



**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MORFOLINA EN  
CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS  
CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A  
DETECTORES DE ESPECTROMETRÍA DE  
MASAS**

**MÁSTER UNIVERSITARIO OFICIAL EN RESIDUOS  
DE PLAGUICIDAS Y CONTAMINANTES. CONTROL  
ALIMENTARIO Y AMBIENTAL**

**SEPTIEMBRE 2011**

**AUTOR: FRANCISCO ROBLES ESCORIZA**

El presente trabajo ha sido presentado por Francisco Robles Escoriza, correspondiente al Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental.

**Fdo: Francisco Robles Escoriza**

**Tutores**

**Fdo: Roberto Romero González**

**Fdo: Patricia Plaza Bolaños**

## ÍNDICE

<b>I. PRESENTACIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>II. MEMORIA CIENTÍFICA .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Objeto y campo de aplicación .....</b>	<b>13</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>14</b>
2.1. Marco legislativo de la morfina en alimentos .....	18
2.2. Identidad, propiedades físicas y químicas .....	20
2.3. Metodología existente para la determinación de morfina .....	23
<b>3. Materiales, equipos y métodos empleados.....</b>	<b>27</b>
3.1. Aparatos, equipos y consumibles .....	27
3.2. Reactivos y disoluciones .....	28
3.3. Análisis cromatográfico y determinación espectrométrica.....	30
3.4. Procedimiento de extracción .....	32
<b>4. Resultados y Discusión .....</b>	<b>33</b>
4.1. Optimización de las condiciones MS/MS.....	33
4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas.....	35
4.3. Optimización del proceso de extracción .....	39
4.4. Evaluación del efecto matriz.....	42
4.5. Validación .....	50
4.6. Análisis de muestras reales.....	54
<b>5. Conclusiones y propuestas de continuación del trabajo .....</b>	<b>55</b>
<b>6. Referencias .....</b>	<b>56</b>

# **PARTE I**

# **PRESENTACIÓN**

El Máster “Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental”, curso 2010-2011, consta de 60 créditos ECTS y se estructura en 5 módulos, siendo los tres primeros de contenido teórico, el cuarto de carácter práctico y el quinto corresponde a la elaboración del Trabajo Fin de Máster.

## **MÓDULO I. PLAGUICIDAS**

Este módulo está orientado a proporcionar o completar la formación general necesaria acerca de distintas disciplinas científicas que soporten el control alimentario y ambiental de residuos de plaguicidas, atendiendo a aspectos tales como legislación, registro o mejoras en prácticas agrícolas. Consta de las siguientes materias:

1. Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos)
2. Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos)
3. Registro de plaguicidas (3 créditos)
4. Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos)

En este módulo se han adquirido conocimientos relacionados con:

- Los principales aspectos operacionales que determinan el funcionamiento de los equipos pulverizadores.
- La regulación de los principales equipos de aplicación de fitosanitarios, para hacer un uso racional de los mismos.
- Distinguir los tipos de compuestos orgánicos de preocupación ambiental en función de los grupos funcionales presentes en su

estructura y ser capaz de relacionar la estructura de estos compuestos con sus propiedades.

- Implantar los sistemas de autocontrol en aquellos establecimientos alimentarios que se puedan acoger a los criterios de flexibilidad, adoptados a nivel autonómico.
  
- Los procedimientos de registro de plaguicidas, así como los procedimientos y normas establecidas por la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) y la Unión Europea (UE).
  
- Los diferentes tipos de formulaciones de plaguicidas, especialmente las de liberación controlada, así como su diseño, técnicas de preparación, caracterización y evaluación de las mismas.

## **MÓDULO II. CONTAMINANTES**

Este módulo está centrado en el estudio de contaminantes alimentarios y ambientales, abordando, entre otros, procesos de remediación de suelos y de tratamientos de aguas contaminadas, constando de las siguientes materias:

1. Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos)
2. Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos)
3. Contaminación y remediación de suelos (3 créditos)

En este módulo se han adquirido conocimientos relacionados con:

- La calidad y seguridad alimentaria, así como el control oficial de productos alimenticios.
  
- La trazabilidad alimentaria, con objeto de aumentar la seguridad alimentaria, facilitando el seguimiento de alimentos “de la granja a la mesa”.
  
- La toxicología ambiental y alimentaria, para desarrollar habilidades de intervención en programas industriales de producción de alimentos y gestión ambiental, así como el desarrollo de conocimientos necesarios para la evaluación de la contaminación de las distintas muestras alimentarias y biológicas.
  
- Los contaminantes que más inciden sobre el suelo y los diferentes métodos y técnicas para la prevención de la contaminación, así como para la remediación de suelos contaminados.

### **MÓDULO III. GESTIÓN DE LABORATORIOS**

En este módulo se pretende la formación de investigadores, colaborando en satisfacer la demanda de personal cualificado, dotándoles de las herramientas cognitivas y estratégicas precisas para el control analítico en el campo alimentario y ambiental, así como en la gestión de la calidad en laboratorios, a fin de que puedan desarrollar un trabajo relevante. Dicho módulo consta de las siguientes materias:

1. Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos)
2. Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos)
3. Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos)

En este módulo se han adquirido conocimientos relacionados con:

- Los principales procedimientos de toma de muestra, su problemática y su importancia dentro del problema analítico, así como las principales técnicas para la separación y/o preconcentración de trazas, destacando distintos aspectos relacionados con la reducción del tiempo y coste de dicha etapa.
- El diseño y utilización de las técnicas de muestreo adecuadas para obtener muestras representativas en función del objetivo y la muestra a analizar y la elección del tratamiento y modo de preparación de la muestra en función del tipo de análisis requerido, del método seleccionado y de la naturaleza de la matriz.
- La validación de métodos analíticos tanto cualitativos como cuantitativos, así como las diferentes estrategias para el cálculo de la incertidumbre en dichos métodos.
- Los sistemas de gestión de laboratorios, incluyendo normas ISO 9001, ISO 14001, ISO 17020, ISO 17025 y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs). Se han estudiado los fundamentos de las mismas, los documentos de los sistemas de gestión de la calidad, prestando especial atención a la redacción de los mismos. Además se han señalado aspectos relativos a gestión de personal y de equipos y los procedimientos de evaluación de la calidad basados en el sistema de auditorías.



---

## **MÓDULO IV. EXPERIMENTACIÓN EN TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.**

Este módulo tiene un contenido fundamentalmente práctico. Se basa en el manejo de técnicas analíticas avanzadas en el control de plaguicidas y contaminantes orgánicos, así como en la caracterización de metabolitos y/o productos de degradación. Consta de las siguientes materias:

1. Espectrometría de masas (3 créditos)
2. Exposición a plaguicidas (3 créditos)
3. Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos)

En este módulo se han adquirido conocimientos relacionados con:

- Los fundamentos de la técnica de espectrometría de masas, y los distintos tipos de fuentes de ionización, analizadores y modos de operación usados.
- Las metodologías analíticas para la evaluación de riesgos de exposición humana a plaguicidas como consecuencia de su aplicación en cultivos intensivos, jardines públicos, etc.
- Las técnicas cromatográficas tanto de gases como de líquidos, así como el acoplamiento con la espectrometría de masas y detectores convencionales como el de fluorescencia. Además, se evaluaron los diferentes parámetros que influyen en el proceso de separación cromatográfica y optimización del sistema de detección.

## **MÓDULO V. TRABAJO FIN DE MÁSTER.**

El Trabajo Fin de Máster titulado: “Análisis de residuos de morfolina en cítricos mediante técnicas cromatográficas acopladas a detectores de espectrometría de masas” se ha realizado en el Grupo de Investigación “Química Analítica de Contaminantes” perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería.

El trabajo se encuadra en la línea de investigación titulada “Métodos analíticos para residuos y contaminantes orgánicos en muestras alimentarias, ambientales y biológicas mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas”.

En el desarrollo de este trabajo de investigación se han adquirido habilidades y conocimientos para:

1. Buscar información y legislación relacionada a la temática del trabajo científico desarrollado.
2. Evaluar los distintos parámetros involucrados en la extracción de morfolina en cítricos.
3. Validar métodos de cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS).

Finalmente, cabe mencionar que la realización de las materias cursadas en el Máster, así como el desarrollo del Trabajo Fin Máster, me han permitido adquirir determinadas competencias, entre las que

se pueden mencionar capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia, siendo éstas fundamentales tanto para la consolidación de la formación científica como para el desarrollo profesional.

