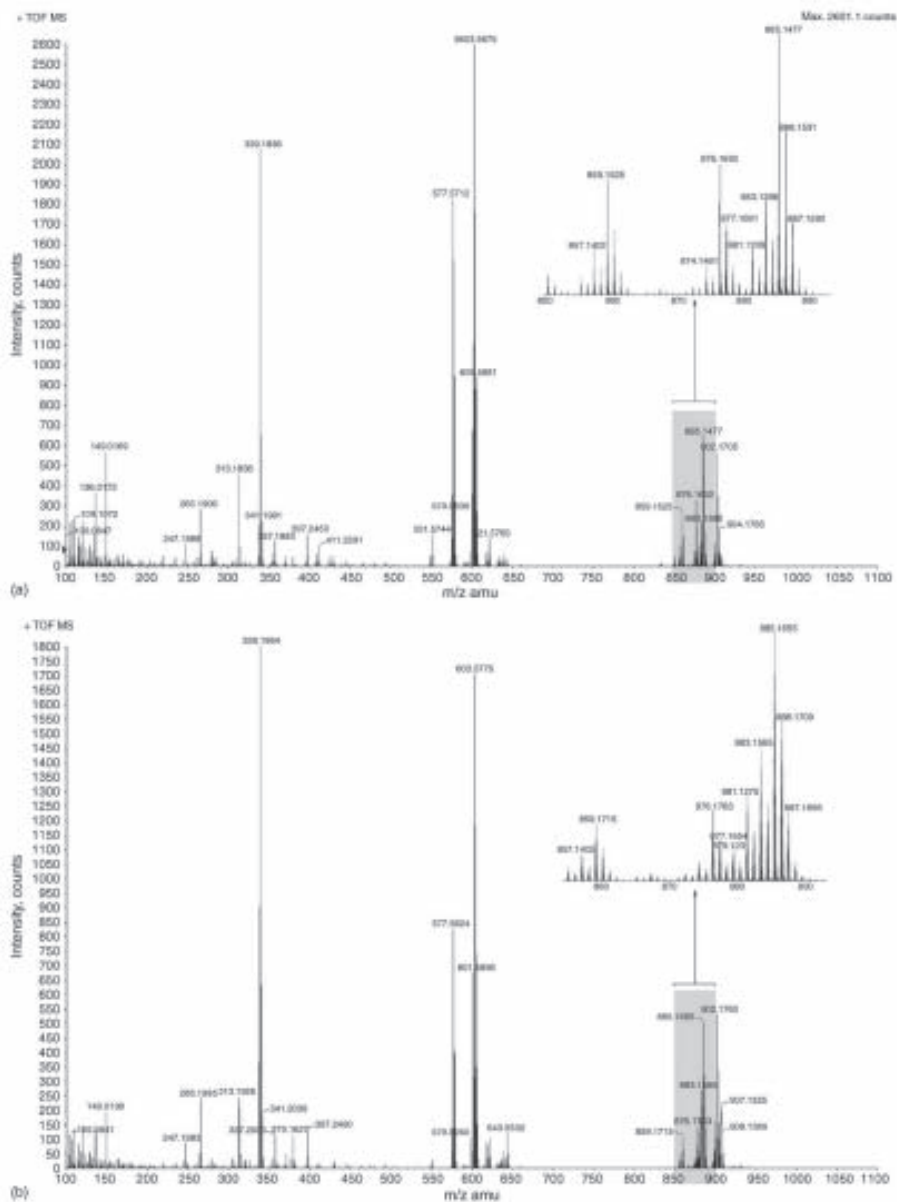


Fig. 5. Full-scan APPI-MS: (a) olive oil and (b) hazelnut oil. The region between m/z : 800 and 900 is magnified.

3.2. Oil mixtures study

In order to assess the possible adulteration of olive oil with the previously studied vegetable oils, several mixtures were performed as previously described (Section 2.1). As can be seen in Table 3, several triacylglycerols can be used as markers of the presence of hazelnut in olive oil, like OOO and LOO, when the ESI source is used. These compounds are present in both olive and hazelnut oils, although their relative abundance in the mass spectra is higher in the last (OOO, 31.16%; LOO, 18.23%) than those from olive oil (OOO, 26.92%; LOO, 11.76%). This difference can be appreciated in mixtures with hazelnut oil at percentages lower than 10%. In addition, LLL, which is not present in olive oil, is at 1.44% in the mass spectra from hazelnut oil and for this reason it can also be used to identify this adulteration. The adulteration of olive oil with sunflower and corn oils can be detected on the basis of LLO, which is the most abundant triacylglycerol in the formers. Due to the low relative abundance of LLO in olive oil mass spectra, an increase of this peak can be used for this purpose. In this way, BLL is only present in a measurable abundance in sunflower oil.

When the APPI source is used (Table 4) significant differences can be pointed out between hazelnut and olive oils. Hazelnut oil mass spectra exhibit a higher relative abundance of OOO (6.23%), the fragment ion of DAG [OO]⁺ (28.88%) and of MAG [O]⁺ (28.31%). As commented previously, the presence of LLL in sunflower and corn oils and its absence in olive oil, can also be detected using the APPI source. Analogously, [LL]⁺ and [L]⁺ appear in the mass spectra of sunflower and corn oils with a higher relative abundance. Mixtures of olive oil with them are in good agreement with the previous results for the ESI source.

The APPI source allows more sensitive detection of monoacyl- and diacylglycerol fragment ions than ESI, which confers to the former additional advantages. However, both sources are complementary, since ESI is more suitable for the detection of triacylglycerols.

3.3. Principal component analysis

For a better understanding of the discriminating efficiency of the descriptors selected, a preliminary study based on principal component analysis has been carried out, despite of the a priori knowledge the class membership of the oil samples. PCA finds the maximum variations in the data set and forms new variables known as principal components (PCs) [18], such that each successive PC accounts for as much of the remaining variability as possible and each new variable must be totally independent of all other variables. In this case, PCA was applied to our data calculated according to the relative abundance (percentage) of each peak in the TIC, as a semiquantitative method.

For the ESI source, the abundance of TAG adducts (OOO, POO, LOO, PLO, PPO, OOS, LLO, POPo, LLL, LLP, LLLn, LnLP, SOP and BLL) in mass spectra of the oils were considered as variables, and each type of oil or mixture as a class. From the loadings of original variables in the two first considered principal components (Table 5), the dominant variables in the first principal component (PC1) representing 70.56% of the total variance are POO, LLO, LLL, LLP, OOS and OOO while PPO, POPo and LOO show the lower values of variance. The variables appear at negative and positive values of PC1 and PC2. From this fact, it could be inferred that they provide different type of information. Principal component two (PC2) explains up to 18.04% of the total variance. Examining the loadings PPO and POPo are the most dominant variables in PC2. The first two principal components account for 88.6% of the total variance and were considered to be sufficient for this study.

The resulting ordination plot from PCA on these oils and their mixtures samples with ESI source is shown in Fig. 6. It can be seen even from this simple PCA that clear separation in PCA space occurs between the three oils (hazelnut, sunflower and corn oil), which are clearly separated from olive oil. Moreover, the principal components analysis showed that the mixtures

Table 5
Loadings of the variables for the two first principal components (PCs) using ESI and APPI sources

ESI Variable	ESI		APPI Variable	APPI	
	PC1	PC2		PC1	PC2
OOO	-0.292	0.047	OOO	-0.255	-0.149
POO	-0.304	-0.159	LLL	0.277	-0.066
LOO	0.195	0.296	LLO	0.279	-0.031
PLO	0.260	-0.340	OO	-0.272	-0.089
PPO	-0.168	-0.462	OL	0.268	-0.033
OOS	-0.295	0.018	LL	0.280	-0.017
LLO	0.302	0.121	OP	-0.216	0.475
POPo	0.199	-0.483	L	0.279	-0.083
LLL	0.308	0.097	P	0.043	0.793
LLP	0.310	-0.121	O	-0.270	-0.132
LLLn	0.275	-0.243	La	0.262	0.252
LnLP	0.248	-0.289	[RCO] ⁺ oleic acid	-0.259	-0.041
SOP	-0.288	-0.185	[RCO] ⁺ linoleic acid	0.277	-0.097
BLL	0.239	0.522	[RCO-H ₂ O] ⁺ oleic acid	-0.252	-0.030
			[RCO-H ₂ O] ⁺ linoleic acid	0.277	-0.083

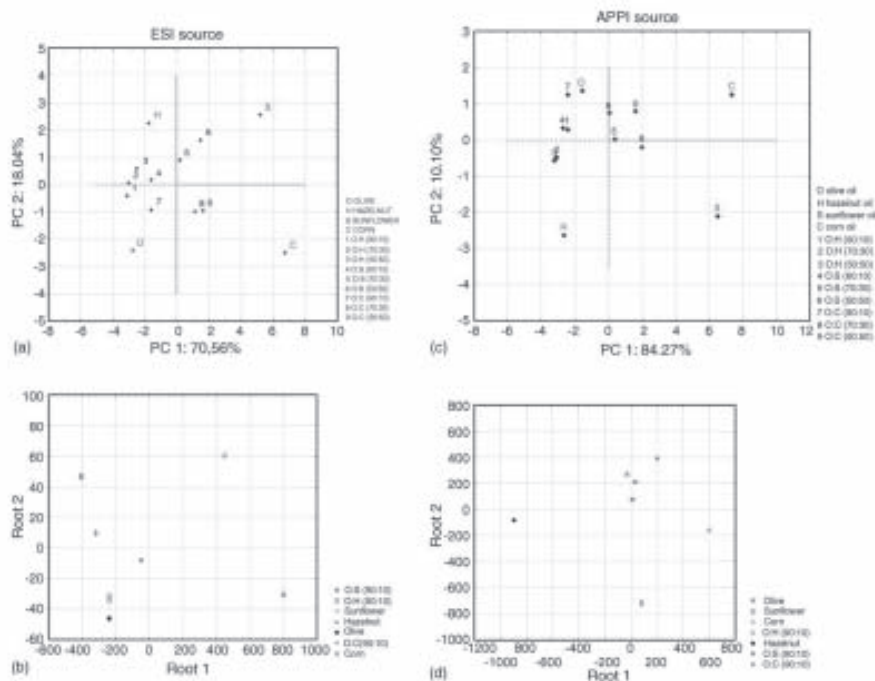


Fig. 6. Principal components analysis for (a) ESI-MS and (c) APPI-MS. Linear discriminant analysis for (b) ESI-MS and (d) APPI-MS.

(90% olive oil with 10% hazelnut and 90% olive oil with 10% corn oil) are the nearest in the PCA space to olive oil.

Similarly, PCA was applied to the data obtained with the APPI source. The relative abundance in the mass spectra corresponding to compounds, fragments and acylium ions (Table 4) from the different oils were considered as variables, and each type of oil or mixtures of them as classes.

Table 5 shows the first two principal components that were extracted. These typically accounted for >94% of the overall variance. Examining the score plot of the objects in the space defined by the two principal components considered (Fig. 6), it can be observed an evident separation of the four oils and their mixtures. These results were in good agreement with those obtained by the ESI source.

3.4. Linear discriminant analysis

Unsupervised techniques only have visualizing capabilities, so a supervised pattern recognition method such as linear discriminant analysis was performed with the purpose of obtaining classification rules to assign categories to samples.

After applying LDA, four discriminant functions were calculated. Fig. 6 shows the scatter plot of oils samples in the plane defined by the discriminant functions DF_1 and DF_2 . Seven differ-

ent classes were correctly separated (olive oil, hazelnut oil, sunflower oil, corn oil and their corresponding mixture 90:10 with olive oil). We analyzed the mixture 90:10 of different oils with olive oil, because this adulteration is the most difficult to detect.

LDA using the relative abundance of TAGs as the variables showed that oils and their mixtures were clearly grouped according to their triacylglycerols composition. These results are consistent with other previously published data related to olive oil [19].

Moreover, the pattern recognition method shows that the reproducibility of the analysis is very high, especially with the APPI source, and that olive oil can be clearly separated from other edible oils which could be used as adulterants.

4. Conclusions

The use of both ESI- and APPI-QqTOF represents a good alternative for edible oils fingerprinting. These couplings involving powerful ionization sources and highly discriminant mass analyzers, namely QqTOF-MS, provide a high resolution for multi-component matrices such as vegetable oils. These instrumental systems enable a very simple sample handling and high sample throughput, because no chromatographic separation is required.

ESI and APPI sources are complementary on the basis of the higher sensitivity of ESI for triacylglycerols and APPI for monoacyl- and diacylglycerol fragment ions. Reproducibility of the analysis is very high but APPI provides better results. In addition, some fragments such as $[R,CO-H_2O]^+$, corresponding to the lost of water from the acylium ion only can be detected by APPI-MS.

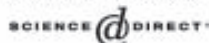
Both ESI- and APPI-QqTOF can be used for olive oil adulteration diagnosis, because the discrimination from commonly used adulterants is allowed. The PCA of olive oil permits a safe evaluation of its authenticity and provides a precise classification of other edible oils and their mixtures. The application of LDA verifies methods reproducibility, especially with the APPI source, and gives additional evidences of the presence of adulterants.

Acknowledgements

The authors are indebted to "Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCyT)" for the Grant REN2002-04366-C02-02. We thank Applied Biosystems for technical assistance with APPI-MS.

References

- [1] R. Aparicio, J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil Analysis and Properties*, Aspen Publisher Inc., Gaithersburg, Maryland, 2000.
- [2] C. Rodríguez-Villan, A. Pérez-Heras, I. Mercade, E. Casals, E. Ros, *Diabet. Med.* 21 (2004) 142.
- [3] C. Puell, A. Quilín, A. Agallos, J. Mathey, C. Obied, A. Mazur, M.J. Davicco, P. Lebeocque, A.L. Skaltsounis, V. Coxam, *Br. J. Nutr.* 92 (2004) 119.
- [4] K. Tassinen, *Toxicology* 196 (2004) 31.
- [5] J.R. Huertas, E. Martínez-Velasco, S. Ibanez, M. López-Frías, J.J. Ochoa, J. Quiles, G.P. Castell, J. Manau, G. Lema, *Biofactors* 9 (1999) 337.
- [6] L. Cercuel, M.T. Rodríguez-Estrada, G. Lercker, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 211.
- [7] R. Aparicio, R. Aparicio-Ruiz, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 93.
- [8] A.D. Shaw, A. Di Camillo, G. Vlahov, A. Jones, G. Bianchi, J.J. Rowland, D.B. Kell, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 357.
- [9] V. Baeten, M. Mearens, M.T. Morales, R. Aparicio, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2225.
- [10] H. Yang, J. Indrayaj, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78 (2001) 889.
- [11] G. Vlahov, A.D. Shaw, D.B. Kell, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76 (1999) 1223.
- [12] I.M. Lorenzo, J.L.P. Pison, M.E.F. Laespada, C.G. Pinto, B.M. Cordero, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 221.
- [13] R. Goodacre, S. Vaidyanathan, G. Bianchi, D.B. Kell, *Analyst* 127 (2002) 1457.
- [14] J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Boniego, T. García-Barrera, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, submitted for publication.
- [15] D.B. Roob, T.R. Covey, A.P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
- [16] J.A. Syage, M.D. Evans, *Spectroscopy* 16 (2001) 15.
- [17] J. Parcerisa, I. Casals, J. Bonella, R. Codony, M. Rafecas, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 149.
- [18] S. Wöhl, K. Esbensen, P. Geladi, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2 (1987) 37.
- [19] P. Kaufman, *Anal. Chim. Acta* 277 (1993) 467.

Available online at www.sciencedirect.com

Journal of Chromatography A, 1121 (2006) 191–199

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chema

Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection[☆]

J.L. Gómez-Ariza^{*}, A. Arias-Borrego, T. García-Barrera

Departamento de Química y Ciencia de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva,
Campus de El Carmen, 21007 Huelva, Spain

Received 31 December 2005; received in revised form 6 April 2006; accepted 7 April 2006
Available online 6 May 2006

Abstract

Pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographical origin in Spain and Portugal have been investigated concerning total element content and metal-biomolecules size distribution patterns Mn, Zn, Ni and Cu. All the studied metals were at the highest concentration in pine nuts from Faro and at the lowest from Cataluña. The most abundant element in samples was Mn at concentrations in the range of $26 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña) to $559 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro). Zn was also present at high concentration in samples, from $25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña) to $113 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro). To a deeper insight to obtain classification rules for samples, pine nuts were analyzed by size-exclusion chromatography (SEC) with UV detection and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Two columns were used covering the molecular weight range from <10 to 70 kDa that allowed the discrimination of the studied samples. Data reveal that the most differential UV-profile with low molecular weight (LMW) column was obtained with pine nuts from Huelva. This column allows good discrimination in the range of 2126–1352 Da in which a lot of peaks can be used to differentiate samples. The UV profiles obtained with the high molecular weight (HMW) column allows a poorer differentiation of samples, but pine nuts from Huelva, Castilla and Madrid are clearly distinguished to the others. In relation to fractionation patterns of metals, Mn allows a good discrimination between samples (LMW column), Cu was the only one associated to fractions at MW > 70 kDa in sample from Cádiz, and profiles of Ni and Zn are clearly different in terms of abundance of peaks. All these chromatographic profiles for elements give valuable information about the geographical origin of the studied samples and the differences found are discussed in this work.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Pine nuts; Metals; Multielemental fractionation; Size-exclusion chromatography; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Geographic origin distinction

1. Introduction

Pinus pinea has been widely planted in Spain, Portugal, Italy, Greece, Albania and Turkey where it is one of the most important ingredients of the Mediterranean diet [1]. Pine nuts, raw or roasted, are included as ingredients in a great variety of traditional dishes, such as breads, candies, sauces and cakes, as well as vegetable and meat dishes. It is an edible nut with an exquisite flavor and high protein content which makes them a good source of nutrients. The seeds of the *P. pinea* have a complex chemical composition (5.6% moisture, 31.1% protein, 47.4% fat, 10.7%

carbohydrate and 4.3% ash) [2], they contain Vitamins, particularly B1 (thiamine) and also minerals [1]. In addition, the consumption of nuts has health benefits since they reduce risk of both coronary heart disease and non-fatal myocardial infarction [2].

The elemental composition of plant foods plays important biological roles and can also be associated with the toxicity, pollution, geographic origin of plants, etc. [3,4]. Therefore, the content of trace elements can be very useful as markers for the identification of product's geographical origin and authenticity [5]. Several authors have proposed the use of the mineral content to characterize wines [6,7], vinegars [8], coffees [9], potatoes [10], honey [11], teas [12] and so on. Likewise, multielement analysis can be a valuable tool for the authentication and characterization of foodstuffs.

Moreover, the bioavailability, effects and toxicity of the elements are highly associated with their chemical form [13]. In

[☆] Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15–17 November 2005.

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 959 219968; fax: +34 959 219942.
E-mail address: ariza@uhuelva.es (J.L. Gómez-Ariza).

addition, metals and metalloids can be found as part of biomacromolecules that represent a valuable information about their differential actions and behaviors [13–16]. Therefore, the information about trace elements speciation in biological and food samples is today mandatory to understand the biochemistry of metals and semi-metals [16]. Consequently, the development of speciation studies gives valuable information rather than total elements determinations [13].

