

Selección del procedimiento QuEChERS aplicado al análisis de residuos de plaguicidas

Apellidos, nombre	Fuentes López, Ana (anfuelo@upvnet.upv.es) Fernández Segovia, Isabel (isferse1@tal.upv.es) Fuentes López, Cristina (crifuelp@upvnet.upv.es)
Departamento	Tecnología de Alimentos
Centro	Universitat Politècnica de València



1 Resumen de las ideas clave

La extracción en fase sólida dispersiva “QuEChERS” es uno de los procedimientos de preparación de muestra más rápidos y sencillos. Con este procedimiento se consigue minimizar el uso de solventes y puede ser utilizado con matrices alimentarias muy distintas y en múltiples aplicaciones. Este método combina dos etapas: una etapa de extracción de los compuestos de interés empleando acetonitrilo y una mezcla de diferentes sales, y una segunda fase de dispersión en fase sólida donde se realiza la limpieza o “clean-up” del extracto obtenido. Al finalizar, el extracto obtenido puede analizarse directamente o ser sometido a evaporación y posterior reconstitución en el disolvente adecuado a la técnica de análisis a utilizar. La correcta manipulación de la muestra y la selección de las mezclas de sales y sorbentes en las etapas de extracción y lavado es determinante para conseguir unos resultados analíticos óptimos.

2 Introducción

En 2003, Anastasiades y col.^[1] publicaron el trabajo titulado “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce” donde se dio a conocer un nuevo procedimiento de preparación de muestra para la determinación de residuos de plaguicidas en vegetales. El nombre con el que los autores denominaron este nuevo procedimiento fue QuEChERS, respondiendo al acrónimo en inglés “Quick (rápido), Easy (sencillo), Cheap (barato), Effective (eficaz), Rugged (robusto), Safe (seguro)”. Con la aparición de esta nueva metodología se consiguió resolver los grandes retos de los análisis multiresiduos, como son las grandes diferencias en las matrices y en la naturaleza de los compuestos a analizar.



Figura 1. Acrónimo “QuEChERS”

Aunque la metodología “QuEChERS” apareció como un procedimiento de preparación de muestras aplicado al análisis multiresiduos de pesticidas en frutas y verduras, en la actualidad podemos encontrar muchas más aplicaciones del procedimiento QuEChERS como son: la determinación de fármacos veterinarios, micotoxinas, acrilamida, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), bisfenol A y otros contaminantes. Además, con el paso del tiempo, el procedimiento original ha ido incorporando modificaciones lo que ha permitido adaptarse a las



características propias de las distintas matrices alimentarias^[1]. En la actualidad, existen procedimientos QuEChERS adaptados al análisis de una enorme variedad de alimentos, pero también a otros tipos de matrices como muestras biológicas (plasma, orina, tejidos del riñón, hígado o páncreas), lodos y sedimentos, etc.^[2]

El aumento en el número de aplicaciones del procedimiento QuEChERS ha sido posible gracias a la introducción de modificaciones respecto al método original, basadas en el uso de diferentes solventes de extracción y la adaptación de las mezclas de sales, tampones y sorbentes d-SPE. Por ello, hay que tener en cuenta que la calidad de los resultados obtenidos en el análisis de los extractos dependerá de la correcta selección de las formulaciones de sales empleadas en cada una de las fases del procedimiento, así como de la manipulación previa de las muestras y su acondicionamiento.

3 Objetivos

El presente artículo tiene como objetivo que el alumno sea capaz de

- Identificar el procedimiento QuEChERS, aplicado a la determinación de residuos plaguicidas, más adecuado en función del tipo de muestra, método de análisis y los compuestos a determinar.
- Llevar a cabo la preparación de la muestra siguiendo el procedimiento QuEChERS seleccionado.

4 Desarrollo

A continuación, vamos a describir las diferentes opciones del método "QuEChERS" para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos vegetales.

4.1 Fundamento

El método QuEChERS es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) muy utilizado en la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal. El procedimiento QuEChERS consta de dos fases: una primera fase de extracción/partición simple y una segunda fase de lavado del extracto orgánico mediante una extracción en fase sólida de dispersión (d-SPE). Finalmente, el extracto obtenido se analiza empleando cromatografía líquida o cromatografía de gases.

Existen diferentes variaciones del procedimiento QuEChERS original según el tipo de residuo a analizar, la matriz alimentaria en estudio o del método analítico. Para llevar a cabo una selección correcta del método QuEChERS y de la composición de los sorbentes a utilizar en cada fase, es necesario conocer cuáles son las posibles alternativas de este procedimiento y cuáles los criterios a tener en cuenta para realizar nuestra elección.