# **PARTE II.**

## **MEMORIA CIENTÍFICA**

## 1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La detección por parte de la Agencia de Alimentos del Reino Unido “*Food Standards Agency*” (FSA) en el mes de septiembre de 2010 de manzanas procedentes de Chile que contenían morfolina, y la sospecha de que otras partidas de frutas como naranja, provenientes de mercados ajenos a la Unión Europea (UE) también estuviesen contaminadas con este emulgente, llevó a la puesta en marcha del sistema de alarma de la UE, poniéndose de manifiesto la falta de metodología analítica que permitiese una determinación fiable de este compuesto.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de una metodología sencilla para la extracción y posterior determinación y cuantificación de morfolina en cítricos mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).

Este trabajo ha estado motivado por la falta de información en la literatura científica con respecto a la determinación de este compuesto en cítricos mediante una metodología sencilla y fácilmente aplicable en laboratorios de rutina.

Los pasos seguidos para el desarrollo de este método han sido:

1. Optimización de un método de extracción adecuado para la determinación de morfolina.
2. Optimización de un método de UHPLC-QqQ-MS/MS para la determinación de morfolina.

3. Validación del método desarrollado.
4. Aplicación del método al análisis de muestras reales.

## 2. INTRODUCCIÓN

La Unión Europea (UE) tiene una estrategia global de seguridad alimentaria que no sólo se aplica a los alimentos, sino a la salud y bienestar de los animales y a la salud de las plantas (fitosanidad). Su objetivo es garantizar la trazabilidad de los alimentos desde la granja hasta la mesa (si es necesario, más allá de las fronteras de la UE) sin dificultar el comercio y garantizando al consumidor una alimentación rica y variada, aplicando tanto a los alimentos producidos en la UE como a los importados, normas estrictas relacionadas con la seguridad alimentaria [1].

Para apartar los alimentos sospechosos del mercado, la UE cuenta, desde hace ya 30 años, con un sistema de alerta rápida para alimentos y piensos (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) [2] que permite a los países miembros intercambiar rápidamente información sobre productos potencialmente peligrosos y reaccionar de forma inmediata [3]. Así, si se detectan con rapidez los posibles problemas y se transmite la información, los productos pueden retirarse en seguida del mercado en toda la UE, o incluso requisarse antes de salir a la venta. También se notifica a las autoridades nacionales cualquier denegación de entrada de un producto en la UE por razones de seguridad [3].

Cuando se determina la composición de un alimento, pueden aparecer especies químicas que no corresponden con las materias primas usadas en su elaboración, ni proceder de reacciones químicas

originadas por los procesos de fabricación. En estos casos, se trata de sustancias que se encuentran en el alimento por dos posibles razones: o bien han llegado al mismo debido a una contaminación, o responden a una adición intencionada encaminada a mejorar sus características [4]. A estas sustancias se las conoce como aditivos alimentarios.

Se define como aditivo alimentario a cualquier sustancia que como tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo [5]. Su adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) se puede realizar en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, con el objetivo de que dicho producto o sus subproductos, afecten a las características de un alimento. En esta categoría no se incluyen contaminantes o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales [5]. Los aditivos alimentarios se diferencian de otros componentes de los alimentos en que se añaden voluntariamente, no pretenden enriquecer el alimento en nutrientes y solamente se utilizan para mejorar alguno de los aspectos del mismo, como son el tiempo de conservación, sabor, color, textura, etc. Así, por ejemplo, cuando se añade ácido ascórbico a un zumo de fruta por su función antioxidante, es decir, para mejorar su conservación, se contempla como aditivo y no como nutriente [6].

Actualmente, se exige a la industria que prepare alimentos en grandes cantidades, los envase, los envíe a grandes distancias y que permanezcan expuestos en tiendas y supermercados (a veces en condiciones extremas de calor, temperatura, luz, humedad, etc.). Por supuesto, también se exige que dichos alimentos se conserven

durante días, semanas, meses ó incluso años, según el tipo de producto, hasta el momento de su consumo. En consecuencia, para que los alimentos conserven todo su valor nutricional y el aspecto de recién preparados durante más tiempo, la industria alimentaria tuvo que recurrir a los aditivos allí donde las tecnologías físicas no alcanzan a cumplir estos propósitos [7].

En España, al igual que en el resto de países de la UE, para que un aditivo pueda ser utilizado en la elaboración de un producto alimenticio, debe haber sido autorizado mediante su inclusión en las listas positivas de aditivos. De este modo, para ser autorizados, los aditivos no deben representar ningún peligro para la salud del consumidor cuando se usan siguiendo las dosis propuestas y deben haber sido evaluados toxicológicamente y sometidos a ensayos que demuestren su inocuidad [6].

Atendiendo al uso al que son destinados los aditivos alimentarios, éstos pueden clasificarse de la siguiente forma [8,9]:

- i) Sustancias modificadoras de los caracteres sensoriales:
  - Edulcorantes
  - Potenciadores del sabor
  - Colorantes
  
- ii) Sustancias que inhiben o impiden alteraciones químicas y biológicas:
  - Conservantes
  - Antioxidantes



---

iii) Estabilizadores de la textura y otras propiedades físico-químicas:

- Emulsionantes
- Acidulantes y correctores de la acidez
- Antiaglomerantes
- Gasificantes
- Endurecedores
- Secuestrantes
- Agentes de carga
- Espesantes y gelificantes
- Agentes de recubrimiento
- Gases propulsores y gases de envasado
- Agentes de tratamiento de la harina
- Antiespumantes
- Almidones modificados
- Humectantes
- Enzimas
- Sales de fundido

Las ceras se encuentran clasificadas como aditivos dentro de los agentes de recubrimiento, generalmente de frutas y hortalizas. Su utilización viene motivada puesto que tras la recolección del producto y durante su manipulado, sobre todo en el lavado, parte de su cubierta cerosa se destruye o se desprende, agravando todos los procesos de deterioro naturales. Por tanto, proteger al fruto con cubiertas artificiales resulta indispensable para asegurar su comercialización en perfectas condiciones [10]. Actualmente existen varios tipos de ceras de recubrimiento, las cuales pueden estar compuestas de [11]:

1. Una emulsión de ceras.

2. Una disolución de resinas, como por ejemplo colofonia y *shellac* (goma laca).

3. Una combinación de una emulsión de ceras más una disolución de resinas.

Además, estas combinaciones también necesitan otros aditivos (plastificantes, antiespumantes, etc.) que son añadidos para obtener una formulación final equilibrada [11].

El tipo de recubrimientos comerciales empleados en la industria cítrica son “ceras al agua” que consisten en disoluciones/dispersiones de una o más resinas y/o ceras emulsionadas. Estas ceras han ido desplazando a las “ceras solventes” que utilizan solventes orgánicos, por el peligro y la contaminación medioambiental que conllevan. Las formulaciones de “ceras al agua” requieren generalmente medios alcalinos para emulsionar la cera y la disolución de la resina (generalmente goma laca), por lo que está extendido el uso de álcalis, como hidróxido potásico, amoníaco o morfolina en su formulación. Las ceras mayoritariamente empleadas son ceras sintéticas del tipo polietileno oxidado, empleándose en mucha menor medida las ceras vegetales del tipo carnauba, siendo prácticamente testimonial el uso de ceras de origen animal, como la cera de abeja [12].

Por lo tanto, la morfolina está clasificada dentro de los aditivos alimentarios como emulsionante, y como se ha explicado anteriormente, se usa como medio alcalino para emulsionar las ceras usadas en el recubrimiento de frutas y hortalizas [12].

## **2.1. Marco legislativo de la morfolina en alimentos**

En la UE, los aditivos autorizados en la alimentación humana están regulados mediante listas positivas, y en consecuencia todas las sustancias que no estén incluidas en estas listas no están autorizadas. En 1989, la UE adoptó una Directiva Marco (89/107/CEE), que establecía los criterios para la evaluación de aditivos y preveía la adopción de tres Directivas técnicas específicas [13]. Dichas Directivas establecen la relación de aditivos que se pueden utilizar (excluyendo otros), los alimentos a los que se podrían añadir y los contenidos máximos admisibles:

- Directiva 94/35/CE relativa a los edulcorantes [14].
  
- Directiva 94/36/CE relativa a los colorantes [15].
  
- Directiva 95/2/CE, relativa a otros aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes [16].