The elements studied in this work exhibit important biochemical roles, for example, Mn is a cofactor of the enzyme pyruvate carboxylase and it seems to act also as a non-specific activator for several enzymes, such as superoxide dismutase, glycosyl transferases, arginase and other. Other proteins in which Mn can be present are albumin and B₁-globulin [17]. Moreover, Mn is required for protein and fat metabolism, healthy nerves and healthy immune system as well as for sugar regulation [18]. Cu can be bound to several proteins such as superoxide dismutase and cytochrome oxidase [17]. This element is also needed for the transport of iron and it is involved in the synthesis of connective tissue, lipid metabolism and antioxidant protection [19]. Ni is thought to play an important role in folate metabolism [20]. Zn is a constituent in more than 200 enzymes and proteins which participate in all major metabolic processes [17]. Furthermore, Zn also affects proteins synthesis through gene expression [19]. Co is a cofactor of several enzymes like cytochrome oxidase and superoxide dismutase, and can also be the source of goiter disease. Moreover, Co is a constituent in vitamin B₁₂ and it is absorbed as cobalamine that interacts with iron and Mn [21].

Along the last decade high attention has been paid on the development of analytical methods for the determination of elements bound to biomolecules in foods mainly based on ICP-MS coupled to some separation device. In connection to this Mn compounds have been determined by capillary electrophoresis (CE) coupled to ICP-MS in liver [22] and in human milk by SEC/anion-exchange-ICP-MS [18]. Selenium speciation has been carried out in nuts by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled to ICP-MS [23] and electrospray mass spectrometry (ESI-MS) [24] and also in yeast by means of SEC-CE-ICP-MS [25], SEC-HPLC-ICP-MS and MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) [26], using a metallomic approach. In addition, the multielemental fractionation of Ni, Cu, Zn, and Mn in nuts [19] and soybean flour [27] by SEC-ICP-MS has been performed. Other multielemental fractionation studies have also been performed with this coupling in premature human [28,18] and whey milk [13].

As can be concluded from these studies, SEC-ICP-MS is a very suitable technique to get distribution patterns of elements along different molecular weight fractions and provides valuable information about the association of elements with the different compounds in the sample [29,30]. Many distribution studies based on SEC-ICP-MS have been focused on Se in nuts [25,26]. However, other metals of nutritional and toxicological importance exist in nuts, which have less been studied [19] and under our knowledge, distribution patterns of elements has not yet been performed in pine nuts (*P. pinea*).

The aim of this work is to determine the total content of some of these metals (Cu, Mn, Ni and Zn) as well as metal-binding biomolecules fractionation in pine nuts (*P. pinea*) for geographic origin assessment. The analytical methodology for distribution patterns of these elements was based on size-exclusion liquid chromatography (SEC) on-line coupled to UV and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

2. Experimental

2.1. Standard solutions and reagents

The mobile phase solution was daily prepared at 0.05 M of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) prepared at pH 8.0 from Trizma base and Trizma hydrochloride (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany).

Hydrochloric acid (37%), nitric acid (65%) and perchloric acid (70–72%) were of Suprapur grade (Merck, Darmstadt, Germany). Copper, manganese, nickel and zinc stock solutions (1000 mg l⁻¹) were also obtained from Merck. Ultrapure water (18 MΩ cm) from a Milli-Q System (Millipore, Watford, UK) was used throughout. Commercial chemicals were of analytical reagent grade and were used without further purification. The presence of trace elements was not detected in the working range.

2.2. Samples

Samples of pine nuts (*P. pinea*) were obtained from different areas in Spain (Huelva, Cádiz, Badajoz, Cataluña, Castilla, Madrid) and Portugal (Faro and Coimbra) and were supplied by Frutos Secos Paig (Tarragona, Spain). All samples were washed with ultrapure water, freeze-dried using a Benchtop lyophilizer (Hucoa-Erlöss, Spain) and finally ground using a conventional grinder Moulinette (Moulinex, Spain).

2.3. Instrumentation

Semi-preparative size-exclusion chromatography (SEC) was carried out in both Hiload 26/60 Superdex 30 Prep for separation range <10 kDa (low molecular weight, LMW) and Superdex 75 Prep for separation range 3–70 kDa (high molecular weight, HWM) (all from Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). An AKTA-Prime system (pump and UV detector at 280 nm) (Amersham) was used as the eluant delivery system, equipped with a 2 ml sample loop.

Elemental detection was performed using a model 4500 ICP-MS system (Hewlett-Packard, USA). A model Sigma 4–10 centrifuge (Spain) and a constant orbital shaking of 105 rpm (Heidolph, Unimax 1010, Germany) was used to accelerate the phase separation process in the extraction of the compounds.

2.4. Procedures

2.4.1. Quality control of the analyses

To overcome problems related to contaminations, losses, stability of the species during analysis as well as identification

difficulties, several considerations were taken into account:

- (1) The use of metal pieces (stainless steel) such as spatulas, injection syringes and syringe needles were avoided since this increases signal noise and causes contamination. All the instruments used were previously washed with a 10% (v/v) HNO_3 water solution and then with ultrapure water.
- (2) The column must be cleaned properly [17] to prevent proteins absorption on the SEC matrices caused by hydrophobic interactions. Between two consecutive injections the SEC columns were cleaned with one column volume of 0.002 M EDTA solution. After that, the SEC columns were washed with one-half to one column volume of 0.5 M NaOH to remove most non-specifically adsorbed proteins to the gel. After cleaning, the columns were equilibrated with at least two column volumes of mobile phase until the UV baseline stabilizes before applying next sample.

For a more rigorous cleaning the columns were washed with four column volumes of 1M NaOH (removal of hydrophobic proteins and lipoproteins) followed by four column volumes of Milli-Q water. Finally, one-half column volume of 30% isopropyl alcohol (removal of lipids and very hydrophobic proteins) followed by two column volumes of Milli-Q water were passed.

- (3) In order to obtain an accurate measurement of the relative MW obtained in the pine nuts extracts, both columns were calibrated with appropriate calibrants. For LMW column, the calibration standards were: bovine serum albumin (67 000 Da), metallothionein I (7000 Da), gastrin rat I (2126 Da), vitamin B_{12} (1352 Da) and Glyc (360 Da). For the HMW column, the calibration standards were: bovine serum albumin (67 000 Da), ovalbumin (43 000 Da), chymotrypsinogen A (25 000 Da) and ribonuclease A (13 700 Da). The relation between retention time (determined by peak maxima in UV detection) and MW (Da) for both columns is shown in Fig. 1a (LMW) and Fig. 1b (HMW). The void retention time was determined in the LMW and HMW columns using bovine serum albumin (67 kDa) and Blue Dextran 2000 (2000 kDa), respectively.

2.4.2. Total elements determination in pine nuts

First of all, lipids were extracted from 5 g of previously freeze-dried pine nuts with 25 ml chloroform/methanol (2:1) mixture by mixing those together for 30 min in a constant orbital shaking and centrifugation at 10 000 rpm for 20 min. Afterward, the organic layer was discarded and the remaining residue was dried at room temperature.

Samples without lipids were exactly weighted (0.2 g) into PTFE bombs and digested in a domestic microwave oven placed inside a fumed cupboard. Nitric acid (65%, 10 ml) was added and the vessels were tightly closed. The microwave program consisted in three steps as follows: heated at 800 W (3 min), 400 W (3 min) and 100 W (3 min). The bombs were left at room temperature for 10 min between each step to avoid overpressure. This solution was filtered through a 0.20 μm surfactant-free cellulose acetate filter. Cu, Mn, Ni and Zn were measured by ICP-MS (conditions as stated in Table 1).

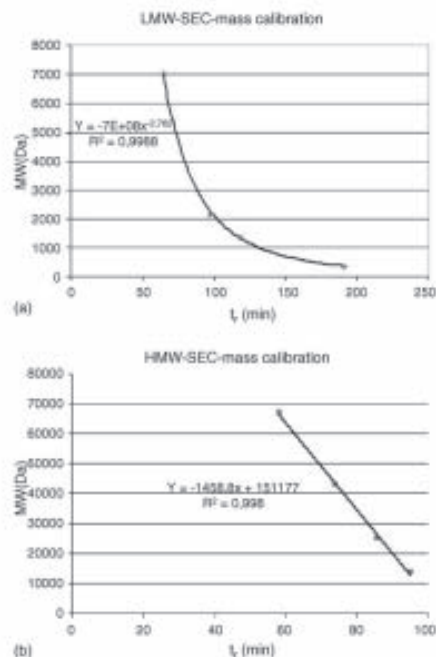


Fig. 1. Mass calibration of SEC columns. Relation between retention time (determined by peak maxima in UV detection) and MW (Da) for both columns: (a) LMW and (b) HMW.

2.4.3. Extraction of elemental species and distribution patterns by SEC-UV-ICP-MS

Freeze-dried samples (without lipids) were accurately weighted (0.2 g) in PTFE centrifuge tubes. The extraction of

Table 1
ICP-MS and SEC instrumental conditions

SEC conditions	
Columns	Hücol 26/60 Superdex 30 Prep Hücol 26/60 Superdex 75 Prep
Resolution range	$\text{Mr} < 10\,000\text{ Da}$; 3000–70 000 Da
Mobile phase	Tris 50 mmol^{-1} (pH 8.0)
Flow rate	2 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$
Injection volumes	2 μl
UV-vis wavelength	280 nm
ICP-MS conditions	
Forward power	1350 W
Plasma gas flow rate	15.0 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$
Auxiliary gas flow rate	0.871 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$
Carrier gas flow rate	0.9751 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$
Sampling depth	6 mm
Sampling and skimmer cones	Nickel
Dwell time	0.1 s per isotope
Isotopes monitored	^{45}Ca , ^{55}Mn , ^{58}Ni , ^{66}Zn

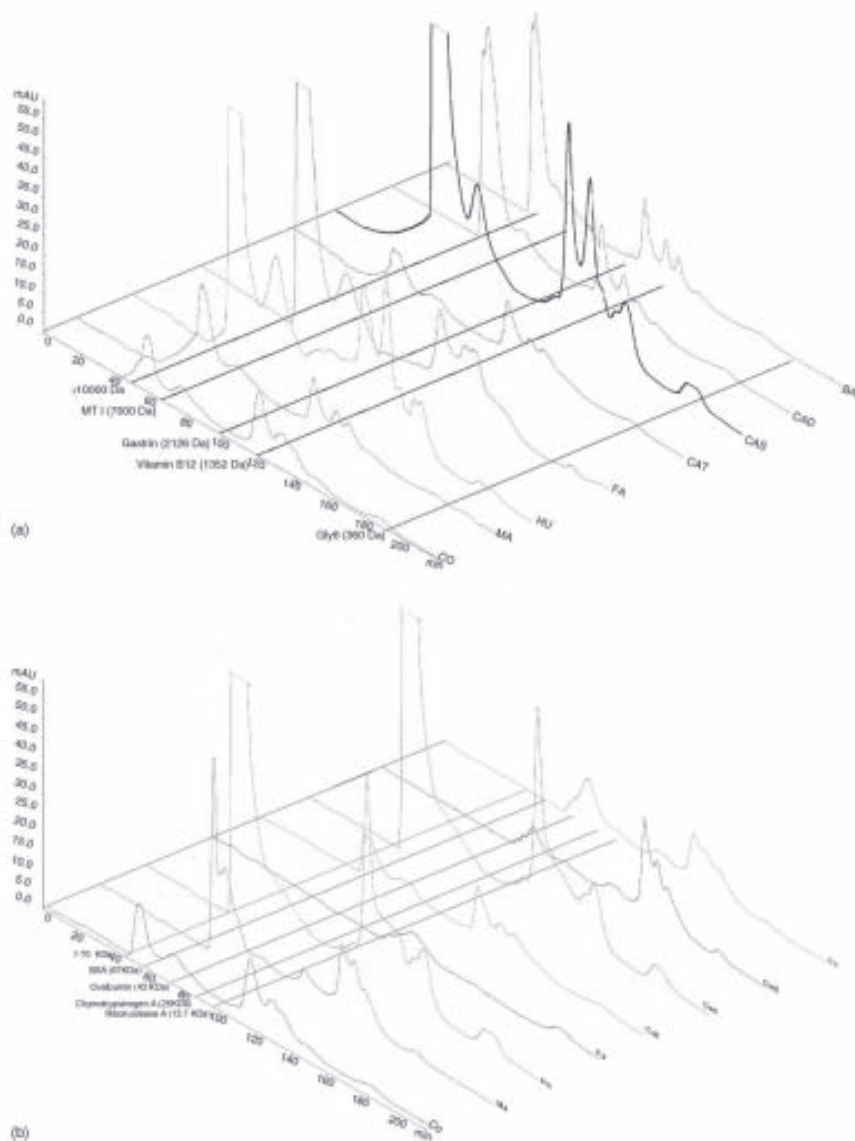


Fig. 2. UV profiles of the SEC separations from pine nuts samples: (a) LMW and (b) HMW. Codes in parenthesis: Coimbra (CO), Madrid (MA), Huelva (HU), Faro (FA), Cataluña (CAT), Castilla (CAS), Cádiz (CAD) and Badajoz (BA).

elemental species from pine nuts was performed with 4 ml of 0.1 M sodium hydroxide by centrifugation at 10000 rpm for 20 min after mixing for 10 min in a constant orbital shaking. Generally, the extraction conditions for elemental species are based in the use of NaOH, HCl [19] or in a less extent hot water [31]. It has been reported that NaOH solutions extract both LMW and HMW elemental compounds with higher recoveries while HCl solutions mainly extract LMW compounds due to the lower solubility of protonated compounds such as proteins [19,32,33]. Therefore, NaOH solutions were used in the present study.

Elemental fractionation profiles of the pine nut samples was performed by SEC using the two columns described in Section 2.3.

Elemental detection was carried out using an ICP-MS. The sensitivity of the instrument was optimized using a multielement standard solution containing the following elements: $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Li, Y, Ce and Tl, of each element and dissolved in 2% nitric acid. The analytical conditions are shown in Table 1.

The SEC-UV-ICP-MS coupling was performed connecting the outlet of the UV detector to the nebulizer inlet of the ICP-MS. The instrumental operating conditions are given in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of total elements determination

Several digestion procedures were tested for the analysis of total elements in pine nuts by adding $1000 \mu\text{g l}^{-1}$ of each element. Wet-digestion with concentrated nitric acid in open PTFE vessels until nearly dryness and later treatment with 2:1 ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$) mixture has been proposed in the literature for elemental analysis in honey [11] and plant samples [34]. However, this procedure was time-consuming and did not provide good recoveries. Therefore, other two different procedures based in closed vessel and microwave digestion were assayed. One of them based on the successive attack with concentrated nitric and perchloric acid, was reported for metal analysis in tea leaves [35].

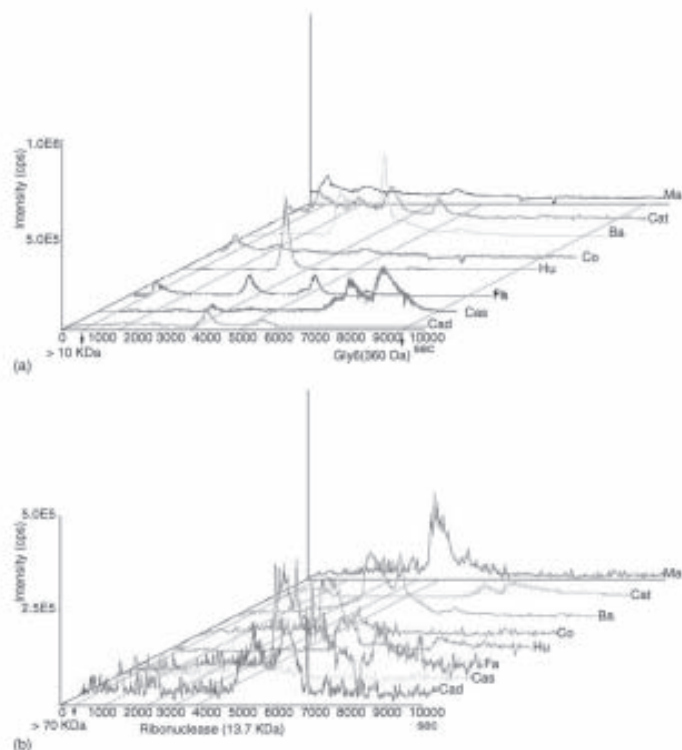


Fig. 3. Mn chromatograms of the SEC separations from pine nuts samples: (a) LMW and (b) HMW. Codes in parenthesis: Coimbra (CO), Madrid (MA), Huelva (HU), Faro (FA), Cataluña (CAT), Castilla (CAS), Cádiz (CAD) and Bajajoz (BA).

with recoveries in the range of 80–91%. Other approach optimized in our laboratory considers the digestion with 65% nitric acid with a domestic microwave oven (see Section 2.4.2) providing higher recoveries in the range of 91–96%. With this later procedure the analysis time was considerably reduced (from 24 h to 29 min) and it was selected for the further studies.

Seven pine nuts samples from different geographic origins were analyzed for total element content (as described in Section 2.2). The results are shown in Table 2. As can be seen, all the metals were at the highest mass fraction in pine nuts from Cataluña and at the lowest in Faro. The most abundant element was Mn at mass fractions in the range of $26 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña) to $559 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro). Zn was also present at high mass fraction from $25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña) to $113 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro).