El método QuEChERS se inicia con una **fase de extracción** que consta a su vez de dos etapas. En la primera etapa de extracción se emplea un disolvente orgánico como puede ser la acetona, el acetonitrilo o el acetato de etilo. De todos ellos, el



acetoniitrilo es el disolvente más utilizado, ya que es el que mejores rendimientos de extracción consigue. En esta etapa es muy importante la homogeneización de la muestra, siendo en algunos casos recomendable el uso de hielo seco para reducir las pérdidas de los analitos más volátiles y favorecer de este modo la eficacia de la extracción.

En la segunda etapa de extracción es muy importante la selección de las sales a utilizar. Esta selección va a depender de los compuestos que se desean analizar y del tipo de protocolo de análisis a utilizar. Así, encontramos principalmente 3 procedimientos de extracción:

- Método original "QuEChERS"^[1]: utiliza sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y cloruro sódico ($NaCl$).
- Método AOAC 2007.01^[3]: utiliza sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y acetato de sodio ($NaOAc$).
- Método EN 15662^[4]: combina sulfato de magnesio ($MgSO_4$), cloruro sódico ($NaCl$), citrato tribásico de sodio dihidrato y citrato de sodio dibásico sesquihidrato.

El sulfato de magnesio y el cloruro sódico favorecen la separación de las fases sin necesidad de diluir el extracto con disolventes no polares. El sulfato de magnesio mejora las recuperaciones al favorecer el reparto de los plaguicidas en la fase orgánica, siendo especialmente importante controlar la cantidad utilizada, ya que no se debe superar la concentración de saturación. El uso del cloruro sódico ayuda a controlar la polaridad, aunque demasiada sal podría llegar a impedir el reparto. Por otro lado, el acetato de sodio ($NaOAc$) y las sales de citrato empleados en los métodos tamponados, son recomendables en el análisis de compuestos que son afectados por el pH del medio. Estas sales facilitan el control del pH durante la fase de extracción y optimizan la recuperación de los plaguicidas sensibles a los valores de pH.

La segunda fase de este procedimiento corresponde a una **etapa de lavado o "clean-up"** del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE). Existen diferentes formulaciones para la fase de limpieza, cuya composición viene determinada por la naturaleza de las matrices que se van a analizar. Estas formulaciones incluyen: $MgSO_4$ para eliminar el exceso de agua residual y un sorbente aminado primario secundario (PSA: *primary secondary amin sorbent*) para eliminar interferencias polares como son los ácidos orgánicos, azúcares, ácidos grasos y algunos pigmentos como las antocianidinas. Además de estos compuestos, en el caso de matrices con un alto contenido en grasas y esteroides, las formulaciones de limpieza incluyen una cierta cantidad de sorbente C18; mientras que en el caso de muestras pigmentadas se emplea carbón negro grafitado (GCB), ya que este sorbente permite la eliminación de clorofilas y carotenoides.

A pesar de que podemos encontrar un gran número de investigaciones donde se emplean diferentes formulaciones en las etapas de extracción y limpieza, a continuación vamos a mostrar las mezclas de sales más empleadas habitualmente para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal. En este artículo veremos cuáles son los criterios que nos ayudarán a seleccionar cada una de estas formulaciones QuEChERS y algunas consideraciones importantes para la preparación de la muestra según su naturaleza y las sustancias a determinar.



4.2 Procedimiento QuEChERS

1. Preparación de la muestra

¿Qué aspectos tengo que considerar para una correcta selección de la porción de la muestra que voy a analizar?

- La muestra para el análisis debe ser lo suficientemente homogénea.
- Es necesario seleccionar la porción de la muestra para la que se aplica el límite máximo de residuos (LMR).
- Se deben eliminar aquellas partes que puedan afectar a la homogeneización, como por ejemplo el hueso de las frutas.
- Se debe evitar la pérdida de zumo o carne durante la preparación de la muestra.

También hay que tener en cuenta el tipo de alimento con el que estamos trabajando, ya que este aspecto va a condicionar la cantidad de muestra necesaria para el análisis.



Figura 2. Selección de la cantidad de muestra según las características del alimento

La humedad de la muestra es un factor a tener en cuenta para una correcta extracción de los compuestos de interés. No hay que olvidar que este procedimiento de extracción fue diseñado para frutas y verduras con un contenido en humedad elevado, de forma que si los alimentos a analizar poseen un contenido de agua inferior al 80%, será necesario incorporar agua para optimizar la extracción; este es el caso de algunas frutas y verduras, cereales, frutos secos y especias.



¿Qué humedad tiene mi muestra?