Las tres Directivas anteriores han sido trasladadas, mediante Reales Decretos, al ordenamiento jurídico español. Así, el Real Decreto 142/2002 ha refundido en un único texto la lista positiva de aditivos, distintos de colorantes y edulcorantes [17]. Además, recientemente se ha publicado la Orden SPI/681/2011, de 28 de Marzo, que viene a actualizar los anexos del Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, ampliando los usos de algunos aditivos previamente ya autorizados e introduciendo nuevos aditivos [18]. La Orden incorpora a nuestro ordenamiento jurídico la Directiva 2010/69/UE [19], por la que se modifican los anexos de la Directiva 95/2/CE relativa a aditivos alimentarios distintos de edulcorantes y colorantes.

Como se ha comentado previamente, la morfolina, es utilizada como agente emulsionante en ceras de recubrimiento para frutas y hortalizas. Sin embargo, este aditivo no está incluido en las listas positivas de aditivos alimentarios permitidos por la legislación europea y, por tanto, su uso no es legal, aunque si está permitido en otros países como EE.UU. [20]. En este sentido, el 1 de octubre de 2010 la Agencia de Alimentos del Reino Unido (*Food Standards Agency, FSA*) informó de la detección de la presencia de morfolina en algunas partidas de manzanas importadas por Reino Unido desde Chile. En una reunión posterior al hallazgo, se informó a la FSA de que también se habían utilizado ceras que contenían morfolina para el recubrimiento de algunos cítricos y que estos habían sido importados por el Reino Unido y posiblemente por otros estados miembros de la UE. A raíz de estos hechos, la FSA realizó una evaluación inicial de riesgos basada en la información disponible, concluyendo que la exposición a morfolina a los niveles detectados en estas manzanas era probablemente de bajo riesgo para los consumidores [21].

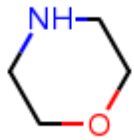
## **2.2. Identidad, propiedades físicas y químicas**

La morfolina (1-oxa-4-azaciclohexano) es un líquido incoloro, aceitoso, higroscópico, volátil y con un olor característico a amina. Es completamente miscible en agua, así como en muchos disolventes orgánicos, pero tiene una solubilidad limitada en disoluciones acuosas alcalinas. La morfolina es una base fuerte, y una disolución acuosa de concentración 0.01 % (m/m) proporciona un pH de 9.4, mientras que una del 10 % (m/m), origina un pH de 11.2.

En relación a su reactividad, la morfolina es una amina heterocíclica secundaria que posee dos grupos funcionales, grupo amino y grupo éter, pudiendo experimentar una gran variedad de reacciones. Se

comporta químicamente como una amina secundaria, mientras que el grupo éter de la molécula es normalmente inerte y la mayoría de las reacciones implican al grupo amino secundario. Así, la morfolina reacciona con ácidos inorgánicos y gases ácidos, como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  o  $\text{HCN}$  para formar sales de morfolina. Esta propiedad se usa en la adición de morfolina como un anticorrosivo en sistemas de calderas. Este compuesto puede reaccionar con agentes oxidantes, someterse a cloración directa y formar complejos con haluros metálicos. Además, reacciona con ácidos carboxílicos, anhídridos, cloruros y ésteres para formar morfolidos. Los alquilmorfolidos se forman por reacción de morfolina con halogenuros de alquilo, sulfatos o dialquil trialquil fosfatos. Los N-alquilmorfolidos, en particular N-metilmorfolidos y N-etilmorfolidos, se utilizan como catalizadores en la preparación de poliuretanos [22]. Además, industrialmente, la reacción con formaldehído para formar N-formilmorfolina se usa como disolvente selectivo para la extracción de compuestos aromáticos de alta pureza [22]. De manera resumida, en la Tabla 1 se muestran algunas de las características más relevantes de la morfolina.

Tabla 1. Datos de identificación de la morfolina

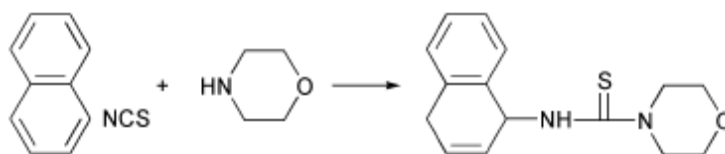
		Referencia
<b>Nombre IUPAC</b>	Morfolina	[23]
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO	[23]
<b>Estructura química</b>		[24]
<b>Número CAS</b>	110-91-8	[25]
<b>Sinónimos</b>	1-Oxa-4-azaciclohexano Tetrahidro-2H-1,4-oxazina Tetrahidro-1,4-oxazina Dietileno oximida Dietilenoimida oxido Dietileno imidoxida	[22]
<b>Peso molecular</b>	87.12 g/mol	[22]
<b>Punto de fusión (°C)</b>	-3.1	[26]
<b>Punto de ebullición (°C a 760 mm Hg)</b>	128.9	[23]
<b>Punto de inflamación (°C)</b>	35.6	[23]
<b>T<sup>a</sup> autoignición (°C)</b>	310	[23]
<b>T<sup>a</sup> descomposición (°C)</b>	> 330	[22]
<b>pK<sub>a</sub> (ácido conjugado) (a 25 °C)</b>	8.33	[22]
<b>Presión de vapor (kPa a 20 °C)</b>	1.1	[26]
<b>Log Kow</b>	0.86	[23]
<b>Umbral del olor (ppm)</b>	0.01	[26]

### 2.3. Metodología existente para la determinación de morfolina

La mayoría de los métodos publicados hasta la fecha para el análisis de morfolina han sido desarrollados para su determinación en muestras medioambientales, como aire y agua, encontrándose únicamente una metodología en la cual se describe su determinación en cítricos y que ha sido propuesta por el Laboratorio Europeo de Referencia de Stuttgart (*Laboratory for Chemical and Veterinary Analysis of Food*, CVUA, Stuttgart, Alemania) [27].

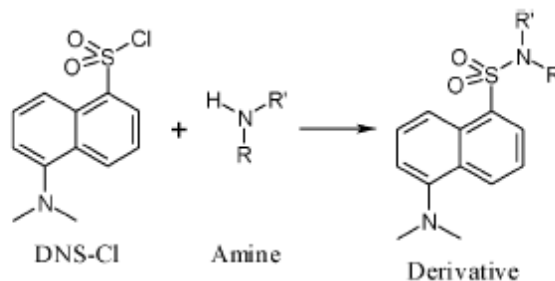
Los métodos publicados para el análisis a niveles traza de morfolina en distintas matrices incluyen el uso de cromatografía iónica (IC) [28], cromatografía de gases (GC) [29] y cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) [30]. En cuanto a los tipos de sistemas de detección utilizados en los métodos de análisis publicados, se describe el uso de detectores ultravioleta (UV) [30] y de espectrometría de masas (MS) [27], si se emplea HPLC como técnica separativa, y detectores de ionización de llama (FID) [31] y MS [31], si se utiliza GC.

Así, para el análisis de morfolina en aire, se han propuesto distintos métodos. En primer lugar, se ha descrito la formación del compuesto derivatizado con tiourea (Figura 1) y su posterior análisis mediante HPLC-UV, obteniendo un límite de cuantificación de 7 mg/m<sup>3</sup> [30].



**Figura 1. Formación del derivado de naftilisotiourea de morfolina**

Otro agente derivatizante empleado ha sido el cloruro de dansilo (Figura 2), siendo analizado el compuesto derivatizado por HPLC-MS, obteniéndose un límite de detección de 0.03 mg/mL [32].

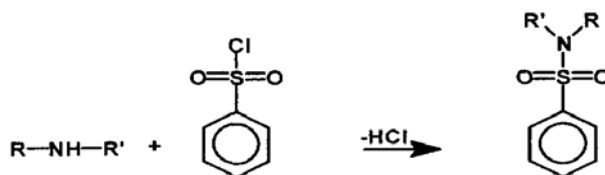


**Figura 2. Reacción característica del cloruro de dansilo con una amina secundaria**

Por otro lado, los métodos de análisis de morfolina en agua se pueden llevar a cabo mediante análisis directo por IC, con un límite de cuantificación de 1 mg/L [28]. Sin embargo, se obtiene mejor límite de detección (0.03  $\mu\text{g/mL}$ ) cuando se lleva a cabo una reacción de derivatización con cloruro de dansilo y posterior determinación con HPLC-UV a 456 nm [33], de manera similar a como se ha mostrado en la Figura 2.

Además se puede emplear también GC-MS, realizándose una derivatización con cloruro de bencenosulfonilo (Figura 3). En este caso, se obtiene un límite de cuantificación de 0.74  $\mu\text{g/L}$  [29]. Finalmente, hay que comentar que se puede utilizar como agente derivatizante el cloroformiato de isobutilo (IBCF), determinándose posteriormente la sustancia derivatizada mediante GC-FID y GC-MS, alcanzando límites de detección inferiores a  $10^{-8}$  mg/L [31].