3.2. Fractionation profiles by UV detection

As previous step for trace elements fractionation analysis in pine nuts the eluate from the SEC column was passed through

Table 2

Total element mass fractions in the analyzed pine nut samples ($n=3$)

	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Coimbra	65 ± 7.14	4.5 ± 0.49	31 ± 9.45	86 ± 9.45
Cataluña	26 ± 2.87	2 ± 0.10	8 ± 2.81	25 ± 2.81
Badajoz	458 ± 50.29	8 ± 0.85	35 ± 10.37	94 ± 10.37
Madrid	87 ± 9.58	7 ± 0.81	34 ± 10.70	97 ± 10.70
Faro	559 ± 61.41	15 ± 1.69	41 ± 12.42	113 ± 12.42
Castilla	72 ± 7.89	6 ± 0.65	35 ± 11.40	104 ± 11.40
Cádiz	414 ± 45.48	11 ± 1.21	38 ± 11.06	101 ± 11.06
Huelva	75 ± 8.26	5 ± 0.60	37 ± 11.73	107 ± 11.73

the UV detector set at 280 nm and the corresponding chromatograms were registered. The absorbance was initially studied in the 200–500 nm wavelength range to detect the different compounds present in the extraction solutions. It was observed that all the fractions showed good response at 280 nm. The superimposed UV chromatographic profiles of pine nuts from the different geographic origins are shown in Fig. 2a (for LMW

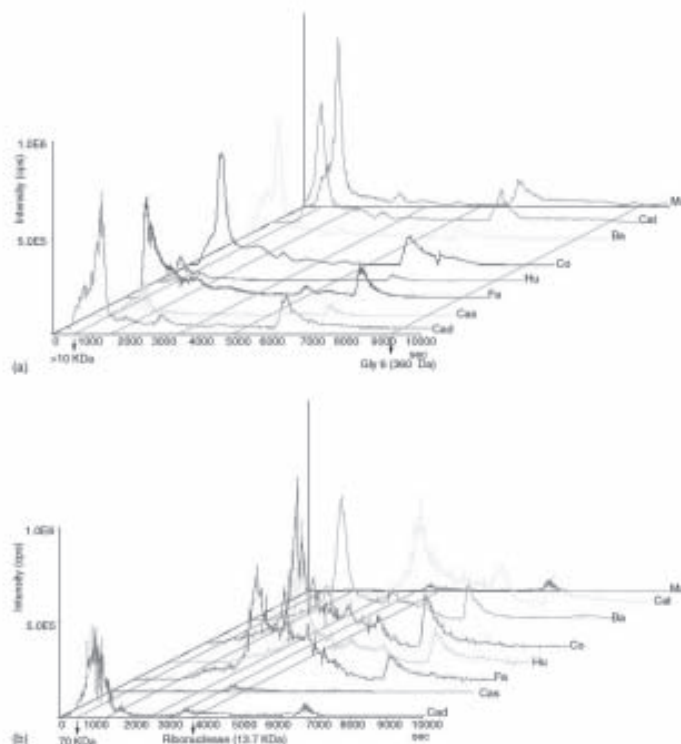


Fig. 4. Cu chromatograms of the SEC separations from pine nut samples: (a) LMW and (b) HMW. Codes in parenthesis: Coimbra (CO), Madrid (MA), Huelva (HU), Faro (FA), Cataluña (CAT), Castilla (CAS), Cádiz (CAD) and Badajoz (BA).

column) and Fig. 2b (for HMW column). The combined use of both columns allowed a clear separation of compounds in the range of 360–70 000 Da.

3.2.1. Low molecular weight UV profiles (<10 kDa)

The chromatographic run time was extended to 4 h to ensure the elution of all fractions. However, no peaks were observed at retention times higher than 190.52 min that corresponds to Gly₀.

As can be seen in Fig. 2a, all the analyzed pine nuts present fewer peaks in the fraction corresponding to the MW range of 1352–360 Da and 7000–2126 Da. In the last range the Huelva samples present a characteristic profile with two peaks which are absent in the other samples. Profiles from Castilla and Huelva samples show some peaks at low intensity in the 1352–360 Da range. On the other hand, highly similar profiles can be found between sample from Coimbra, Madrid and Cataluña in the MW range of 2126–1352 Da and also between Cádiz and Badajoz samples. However, samples from Huelva do not present any peaks in this range and that from Castilla exhibits two prominent peaks of high intensity. Finally, highly abundant peaks can be

observed for all the samples (except that from Faro) in the fraction >7000 Da with low resolution and they will be considered in more detail in Section 3.2.2 for HMW column. Therefore, in spite of somewhat similar patterns were found in the samples studied, the pine nuts UV-profile are depending of their geographic origin.

3.2.2. High molecular weight UV profiles (3–70 kDa)

As can be seen in Fig. 2b, molecules with MW > 7000 exhibit very similar profiles for pine nuts from Coimbra and Cataluña, Cádiz and Badajoz and also between Castilla and Huelva. It is significant the absence of peaks in the chromatogram of Faro that is in good agreement with data obtained from LMW column. In Fig. 2b it can be observed some peaks that discriminate samples from Madrid, Huelva and Castilla. Likewise the chromatogram of Madrid presents two highly abundant peaks at about 70 and 68 kDa that are absent in the rest of pine nuts. On the other hand, Huelva and Castilla present similar chromatograms with a peak at about 16 kDa that clearly distinguish these samples from the others.

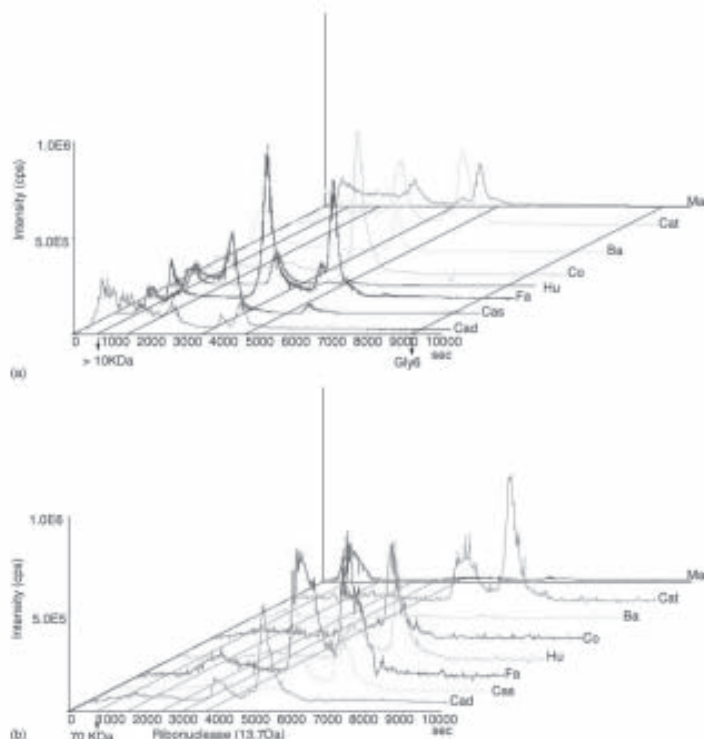


Fig. 5. Zn chromatograms of the SEC separations from pine nuts samples: (a) LMW and (b) HMW. Codes in parenthesis: Coimbra (CO), Madrid (MA), Huelva (HU), Faro (FA), Cataluña (CAT), Castilla (CAS), Cádiz (CAD) and Badajoz (BA).

Poor resolution can be observed in the chromatograms of pine nuts from Castilla, Huelva and into lesser extent from Coimbra, since the most abundant peak elutes in the void volume (retention time of Blue Dextran 2000, 49.7 min). However, the molecular weight range covered with both columns was suitable for most of the compounds present in the analyzed pine nuts.

3.3. Elemental fractionation patterns of pine nuts

The fractionation profiles of the metals in pine nuts are shown in Figs. 3–6.

3.3.1. Manganese fractionation profiles

3.3.1.1. LMW (<10kDa). Typical chromatographic profiles obtained for ^{55}Mn are shown in Fig. 3a. In pine nuts from Cádiz, Cataluña and Madrid this element was absent. However, it is clear the presence of this element in the chromatographic profile of Huelva, in which it is mainly associated to a MW fraction

of 7000–2126 Da. In the sample from Castilla, only one ^{55}Mn -containing fraction was observed in the range of 1352–360 Da. Finally three peaks were detected in the sample from Faro one of them associated to the fraction of MW > 10 kDa.

3.3.1.2. HMW (3–70kDa). Fig. 3b shows the chromatographic profiles of ^{55}Mn in which it can be observed that the intensity of peaks is very low. However, this element allows the discrimination between samples fairly well as can be also concluded from the LMW profiles.

3.3.2. Copper fractionation profiles

3.3.2.1. LMW (<10kDa). The chromatographic profiles of ^{63}Cu (Fig. 4a) were almost the same in all the samples with a peak outside the calibration range. So, they were further studied with the HMW column. Only the fractionation profiles of Huelva and Castilla were slightly different in terms of the peaks intensity.

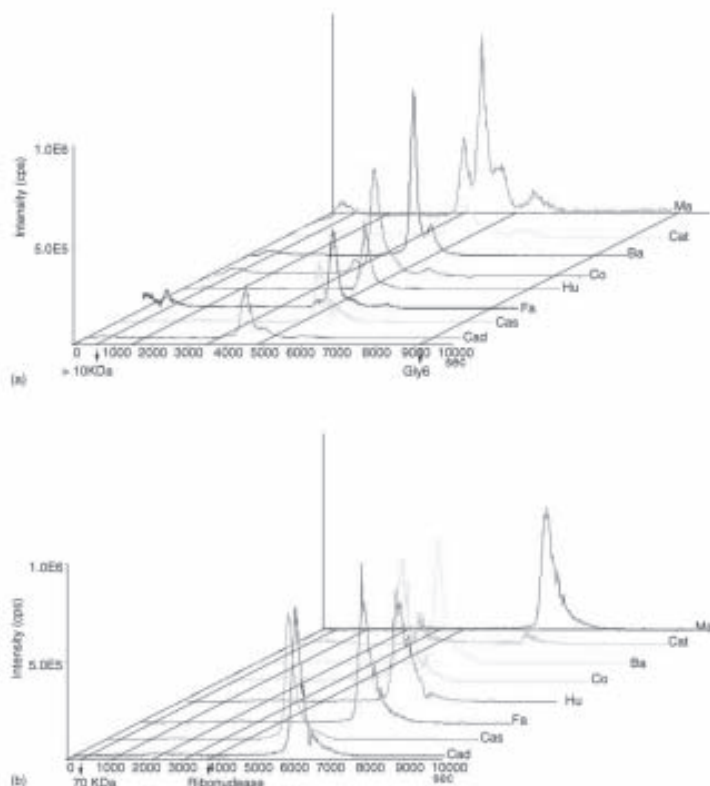


Fig. 6. Ni chromatograms of the SEC separations from pine nuts samples: (a) LMW and (b) HMW. Codes in parenthesis: Coimbra (CO), Madrid (MA), Huelva (HU), Faro (FA), Cataluña (CAT), Castilla (CAS), Cádiz (CAD) and Badajoz (BA).

3.3.2.2. HMW (3–70 kDa). Copper showed an especial behaviour since as can be seen in Fig. 4h, it was the only one associated to fractions at MW > 70 kDa in sample from Cádiz. For this reason this element can be used to discriminate samples from this origin.

3.3.3. Zinc fractionation profiles

3.3.3.1. LMW (<10 kDa). This element shows low abundance in pine nuts from Cádiz and Madrid but the opposite situation was observed in Faro in which two high abundant ⁶⁶Zn-containing fractions were detected at about 2186 and 993 Da (Fig. 5a). A similar profile can also be observed for samples from Cataluña. The second profile that contains Zn at high abundance is Coimbra. The profile of the samples from Coimbra also shows a high abundance of Zn.

3.3.3.2. HMW (3–70 kDa). Zn is mainly associated to compounds of MW < 10 kDa. For this reason was considered in the previous section. However, samples from Madrid exhibit a different profile with a prominent peak at about 70 kDa (Fig. 5b).

3.3.4. Nickel fractionation profiles

3.3.4.1. LMW (<10 kDa). This element shows highly similar behavior in pine nuts from all the analyzed samples except for Madrid, in which the abundance is clearly higher. For these samples, the most abundant ⁵⁸Ni-containing peak was in the range 2126–1352 Da. On the other hand, the chromatographic profile obtained for the sample from Cádiz was clearly different with a peak at 1570 Da (Fig. 6a). Because of this element is mainly associated to the above mentioned fraction, that was better resolved with the LMW column, the profiles obtained with the HMW column are not discussed (Fig. 6b).

4. Conclusions

The multielemental fractionation in pine nuts from *P. piner* allows a good discrimination between samples from different geographic origins. The use of SEC-UV-ICP-MS represents a powerful tool to distinguish them using the fractionation patterns of elements.

In some cases, the analyzed elements were associated to LMW fractions, indicating the possible linkage of these elements to proteins. Further studies could be focused on the identification and quantification of these metallobiomolecules to their use as markers of the geographic origin of this food. In addition, classification of samples could be performed by applying pattern recognition methods to a set of samples by using the proposed approach.

References

- [1] E. Örgülven, K. Varsavau, J. Food Eng. 68 (2005) 191.
- [2] C. Nergiz, I. Gómez, Food Chem. 86 (2004) 365.
- [3] R.S. Schwartz, L.T. Hecking, J. Anal. At. Spectrom. 6 (1991) 63.
- [4] B. Kolczko, P.J. Aggot, J.G. Bindels, P. Bang, P. Ferro, A. Gil, M.J. Lento, M. Roberfroid, S. Strobel, Br. J. Nutr. 80 (1998) 55.
- [5] R. Kokkinou, P.V. Petrakis, T. Mavrouniotakis, C.R. Theodoris, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 6233.
- [6] M.J. Baxter, H.M. Crews, M.J. Dennis, I. Goodall, D. Anderson, Food Chem. 60 (1997) 443.
- [7] M.J. Latanz, C. Garcia-Jano, B. Molina, C. Herrero, J. Agric. Food Chem. 42 (1994) 1451.
- [8] M.J. Guerrero, C. Herce-Paglal, A.M. Carnein, A.M. Troncoso, A.G. González, Talanta 45 (1997) 379.
- [9] M.J. Martín, F. Pablos, A.G. González, Food Chem. 66 (1999) 365.
- [10] R.C. Rivero, P.S. Hernández, E.M. Rodríguez, J.D. Martín, C.D. Romero, Food Chem. 83 (2003) 247.
- [11] R. Fernández-Torres, J.L. Pérez-Bernal, M.A. Bello-López, M. Calleja-Mochón, J.C. Jiménez-Sánchez, A. Gutiérrez-Pérez, Talanta 55 (2005) 686.
- [12] A. Marcos, A. Fisher, G. Rea, S.J. Hill, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 521.
- [13] F.A. Rivero-Martino, M.L. Fernández-Sánchez, A. Sano-Medel, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1271.
- [14] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M.J. Villegas, V. Oliveira, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 15.
- [15] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, A. Arias, Int. J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 255.
- [16] A. Sano-Medel, M. Montes-Bayón, M.L. Fernández Sánchez, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 236.
- [17] M.B. Calle-Guaitas, G. Borfina, A.R. Rodríguez, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 369.
- [18] B. Michalke, P. Schramel, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 121.
- [19] R.G. Wulbold, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 495.
- [20] L.A. Smitin, M.D. Grosvenor, Nutrition: Science and Application, third ed., Saunders, Orlando, FL, 2000.
- [21] L. Thunn, R. Lajoux, in: H.G. Seiler, A. Rigel, H. Riger (Eds.), Metals in Clinical and Analytical Chemistry, Marcel Dekker, New York, Basel, 1994, p. 333.
- [22] B. Michalke, J. Chromatogr. A 1050 (2004) 69.
- [23] K. Wrobel, S.S. Kannamkumarath, K. Wrobel, J.A. Caruso, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 133.
- [24] A.P. Vonderheide, K. Wrobel, S.S. Kannamkumarath, C.B. Hymer, M. Montes-Bayón, C.P. de León, J.A. Caruso, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 5722.
- [25] S. Mouzicos, S. McSheehy, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Lobinski, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 15.
- [26] J.R. Encinar, L. Oesdane, W. Buchmann, J. Tortajada, R. Lobinski, J. Szpunar, Anal. Chem. 75 (2003) 3765.
- [27] H. Fingerson, R. Kopic, Fresenius J. Anal. Chem. 363 (1999) 545.
- [28] R.R. de la Flor St. Remy, M.L. Fernández Sánchez, J.B. López Sastre, A. Sano-Medel, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 1.
- [29] C.A.P. de Loro, M. Montes-Bayón, J.A. Caruso, J. Chromatogr. A 974 (2002) 1.
- [30] J. Szpunar, P. Pellerin, A. Makarov, T. Doce, P. Williams, R. Lobinski, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 639.
- [31] R.G. Wulbold, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1315.
- [32] C.R. Cantor (Ed.), Protein Purification—Principles and Practice, third ed., Springer, Boston, MA, 1993.
- [33] S.S. Kannamkumarath, K. Wrobel, A. Vonderheide, J.A. Caruso, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 454.
- [34] F.J. Krug, H.B. Fo, E.A.G. Zagatto, S.S. Jorgense, Analyst 102 (1977) 505.
- [35] K. Lambie, S.J. Hill, Analyst 120 (1995) 413.

Combined use of total metal content and size fractionation of metal biomolecules to determine the provenance of pine nuts (*Pinus pinea*)

J. L. Gómez-Ariza · A. Arias-Borrego ·
T. García-Barrera

Received: 14 December 2006 / Revised: 18 April 2007 / Accepted: 26 April 2007 / Published online: 31 May 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract Four essential elements (Mn, Ni, Zn, and Cu) and their molecular-size distribution patterns have been determined, for twenty four samples of pine nuts from eight areas in Spain and Portugal (Huelva, Cádiz, Badajoz, Cataluña, Castilla, Madrid, Firo, and Coimbra), by size-exclusion liquid chromatography (SEC) coupled on-line to UV and inductively coupled plasma mass spectrometric (ICP-MS) detection. The variability observed in total element content and the size-exclusion profiles of elements in samples from distant areas were considered as chemical descriptors for characterization of geographic origin. A pattern-recognition technique, the display method principal component analysis, was used as visualization technique to determine the provenance of the pine nuts collected. The results obtained confirmed that size fractionation profiles give more information for assessing the provenance of pine nuts than the total elements composition traditionally used for this purpose. Combination of these chemical descriptors was the most suitable choice for the samples studied.

Keywords Pine nuts · Metals · Multielement molecular-size fractionation · Size-exclusion chromatography · Inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) · Food provenance

Introduction

Pine nuts (*Pinus pinea*) are a very valuable traditional food with an exquisite flavor and high protein content and are frequently used for preparation of cakes, vegetables, and other foods [1, 2]. The nuts also have important health properties associated with reduction of the risk both of coronary heart disease and non-fatal myocardial infarction [2].

The presence of essential elements in this food is critical, because of their important biological roles, the potential connection with pollution, and the effect of soil element composition in forestry areas [3, 4]. The function of many biomolecules and, in particular, metalloproteins, critically depends on their interaction with elements, mainly transition metals [5]. Some proteins (e.g. metallothioneins) are produced under heavy metal stress during pollution episodes, others, for example albumin and transferrin, are transporters of essential nutrient ions; finally, many elements are enzyme activators [5]. In contrast, many small biomolecules that incorporate metallic or non-metallic heteroelements are also crucial for many biological processes related to cells, body fluids, tissues, and foods [5, 6].

Most of the problems arising in analytical characterization of these metallomolecules in food are related to their unknown nature [7]; this makes it mandatory to use multidimensional analytical techniques to obtain complementary information (metallomics). The metallomics analytical approach [7, 8] usually involves use of one or several orthogonal chromatographic devices for species separation coupled with a sensitive atomic detector, for example ICP-MS, that also has multielement capability and is easily interfaced with HPLC (high-performance liquid chromatography) and CE (capillary electrophoresis). Use in parallel of an instrumental technique for elucidation of species structure is also necessary. This combination of

J. L. Gómez-Ariza (✉) · A. Arias-Borrego · T. García-Barrera
Departamento de Química y Ciencias de los Materiales,
Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva,
Campus de El Carmen,
21007 Huelva, Spain
e-mail: ariza@uhu.es

elemental and molecular mass spectrometry is an emerging and powerful tool in food and life science [9].