Figura 3. Adición de agua según la humedad del alimento

Teniendo en cuenta estas consideraciones, vamos a ver algunos ejemplos:

- Vamos a analizar manzanas, por lo que emplearemos una cantidad de muestra igual a 10 g. Como sabemos que las manzanas tienen un contenido típico de agua cercano al 85%, en este caso no se necesitará añadir agua antes de la extracción.
- Vamos a analizar plátanos, los cuales sabemos que tienen un contenido típico de agua del 75%, por lo tanto, para el análisis pesaremos 10 g de muestra y añadiremos 2.5 g de agua.
- Vamos a analizar uvas pasas, los cuales sabemos que tienen aproximadamente un contenido típico de agua del 20%, por lo tanto, para el análisis pesaremos 5 g de muestra y añadiremos 8.5 g de agua.
- Vamos a analizar lentejas secas, las cuales tienen un contenido típico de agua inferior al 10%, por lo tanto, para el análisis pesaremos 5 g de muestra y añadiremos 10 g de agua.
- Vamos a analizar granos de café. El café que consumimos habitualmente es un producto que ha sido previamente fermentado, por ello pesaremos 2 g de muestra. Además, como el contenido típico de agua en el café es inferior al 10% añadiremos 10 g de agua a los 2 g de café pesados inicialmente.

2. Extracción inicial

La muestra se introduce en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad con tapón de rosca, donde se añaden 10 mL de acetonitrilo. En el caso de que se vayan a utilizar patrones internos, la incorporación de la disolución que contiene uno o varios de estos patrones se realiza en este punto.

A continuación, el tubo se cierra y se agita vigorosamente durante 1 minuto, pero si los trozos de la muestra no son lo suficientemente pequeños o los residuos no se extraen con facilidad, el tiempo de agitación se puede prolongar.



¿Cómo realizamos la extracción inicial?

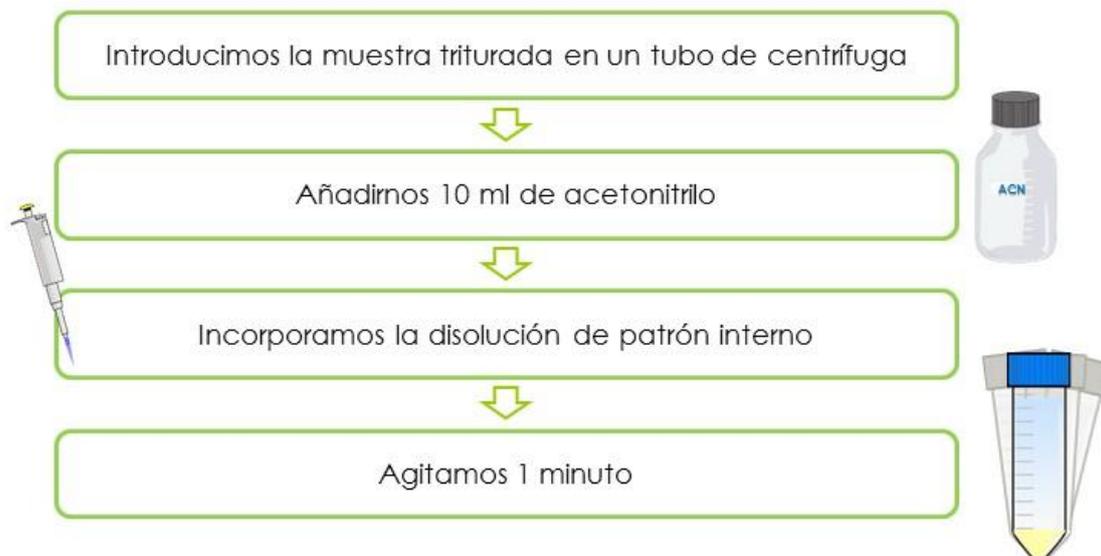


Figura 4. Extracción inicial

3. Segunda etapa de extracción y reparto

En el tubo donde se encuentra la suspensión de la muestra y el acetonitrilo se añaden las sales de extracción, se agita vigorosamente durante 1 minuto y finalmente se centrifuga la mezcla.

¿Cómo realizamos la segunda extracción?