**Figura 3. Reacción característica del cloruro de bencenosulfonilo con una amina secundaria**

Para el análisis de morfolina en sedimentos existe en bibliografía un solo método en el que se utiliza como agente derivatizante el IBCF para a continuación llevar a cabo la determinación mediante GC-FID y GC-MS, siendo el límite de detección inferior a  $10^{-8}$  mg/kg [31].

En el caso de la determinación de morfolina en alimentos, el único método propuesto hasta la fecha para analizar morfolina en cítricos es el del CVUA, antes mencionado [27]. En este método no se utilizan agentes derivatizantes, como ocurre en las metodologías anteriormente expuestas, sino que la morfolina es extraída directamente con metanol acidificado al 1 % (v/v) con ácido acético y determinada mediante HPLC-MS/MS. A priori, parece ser un método sencillo y rápido de fácil adaptación a los diferentes laboratorios pues no precisa de etapas de extracción complejas, de derivatización, o de limpieza. Además, usa pequeñas cantidades de disolventes orgánicos, consiguiendo un límite de cuantificación de 0.01 mg/kg [27].

Finalmente, en la Tabla 2 se muestra un resumen de los diferentes métodos explicados anteriormente para el análisis de morfolina en diferentes tipos de matriz y con diferentes técnicas de análisis, donde se dan detalles de porcentajes de recuperación obtenidos en cada una de las metodologías aplicadas, así como de los procedimientos de extracción de la morfolina en diferentes matrices.

**Tabla 2. Resumen de los diferentes métodos desarrollados para el análisis de morfina en distintas matrices**

Matriz	Derivatizante	Técnica	Columna	Fase móvil	Tipo detección	Recuperación	Precisión	Límites Inferiores	Referencia
Aire	1-Naftilisotiocianato (NIT)	LC	A: Waters Radial-Pak NVC18 (100 x 5 mm, 4 µm) B: 4 µm Waters Nova-Pak C18 (250 x 4.6 mm, 4 µm)	Acetonitrilo-agua	UV	91 %	5.5	7.7 mg/m <sup>3</sup>	[30]
Aire	Cloruro de dansilo	LC	Phenomenex Luna C18, (150 mm x 2.0 mm, 3 µm )	Acetonitrilo + 1% ácido fórmico	MS	97 %	13 %	0.03 mg/mL	[32]
Agua	No utiliza	IC	4 mm x 200 mm Dionex Normal Cation Separador 30831	0.005 M HCl	Conductividad	91-97 %	N.D.*	0.1 mg/L	[28]
Agua	Cloruro de dabsilo	LC	µBondapak C18, (30 cm x 3.9 mm, 10 µm)	Agua-etanol	UV	92-106 %	N.D.*	0.15 µg/mL	[33]
Agua	Bencenosulfonilo cloruro	GC	DB5 (35 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	-	MS	N.D.*	3.1 %	0.74 µg/L	[29]
Agua y Sedimento	Cloroformiato de isobutilo	GC	DB5 (50 m x 0.25 mm, 0.25 µm)	-	FID-MS	85-100 %	1.1-4.7 %	N.D.*	[31]
Naranja	No utiliza	LC	Obelisc R 2.1 x 150 mm, 5 µm 100 Å (SIELC; OR-21.150.0510)	20 mM formiato amónico en agua-acetonitrilo	MS/MS	100-106 %	N.D.*	0.01 mg/kg	[27]

\* N.D. Dato no disponible.

### 3. MATERIALES, EQUIPOS Y MÉTODOS EMPLEADOS

#### 3.1. Reactivos y disoluciones

- Patrón de morfolina. Sigma-Aldrich (Madrid, España), con una pureza  $\geq 99.5\%$  y densidad de 0.996 g/mL a 25 °C.
  
- Preparación de la disolución patrón de morfolina. Se preparó una disolución patrón de morfolina, con una concentración de 400 mg/L, por pesada exacta del compuesto. Una vez pesado, el compuesto se disolvió en metanol hasta un volumen de 50 mL y se almacenó a -5 °C, en un bote topacio y en oscuridad.
  
- Preparación de las disoluciones de trabajo. En cada jornada de trabajo se prepararon los patrones intermedios necesarios, diluyendo la disolución madre con metanol hasta obtener la concentración necesaria para la fortificación de las muestras, los experimentos de recuperación, o para la preparación de los patrones de calibración.
  
- Agua ultrapura obtenida mediante un sistema de gradiente de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).
  
- Metanol (grado HPLC), J. T. Baker (Deventer, Holanda).
  
- Acetonitrilo (grado HPLC), J. T. Baker.
  
- Acido fórmico concentrado (grado HPLC), Fluka (Buchs, Suiza).

- Acido acético concentrado (grado HPLC), Panreac (Barcelona, España).
- Metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico (v/v). Pipetear 1 mL de ácido fórmico en un matraz aforado de 100 mL y enrasar con metanol.
- Acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético (v/v). Pipetear 1 mL de ácido acético en un matraz aforado de 100 mL y enrasar con acetonitrilo.
- Ácido pentadecafluorooctanoico (PDFOA), Sigma-Aldrich.

### **3.2. Aparatos, equipos y consumibles**

- Tubos de centrifuga de 50 mL con tapón de rosca.
- Balanza Granatario, PB 602-S (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza).
- Balanza de Precisión, AB204-S (Mettler Toledo).
- Centrifuga, modelo Centronic BL II (J. P. Selecta, Barcelona, España).
- Agitador Rotatorio modelo Reax 2 (Heidolph, Kelheim, Alemania).
- Cromatógrafo de líquidos de ultra presión. Acquity UPLC<sup>®</sup> (Waters, Milford, MA, EE.UU.). Empleo de una columna C18 Acquity UPLC BEH (100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm tamaño de partícula) de Waters.

- 
- Analizador de triple cuadrupolo modelo Waters Acquity TQD (Waters, Manchester, Reino Unido), equipado con una fuente de ionización de electronebulización (ESI) en modo positivo.
  - Columna cromatográfica, Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> (50 mm x 50 mm, 1.7 µm) de Waters.
  - Columna cromatográfica, Acquity UPLC® BEH HILIC (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µm) de Waters.
  - Columna cromatográfica, X Terra MS C<sub>8</sub> (150 mm x 2.1 mm, 5 µm) de Waters.
  - Columna cromatográfica, Kinetex C18 (50 mm x 2.1 mm, 2.6 µm) de Phenomenex (Torrance, California, EE.UU.).
  - Filtros de 0.20 µm de Nylon de VWR (Barcelona, España). Se usan para el filtrado de los extractos después del proceso de extracción.
  - Filtros 0.45 µm GVHP de Millipore (Irlanda). Usados para filtrar las fases móviles antes de usarlas en el UHPLC-MS/MS.
  - Cartuchos C18 (Sep-Pak, 500 mg, 3 cm<sup>3</sup>) de Waters.
  - Cartuchos Florisil (Bond Elut Jr, 500 mg). Varian (Habor City, CA, EE.UU.)

### **3.3. Análisis cromatográfico y determinación espectrométrica**

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema Acquity UPLC® (Waters, Milford, MA, EE.UU.). El modo de ionización fue ESI positivo. La columna usada fue una Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> 50 x 2.1 mm, 1.7 µm (Waters), equilibrada a 30 °C. El analito fue separado con una fase móvil formada por metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0.01 % v/v, (eluyente B) a un flujo de 0.35 mL/min. En la Tabla 3 se muestra el gradiente utilizado:

**Tabla 3. Gradiente de elución empleado para la separación de la morfina**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>% Eluyente A</b>	<b>% Eluyente B</b>
0.00	0.35	10	90
2.50	0.35	50	50
3.00	0.35	90	10
3.50	0.35	10	90
5.00	0.35	10	90

Para la detección de los compuestos se empleó un analizador de triple cuadrupolo, citado anteriormente, en el que la colisión se llevó a cabo con argón, con una presión de trabajo en la celda de colisión de  $4 \times 10^{-3}$  mbar. La adquisición de los datos se llevó a cabo empleando el software MassLynx 4.0 y el programa QuanLynx (Waters).

En la Tabla 4 se muestran los parámetros más relevantes del método de masas.