Many workers have studied the total element content of food in relation to nutritional value, toxicity, pollution processes, etc. [3, 4, 10]. In several reports the trace element content has been used as a marker for identification of product's geographical origin and authenticity [11], and several authors have proposed use of the mineral content to characterize the provenance of wines [12, 13], vinegars [14], coffees [15], potatoes [16], honey [17], teas [18], nuts [19], and other foods. Few have considered using metals bonded to biomolecules in foods, especially in nuts, for this purpose, however. Size-exclusion chromatography (SEC) coupled to ICP-MS has been proposed for separation and on-line detection of elements bonded to biomolecules in some nuts [19–21].

In the work discussed in this paper the total Mn, Cu, Ni, and Zn content and the relative abundance of these elements in fractions obtained by SEC have been quantified by use of ICP-MS and the results have been used to determine the provenance of pine nuts collected from eight forestry locations in the Iberian peninsula. These elements were selected because of their important biochemical roles, which are described elsewhere [22]. Briefly, Mn is a cofactor of several enzymes; it can be present in proteins, for example albumin and β_2 -globulin, and is required for protein and fat metabolism, healthy nerves, a healthy immune system, and for sugar regulation [23]. Cu can be bound to several proteins (i.e. superoxide dismutase and cytochrome oxidase); it is also needed for transport of iron and is involved in the synthesis of connective tissue, lipid metabolism, and antioxidant protection [19]. Ni is thought to play an important role in folate metabolism [24]. Zn is a constituent in more than 200 enzymes and proteins which participate in all major metabolic processes [25]. Zn also affects protein synthesis via gene expression [19].

Principal component analysis (PCA) has been used as a visualization technique; total element concentrations, the relative abundance of metal-biomolecules in size-exclusion fractions, or a combination of both have been used as chemical descriptors. Likewise, a statistical approach has also been applied to Mn separately, because it is the most abundant element in pine nuts [22].

The results described in this paper show that size fractionation profiles give more information for determination of the provenance of pine nuts than the total element composition traditionally used for this purpose. Combination of these chemical descriptors is also a powerful tool for establishing differences between pine nuts in relation to the presence of elements in unknown samples.

Experimental

Standard solutions and reagents

Standard solutions were prepared by dilution of a multi-element standard (1000 mg l⁻¹ in 1 M HNO₃) obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Nitric acid (65%) of Suprapur grade (Merck) was used for the mineralization of the samples. The mobile phase solution was daily prepared at 0.05 M of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) prepared at pH 8.0 from Trizma base and Trizma hydrochloride (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). Copper, Manganese, Nickel and Zinc stock solutions (1000 mg l⁻¹ in 1 M HNO₃) were also obtained from Merck. Ultrapure water (18 M Ω cm) from a Milli-Q Gradient System (Millipore, Watford, UK) was used throughout.

Samples

Samples of pine nuts (*Pinus pinea*) were obtained in different forestry zones from the most important production areas in Spain and Portugal. Twenty-four samples were collected from the Spanish locations (codes in parentheses): Huelva (Hu) and Cádiz (Cad) (southwest), Castilla (Cas) and Madrid (Ma) (center), Badajoz (Ba) (center-west), and Cataluña (Cat) (northeast). Samples from Portugal were collected from the south (Faro, Fa) and from the center to the north (Coimbra, Co). They were supplied by Frutos Secos Puig (Tarragona, Spain). All samples were washed with ultrapure water, ground by use of a conventional grinder Moulinette (Moulinex, Spain) and finally freeze-dried with a benchtop lyophilizer (Hucoa-Erlöss, Spain).

Instrumentation

Elemental analysis was performed with a Hewlett-Packard (USA) HP 4500 ICP-MS containing an ICP source with a plasma shielded torch. This instrument was fitted with a standard Babington nebulizer. The spray chamber was cooled to 2 °C. The operating conditions were optimized, and are summarized in Table 1. The sensitivity of the ICP-MS instrument was optimized using a multi-element standard solution containing 9.9±0.5 ng mL⁻¹ Li, 10.01±0.5 ng mL⁻¹ Y, 9.98±0.5 ng mL⁻¹ Ce, and 10.00±0.5 ng mL⁻¹ Tl, dissolved in 2% nitric acid.

Element distribution profiles for the pine nuts were determined by size-exclusion chromatography (SEC) with on-line simultaneous elemental detection by ICP-MS. The ICP-MS instrument was connected to the chromatograph by using Tygon capillary tubing to connect the size-exclusion column outlet to the inlet of the nebulizer. A Hiloadd 26/60 Superdex 30 Prep semi-preparative size-exclusion chroma-

Table 1 Operating conditions for the ICP-MS and SEC

Conditions	
SEC conditions	
Column	Hiload 26/60 Superdex 30 Prep
Resolution range	Mr < 10,000 Da
Mobile phase	Tris 50 mmol L ⁻¹ (pH 8.0)
Flow rate	2 mL min ⁻¹
Injection volume	2 mL
UV-visible wavelength	280 nm
ICP-MS conditions	
Forward power	1350 W
Plasma gas flow rate	15.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.87 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.975 L min ⁻¹
Sampling depth	6 mm
Sampling and skimmer cones	Nickel
Dwell time	0.1 s per isotope
Isotopes monitored	⁴³ Ca, ⁵⁵ Mn, ⁵⁸ Ni, ⁶⁶ Zn

tography (SEC) column was used for separation of molecules in the range <10 kDa. An AKTA-Prime system (pump and UV detector at 280 nm) (Amersham), equipped with a 2-mL sample loop, was used as the mobile phase delivery system. The instrument settings used are listed in Table 1.

A Sigma (Spain) model 4-10 centrifuge and a Heidolph (Germany) Unimax 1010 constant orbital shaker operating at 105 rpm were also used, the latter to accelerate the phase-separation process during extraction of the compounds.

Procedures

Evaluation of the total element content of pine nuts

Samples were digested for metal analysis by ICP-MS by a procedure described elsewhere [22]. Briefly, residues (0.2 g, accurately weighed), previously defatted with a chloroform-methanol mixture, were digested in closed PTFE bombs with 10 mL nitric acid (65% w/v) by use of a domestic microwave oven. Three steps with decreasing energy input—heating at 800 W (3 min), 400 W (3 min), and 100 W (3 min)—were used successively for sample decomposition. Samples were cooled to room temperature for 10 min between each step to avoid overpressure. The final solution was filtered through a 0.20 µm surfactant-free cellulose acetate filter. The elements were measured by ICP-MS (conditions as listed in Table 1).

Metal species distribution patterns by SEC-UV-ICP-MS

Lipid-free pine nut samples were accurately weighed (0.2000 g) in PTFE centrifuge tubes to extract the metal species with 4 mL 0.1 mol L⁻¹ sodium hydroxide by

mixing for 10 min in a constant orbital shaker. NaOH has been proved to be a better extractant than HCl and hot water for high and low-molecular-weight species, HCl solutions mainly extract LMW compounds, because of the lower solubility of protonated compounds such as proteins, and hot water is used to much less an extent [19, 26, 27].

Element fractionation profiles for the pine nut samples were obtained by size-exclusion chromatography (SEC) using the column described in the section "Instrumentation". All instrumental operating conditions are listed in Table 1. The SEC column was calibrated by use of standards of bovine serum albumin (67,000 Da), metallothionein I (7,000 Da), rat gastrin I (2,126 Da), vitamin B₁₂ (1,352 Da), and Glyc (360 Da). The standards were dissolved in the mobile phase and their chromatographic profiles were monitored by UV detection. The void volume was determined by use of bovine serum albumin.

Cleaning of SEC columns between consecutive injections was achieved by passage of one column volume of 0.002 mol L⁻¹ aqueous EDTA solution and then washing with a half to one column volume of 0.5 mol L⁻¹ NaOH, to remove most of the proteins non-specifically adsorbed by the gel [22]. Finally, the column was equilibrated with at least two column volumes of mobile phase, until the UV baseline was stabilized, before injection of the next sample. To test the reproducibility of the SEC column each sample was chromatographed three times.

Chemometrics

Computations were performed by use of the statistical package Statistica version 6.0 (2001) (StatSoft, Tulsa, USA). Principal-components analysis was applied to determine the provenance of pine nuts from different forestry areas.

Results and discussion

Total metal composition and size exclusion fractionation profiles in pine nuts

The element composition of vegetables and fruits can be used to determine their geographical origin [3, 4]. This approach is, however, "blind" to the metal species present in the sample, which are usually related to intake of essential elements or elimination of toxic elements, and are strongly affected by the conditions in which the plant grows. This loss of information from total metal analysis can be overcome by use of size-exclusion metal profiles, especially when the relative abundance of metals in the different peaks is used for this purpose. This increases the

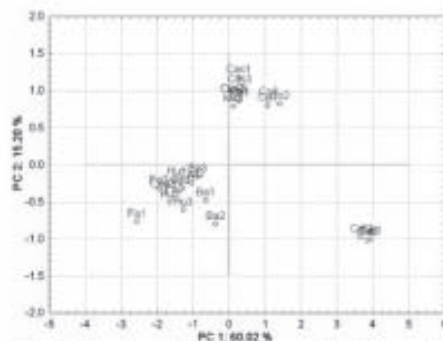
Table 2 Total element concentrations^a ($\mu\text{g g}^{-1}$) in the pine nut samples analyzed in this work

Code	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Hu1	500±21	9.2±0.8	41±10	107±19
Hu2	512±23	11±1	39±11	106±17
Hu3	513±26	10.7±0.4	35±4	105±30
Co1	65±6	4.5±0.2	31±6	86±17
Co2	64±9	3.5±0.3	29±2	85±10
Co3	67±10	4.72±0.06	30±5	90±18
Cat1	26±7	2.1±0.3	8±1	25±9
Cat2	28±5	3.05±0.02	8±2	30±12
Cat3	25±4	2.6±0.2	8±1	26±10
Ba1	458±23	8±2	35±9	94±20
Ba2	498±20	7±1	30±10	93±10
Ba3	399±12	9±1	26±8	102±24
Ma1	87±6	7.1±0.2	34±12	97±8
Ma2	90±9	8±1	33±15	100±16
Ma3	88±10	7.8±0.5	34±9	98±10
Fa1	559±38	15±5	41±11	113±30
Fa2	523±35	10±4	38±16	109±20
Fa3	450±17	13±3	40±6	111±28
Cad1	72±9	6.8±0.2	35±9	104±24
Cad2	70±9	8±2	34±20	101±19
Cad3	73±8	6.5±0.7	33±9	104±22
Cad4	414±15	11±1	38±10	101±19
Cad5	398±11	10±1	37±18	100±47
Cad6	400±13	14±2	39±16	106±38
LOD	0.023	0.032	0.018	0.037
LOQ	0.077	0.107	0.060	0.123

^a Average from determination in triplicate ± SD

number of features suitable for statistical assessment and the general information obtained.

Table 2 shows the levels of the elements Cu, Zn, Ni, and Mn in twenty-four samples of pine nuts from the eight locations listed above. The variability in the concentrations of some of the elements is very marked, especially for manganese, which is the most abundant. One-way ANOVA

**Fig. 1** Results from principal-components analysis for the variable total metal concentration (PC₁ versus PC₂)

revealed that means of these triplicate results were significantly different, ($p < 0.05$).

The size-fractionation profiles for these elements reveal an important presence of metal species with molecular weights (MW) below 10 kDa. Table 3 shows the relative abundance of the different metal-fractions expressed as peak-area ratio (%) relative to the total area of the chromatogram [19].

Most of the manganese is usually bound to lower-MW species, although the exact distribution depends on sample location. For example, 90% of the Mn in the sample from Coimbra and 80% of that in the sample from Madrid is in the 7 to 10 kDa fraction. The samples from Huelva contain approximately 100% of the manganese in molecules in the range 7 to 2 kDa, whereas 75% of the Mn in Cádiz samples and 60% of that in Badajoz samples is in the 2 to 1.5 kDa fraction. Smaller MW manganese fractions (in the range 1.3 to 0.3 kDa) were detected in a few samples only, for example those from Castilla, in which this fraction contains

Table 3 Molecular size distribution of Mn, Cu, Ni, and Zn in pine nut samples from different forestry areas ($n=5$)

Pine nut sample	Mn area (%)					Cu area (%)					Ni area (%)					Zn area (%)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Cad	–	–	–	75	25	7	70	2.5	0.5	20	0.3	–	–	99	0.7	20	50	10	15	–
Cas	–	–	5	–	95	–	90	–	–	10	–	–	–	100	–	4	95	1	–	–
Fa	–	30	30	5	35	10	70	10	2	8	5	–	–	90	5	–	7	50	40	3
Hu	–	–	100	–	–	–	95	–	–	5	–	–	–	97	3	7	10	80	3	–
Co	–	90	7	2	–	4	60	14	2	20	2.5	2.5	–	90	5	3	–	2	95	–
Ba	–	–	40	60	–	10	70	10	2	8	–	3	–	90	7	30	20	5	45	–
Cat	–	35	40	25	–	–	50	20	5	35	–	2	–	90	7	–	20	60	15	5
Ma	–	80	10	10	–	–	80	5	–	15	–	2	5	90	3	10	30	30	30	–

^a 1, >10 kDa MW fraction; 2, 10–7 kDa MW fraction; 3, 7000–2126 Da MW fraction; 4, 2126–1352 Da MW fraction; 5, 1352–360 Da MW fraction

Results for the different locations (i.e. Hu1, Hu2, Hu3) were averaged in this table

95% of this element. In the samples from Faro and Cataluña this element is distributed among the different fraction without any apparent trend (Table 3).

For the other elements (Cu, Ni, Zn) several trends are apparent:

1. a low percentage of these elements is observed in the void volume (fraction >10 kDa; 20% and 30% of Zn in the samples from Cádiz and Badajoz, respectively);
2. the abundance of a metal in a particular fraction depends on the metal, thus the amount of Cu in the 10 to 7 kDa fraction ranges from 95% (Huelva) to 50% (Cataluña), the amount of Ni in the 2 to 1.3 kDa fraction ranges from 99% (Cádiz) to 90% (Faro, Coimbra, Badajoz, Cataluña), and the amount of Zn in the 7 to 2 kDa fraction is 95, 80, 60, and 50% for the samples from Castilla, Huelva, Cataluña, and Faro, respectively; and
3. samples from Castilla are the only ones with significant abundance of metals in the LMW fractions—95% of Mn in the 1.3 to 0.3 kDa fraction and 100% of Ni in the same fraction.

Statistical data analysis by principal-components analysis

The variability in the total element content and size-exclusion profiles for the elements in pine nut samples from different forestry areas in the Iberian peninsula (Tables 2 and 3) can be used as descriptors to establish differences between these samples. A pattern recognition technique, principal-components analysis, was used as display method for this purpose.

The data set were analyzed on the basis of the results listed in Tables 2 and 3. Several aspects were considered.

Total metal concentration

When PCA is applied to total element concentrations (Table 2), two principal components (PCs) were extracted. PC1, the first principal component, explained up to 60.02% of the total variance and PC2, the second principal

Table 4 Loadings of variables for the two PCs for the variable total metal concentration (Mn, Ni, Cu, Zn) for the eight locations studied

Variable	PC 1	PC 2
Mn	-0.752283	-0.4077
Ni	-0.511151	-0.2885
Cu	-0.524581	0.4027
Zn	-0.508900	0.5036

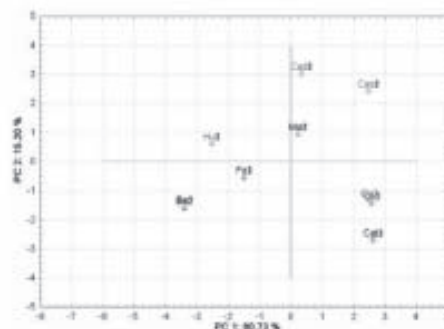


Fig. 2 Results from principal component analysis for the variables total metal concentration and metal molecular size distribution (PC₁ versus PC₂)

component, explained up to 15.20%. The first two principal components thus account for 75.22% of the total variance, which was regarded as sufficient for such data. The score plot of the samples in the space defined by the two PCs (Fig. 1) reveals the number of classes and groups is different. For this reason the only distinction that can be

Table 5 Loadings of variables for the two PCs for the variables total metal concentrations and metal molecular size distribution for the eight locations studied

Variable	PC 1	PC 2
Mn	-0.546528	0.278990
Ni	-0.253440	0.212282
Cu	-0.304001	0.176694
Zn	-0.311537	0.141990
Mn-2 ^a	0.701249	-0.018272
Mn-3	-0.053752	0.012429
Mn-4	0.632007	0.292407
Mn-5	-0.500589	-0.248593
Cu-1	-0.020142	0.324850
Cu-2	-0.629966	-0.084319
Cu-3	0.342646	0.012457
Cu-4	0.315120	-0.027215
Cu-5	0.403742	-0.085166
Ni-1	0.019330	0.070549
Ni-2	0.451885	0.105636
Ni-3	0.005847	0.013181
Ni-4	0.643977	0.328712
Ni-5	-0.153474	-0.325539
Zn-1	-0.051018	0.340468
Zn-2	0.002641	0.223551
Zn-3	-0.139560	-0.349636
Zn-4	0.167773	0.158392
Zn-5	0.224124	-0.116536

^a 1, >10 kDa MW fraction; 2, 10–7 kDa MW fraction; 3, 7000–2126 Da MW fraction; 4, 2126–1352 Da MW fraction; 5, 1352–360 Da MW fraction

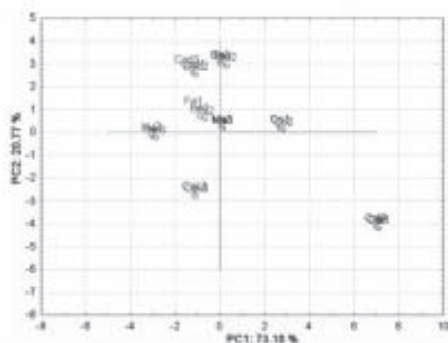


Fig. 3 Results from principal-components analysis for the variable metal molecular size distribution (PC₁ versus PC₂)

clearly achieved is that between samples from Cataluña (Cat) and the others. The samples from Castilla (Cas), Coimbra (Co), and Madrid (Ma) are in the same group, and this is separated from another group containing the samples from Huelva (Hu), Badajoz (Ba), and Faro (Fa). As shown in Table 4, the dominant variable is Mn in PC₁. All the variables appear at negative values in PC₁ which suggests they give the same kind of information. In PC₂ the dominant variable is Zn, with Mn and Cu very close. In

Table 6 Loadings of variables for the two PCs for metal molecular size distribution for the eight locations studied

Variable	PC 1	PC 2
Mn-2 ^a	0.769290	-0.359546
Mn-3	-0.133723	0.001057
Mn-4	0.359382	0.719853
Mn-5	-0.750536	-0.237565
Cu-1	0.374029	0.396235
Cu-2	-0.879589	0.293333
Cu-3	0.831778	-0.496411
Cu-4	0.699385	-0.511417
Cu-5	0.580446	-0.365502
Ni-1	0.229420	-0.373777
Ni-2	0.702575	0.024913
Ni-3	0.035321	0.180029
Ni-4	0.731124	0.338782
Ni-5	-0.754329	-0.312908
Zn-1	0.231987	0.906299
Zn-2	0.213465	0.688338
Zn-3	-0.752777	-0.503984
Zn-4	0.645059	-0.104193
Zn-5	0.392631	-0.642856

^a1, >10 kDa MW fraction; 2, 10–7 kDa MW fraction; 3, 7000–2126 Da MW fraction; 4, 2126–1352 Da MW fraction; 5, 1352–360 Da MW fraction

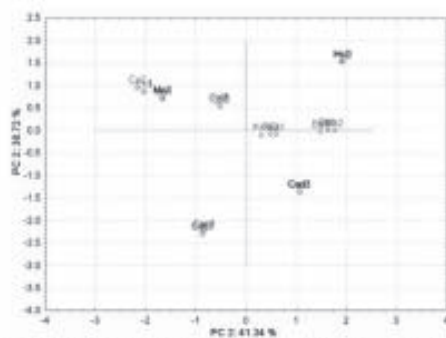


Fig. 4 Results from principal-components analysis for the variable Mn molecular size distribution (PC₁ versus PC₂)

PC₂, Mn and Ni appear at negative values but Cu and Zn appear at positive values.