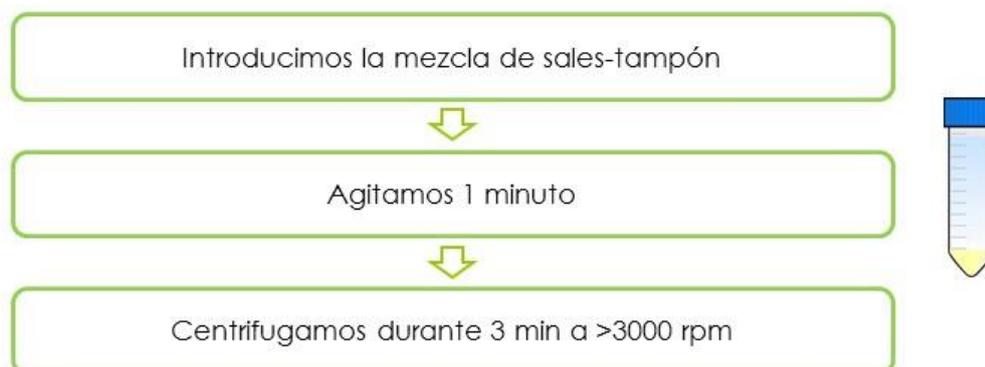


Figura 5. Segunda extracción



Pero ¿qué mezcla de sales debemos utilizar? Tal y como se ha comentado anteriormente la selección de tipo de sorbentes dependerá del protocolo de análisis y de los compuestos que se deseen analizar. A continuación, se muestra la composición de algunas de las mezclas de sales-tampón más utilizadas según el procedimiento analítico seleccionado.



Figura 6. Selección de las sales-tampón de la segunda extracción

4. Lavado

Mediante el lavado se eliminan algunos compuestos presentes en la muestra que podrían interferir en el análisis posterior. Compuestos como azúcares, ácidos grasos, ácidos orgánicos, pigmentos, esteroides y otras interferencias no polares, requieren sorbentes específicos para cada uno de ellos. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la composición de la mezcla de sorbentes de la d-SPE utilizados en cada caso dependerá de la composición del alimento.

¿Qué tipos de sorbentes puedo encontrar? ¿qué composición debe tener la d-SPE de debo utilizar?

- Sorbente aminado ("SPE de dispersión" con PSA): para vegetales en general.
- Sorbente aminado con GCB ("SPE de dispersión" con PSA+CGB): para muestras con un alto contenido en carotenoides (pimiento rojo, zanahorias, etc.) o de clorofila (espinacas, col, lechuga, etc.).
- Sorbente aminado con C18 ("SPE de dispersión" con PSA+C18) para muestras con un alto contenido en grasa (cereales, aguacate, harinas, frutas con ceras, etc.)

¿Qué composición tendrá la d-SPE que tengo que utilizar?



Figura 7. Selección de sales y sorbentes de lavado

Para llevar a cabo el lavado del extracto, se transfiere una alícuota de la fase de acetonitrilo a un tubo de centrífuga que contiene la mezcla d-SPE seleccionada y finalmente se vuelve a centrifugar la disolución.

¿Cómo realizamos el lavado?

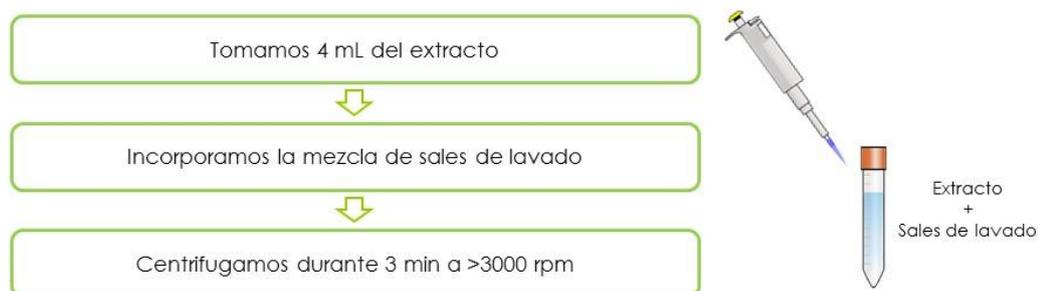


Figura 8. Lavado del extracto obtenido

5. Determinación analítica

Finalmente, los extractos obtenidos en la fase anterior se pueden analizar directamente por cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta eficacia. En algunos casos, puede ser necesario evaporar el disolvente del extracto recogido y posteriormente reconstituirlo en otro disolvente más compatible con nuestro sistema analítico.



5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos visto las diferentes opciones de preparación de muestra del procedimiento QuEChERS aplicado al análisis de residuos de plaguicidas. Para ello, se han detallado los aspectos más relevantes para una correcta selección y manipulación de la muestra. Además, se han descrito detalladamente los pasos a seguir en cada una de las fases del procedimiento y cuáles son las sales, tampones y sorbentes más adecuados en función del procedimiento de análisis y de las características del alimento a analizar.

6 Bibliografía

[1] Anastasiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2):412-430.

[2] González-Curbelo, M.Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V, González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71: 169-185.

[3] AOAC Official Method 2007:01. "Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate".

[4] EUROPEAN STANDARDS CSN EN 15662. "Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method".