**Tabla 4. Valores de los parámetros de la fuente de ionización y del analizador**

	<b>Parámetro</b>		<b>Valor</b>
<b>Fuente de Ionización</b>	<b>Voltajes</b>	Capilar (kV)	3.0
		Extractor (V)	2
		RF Lentes (V)	1
	<b>Temperaturas</b>	Fuente (°C)	120
		Desolvatación (°C)	350
	<b>Flujo Gas</b>	Desolvatación (N <sub>2</sub> ) (L/h)	600
		Cono (N <sub>2</sub> ) (L/h)	80
<b>Analizador</b>	<b>Analizador</b>	LM Resolución 1	15
		HM Resolución 1	15
		Energía Ion	0.5
		Modo	MSMS
		Voltaje salida (V)	0.5
		LM 2 Resolución 2	14
		HM Resolución 2	14
		Energía Ion 2	0.8
		Ganancia	1.00
	<b>Celda Colisión</b>	Flujo gas colisión (mL/min)	0.12

### **3.4. Procedimiento de extracción.**

Para determinar cuáles eran las mejores condiciones de extracción de la morfolina y así obtener unos mejores valores de recuperación del analito se evaluaron diferentes procesos de extracción. El método desarrollado por el CVUA utiliza como disolvente de extracción metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico (v/v). Esta mezcla de disolventes se comparó con otra compuesta por acetonitrilo acidificada al 1 % con ácido acético (v/v), indicándose a continuación los procedimientos evaluados:

#### **a) Procedimiento de extracción con acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético**

El procedimiento operatorio se puede resumir como sigue: pesar 10 g de muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de polipropileno (50 mL). Seguidamente, añadir 10 mL de disolución de acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético (v/v), y agitar vigorosamente los tubos de centrifuga durante 2 minutos de forma manual. A continuación, agitar durante 40 minutos en un agitador rotatorio. Transcurrido dicho tiempo, centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 6 minutos. Finalmente, proceder al análisis de una alícuota del sobrenadante mediante UHPLC-MS/MS.

#### **b) Procedimiento de extracción con metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico [27] y seleccionado como óptimo para su validación**

El procedimiento operatorio se puede resumir como sigue: pesar 10 g de muestra homogeneizada en un tubo de centrifuga de polipropileno (50 mL). Seguidamente, añadir 10 mL de disolución de



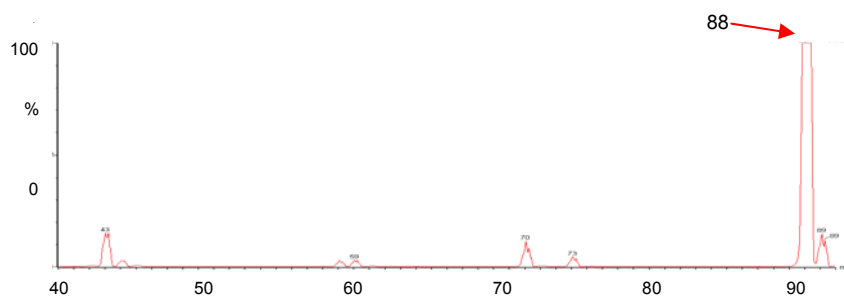
metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico (v/v), y agitar vigorosamente los tubos de centrifuga durante 2 minutos de forma manual. A continuación, agitar durante 40 minutos en un agitador rotatorio. Transcurrido dicho tiempo, centrifugar los tubos a 4000 rpm durante 6 minutos. Filtrar una alícuota del sobrenadante a través de filtros de nylon (0.20  $\mu\text{m}$ ). Finalmente proceder al análisis mediante UHPLC-MS/MS.

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método sencillo y eficaz para la determinación de morfolina en muestras de cítricos, especialmente naranja, aplicando un método de extracción que permita unos niveles aceptables de recuperación del analito y posterior detección y confirmación mediante UHPLC-MS/MS.

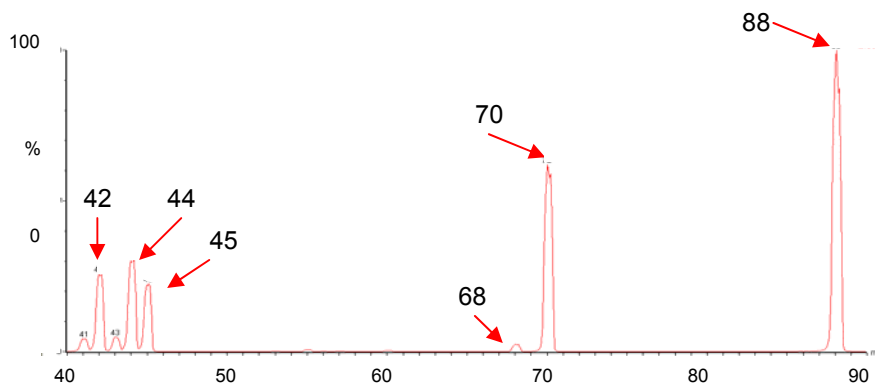
##### **4.1. Optimización de las condiciones MS/MS**

La optimización de parámetros se realizó por perfusión directa del compuesto en el espectrómetro de masas. En primer lugar, se modificó el voltaje de cono para obtener aquel valor que proporcionase una mejor señal del ión precursor ( $m/z$  88.0), obteniendo finalmente un valor de 35 V, mostrándose en la Figura 4 el espectro obtenido.



**Figura 4. Señal del ión precursor ( $m/z$  88.0) producida al utilizar un voltaje de cono de 35 V.**

Una vez fijado éste, se procedió a la optimización de la energía de colisión para cada para cada uno de los distintos iones producto, observándose que las mayores intensidades para los distintos iones producto se obtuvieron a 15 eV, mostrándose en la Figura 5 el espectro MS/MS obtenido, donde se puede indicar que los distintos iones producto obtenidos son  $m/z$  70, 68, 45, 44 y 42. Finalmente, en la Tabla 5 se muestra un resumen de las diferentes condiciones experimentales obtenidas, durante el proceso de caracterización espectrométrica de la morfolina.



**Figura 5. Espectro MS/MS de la morfolina obtenido con una energía de colisión de 15 eV**

De todas las transiciones estudiadas, se eligió la transición  $m/z$  88.0 > 70.1 como transición de cuantificación, mientras que la transición  $m/z$  88.0 > 45.1 se empleó como transición de identificación, al ser las dos transiciones que originalmente proporcionaban una mayor sensibilidad.

**Tabla 5. Parámetros específicos UHPLC- MS/MS de la morfolina**

Compuesto	Reacción	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (eV)
Morfolina	88.0 > 42.0	35.0	15.0
	88.0 > 44.2	35.0	15.0
	88.0 > 45.1	35.0	15.0
	88.0 > 68.0	35.0	15.0
	88.0 > 70.1	35.0	15.0

#### 4.2. Optimización de las condiciones cromatográficas

Una vez caracterizado el compuesto, se decidió optimizar las condiciones cromatográficas. En primer lugar se evaluaron diferentes tipos de columna para probar la compatibilidad de la molécula, de naturaleza muy polar, con la fase estacionaria y la variabilidad del tiempo de retención de la morfolina con cada una de ellas. Las columnas probadas fueron:

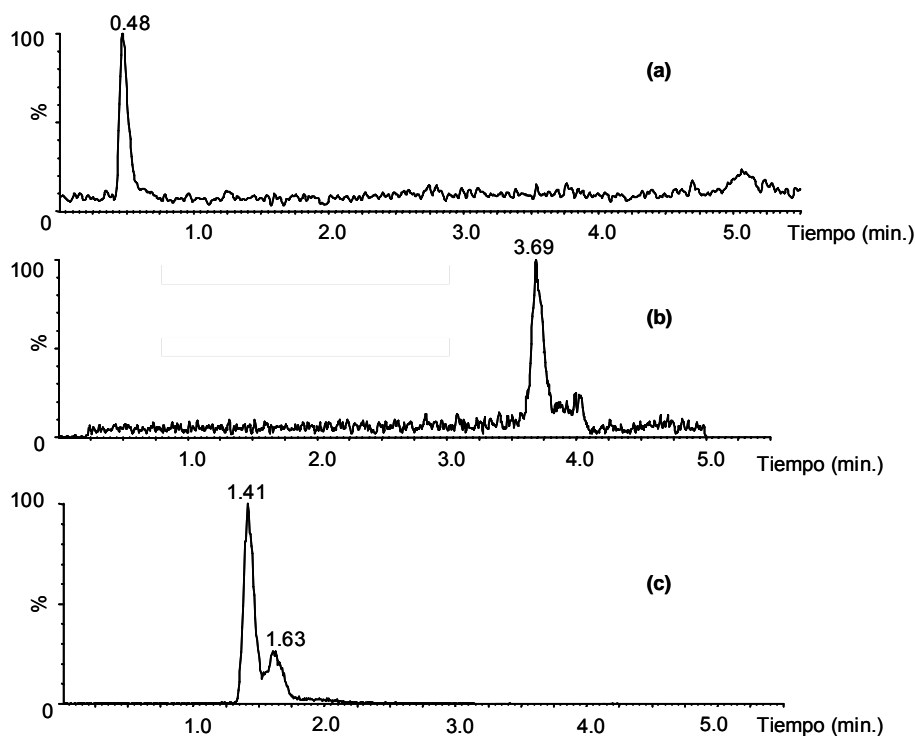
- ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC (100 mm x 2.1 mm, 1.7 $\mu$ m). Este tipo de columna contiene sustrato BEH (*Ethylene Bridged Hybrid*) y esta diseñada para retener y separar compuestos muy polares. Estas columnas se han optimizado y probado para producir

separaciones eficientes y reproducibles bajo las condiciones de interacción hidrofílica de cromatografía de líquidos. [34].

- Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> (50 mm x 2.1 mm, 1.7 μm). Es la columna más universal para las separaciones por UHPLC. Permite separaciones en una amplia gama de pH (pH 1-12), y una mayor estabilidad a pHs bajos [34].
- X Terra MS C<sub>8</sub> (150 mm x 2.1 mm, 5 μm). Este tipo de columnas combinan propiedades de la sílice y los materiales poliméricos en la llamada tecnología de partícula híbrida, en la que se sustituye uno de cada tres silanoles por un grupo metilo durante la síntesis. Esta hidrofobicidad se distribuye a través de toda la estructura de la partícula, lo que genera una partícula híbrida (inorgánica/ orgánica) robusta con la que se puede trabajar a altas velocidades de fase móvil, altas temperaturas y pH elevado [34].

En el caso de la columna HILIC, la fase móvil utilizada fue metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de formiato amónico 5 mM (eluyente B) con un flujo de 0.25 mL/min. Para la columna C18 se utilizó como fase móvil metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico 0.01 % (v/v) (eluyente B) con un flujo de 0.35 mL/min. Con la columna C<sub>8</sub> se empleó una fase móvil compuesta por metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido pentadecafluorooctanoico (PDFOA) 0.12 % m/v (eluyente B) con un flujo de 0.35 mL/min.

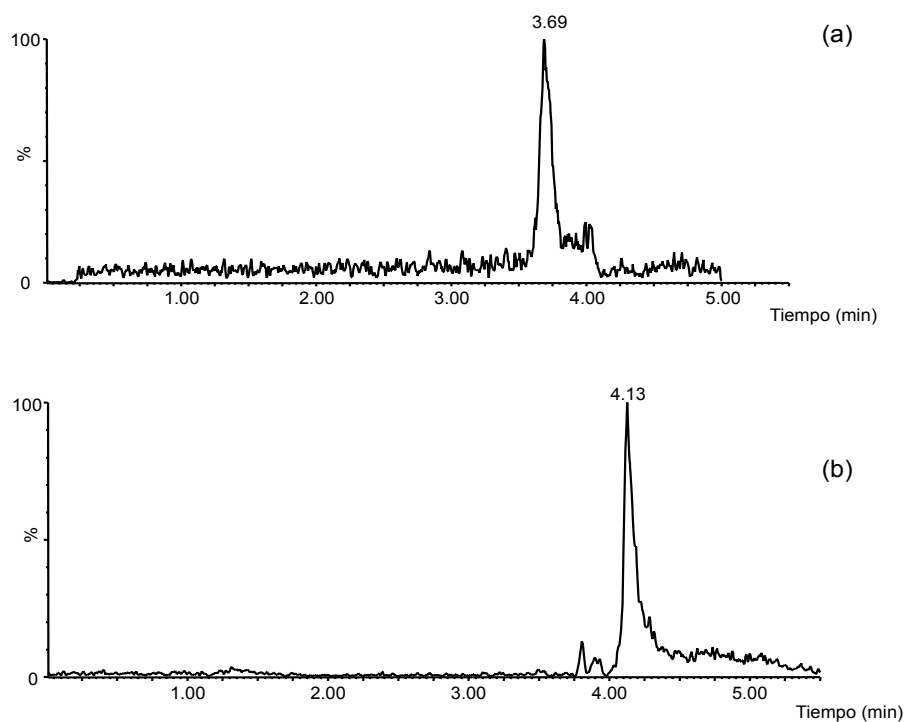
En la Figura 6 se muestra la comparación de los diferentes cromatogramas obtenidos cuando se empleaban los distintos tipos de columna, al inyectar un patrón de morfolina de 200 μg/L preparado en metanol.



**Figura 6. Influencia del tipo de columna en la elución de la morfolina. Columna empleada: (a) HILIC, (b) C<sub>18</sub>, (c) C<sub>8</sub>**

A la vista de los diferentes cromatogramas se puede observar que la columna que proporciona un menor tiempo de retención es la HILIC (0.5 min), seguida de la C<sub>8</sub> (1.4 min) y por último la C<sub>18</sub> (3.7 min). Valorando los resultados obtenidos y con objeto de minimizar la posibilidad de interferencias, se decide seleccionar como fase estacionaria para posteriores experiencias la C<sub>18</sub>, ya que ofrece un tiempo de retención mayor, y por lo tanto una mejor separación de la morfolina de las sustancias interferentes. Además, la columna C<sub>18</sub> es la de uso más común, y con la elección de esta columna se cumple uno de los objetivos en el desarrollo del método analítico que consistía en utilizar materiales de uso lo más común posible.

Una vez seleccionada el tipo de columna, se evaluó la composición de la fase móvil. Por un lado, se probó una fase móvil no formadora de pares iónicos que se componía de metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico (0.01 %, v/v) (eluyente B). Por otra parte, se evaluó una fase móvil formadora de pares iónicos que se componía de metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de un agente formador de pares de iones, PDFOA (0.12 %, m/v). Los agentes formadores de pares de iones pueden mejorar la resolución cromatográfica y el tiempo de retención para analitos muy polares cuando se trabaja en fase reversa [35]. La Figura 7 muestra dos cromatogramas representativos al utilizar ambos tipos de fase móviles.



**Figura 7. Efecto de la fase móvil en la separación de la morfolina.**

**Tipo de fase móvil: (a) sin formador de pares de iones, (b) con formador de pares de iones.**

Con la fase móvil que no utilizaba agentes formadores de pares de iones se obtenía un tiempo de retención de la morfolina de 3.7 minutos, mientras que con la fase móvil que empleaba PDFOA, el tiempo de retención era de 4.1 minutos. Este retraso en el tiempo de retención es debido al efecto del PDFOA, que forma un par iónico con la morfolina.

Finalmente, al realizar pruebas en extracto de matriz fortificada con diferentes concentraciones de morfolina (50, 100, 200, 500, 1000 µg/L) se obtuvo mayor sensibilidad con la fase móvil que no empleaba agentes formadores de pares de iones. Por tanto, a pesar de que con el PDFOA se retrasaba la elución del analito, lo que podía ser beneficioso para evitar posibles interferentes de la matriz que presentan tiempos de retención bajos, se decidió desechar el uso de este agente y se estableció como fase móvil de trabajo la compuesta por metanol (eluyente A) y una disolución acuosa de ácido fórmico 0.01 % (eluyente B).

#### **4.3. Optimización del proceso de extracción**

El método desarrollado por el CVUA para la determinación de compuestos polares, como puede ser la morfolina, emplea como disolvente de extracción una disolución de metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico [27]. Tomando como partida dicho procedimiento, en el presente trabajo se van a evaluar otro tipo de disolventes, intentando reducir al máximo los límites de cuantificación y detección.

Se estudiaron diferentes composiciones de disolventes tales como, metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico y acetonitrilo acidificado al 1 % con ácido acético. Además, se realizaron experiencias

aplicando una etapa de limpieza posterior a la extracción con el objetivo de contrarrestar la carga de matriz en las muestras a analizar.

En primer lugar, para estos estudios, se emplearon muestras blancas de naranja fortificadas a una concentración de 5 mg/kg de morfina. Se realizaron dos tandas de 3 réplicas. Cada una de las tandas fue sometida al proceso de extracción. Una de las tandas se extrajo con metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico y la otra con acetonitrilo acidificado 1 % con ácido acético. En ambos casos se siguieron los procedimientos descritos en el Apartado 3.4. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos al comparar las diferentes variantes en el procedimiento de extracción.