Total metal concentrations plus metal molecular size distribution

PCA was also applied using both total metal content (Table 2) and metal distribution obtained by SEC-ICP-MS (Table 3) as chemical descriptors. PC₁ now explained up to 80.73% of the total variance and PC₂ up to 15.20%. Thus both components account for 95.93% of the total variance, much higher than that in Fig. 1. The score plot enables very clear recognition of the samples according to their forestry area location (Fig. 2). The loadings of the variables used in this section are shown in Table 5. The most important variable for PC₁ is Mn fraction in the molecular weight range 10,000 to 7,000 Da, followed by Ni (2,126–1,352 Da) and, very closely, by Mn (2,126–1,352 Da). In

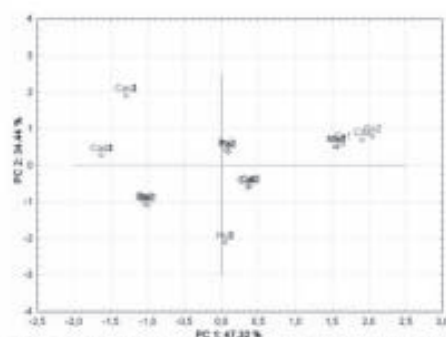


Fig. 5 Results from principal-components analysis for the variable total Mn concentration and Mn molecular size distribution (PC₁ versus PC₂)

PC2 the variables with higher loadings are different; the Zn fractions (7,000–2,126 Da) and (>10,000 Da) should be noted; the former is the only one with a negative sign.

Metal molecular size distribution

When PCA was applied to data from Table 3 only the origin of the samples could again be unequivocally recognized (Fig. 3). PC1 explained 73.10% of the total variance and PC2 up to 20.77%. Both components accounted for 93.87%. The loadings of the variables are collected in Table 6, in which we draw attention to PC1 for the molecular weight distributions Cu (10000 to 7000 Da), Cu (7000 to 2126 Da), and Mn (10000 to 7000 Da). It is important to remark that the most important variable has a negative sign relative to the other two variables. In PC2 the most important variable is Zn (>10000 Da), followed by Zn (10000 to 7000 Da), and Mn (2126 to 1352 Da); in this instance no differences between the loadings were observed.

It is possibly the important differences between the main molecular size fractions in which the elements are present (especially Mn) that explain the exploratory power of this approach. For this reason a further study based on this aspect was accomplished.

Pattern recognition based on manganese data

Inspection of the results for Mn in Tables 2 and 3 shows that concentration of this element is most variable. Figures 4 and 5 show the results obtained by using, respectively, Mn molecular size distribution and the combination of this with element content as chemical descriptors. In this case, similarly to the results obtained for all the metals, combined use of Mn molecular size distribution and manganese concentration data enables better explanation of the total variance—81.76% compared with 80.06%. Although we cannot conclude that use of manganese data only is better than those from all the metals, it is evident that the variance explained by this element is high enough to be regarded as a simple option for this kind of study.

On the basis of these findings the best choice for determination of the provenance of pine nuts is the combined use of total element concentrations and their multielement fractionation profiles obtained by SEC. As we can conclude from PCA, the three cases mentioned above can be used because the variance of the data explained by use of all of them is high. Combination of both chemical descriptors gives the best results, however. The advantage of using only one chemical descriptor is that sample throughput is higher, because these approaches can be used with few data only. In studies in which the classes are very similar or other elements must be considered, however, combined use of the chemical descriptors might be mandatory.

Conclusions

Results from multielement fractionation and total element analysis for *P. pinea* nuts are good chemical descriptors for differentiating samples of different geographic origin. This has been confirmed by applying unsupervised pattern recognition techniques to samples from several parts of Spain and Portugal. Several procedures were tried but the best for determination of the provenance of pine nuts was the combined use of total element concentrations and their multielement fractionation profiles. SEC-UV-ICP-MS is a powerful tool for distinguishing the provenance of these samples from element fractionation patterns. Mn was the most abundant element in the samples; for this reason it was studied separately. Results obtained showed that this element explained a higher percentage of the total variance in the PCA. Use of Mn as a chemical descriptor is, therefore, sufficient to determine the provenance of the sample; this is a simpler alternative to considering all the elements, although better results are obtained by the latter procedure.

Acknowledgements We express our gratitude to the Frutos Secos Puig, S.A. cooperative for supplying pine nut (*P. pinea*) samples of authentic origin. This work is supported by Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía), Grant no. PQM 348. Ana Arias-Borrego thanks Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for a pre-doctoral scholarship.

References

- Öngören F, Varastus K (2005) *J Food Eng* 68:191
- Nergiz C, Cömmez I (2004) *Food Chem* 86:365
- Schwartz RS, Hecking LT (1991) *J Anal At Spectrom* 6:62
- Koletzko B, Agost PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, Lentze MJ, Roberfrid M, Strobel S (1998) *Br J Nutr* 80:55
- Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Bernal V, Villegas MJ, Oliveira V (2004) *Anal Chim Acta* 524:15
- Gómez-Ariza JL, García-Barrera T, Lorenzo F, Arias-Borrego A (2005) *Intern J Environ Anal Chem* 85:235
- Sanz-Medel A, Montes-Bayón M, Fernández-Sánchez ML (2003) *Anal Bioanal Chem* 377:236
- Montes-Bayón M (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:287
- Montes-Bayón M, DeNicola K, Caruso JA (2003) *J Chromatogr A* 1000:457
- Rivero-Martino FA, Fernández-Sánchez ML, Sanz-Medel A (2002) *J Anal At Spectrom* 17:1271
- Kokkinou R, Penakis PV, Mavroumoustakos T, Theodoridis CR (2003) *J Agric Food Chem* 51:6233
- Baxter MJ, Crews HM, Dennis MJ, Goodall I, Anderson D (1997) *Food Chem* 60:443
- Latorre MJ, García-Jares C, Medina B, Herrero C (1994) *J Agric Food Chem* 42:1451
- Guerrero ML, Herce-Pugliai C, Carrión AM, Troncoso AM, González AG (1997) *Talanta* 45:379
- Muñoz MJ, Pablos F, González AG (1999) *Food Chem* 66:365
- Rivero RC, Hernández PS, Rodríguez EM, Martín JD, Romero CD (2003) *Food Chem* 83:247

17. Fernández-Torres R, Pérez-Bernal JL, Bello-López MA, Callejón-Mochón M, Jiménez-Sánchez JC, Guzmán-Pérez A (2005) *Talanta* 65:686
18. Marcos A, Fisher A, Rea G, Hill SJ (1998) *J Anal At Spectrom* 13:521
19. Wulfford RG, Karanikumarath SS, Caruso JA (2004) *Anal Bioanal Chem* 379:495
20. Vonderheide AP, Wrobel K, Karanikumarath SS, Hymel CB, Montes-Bayón M, León CP, Caruso JA (2002) *J Agric Food Chem* 50:5722
21. Mounicou S, McSheehy S, Szpunar J, Potin-Gautier M, Lobiński R (2002) *J Anal At Spectrom* 17:15
22. Gómez-Ariza JL, Arias-Borrego A, García-Barrera T (2006) *J Chromatogr A* 1121:191
23. Michalke B, Schramel P (2004) *J Anal At Spectrom* 19:121
24. Smolin LA, Grosvenor MD (2000) *Nutrition: science and application*, 3rd edn. Saunders, Orlando
25. Calle-Gantifias MB, Bonfin G, Rodríguez AR (2002) *Anal Bioanal Chem* 374:569
26. Carnor CR (1993) *Protein purification-principles and practice*, 3rd edn. Springer, Boston
27. Karanikumarath SS, Wrobel K, Vonderheide A, Caruso JA (2002) *Anal Bioanal Chem* 373:454

Characterization of pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origin according to their mineral content

J.L. Gómez-Ariza*, A. Arias-Borrego, T. Garcia-Barrera.

Departamento de Química y Ciencias de los Materiales, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Huelva, Campus de El Carmen
21007-Huelva, Spain

Abstract

In the present study several elements, namely, Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb were determined in forty samples from Spain and Portugal (Huelva, Cádiz, Badajoz, Cataluña, Castilla, Madrid, Faro and Coimbra) by using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). These elements were considered as chemical descriptors for geographic origin characterization of these samples. Pattern recognition techniques such as exploratory techniques (Principal Component analysis and Cluster analysis) and classification procedure (Linear Discriminant analysis) were applied to attain the differentiation of pine nuts according to the mineral composition. The results obtained confirm the possibilities of this analytical approach to characterize pine nuts samples from different locations, especially those from more distant areas.

Keywords: Pine nut; Pattern recognition; Chemometrics; Selected trace elements; Inductively coupled plasma-mass spectrometry.

*ariza@uhu.es

1. Introduction

Pine nuts are a good source of nutrients with an exquisite flavour and high protein and fat content. Pine nuts (*Pinus pinea*) are very frequently consumed in the Mediterranean area raw (Mirete et al., 2003), slightly processed in diverse food products or included as ingredients in a variety of traditional dishes (Özgüve, & Vursavus, 2005). It is reported that the seeds of *P. pinea* show a composition of 5.6% moisture, 31.1% protein, 47.4% fat, 10.7% carbohydrate and 4.3% ash (Nergiz, & Cömmez, 2004). They contain vitamins, particularly B1 (thiamine) and also minerals (Özgüven et al., 2005). Regular consumption of nuts has been associated with a reduced risk of both coronary heart disease and non-fatal myocardial infarction (Nergiz et al., 2004).

There are a number of studies in which the elemental composition of plant foods have been associated with important biological roles, toxicity, pollution, geographic origin of plants, etc (Marcos, A., Fisher, A., Rea, G., & Hill, S.J.1998). Moreover, this elemental composition is a reflection of the trace mineral composition present in the soil and environment in which the plants grow. Therefore, it can be used to investigate the element composition in the soil in which the plant growth. On the other hand, the content of trace elements can be very useful as markers for the identification of product's geographical origin and authenticity (Kokkinofa, Petrakis, Mavromoustakos, & Theocharis, 2003), and several authors have proposed the use of the mineral content to characterize wines (Baxter, Crews, Dennis, Goodall, & Anderson, 1997; Latorre, Garcia-Jares, Medina, & Herrero, 1994), vinegars (Guerrero, Herce-Pagliai, Cameán, Troncoso, & González, 1997), coffees (Martín, Pablos, & González, 1999; Costa-Freitas & Mosca, 1999), potatoes (Rivero, Hernández, Rodríguez, Martín, & Romero, 2003), honey (Fernández-Torres et al., 2005), teas (Marcos, Fisher, Rea, & Hill, 1998; Moredo-Piñeiro, Fisher, & Hill 2003) and so on.

The selected elements (Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb) are known to have severe toxicological effects on human health even at very low concentrations. Several factors may affect the accumulation and concentration of trace elements and heavy metals in pine nuts. Concentrations of the elements are generally assumed to the species-

dependent, but substrate composition is also considered to be an important factor (Kalac and Svoboda, 2000).

This approach has not been yet performed on pine nuts for classification purpose. For this reason, multi-element analysis can be a valuable tool for the characterization of pine nuts from different geographic origins, on the basis of its nutritional properties and beneficial effects that needs a periodical control of these markers. This has been mainly conducted through multivariate analysis in combination with pattern recognition techniques (González-Arjona, González-Gallero, & González, 2003; Terrab, González, Díez, & Heredia, 2003).

In the present paper, the content of Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb were determined in samples from different geographic origin by using ICP-MS after a previous acid digestion.

Pattern recognition procedures such as display methods, Principal Component analysis (PCA) and Cluster analysis (CA), and supervised techniques Linear Discriminant analysis (LDA) were applied with these chemical descriptors to establish differences between pine nuts from different origin geographic, in relation to selected trace elements presence.

2. Experimental

2.1. Standard solutions and reagents

Standard solutions were prepared by dilution of a multi-element standard solution containing Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb (1000 mg l^{-1} each) obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Nitric acid (65 %) of Suprapur® grade (Merck) was used for the mineralization of the samples. Ultrapure water ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) from a Milli-Q Gradient System (Millipore, Watford, UK) was used throughout. Commercial chemicals of analytical reagent grade were used without any further purification.

2.2. Samples

Forty pine nuts (*Pinus pinea*) samples were obtained from different areas in Spain (Huelva, Cádiz, Badajoz, Cataluña, Castilla, Madrid) and Portugal (Faro and Coimbra). Each of the 5 samples from a region were collected from 5 different locations in this region.

They were supplied by Frutos Secos Puig, S.A (Tarragona, Spain). All samples were washed with ultrapure water, freeze-dried using a Benchtop lyophilizer (Hucos-Erlöss, Spain) and finally ground using a conventional grinder Moulinette (Moulinex, Spain). To overcome problems related to contaminations, losses as well as identification difficulties, several considerations were taken into account. For example, the use of metal pieces (stainless steel) such as spatulas, injection syringes and syringes needle was avoided since this increases signal noise and causes contamination. Moreover, all the instruments used were previously washed with a 10% (v/v) HNO₃ water solution and then with ultrapure water.

Table 1 shows the analyzed samples of pine nuts with an identification code assigned to each of them.

2.3. Instrumentation

Elemental analysis was performed using an ICP-MS HP 4500 (Hewlett-Packard, USA). The sensitivity of the ICP-MS instrument was optimized using a multielemental standard solution containing the following elements: $9.9 \pm 0.5 \text{ ng ml}^{-1}$ Li, $10.01 \pm 0.5 \text{ ng ml}^{-1}$ Y, $9.98 \pm 0.5 \text{ ng ml}^{-1}$ Ce and $10.00 \pm 0.5 \text{ ng ml}^{-1}$ of Tl, dissolved in 2 % nitric acid. The instrumental conditions were shown in Table 2.

2.4. Determination of Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb

First, lipids were extracted from five grams of previously freeze-dried pine nuts with 25 ml chloroform/methanol (2:1) mixture by mixing those together for 30 min in a constant orbital followed by shaking and centrifugation at 10000 rpm for 20 min. Afterward, the organic layer were discarded and the remaining residue was dried at room temperature (Gómez-Ariza, Arias-Borrego & Barrera-García, 2006).

Samples without lipids were exactly weighed (0.2000 g) into Teflon bombs (home-made by a technician) and digested in a domestic microwave oven placed inside a fumed cupboard. Nitric acid (65%, 10 ml) was added and the vessels were tightly closed. The microwave program consisted of three steps as follows: heated at 800 W (3 min), 400 W (3 min) and 100 W (3 min) (Gómez-Ariza, Arias-Borrego & Barrera-García, 2006). The bombs were left at room temperature for 10 min between each step to avoid overpressure. The resulting solution was filtered through a 0.20 µm surfactant-free cellulose acetate filter. The elements: Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb were measured by ICP-MS (conditions as stated in Table 2). The same procedure was used to run reagent blanks that were prepared fresh daily. External calibration graphs were performed and to evaluate the analytical characteristics of the method for each element, the detection and quantification limits were calculated according to IUPAC guidelines. Accuracy was checked with recovery assays, by adding known amounts of analytes 1000 µg l⁻¹ of each element to five different randomly chosen samples and processing the mixtures as described above for experimental samples. To check the precision of the method, five samples were randomly selected and relative standard deviation was calculated (n=10). Detection limits were calculated as three times the standard deviation of a blank. The results are summarized in Table 3.

2.5. Chemometrics

Computations were performed by using the statistical package STATISTICA version 6.0 (2001) StatSoft (Tulsa, USA). Pattern recognition methods (cluster analysis, principal components analysis and discriminant analysis) were applied to characterize and differentiate the pine nuts from different geographic origin. The replicates of a particular origin were assayed in different batches and a multielemental standard solution was analyzed each three measurements to avoid the analytical variability as a factor.

Unsupervised techniques (PCA and cluster analysis) only have visualising capabilities, so a supervised pattern recognition method such as linear discriminant analysis (LDA) have to be performed with the purpose of obtaining classification rules for assigning

categories to samples. On the other hand, the use of PCA and cluster analysis is required to reduce the number of variables in order to select the most affecting ones.

PCA is generally used to achieve a reduction of the data dimensions, fitting a j -dimensional subspace into the original p -variate ($p > j$) space. PCA permits a primary evaluation of the between-category similarity (Vandeginste, Massart, Buydens, Jong, Lewi, & Smeyers-Verbeke, 1998), which can identify the structure of the data set. PCA finds the maximum variations in the data set and forms new variables known as principal components (PCs). Each successive PC accounts for as much of the remaining variability as possible and each new variable must be totally independent of all other variables (Chatfield, & Collins, 1980).

Cluster analysis describes the nearness between pine nut samples from different geographic origins (objects). In this case, taking a matrix consisting of the squared Euclidean distance was used as similarity matrix and the Ward's method as amalgamation rule. This last procedure considers, in each step, the heterogeneity of deviance (sum of squares of the distance of an object from the barycenter of the cluster) of every possible cluster that can be created by linking two existing clusters (Meloum, Militky, & Forina, 1992).

Supervised PR methods such as LDA were performed to obtain a complete separation between the pine nuts (*P. pinea*) from different origins and also to establish classification rules for assigning categories to all samples. This method maximizes the variance between categories and minimizes the variance within categories (Wold, et al., 1984).

3. Results and discussion

3.1. Determination of Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb in pine nuts by ICP-MS

The content of the studied elements (Mn, Co, Ni, Fe, Zn, Cu, Sr and Pb) were determined in the samples of pine nuts. Results, expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$, are collected in Table 4 (average of three measurements). It can be seen that Mn, Fe and Zn are the most

abundant elements in the analyzed samples. The highest levels of these elements were $559 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro 1), $189 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro 4), $113 \mu\text{g g}^{-1}$ (Faro 1), respectively. The lowest levels of them were $25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña 3), $28.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña 1) and $25 \mu\text{g g}^{-1}$ (Cataluña 1), respectively. By contrast, Co and Pb were absent in all the studied samples, detection limits 0.044 and $0.006 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. These results are in good agreement with previously reported studies for some nuts including Pine nuts (*Pinus edulis*) (Cabrera, Lloris, Giménez, Olalla, & López, 2003; Wuilloud, Kannamkumarath, & Caruso, 2004).

Other elements in the samples were at lower levels than previously mentioned. It can be concluded from the previous data that samples exhibit different element contents in relation to the area in which they grow. Therefore, these elements could be considered as good chemical descriptors to classify samples from different geographic origins, except Co and Pb that were not detected in any sample. The differences found could be related to the geographical origin (variations in the composition of soils) of samples but also to other factors like the environmental conditions under which the pine nuts grew (Wuilloud, et al., 2004). For a deeper insight in this study, pattern recognition methods have been applied involving display methods such as PCA and CA and supervised learning procedures for classification such as LDA.

3.2. Data analysis

A preliminary study based on PCA and CA has been carried out for the sake of display methods to qualitatively test the suitability of the selected descriptors.

3.2.1. Principal component analysis

After applying PCA to our data set, two principal components (PC's) were extracted. PC1 explained up to 69.01% of the total variance and PC2 explained up to 16.16%. As shown in Table 5, Cu, Zn and Fe present the higher loadings in PC1 and accordingly, they are the most dominant variables. They appear at positive values of PC1, which are very close that denotes the same kind of information. It can be seen that most of the

variables are located at positive values of PC1, only Sr has negative loading in PC1. Examining the loadings of PC2, Sr results the most dominant variable in this component. The first two principal components account for 85.17% of the total variance and were considered to be sufficient for such data. When representing the scores plot of the samples in the space defined by the two PCs (Fig.1), only the separation between the pine nut from Cataluña and the rest of samples is clearly appreciated. At the bottom left side of the graph, a grouping of the samples from Coimbra can be observed too. The rest of samples do not show clear trends to be grouped, and for this reason, in order to assess this tendency, a hierarchical agglomerative cluster analysis of samples was performed (Massart, & Kauffman, 1992).

3.2.2. Cluster analysis

According to PCA findings, Cu, Zn and Fe were found to be the descriptors with more contribution. As a result, cluster analysis was applied by using Cu, Zn and Fe as variables. The results obtained are shown as a dendrogram in Figure 2. Three clusters were found at a linkage distance level of 50. From bottom to top, the first cluster (A) corresponds to pine nuts from Cataluña; cluster (B) is related to samples from Madrid, Castilla and Coimbra; and cluster (C) is formed by samples from Cádiz, Badajoz, Faro and Huelva.

The existence in the dendrogram of the cluster (A) formed by pine nuts from same geographic origin, indicated differences between the studied samples. However, the rest of clusters (B and C) are formed by pine nuts from different geographic origins. This fact suggests the presence in the samples of common characteristics in the selected trace elements composition at the linkage distance used.

3.2.3. Linear discriminant analysis

After applying LDA to calculate discriminant functions as linear combinations of the selected descriptors, six discrimination functions were obtained. The figure 3 shows the scatter plot of samples obtained when using as axes DF1 and DF2. Four clusters are clearly separated in the plot. They correspond to Cataluña, Madrid, Cádiz and Badajoz samples. When observing the Huelva and Faro groups, they appear together in one only

cluster and the same fact occur with samples from Coimbra and Castilla. The overlapping between these samples can be attributed to the similarity of elements composition among them. However, the present study is a good trial to check the feasibility of trace elements to distinguish the geographic origin of pine nuts.

3.2.3.1. Validation of the method

Validation was performed using a cross-validation method with ≈20% of samples as the evaluation set. The same process was repeated several times with different compositions of both training and evaluation sets, ensuring that all samples were included in the evaluation set at least once. Recognition ability, calculated as the percentage of members of the training set that were correctly classified, and prediction ability, calculated as the percentage of members of the evaluation set correctly classified were 90 and 85%, respectively. Using LDA analysis a highly classification between the eight pine nuts groups studied was achieved, so, the determination of the mineral content nuts and the later chemometric study can be an useful alternative to obtain classification according to their origin.

4. Conclusions

Selected trace elements content constitutes good chemical descriptors for pine nuts (*P. pinea*) classification according to their origin, which has been confirmed by applying unsupervised and supervised pattern recognition techniques to samples from a number of areas from Spain and Portugal. Further, studies would be focused connecting these differences in relation to elements associations with low and high molecular weight biomolecules, especially metalloproteins (metalloomics) (Gómez-Ariza, García-Barrera, Lorenzo, Bernal, Villegas, & Oliveira, 2004).

Acknowledgements

We express our gratitude to the Frutos Secos Paig, S.A cooperative by supplying pine nuts (*P.pinea*) samples of authentic origin. This work is supported by Consejería de Inovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía), Grant nº FQM 348. Ana Arias-Borrego thanks to Consejería de Innovación Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía) for a pre-doctoral scholarship.

References

- Baxter, M.J., Crews, H.M, Dennis, M.J, Goodall, I., & Anderson, D. (1997). The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. *Food Chemistry*, 60, 443-450.
- Cabrera, C., Lloris, F., Giménez, R., Olalla, M., & López, M.C. (2003). Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *Science of the Total Environment*, 308, 1-14.
- Chatfield, C., & Collins, A.J. (1980). *Introduction to Multivariate Analysis*. London: Chapman & Hall.
- Cocchi, L., Vesconi, L., Petrini, L.E., Petrini, O., 2006. Heavy metals in edible mushrooms in Italy. *Food Chemistry* 98, 277-284.
- Costa-Freitas, A.M, & Mosca, A.I. (1999). Coffee geographic origin-an aid to coffee differentiation. *Food Research International*, 32, 565-573.
- Fernández-Torres, R., Pérez-Bernal, J.L., Bello-López, M.A., Callejón-Mochón, M., Jiménez-Sánchez, J.C., & Guiraúm-Pérez, A. (2005). Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65, 686-691.
- Gómez-Ariza, J.L., Arias-Borrego, A., Barrera-García, T., (2006). Multielemental fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-

exclusion chromatography with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry detection. *Journal Chromatography A*, 1121,191-199.

Gómez-Ariza, J.L., García-Barrera, T., Lorenzo, F., Bernal, V., Villegas, & M.J., Oliveira, V. (2004). Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. *Analytical Chimica Acta*, 524,15-2

González-Arjona, D., González-Gallero, V., Pablos, F., & González, A.G. (2003). Authentication and differentiation of Irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. *Analytical Chimica Acta*, 381, 257-264.

Guerrero, M.I., Hecce-Pagliai, C., Cameán, A.M, Troncoso, A.M., & González A.G. (1997).Multivariate characterization of wine vinegars from the south of Spain according to their metallic content. *Talanta*, 45, 379-386.

Kokkinofa, R., Petrakis, P.V., Mavromoustakos, T., & Theocharis, C.R. (2003). Authenticity of the Traditional Cypriot Spirit "Zivania" on the Basis of Metal Content Using a Combination of Coupled Plasma Spectroscopy and Statistical Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6233-6239.

Latorre, M.J., García-Jares, C., Medina, B., & Herrero, C. (1994). Pattern Recognition Analysis Applied to Classification of Wines from Galicia (Northwestern Spain) with Certified Brand of Origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1451-1455.

Marcos, A., Fisher, A., Rea, G., & Hill, S. J. (1998). Preliminary study using trace element concentrations and a chemometrics approach to determine the geographical origin of tea. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 13, 521-525.

Martin, M.J., Pablos, F., & González, A.G. (1999). Characterization of *arabica* and *robusta* roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content *Food Chemistry*, 66, 365-370.

Massart, D.L., & Kauffman, L. (1983). *Interpretation of Analytical Data by Use of Cluster Analysis*, New York: Wiley.

Meloum, M., Militky, M., & Forina, M. *Chemometric for Analytical Chemistry*, vol. 1(pp.244-250). Chichester, UK: Ellis Horwood.

Mirete, S., et al. (2003). Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from *Pinus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 213-221.

Moredo-Piñero, A., Fisher, A & Hill, S.J. (2003). The classification of tea according to region of origin using pattern recognition techniques and trace metal data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16,195-211

Nergiz, C., & Cönmez, I. (2004). Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seeds. *Food Chemistry*, 86, 365-368.

Özgöven, F., & Vursavus, K. (2005). Some physical, mechanical and aerodynamic properties of pine (*Pinus pinea*) nuts. *Journal of Food Engineering*, 68, 191-196.

Rivero, R.C, Hernández, P.S., Rodríguez, E. M., Martín J.D., & Romero, C.D. (2003). Mineral concentrations in cultivars of potatoes. *Food Chemistry*, 83, 247-253.

Terrab, A., González, A.G., Díez, M.J., & Heredia, F. (2003). Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution to the characterisation of unifloral honeys. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 83, 637-643.

Vandeginste, B.G, Massart, D.L., Buydens, L.M, De Jong, S., Lewi, P.J., & Smeyers-Verbeke, J. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B*. Amsterdam, Holland: Elsevier.

Wold S., et al. (1984). *Mathematics and Statistic in Chemistry*. Holland: B.R. Kowalski.

Wuilloud, R.G., Kannankumarath, S.S., & Caruso, J.A. (2004). Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 495-503.

Legend of figures

Figure 1. Principal components analysis of pine nut samples from different locations in Spain and Portugal (PC₁ versus PC₂).

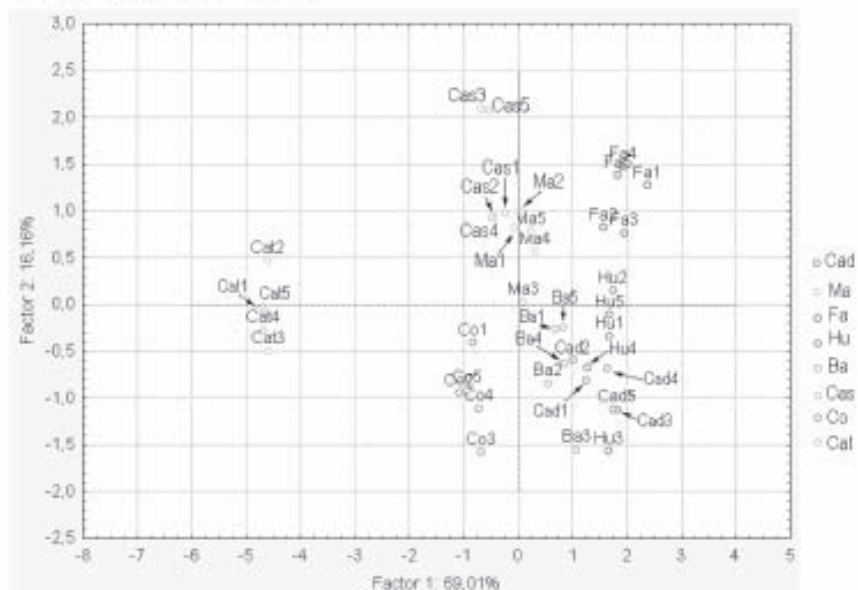


Figure 2.- Dendrogram showing the discriminant capability among pine nuts (*P. pinea*) from 8 different locations in Spain and Portugal using six trace elements as chemical descriptors. Keys in Table 2.

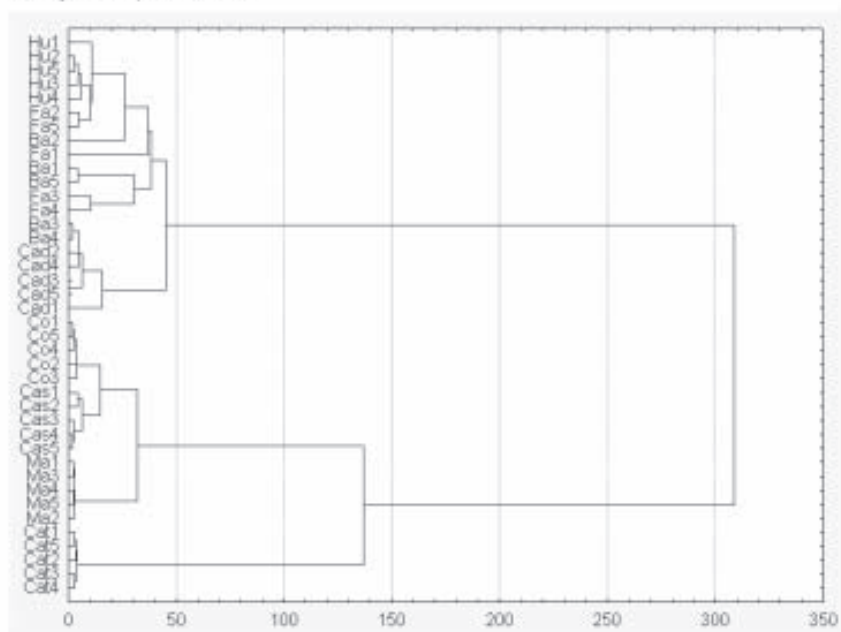


Figure 3. Linear discriminant analysis of pine nut samples from different locations in Spain and Portugal (DF₁ versus DF₂).

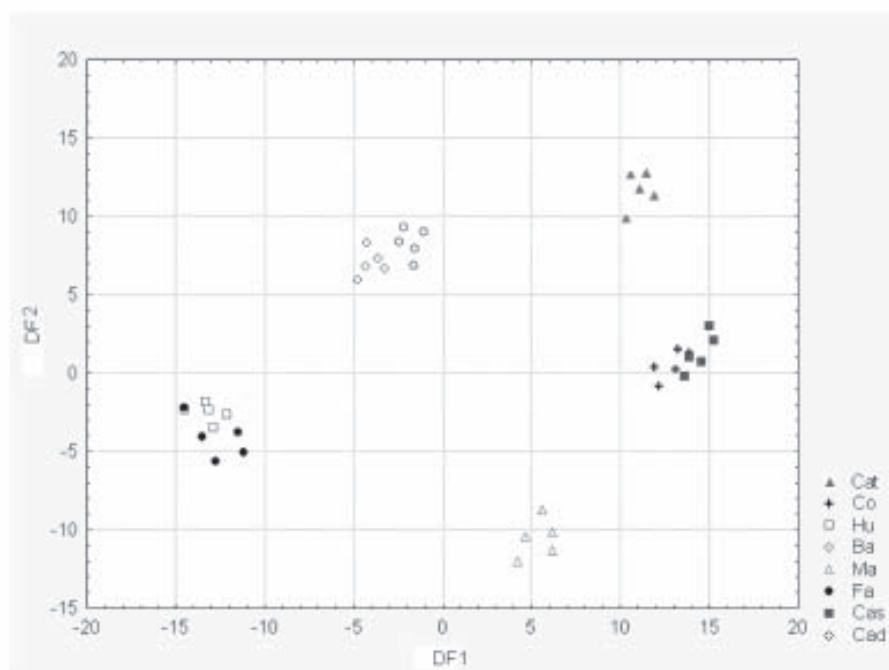


Table 1

Analyzed samples of pine nuts and their geographical origin.

Code	Geographical origin
Hu	Huelva, Spain
Co	Coimbra, Portugal
Cat	Cataluña, Spain
Ba	Badajoz, Spain
Ma	Madrid, Spain
Fa	Faro, Portugal
Cas	Castilla, Spain
Cad	Cádiz, Portugal

Five different samples of each origin were analysed

Table 2 Operating parameters for ICP-MS

Forward power	1159 W
Plasma gas flow rate	15.0 l min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.87 l min ⁻¹
Carrier gas flow rate	1.27 l min ⁻¹
Sampling depth	6 mm
Sampling and skimmer cones	Nickel
Dwell Time	0.5 s per isotope
Isotopes monitored	⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu, ⁵⁵ Mn, ⁵⁸ Ni, ⁶⁰ Ni, ⁶⁶ Zn, ⁶⁸ Zn, ⁵⁹ Co, ⁵⁷ Fe, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb, ⁸⁸ Sr

Table 3

Features of the method

Element	LOD	LOQ	Accuracy (%) ^a	Precision ^b R.S.D. %
Cu	0.018	0.062	90.95±0.5	3.0-4.2
Mn	0.023	0.076	96.00±0.7	4.8-5.6
Ni	0.003	0.012	94.96±1.0	5.0-5.2
Zn	0.001	0.003	93.75±0.2	3.5-4.0
Fe	0.005	0.017	95.95±1.0	4.1-4.6
Co	0.044	0.146	90.01±0.8	4.5-5.7
Pb	0.006	0.020	91.06±0.9	4.0-5.1
Sr	0.010	0.035	94.90±0.8	2.2-3.4

^a Results from recovery assays of 5 randomly chosen samples.^b RSD: Relative standard deviation (n=10) in each of 5 samples.

Table 4 Element concentrations* ($\mu\text{g g}^{-1}$) in the pine nut samples analyzed in this work.

Code (see Table 1)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ni ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Sr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Hu1	500±21	9.2±0.8	41±10	186±30	0.56±0.04	107±19
Hu2	512±23	11±1	39±11	186±6	0.71±0.08	106±17
Hu3	513±26	10.7±0.4	35±4	187±9	n.d. ⁽¹⁾	105±30
Hu4	508±20	8±0.5	34±7	186±10	0.4±0.04	106±20
Hu5	510±19	11±0.8	38±5	185±15	0.6±0.01	104±22
Co1	65±6	4.5±0.2	31±6	152±20	0.54±0.02	86±17
Co2	64±9	3.5±0.3	29±2	150±22	0.38±0.08	85±10
Co3	67±10	4.72±0.06	30±5	153±18	n.d. ⁽¹⁾	90±18
Co4	65±7	5±0.1	30.5±6	154±19	0.2±0.02	84±10
Co5	66±8	3.5±0.3	29.5±7	153±20	0.3±0.01	86±9
Cu1	26±7	2.1±0.3	8±1	28.5±9	1.06±0.07	25±9
Cu2	28±5	3.05±0.02	8±2	30±10	1.21±0.09	30±12
Cu3	25±4	2.6±0.2	8±1	34±17	0.83±0.03	26±10
Cu4	27±3	2±0.3	7.5±0.5	33±15	0.9±0.02	28±9
Cu5	28±2	2.5±0.4	8±0.9	29±9	1±0.5	27±11
Ba1	458±23	8±2	35±9	160±14	0.6±0.1	94±20
Ba2	498±20	7±1	30±10	166±11	0.42±0.02	93±10
Ba3	399±12	9±1	36±8	159±20	n.d. ⁽¹⁾	102±24
Ba4	400±17	8.5±0.7	35±8	160±10	0.4±0.07	103±19
Ba5	460±11	9.5±1.5	34±11	164±15	0.6±0.1	94±15
Ma1	87±6	7.1±0.2	34±12	176±16	0.97±0.07	97±8
Ma2	90±9	8±1	33±15	178±10	1.7±0.1	100±16
Ma3	88±10	7.8±0.5	34±9	178±26	0.62±0.03	98±10
Ma4	89±8	9±0.6	35±10	180±20	0.8±0.05	99±15
Ma5	90±7	8±0.8	36±8	179±15	0.9±0.08	100±20
Fa1	559±38	15±5	41±11	186±36	1.17±0.05	113±30
Fa2	523±35	10±4	38±16	188±20	1.7±0.09	109±20
Fa3	450±17	13±3	40±6	187±11	0.96±0.02	111±28
Fa4	460±20	14±2	39±7	189±10	1.2±0.03	110±25
Fa5	520±24	12±3.5	39±6.5	188±8	1.3±0.07	112±20
Cas1	72±9	6.8±0.2	35±9	145±30	1.51±0.02	104±24
Cas2	70±9	8±2	34±20	145±28	1.12±0.09	101±19
Cas3	73±8	6.5±0.7	33±9	139±20	1.15±0.18	104±22
Cas4	71±7	7±0.6	32±10	138±27	1±0.02	103±12
Cas5	72±8	6.5±1	33±12	138.5±12	1.5±0.2	104±15
Cad1	414±15	11±1	38±10	153±23	0.31±0.02	101±19
Cad2	398±11	10±1	37±18	155±27	0.41±0.08	100±47
Cad3	400±13	14±2	39±16	158±24	0.10±0.07	106±38
Cad4	399±10	14.5±1	38±14	157±20	0.3±0.02	100±20
Cad5	400±8	14±0.9	39±10	158±15	0.1±0.05	106±25
PC ₁	0.780432 ⁽²⁾	0.873007 ⁽²⁾	0.965359 ⁽²⁾	0.932089 ⁽²⁾	-0.328869 ⁽²⁾	0.943447 ⁽²⁾
PC ₂	0.170198 ⁽²⁾	-0.127733 ⁽²⁾	-0.119480 ⁽²⁾	-0.068388 ⁽²⁾	-0.930539 ⁽²⁾	-0.157143 ⁽²⁾

*Average of triplicate determinations ± S.D.