Además es conveniente indicar que aunque, a priori, la transición  $m/z$  88.0 > 70.0 parecía ser la más selectiva, se comprobó experimentalmente que la transición  $m/z$  88.0 > 45.1 proporcionaba mejores resultados (menos interferencias durante el proceso de integración) por lo que se eligió ésta para cuantificar el analito.

**Tabla 6. Resultados de recuperaciones con diferentes disolventes de extracción**

	Recuperación (%)	
	Metanol	Acetonitrilo
<b>Media</b>	91.8	73.4
<b>DER *</b>	1.9	38.5

\* (n = 3)



A la vista de los resultados se decidió continuar con la extracción con metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico ya que se obtienen mejores recuperaciones y un mejor nivel de precisión (desviación estándar relativa, DER, más baja).

- Estudio de una etapa de limpieza posterior a la extracción

Para tratar de minimizar la presencia de componentes de la matriz en el extracto final, se evaluó la inclusión de una etapa de limpieza de los extractos de matriz mediante extracción en fase sólida (SPE), obtenidos en el proceso de extracción, utilizando distintos tipos de sorbentes como C<sub>18</sub> y Florisil y comparando las recuperaciones obtenidas.

Para evaluar la limpieza de los extractos se estudiaron los resultados de muestras de naranja fortificadas con 5 mg/kg de morfina. A estas muestras se les aplicó el proceso de extracción seleccionado previamente. Con los extractos se realizaron las siguientes operaciones:

- Una alícuota se analizó tal cual.
- Una alícuota se pasó por un cartucho de C18 previo a su análisis cromatográfico.
- Una alícuota se pasó por un cartucho de Florisil previo a su análisis cromatográfico.

Sin embargo, esta etapa de limpieza no mejoraba el cromatograma obtenido en relación a las experiencias anteriores (no se aplicaba dicha etapa de limpieza), obteniendo los mismos resultados cuando se

empleaba tanto C18 como Florisil, por lo que se puede concluir que los cartuchos evaluados no son lo suficientemente eficientes. Además, es posible que parte del analito quede atrapado en dichos cartuchos.

Al no mejorar las recuperaciones con la utilización de los cartuchos se decidió no incluir dicha etapa de limpieza en el procedimiento de extracción.

#### **4.4. Evaluación del efecto matriz**

Cuando se emplea ESI como técnica de ionización, uno de los principales problemas que se observa es la disminución o aumento de la señal debido a otros componentes presentes en la matriz (efecto matriz). Este es el tipo de efecto matriz más frecuente en LC, denominado comúnmente como supresión iónica. Dicho efecto matriz repercute en un aumento o disminución de la respuesta del detector, en comparación con las señales producidas por disoluciones preparadas en disolvente [36,37]. La presencia o ausencia de tales efectos se puede demostrar por comparación de la respuesta producida a partir de la sustancia analizada en disolvente con la que se obtiene de la misma cantidad de analito en extracto de muestra. Algunas de las estrategias utilizadas para disminuir o compensar el efecto matriz son:

- Eliminación de los componentes de la matriz a través de limpiezas exhaustivas de los extractos.
- Uso de calibrados preparados con extractos blancos de matriz [38]. Estos extractos blancos de matriz se preparan de la misma manera que las muestras a analizar.

- Empleo del método de adición de patrón, el cual es apropiado cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y no es posible obtener blancos de matriz [39].

Para la detección de dicho efecto matriz se puede realizar una comparación de las pendientes de las rectas de calibrado en disolvente y en matriz, aplicando el procedimiento descrito por González y Herrador [40], y que se comenta brevemente a continuación.

En primer lugar, se realiza el cociente entre ambas pendientes y se calcula la desviación estándar asociada:

$$R = \frac{b_{matriz}}{b_{disolvente}} \quad \text{Ecuación 1}$$

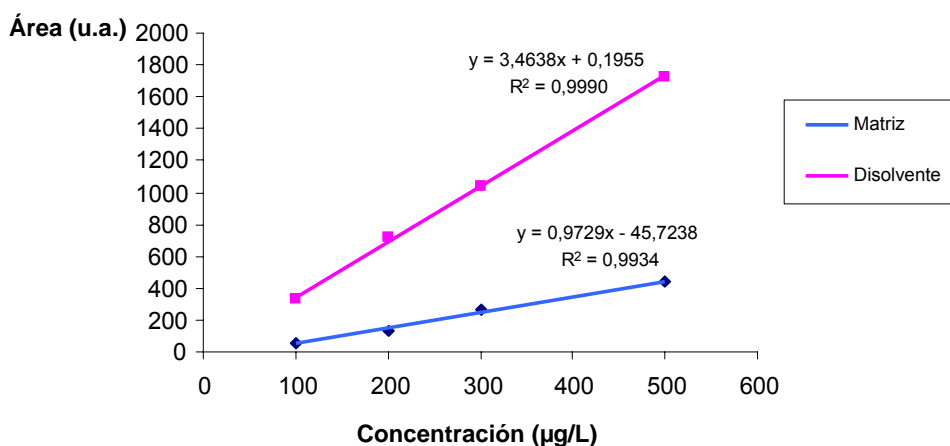
$$s_R = R \sqrt{\left( \frac{s_{bmatriz}^2}{b_{matriz}^2} + \frac{s_{bdisolvente}^2}{b_{disolvente}^2} \right)} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $b_{matriz}$  y  $b_{disolvente}$  son las pendientes de las rectas de calibrado en matriz y disolvente respectivamente, y  $s_{bmatriz}$  y  $s_{bdisolvente}$  son las desviaciones estándar de la regresión correspondiente. Si ambas pendientes son prácticamente iguales, su cociente,  $R$ , no debe ser significativamente distinto de 1, y se aplica un test de comparación de una media respecto a un valor de referencia, aplicando la Ecuación 3.

$$t_{calc} = \frac{|R - 1|}{s_R} \quad \text{Ecuación 3}$$

El valor calculado se compara con el factor de cobertura  $k = 2$  para un 95 % de nivel de confianza. Si  $t_{\text{calc}}$  es mayor que 2, las dos pendientes serán significativamente diferentes, y existirá efecto matriz.

Con el fin de evaluar el efecto matriz y su posible influencia en la disminución o aumento de la señal debido a la presencia de componentes en la matriz de la naranja, se decidió realizar un calibrado en matriz y otro en disolvente a concentraciones comprendidas entre 100 y 500  $\mu\text{g/L}$ , mostrándose los calibrados obtenidos en la Figura 8. Se puede comprobar de manera gráfica las diferencias en las pendientes de las rectas realizadas en disolvente y en extracto de matriz.



**Figura 8. Comparación de las rectas de calibrado preparadas en disolvente y en extracto de matriz**

En la Tabla 7 se muestran los resultados obtenidos al realizar el test indicado previamente, y se puede observar como el valor calculado ( $t_{\text{calc}}$ ) es mayor que 2, por lo que se concluye que las dos pendientes no son iguales y existe efecto matriz.

**Tabla 7. Evaluación del efecto matriz comparando las pendientes de las rectas de calibrado en extracto de matriz y en disolvente**

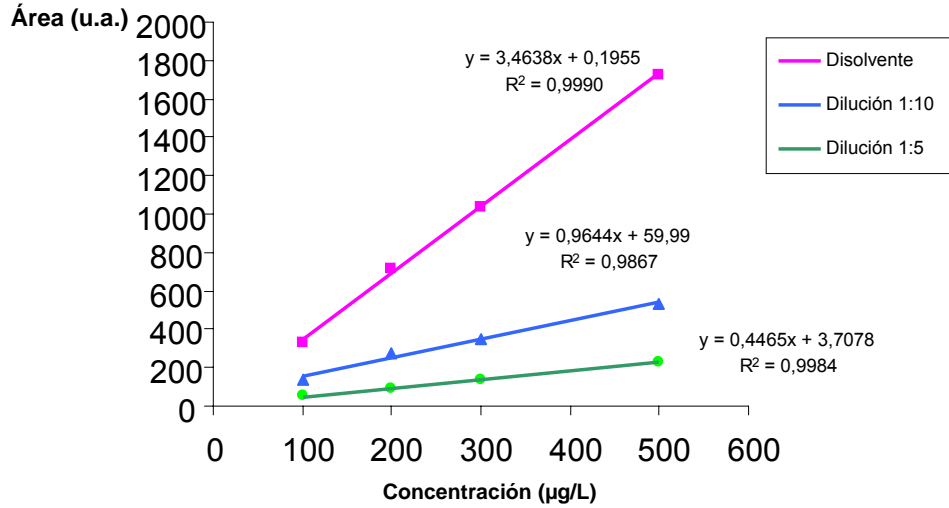
Calibrado	b	s <sub>b</sub>	R	s <sub>R</sub>	t <sub>calc</sub>
Disolvente	3.4638	0.08	0.28	0.017	41.48
Matriz	0.9729	0.05			

Una vez comprobada la presencia de efecto matriz, se decide evaluar posibles estrategias para la minimización de este efecto, como por ejemplo, mediante la realización de una dilución de la matriz de la muestra en el extracto final. El método de dilución se puede utilizar si las especies interferentes no producen un efecto importante por debajo de cierto nivel de concentración. Con este método, el efecto de la interferencia se reduce simplemente al diluir la muestra [41].