(1) n.d. not detected (see Table 3)

(2) Loadings of variables (Mn, Ni, Cu, Fe, Sr and Zn) for the two principal components (PC₁ and PC₂)

Speciation of Manganese-binding to biomolecules in pine nuts (*Pinus pinea*) by two dimensional liquid chromatography coupled to UV and ICP-MS detectors followed by ESI-MS identification

J.L. Gómez-Ariza^{a*}, A. Arias-Borrego^a and T. García-Barrera^a

^a Dpto. Química y CC.MM., Facultad de Ciencias Experimentales, Campus de El Carmen, Universidad de Huelva, Avda. Fuerzas Armadas, s/n. 21007. Huelva, Spain. Fax: +34 959 219968; Tel: +34 959 219942; E-mail: ariza@uhu.es

**This submission was created using the RSC Article Template (DO NOT DELETE THIS TEXT)
(LINE INCLUDED FOR SPACING ONLY - DO NOT DELETE THIS TEXT)**

Advances in analytical methodology for speciation of manganese in pine nuts were presented in this work. The approach was based on the use of orthogonal chromatographic systems namely size exclusion chromatography of the extracts and ion exchange separation of the fractions collected by the first column. In both columns, manganese elution was first monitored by a quadrupole ICP-MS equipped with an octopole reaction cell and an UV detector. Size exclusion chromatography were performed by using two columns covering the molecular weight range from < 10 to 70 kDa that allowed an initial screening of the molecular weight of the Mn species. The highest resolution capability of the low molecular range column was the reason to use this later for further experiments. The fraction from SEC-ICP-MS in which Mn was present at highest concentration was submitted to IEC-ICP-MS allowing Mn-citrate and MnCl₂ identification by retention time matching with standards. The concentration of these species was estimated to be 75 and 125 µg Kg⁻¹ (as Mn) respectively in the pine nuts samples and the presence of Mn-citrate was confirmed by nESI-QqTOF. In the same fraction, a third Mn containing peak was detected in the IEC-UV-ICP-MS chromatogram. This peak corresponds to a protein containing Mn that later submitted to a tryptic digestion and analysed by nESI-QqTOF. The MS/MS data of a doubly charged peptide were used to obtain the sequence of the protein with the Mascot searching engine. The peak turned out to be isocitrate dehydrogenase, a protein commonly associated with Mn.

Introduction

Manganese (Mn) is a relatively abundant element, comprising approximately 0.085 % of the Earth's crust¹. This element exhibits a very low toxicity although a chronic overdose causes "manganism"². On the other hand, Mn is an essential element in the human diet, because it activates at trace level many enzymes involved in metabolic processes, for example, the glial-specific enzyme glutamine synthetase, which accounts for 80 % of the brain concentration of Mn³. In addition, it is also needed for protein and fat metabolism, nervous and immune systems health, as well as for blood sugar regulation⁴. This element is crucial for enzymes involved in energy production and increases the anti-oxidative protection, with enzymes such as the mitochondrial Mn-superoxide⁵. Moreover, manganese is involved in the use of vitamin B1 and vitamin E and it is required for normal bone growth and to avoid clotting defects⁶. Therefore, the content of manganese in plants is important for various reasons, such as, nutritional value, toxicity, pollution, geographic origin, etc.^{7, 8, 9}. From a nutritional point of view, the presence of elements such as manganese is of great concern for an adequate nutrition of other organisms higher up the food chain¹⁰.

Manganese supplements have increased in popularity and nowadays it is present in many of the foods we eat. It has been found that Mn levels in pine nuts (*Pinus pinea*) vary from 26 to 559 µg g⁻¹ depending on the area of origin¹¹. Mn concentration in a sample of pine nuts has been reported to be 478 µg g⁻¹ by other authors¹². Other foods also contain Mn in this range of concentration namely, black walnut (576.2 µg g⁻¹), pecan nut (143 µg g⁻¹), sunflower (179 µg g⁻¹), white walnut (68 µg g⁻¹)¹³, soybean flour (31.2 µg g⁻¹)¹⁴ or (41.7 µg g⁻¹)¹⁵ or in lower concentrations such as in common bean (18.2 µg g⁻¹)¹⁶, Brazil nut (12 µg g⁻¹) and cashew (9 µg g⁻¹)¹⁷. Mn concentrations in a healthy human are typically about 0.5 µg l⁻¹ in serum and 1 µg l⁻¹ in urine⁸, from 2 to 10 µg l⁻¹ in human milk⁸ and about 1.5 mg kg⁻¹

¹ in human liver¹⁸. Much higher concentrations have also been found in almond (4780 µg g⁻¹) and peanut (2110 µg g⁻¹)¹⁹. Other elements have also been studied along with Mn and a multielemental (Mn, Zn, Ni and Cu) fractionation in pine nuts (*Pinus pinea*) from different geographic origins by size-exclusion chromatography (SEC) with UV and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection has been performed and described elsewhere²¹.

Pine nuts are widely produced in forest areas in Spain, Portugal, Italy, Greece, Albania and Turkey where it is one of the most important ingredients of the Mediterranean diet²². Pine nuts, raw or roasted, are included as ingredients in a great variety of traditional dishes, such as bread, sweets, sauces and cakes, as well as in vegetable and meat dishes. It is an edible nut with an exquisite flavour and high protein content which makes them a good source of nutrients. These nuts have a complex chemical composition (5.6% moisture, 31.1% protein, 47.4% fat, 10.7% carbohydrate and 4.3% ash)¹⁹ in addition, they contain vitamins, particularly B1 (thiamine) and minerals¹⁹.

Many analytical methods have been proposed for manganese determination, including spectrophotometry¹⁷, polarography¹⁸, neutron activation analysis (NAA)¹⁹, atomic absorption spectrometry (AAS)²⁰ and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES)²¹. For Manganese speciation several methods have been applied such as electrochemical stripping analysis, anodic stripping voltammetry (ASV), differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV)²³, generally used for water samples analysis. Other methods have also been proposed like capillary electrophoresis-ICP-MS¹⁴ in porcine liver, HPLC-ICP-MS in cereal flour samples analysis²² and flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction in water²⁴. Mn speciation has also been performed in milk samples by using SEC combined with ion exchange chromatography (IEC) and ICP-MS²⁵. However, to our knowledge manganese-binding biomolecules have not been

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

analysed by molecular mass spectrometry for a better understanding of manganese species in the fractions obtained by SEC.

In this work, a metalomics analytical approach has been applied for the first time to the study of manganese species in pine nuts with the aim of identifying known and unknown Mn-binding biomolecules in this food. For this purpose, a two-dimensional chromatographic separation combining size exclusion and strong anion exchange chromatography was used to separate the Mn species that were detected by an ICP-MS, equipped with an octopole reaction cell (ORC). This approach reduces sample complexity prior to tandem mass spectrometry analysis^{32,33}. A rigorous quality control was additionally applied to the ICP-ORC/MS coupling. Commercial Mn standards were injected in IEC-ICP-MS to match the retention times with the compounds in the samples. The presence of Mn species was confirmed by nano-electrospray (n-ESI) with direct infusion-quadrupole time-of-flight (DI-QqTOF) mass spectrometry. In addition, another Mn compound not correlated with the available standards was sequenced and identified by mass spectrometry.

Experimental

Standard solutions and reagents

Standards used to calibrate the size exclusion chromatographic columns were: Bovine Serum Albumin (67000 Da), Metallothionein I (7000 Da), Gastrin rat I (2126 Da), Vitamin B12 (1352 Da) and Glyc (360 Da) for the low molecular weight (LMW) column, and Bovine Serum Albumin (67000 Da), Ovalbumin (43000 Da), Chymotrypsinogen A (25000 Da) and Ribonuclease A (13700 Da) for the high molecular weight (HMW) column. The void volume was determined in the LMW and HMW columns using bovine serum albumin (67 kDa) and Blue Dextran 2000 (2000 kDa), respectively. All these reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The mobile phase solution used in SEC was 0.05 M of tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) at pH of 8.0, prepared daily from Trizma base and Trizma hydrochloride (Sigma-Aldrich).

The mobile phase components for IEC, NaOH and ammonium acetate (each Suprapure grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The trypsin (EC 3.4.21.4) TPCK was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and the urea, indoleacetic acid and dithiothreitol from Bio-Rad (Madrid, Spain). PuroTM R2 50 µm beads from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) was also used in the study.

The Mn standards: arginase, citric acid and MnCl₂ were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Working solutions were prepared daily by further dilution with ultrapure water (18 MΩ cm) from a Milli-Q System (Millipore, Watford, UK). Commercial chemicals were of analytical reagent grade and were used without any further purification. Mn-protein stock standard solution used for IEC (arginase) was prepared by weighing 100 mg of each compound to be dissolved in 10 ml Milli-Q water. Mn-citric stock solution was prepared by mixing a solution of 100 mg L⁻¹ of citric acid with MnCl₂ aqueous solution (10 mg of Mn L⁻¹). Stock solutions were stored in the dark at -20°C. The stability of standard compounds was observed under these conditions.

Instrumentation

The element detection for these speciation analyses was carried out using an ICP-MS Agilent, Model 7500 ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan), consisting of an ICP source with a plasma shielded torch, an enclosed octopole ion guide operated in rf mode and a quadrupole mass analyzer with secondary

electron multiplier operating in dual mode (pulse counting or analogue mode). This instrument was fitted with a microconcentric nebulizer Micromist with microcyclic spray chamber. The spray chamber was cooled to 2°C. Mass spectra measurements were performed on a nano-electrospray ionization tandem mass spectrometer API QSTAR XL Hybrid system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sensitivity of the ICP-MS was optimised by using a 2% HNO₃ solution containing ⁷⁰Cu, ⁸⁹Y and ²⁰³Tl (1 µg L⁻¹ each). The background was tested by using ultrapure water while monitoring the 36 m/z (ArO⁺) until the signal was below 1800 cps.

Size-exclusion chromatography was carried out by using a Hiload 26/60 Superdex 30 Prep for separation range <10 kDa (low molecular weight-LMW) and a Superdex 75 Prep for separation range 3-70 kDa (high molecular weight-HMW) (all from Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). An AKTA-Prime system (pump and UV detector at 280 nm) (Amersham, Biosciences, Uppsala, Sweden) was used as the eluent delivery system, equipped with a 2 ml sample loop. The IEC column (Dionex AS11-HC, Dionex, Idstein, Germany) used for the separation of Mn-containing compounds was mounted in an Agilent 1100 liquid chromatograph with a 75 µl sample loop.

A model Sigma 4-10 centrifuge and a constant orbital shaker operating at 103 rpm (Heidolph, Uimatx 1010, Germany) were used to accelerate the phase separation process in the extraction of the compounds. The collected fractions were freeze-dried using a benchtop lyophilizer (Hucco-Erlbos, Spain).

Procedures

Sample and sample preparation. Samples of pine nuts (*Pinus pinus*) were supplied by Frutos Secos Palg, (Tarragona, Spain). All samples were washed with ultrapure water, freeze-dried and finally ground using a conventional Moulinex (Moulinex, Spain) grinder. First, lipids were eliminated from 5 g of freeze-dried pine nuts with 25 ml of chloroform/methanol (2:1) mixture for 30 min in a constant orbital shaking followed by centrifugation at 10000 rpm for 20 min. Afterwards, lipid-free pine nut samples (approximately 0.2 g) were accurately weighed in PTFE centrifuge tubes to extract the elemental species with 4 ml of 0.1 M sodium hydroxide in a constant orbital shaker for 10 min and centrifugation at 10000 rpm for 20 min³¹.

Determination of total Mn concentration in the digested samples. Samples were digested for metal analysis by ICP-MS following a procedure previously described³¹. This can be briefly described as follows: Aliquots of 0.2 g of defatted residues with a chloroform/methanol mixture, exactly weighed, were digested in closed PTFE bombs with 10 ml of nitric acid (65 % w/v) using a domestic microwave oven. Three decreasing steps were successively used: heating at 300 W (3 min), 400 W (3 min) and 100 W (3 min) for sample decomposition and cooling at room temperature for 10 min between each step to avoid overpressure. The final solution was filtered through a 0.20 µm surfactant-free cellulose acetate filter.

First chromatographic dimension. Fractionation by size-exclusion LC. The SEC-UV-ICP-ORC/MS coupling was performed connecting the outlet of the UV detector to the nebulizer inlet of the ICP-MS. Hydrogen was introduced into the octopole cell as the reaction gas through a brass line using a mass flow controller. The operating conditions were optimized and are summarized in Table 1. Elemental fractionation profiles of the pine nut samples were performed with both columns described in the Section "Instrumentation". A solution of 0.002 M EDTA was used during the washing programme of the

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

chromatographic column to avoid problems related to metal contamination. An additional cleaning with NaOH ensures the elimination of the remaining proteins retained in the column¹¹.

To standardize the molecular weight range of the chromatographic separation, the standard compounds, described in Section "sample and sample preparation" were used. These were dissolved in the mobile phase and their chromatographic profiles were monitored by means of the UV detector.

Second chromatographic dimension. Fractionation by strong anion-exchange LC. Tryptic digestion of unknown fractions. The different molecular weight fractions of Mn were spotted by SEC-UV/ICP-MS and latterly purified by using a similar instrumental arrangement based on anion exchange chromatography (IEC-UV/ICP-MS). The instrumental operating conditions are given in Table 1. The elution in the IEC-UV/ICP-MS system, was carried out with 10 mM $\text{NH}_4\text{-acetate/acetic acid}$, pH 6.3, serving as eluent A, 0.8 mM NaOH as eluent B and 10 mM NaOH as eluent C. The gradient was performed with 100% eluent A (3 min), 100% eluent B (3-14 min) and 100% eluent C (14-22 min).

Identification of peaks from IEC chromatograms was accomplished by retention time matching with standards. The unknown peaks were collected, freeze-dried and stored at -20 °C, for no longer than two weeks, for further identification by mass spectrometry and after tryptic digestion when required.

An aliquot of the lyophilizate from IEC (100 mg) was dissolved in 200 μl of 8M urea-1M ammonium bicarbonate (pH 8.5), followed by the addition of 5 μl of DTT (180 mM), and incubated at 37 °C for 1 hour. After that, the sample was maintained in the dark at room temperature for 1 hour after addition of 5 μl of isoacetamide (400 mM). Finally, the sample was dissolved in 800 μl of 50 mM ammonium bicarbonate aqueous solution and 4 μl of the trypsin solution (1 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) and digested at 37 °C for at least 12 hours in a water bath. The reaction was stopped by bringing the pH down to 5 by addition of 0.1% aqueous formic acid. Sample desalting was performed before the mass spectrometric analysis using the Proteom™ purification capillaries from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Slurry with the Poros R2 material (100 μl) was prepared in 50% MeOH (5 ml), then 5 μl was placed onto the capillary. The packed bed should be no more than halfway up the tapered part. The end of the capillary was slightly opened and centrifuged for 10-20 sec. The stationary phase was cleaned-up by applying 5-10 μl of 3 % formic acid/70% MeOH with centrifugation. Then 5-10 μl of 3% formic acid/5% MeOH was applied twice for preparing the Poros material for peptide adsorption. The sample was applied, re-dissolved in 3% formic acid/5% MeOH and the contaminants were desorbed by applying twice 5-10 μl of 3% formic acid/5% MeOH. Finally, the peptides were eluted onto a nanospray capillary by passing 2 μl of 3% formic acid/70% MeOH using centrifugation until the stationary phase was completely dry. The peptide mixture was introduced into the nanospray source.

Nano-electrospray Q-TOF analysis. The mass spectrometer was calibrated immediately prior to sample analysis, using two MS/MS fragments of glu-fibrinopeptide B [$\text{M}+\text{H}$]⁺=175,1190 and 1285,5444 Da. ESI-TOF-MS data acquisition was performed in positive ion mode with a mass range of 400-1700 m/z. Q1 was fixed at unit mass resolution and the values for ion spray voltage, electron multiplier voltage, sprayer position, curtain gas and airing CAD gas were set to: 700-900 V, 2300 V, 3 mm, 20 and 6 (arbitrary units), respectively. Data analysis was performed using Analyst QS software (Applied Biosystems).

After the TOF-MS spectra, doubly-charged peptide ions were selected, and MS/MS spectra were analyzed by increasing the collision energy. From the MS/MS spectra, peptide sequences were identified by manual peptide sequencing using BioAnalyst™ (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

Peptide sequences were then searched by database (NCBI) using Mascot searching engine (<http://www.matrixscience.com>).

Results and discussion

Extraction of Mn species from pine nuts

The use of NaOH proved to be the best extractant for high and low molecular weight species in comparison with HCl and hot water. HCl solutions mainly extract LMW compounds due to the lower solubility of protonated compounds such as proteins and hot water is used to a lesser extent^{16,20,27}. On the basis of these findings, we used NaOH in order to avoid losses of information.

Size-exclusion fractionation profiles of manganese compounds in pine nut extracts

As previously indicated, extracts of pine nuts were analyzed by SEC on both columns Hiloal 26/60 Superdex 30 and Superdex 75. Eluate from SEC columns was passed through the UV and the chromatograms recorded. The absorbance was initially studied at several wavelength values in the range of 200-500 nm but an optimum response was obtained at 232 nm. The combined use of both columns allowed a good separation of compounds in the range of 360-7000 Da. The coupling of the ICP-MS detector with SEC enabled manganese specific detection of eluted compounds. Chromatograms obtained by in-series UV and ICP-MS detection are shown in Figure 1. Separation obtained by both columns was similar for HMW region, into which they overlap, but for LMW region the Hiloal 26/60 Superdex 30 column allowed a better peak resolution. Since the HMW column does not give additional information to the LMW one, the latter was chosen for further experiments.

The manganese fractionation profile obtained with the LMW column (Fig.1) shows three peaks using the ICP-ORC/MS detection, which are associated with the molecular weight ranges: MW (10-7 KDa), (7000-2126Da) and (2126-1352 Da) according to mass calibration. This seems to indicate Mn bound to biomolecules. However, the confirmation of specific Mn species is not possible with only a SEC separation⁸, and a complementary IEC chromatographic method was applied for further purification of the Mn SEC fractions.

Manganese fractionation and quantification by IEC-UV/ICP-MS

The highest intensity Mn peak in the SEC-ICP-MS chromatogram corresponded to the fraction in the MW range 10-7 KDa. This fraction was collected and latterly submitted to the second chromatographic orthogonal separation based on anion exchange with Mn elution monitoring by ICP-MS. Results are shown in Fig 2.

The IEC chromatogram showed three peaks with retention times at 1.9, 4.4 and 31.8 min. The first two peaks were identified by retention-time matching standards and turned out to be MnCl_2 and Mn-citrate complex, respectively. The peak corresponding to MnCl_2 eluted in the void volume of the column, but when ⁵⁵Mn and ⁵³Cl was monitored on-line by ICP-MS, the chromatogram showed the presence of both elements. The third chromatographic peak did not match with the Mn standards available at the laboratory, so it was collected and further

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

identified by molecular mass spectrometry. As established previously, the chromatogram baseline was noisy, which can be related to the presence of different amino acids from the complex matrix of pine nuts²⁹.

Quantification of Mn compounds identified by retention time matching the available standards in the IEC-ICP-MS chromatograms was performed by plotting integrated peak areas against the absolute amount of analytes. The instrumental detection limits were calculated as being three times the standard deviation of the calibration curve divided by the slope and they are given in Table 2. Linear calibration curves were obtained from the quantification limits to 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all the analytes. The repeatability of the retention times was estimated from six successive chromatographic runs and estimated to be less than 1.95 % for all the Mn species.

Mass balance monitoring of Mn

In order to carry out a quality control of the analytical procedure, the Mn concentration was measured at each step of the proposed scheme. The total Mn concentration in the studied sample was 65 $\mu\text{g g}^{-1}$ (15.24 $\mu\text{g Mn}$). The aqueous extract of the sample contained 71% of the total Mn of the original nut. The SEC column efficiency was estimated to be 53% (Mn eluted/Mn injected). The major Mn-containing fraction (Fig. 1) represents 25 % of the Mn injected onto the SEC column. The efficiency of the IEC column was 86 % and the first peaks isolated from the IEC at retention times 4.4 and 31.8 min, contained 0.6256 and 0.3215 μg of Mn, respectively.

Confirmation of the presence of Mn-citrate by DI-QqTOF.

The peak previously identified as Mn-citrate by retention time matching the standard was collected from the IEC column at the corresponding retention time. The obtained fraction was eluted from the IEC in 10 mM NH_4 -acetate/acetic acid at pH 6.3, which is also suitable for electrospray ionization mass spectrometry⁵.

The *n*-ESI-MS spectrum obtained from the direct infusion of the fraction collected into the mass spectrometer is shown in Figure 3a. As can be observed, the base peak of the spectrum was at *m/z* 438, which matches the protonated molecular ion of Mn-citrate complex $[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)_2\text{H}]^+$. The MS/MS of the *m/z* 438 ion (Figure 3b) gives one abundant fragment at *m/z* 246 indicating the loss of 191 units, which can be attributed to one citric acid molecule $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7]^-$. The fragment at *m/z* 246 matches the 1:1 ratio complex $[\text{Mn}(\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7)]^+$.

Identification of the manganese-binding to protein fraction after tryptic digestion

The third Mn-containing peak in the IEC-ICP-MS chromatogram was collected and freeze-dried. The collection was repeated several times up to a final volume of 1.5 ml. The fraction was submitted to tryptic digestion using the above procedure and analysed by *n*-ESI-QqTOF. Figure 4a shows the obtained mass spectrum of the peptides obtained after the tryptic digestion. As can be seen, the sensitivity was not very high due to the complex sample matrix, which has also been reported by other authors²⁸. For the protein sequencing, the doubly charged peptide ions were located in the range of *m/z* 530-572 (*m/z* 537.3, 537.8, 560.8, 560.3, 571.3 and 571.8) and fragmented (Fig. 4b). Figure 4c shows MS/MS of the *m/z* 537.3 ion, which was selected due to its higher intensity in the mass spectrum than other doubly-charged peptide ions.

The data obtained by nano-ESI-MS and nano-ESI-MS/MS were introduced into the MASCOT database for protein identification.

The sequences obtained were: EATARVGVDR, REAANEGEEK and NGDGDAPQED, which in each case gave a single, highly significant hit to the same protein, referred to as isocitrate dehydrogenase (SwissProt accession no. Q40658) with a sequence coverage of about 51 %. This protein is registered in the database as a protein present in rice (*Oryza sativa*).

This protein, with a molecular mass of about 7204 Da, had not been associated with pine nut (*Pinus pinus*) until now. However, its presence has been confirmed in chestnut (*Castanea sativa*)³⁰. In the present study manganese and isocitrate dehydrogenase have been detected by ICP-MS and ESI-MS, respectively, in the same fraction after two-dimensional SEC plus IEC chromatography, which indicates some possible interaction of both as reported by other authors³¹.

Conclusions

The use of orthogonal chromatographic systems, namely SEC and IEC, allowed the purification of Mn species, which is mandatory for molecular mass spectrometry identification. A third purification step based on a reversed phase desalting onto a nano capillary was developed to improve the identification of these species. In addition, the use of a sensitive elemental specific detector as ICP-MS for Mn elution monitoring ensures the presence of this element in SEC fractions and, in the case of the octopole reaction system ICP-MS, any polyatomic interferences are eliminated. Moreover, the use of the nanoelectrospray probe allows low sample consumption, permitting the fragmentation of all the peaks in the mass spectra, and an accurate mass measurement was attained by means of TOF-MS.

The approach applied in the present work allows the identification of manganese and dehydrogenase, in the same fraction after two-dimensional SEC plus IEC chromatography. Quantification data of some Mn containing species in pine nuts are reported for the first time by using IEC-ICP-MS.

References

1. S. B. Kwon, M.K. Soh, Q. Cai, M.R. Khan and S.X. Guo, *Electroanal.*, 1997, **9**, 45.
2. G. F. Peardon and G. M. Greenway, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 803.
3. J. S. Crossgrove, D. D. Allen, B. L. Bukaveckas, S. S. Rhineheimer and R. A. Yokel, *Neurotoxicology*, 2003, **24**, 1.
4. M. Quintana, A. D. Klouda, M. Ochsenkühn-Petropoulos and B. Michalke, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **554**, 130.
5. M. Ashner, K. E. Vrana and W. Zheng, *Neurotoxicology*, 1999, **20**, 173.
6. B. Michalke and P. Schramel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 121.
7. R. S. Schwartz, L. T. Hucking, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **6**, 677.
8. J. Sadaoka, J. Polonsky, *J. Chromatogr. A*, 1999, **834**, 401.
9. B. Kolantoni, P. J. Aggett, J. G. Bindels, P. Dang, P. Ferra, A. Gil, M. J. Lantuej, M. Rotherhoid, S. Strobel, *Br. J. Nutr.*, 1998, **80**, 55.
10. R. G. Walford, S. S. Kannurukumarath, J. A. Canosa, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **379**, 495.

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

- 11 J.L. Gómez-Ariza, A. Arias-Borrego and T. García-Barrera, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1121**, 191.
- 12 H. Fingerson and B. Koplík, *Preventive J. Anal. Chem.*, 1999, **363**, 545.
- 13 B. Koplík, H. Pavlovská, J. Cincibuhová, O. Mezták, F. Kvašnicka, M. Suchanek, *J. Chromatogr. B*, 2002, **770**, 261.
- 14 B. Michálek, *J. Chromatogr. A*, 2004, **1050**, 69.
- 15 F. Özgüven and K. Varavvas, *J. Food Eng.*, 2005, **68**, 191.
- 16 C. Nuyt and J. Côté, *Food Chem.*, 2004, **86**, 365.
- 17 M. Kamburra, *Anal. Lett.*, 1994, **27**, 1999.
- 18 M. X. Li and H. Yuan, *Phys. Test. Chem. Anal.*, 1998, **34**, 30.
- 19 M. D. Bonda and H. A. Das, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1996, **207**, 325.
- 20 N. J. Miller-Dall, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1994, **9**, 1129.
- 21 K. Danner and K. Venth, *Preventive J. Anal. Chem.*, 1994, **350**, 339.
- 22 B. Koplík, M. Berková, B. Bizarová, J. Polák, O. Mezták and J. Korinková, *Food Chemistry*, 2006, **99**, 158.
- 23 K. C. Terry and J. Chen, *Analyst*, 2001, **126**, 534.
- 24 M. Gilán, P. Olivero, A. E. Daly and J. C. Gebler, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 6426.
- 25 J. Szepaniak, *Analyst*, 2005, **130**, 442.
- 26 C. R. Cantow, *Protein Purification - Principles and Practice*, ed., Springer, Boston, MA, 1993, 3rd.
- 27 S. S. Kannankumarath, K. Wrobel, A. Vanderheide, J.A. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 454.
- 28 A. P. Vanderheide, K. Wrobel, S. S. Kannankumarath, C. B'lymer, M. Montes-Bayón, C. León and J. A. Caruso, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5722.
- 29 C. Carlot, V. Vacchier, H. Chouaigra, J. Szepaniak, M. Petit-Gautier, *M. Anal. Comptes Rendus*, 1999, **36**, 77.
- 30 S. Pereira-Lorenzo and J. Fernández-López, *Food Bioprocess Journal*, 1997, **51**, 13.
- 31 R. S. Ehrlich and K. F. Colman, *The Journal of Biological Chemistry*, 1981, **256**, 1276.

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Single Column Figure/Scheme

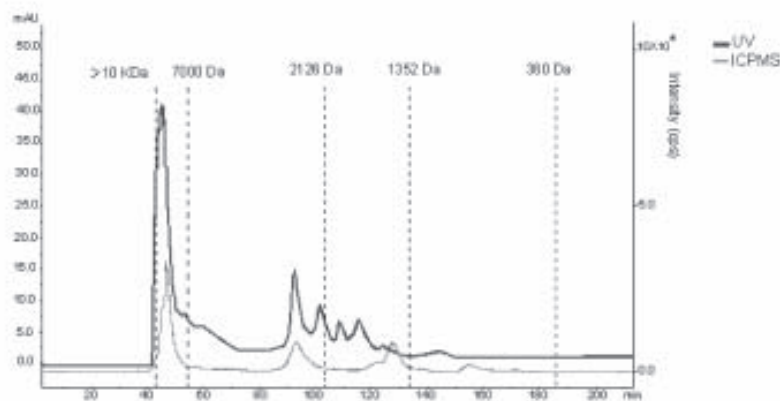
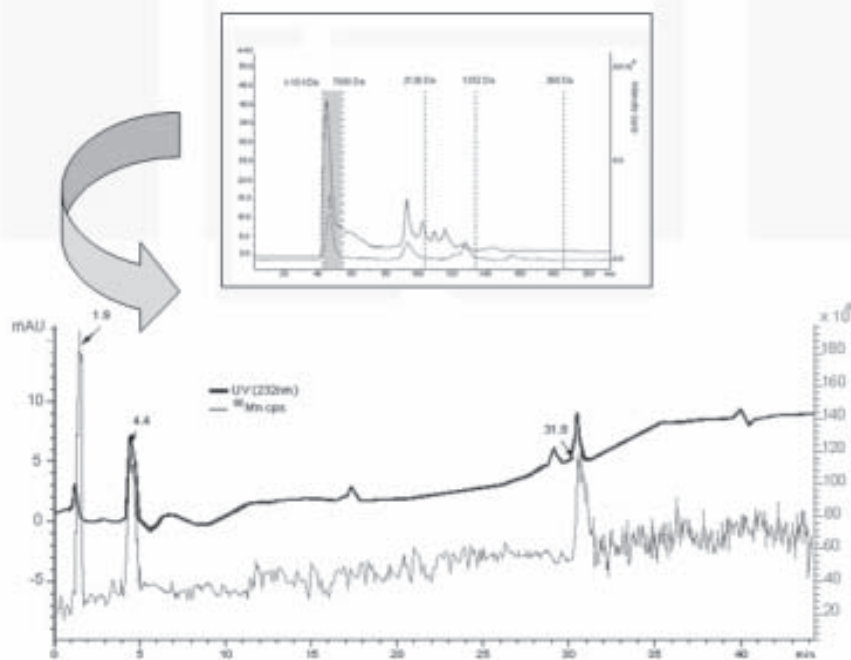


Figure 1. Separation of manganese compounds by size-exclusion chromatography with UV-ICP(DRC)MS detection. Thick line, UV (232 nm) detection; thin line, ^{55}Mn ICPMS detection

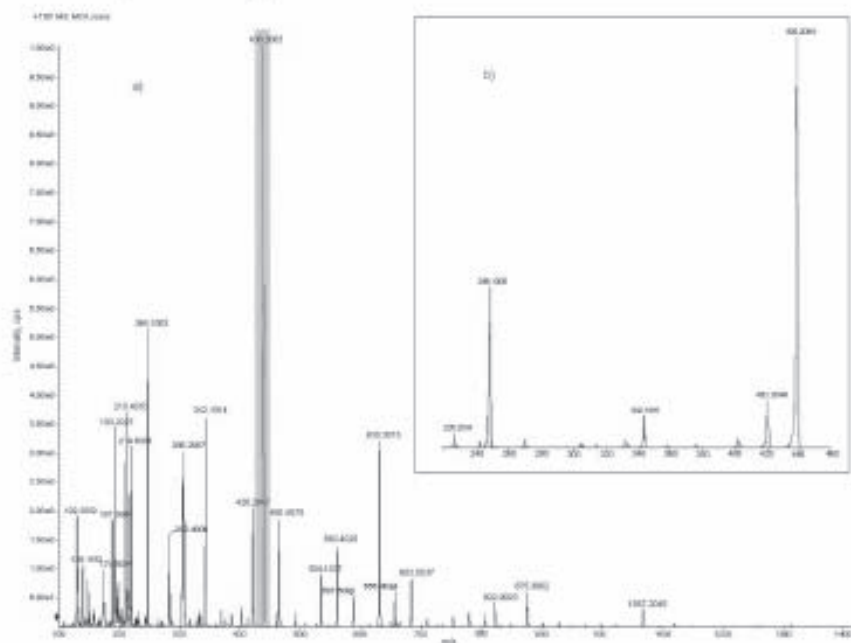
CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Figure 2. IEC-UV-ICPMS chromatogram of Mn-containing fraction collected by SEC. The inset shows SEC fraction collected (MW 10-7 KDa).



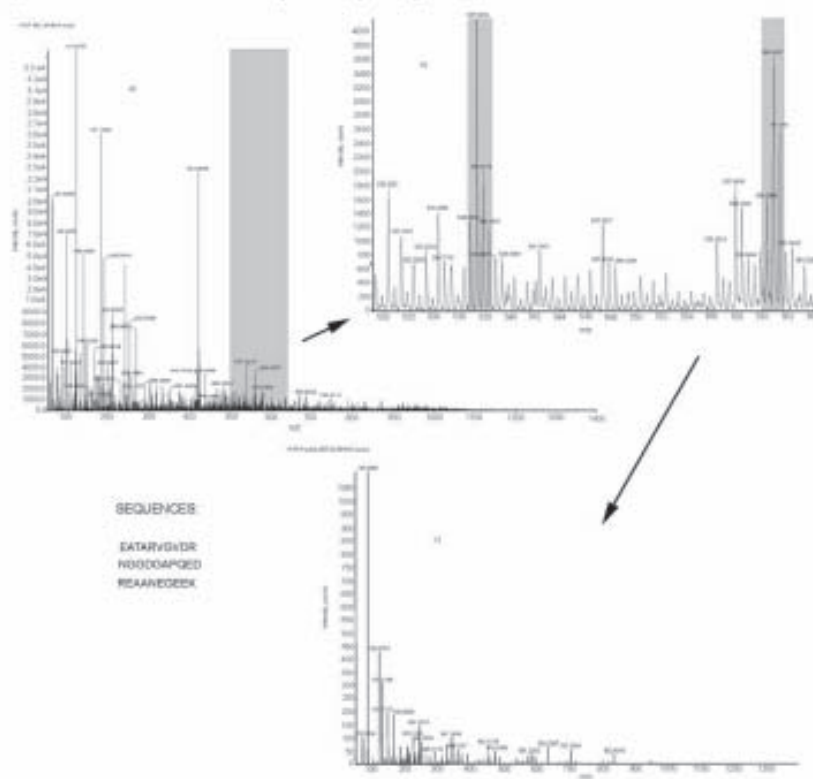
CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Figure 3. (a) nano-ESI-MS mass spectra of the Mn peak collected from IEC separation at 4.43 min; (b) MS/MS of the m/z 438 ion (Mn-citrate complex)



CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Figure 4. (a) n-ESI-MS of the tryptic digestion from the unknown peak;(b) Enlarged region between m/z 530 and 560; (c) MS/MS of m/z 537.3 selected for protein sequencing



CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Double Column Table**Table 1** Operating conditions for the ICP-(ORC)MS, SEC and IEC

SEC conditions	
Columns	Hiload 26/60 Superdex 30 Prep; Hiload 26/60 Superdex 75 Prep
Resolution range	Mr< 10 000 Da; 3000-70 000Da
Mobile phase	Tris 50 mmol L ⁻¹ (pH 8.0)
Flow rate	2 ml min ⁻¹
Injection volume	2ml
UV-visible wavelength	232 nm
IEC conditions	
Column	Dionex AS11-IC
Mobile phase	A=10 mM NH ₄ -acetate/acetic acid (pH 6.3), B=0.5 mM NaOH, C=10mM NaOH
Flow rate	0.5 ml min ⁻¹
Injection volume	75 µl
UV-visible wavelength	232 nm
ICP-(ORC)MS conditions	
Forward power	1350W
Plasma gas flow rate	15.0 L min ⁻¹
Auxiliary gas flow rate	0.87 L min ⁻¹
Carrier gas flow rate	0.975 L min ⁻¹
Sampling depth	6 mm
Sampling and skimmer cones	Nickel
H ₂ flow rate	4 mL min ⁻¹
Q _{ext}	-13 V
Q _f	-11.5V
Dwell Time	0.1 s per isotope
Isotopes monitored	⁵⁵ Mn

* Footnote text.

CREATED USING THE RSC ARTICLE TEMPLATE - SEE WWW.RSC.ORG/ELECTRONICFILES FOR FURTHER DETAILS

Table 2. Performance data of the IEC-UV-ICPMS coupling for Mn species

Compounds	t _r (min)	Detection limits/µg Kg ⁻¹	Identification (retention time matching with standards)	Concentration (as Mn) in µg Kg ⁻¹
MnCl ₂	1.9	26	detected	75
Mn-citrate	4.4	96	detected	125
Arginase	22.2	150	Not detected	—
Peak 3*	31.8	—	Unknown peak	65

* Peak 3 was latterly identified as isocitrate dehydrogenase by ESI-MS