Para realizar este estudio se prepararon varias rectas de calibración. Los puntos de concentración utilizados para construir las rectas variaron entre 100 y 500 µg/L de morfolina. Las rectas se prepararon tanto en disolvente como en extracto diluido de matriz. Las diluciones elegidas fueron las recomendadas por el método desarrollado en el CVUA [27], y que implicaban una dilución del extracto de 5 ó 10 veces. De esta forma, las rectas utilizadas para la evaluación fueron:

- Calibrado en disolvente (metanol).
- Calibrado en matriz diluida 1:5 (dilución con metanol).
- Calibrado en matriz diluida 1:10 (dilución con metanol).

En la Figura 9 se puede comprobar de manera gráfica las diferencias en las pendientes de las rectas realizadas en disolvente y con una dilución de matriz 1:5 y con una dilución de matriz 1:10.



**Figura 9. Evaluación del efecto matriz comparando las pendientes de las rectas de calibrado en extracto de matriz 1:5, 1:10 y en disolvente.**

Además, en la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en relación a las pendientes de las rectas obtenidas en según la dilución 1:5 y 1:10.

**Tabla 8. Evaluación del efecto matriz comparando las pendientes de las rectas de calibrado en extracto de matriz 1:5, 1:10 y en disolvente**

Calibrado	b	s <sub>b</sub>	R	s <sub>R</sub>	t <sub>calc</sub>
Disolvente	3.4638	0.08	0.13	0.005	186.91
Dilución 1:5	0.4465	0.01			
Dilución 1:10	0.9644	0.08	0.28	0.020	30.44

Para ambas diluciones se puede observar que el valor calculado ( $t_{\text{calc}}$ ) es mayor que 2, por lo que se concluye que ambas diluciones no corrigen el efecto matriz, existiendo en ambos caso un efecto matriz acusado.

Sin embargo, se puede indicar que existe un efecto matriz bastante marcado si se emplea la dilución 1:5, observando que una mayor dilución de la matriz (1:10) favorece la disminución del efecto matriz.

A continuación, se comprobó qué tipo de dilución ofrecía una recta que proporcionase un mayor rango de trabajo. Además de un amplio rango de trabajo, también se tuvo en cuenta que a mayor dilución de la matriz, en las muestras reales, los límites de cuantificación serían más altos y por tanto el método perdería parte de su valor comercial. En este punto es importante indicar que obtener unos límites de cuantificación bajos es importante puesto que la morfina es un aditivo cuyo uso no está permitido por la legislación europea, y por tanto, no debe aparecer en cítricos comercializados. En este estudio también se pretendía dilucidar cuál de las transiciones seleccionadas previamente resultaba la más selectiva.

Se representó gráficamente las rectas de calibrado, y se evaluó el ajuste de las mismas mediante inspección visual, el coeficiente de correlación lineal, el cálculo de los coeficientes de linealidad (%Lin) [42] y la desviación estándar relativa de los factores de respuesta (DERFR) [42], para comprobar la linealidad. A tal fin se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$\text{Coeficiente de linealidad (\%Lin)} \quad \%Lin. = \left(1 - \frac{Sb}{b}\right) * 100$$

$$\text{Factor de respuesta (FR)} \quad FR = \frac{\text{Señal}}{\text{Concentración}} \quad [43]$$

$$\text{Desviación estándar relativa de FR (DERFR)} \quad DERFR = \frac{S_{FR}}{\bar{X}_{FR}} * 100$$

Donde:

b: Pendiente de la recta.

sb: Desviación estándar de la pendiente de la recta.

$S_{FR}$ : Desviación estándar de Los factores de respuesta.

$\bar{X}_{FR}$  : Media de los factores de respuesta.

Los criterios de aceptación a priori de las rectas de calibrado fueron los siguientes:

- $R^2 \geq 0.98$ .
- DER de los factores de respuesta  $\leq 25$  %.
- Coeficiente de linealidad  $\geq 95$  %.



En la Tabla 9 se muestra un resumen de los rangos de trabajo permitidos para cada una de las diluciones y cada una de las transiciones de masa estudiadas.

**Tabla 9. Rango de trabajo con dilución de matriz 1:5 y 1:10 para las diferentes transiciones estudiadas**

Reacción	Dilución 1:5				Dilución 1:10			
	R <sup>2</sup>	DERFR	Coficiente lineal	Rango (µg/L)	R <sup>2</sup>	DERFR	Coficiente Lineal	Rango (µg/L)
88.0>42.0	0.9912	10.2	90.6	100-500	0.9968	20.5	96.0	50-500
88.0>44.2	0.9984	8.0	96.0	100-500	0.9895	21.4	92.7	50-500
88.0>45.0	-	-	-	-	0.9999	23.6	99.9	50-500
88.0>68.0	-	-	-	-	0.9957	15.7	95.4	50-500
88.0>70.1	0.9993	13.8	98.2	50-500	0.9999	23.2	99.2	100-500

Se puede observar que la transición  $m/z$  88.0 >70.1, que a priori es la más selectiva ya que proporciona el fragmento con relación  $m/z$  más alto, no da los resultados esperados. Esto se debe a que esta transición corresponde con la pérdida de una molécula de agua ( $[M-H_2O]^+$ ,  $m/z$  18), lo que hace que cualquier compuesto de la matriz con similar peso molecular a la morfolina y con una pérdida tan común interfiera en la determinación de esta sustancia, debido a la poca selectividad de la transición monitorizada.

Además se puede observar que las rectas analizadas con dilución 1:5 no obtienen respuesta para todas las transiciones. Así, por ejemplo, para transiciones que presentan una buena sensibilidad, como es la  $m/z$  88.0 > 45.0, no se obtiene respuesta. Probablemente, esto es debido a la mayor carga de matriz que contienen las muestras analizadas con una dilución 1:5.

En definitiva, las pruebas realizadas con una dilución 1:10 de matriz proporcionan señal para todas las transiciones y un rango de trabajo más amplio. Atendiendo a todas estas razones se decidió finalmente trabajar con una dilución de matriz 1:10.

#### **4.5. Validación**

Una vez desarrollado el método analítico, se procedió a la validación del mismo, entendiendo la validación como el proceso de caracterizar el comportamiento que se espera de un método en términos de su alcance, especificidad, veracidad, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad [44].

Para comprobar la viabilidad de la metodología propuesta, se procedió a la validación del método en naranja como ejemplo típico de cítrico. El método fue validado en términos de veracidad, precisión, linealidad (rango de trabajo) y límites inferiores.

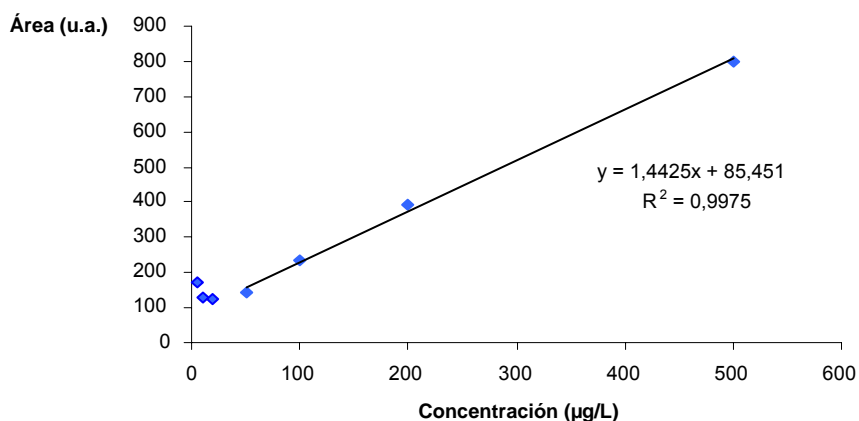
##### **4.5.1. Linealidad y rango de trabajo**

El rango lineal o dinámico de un método analítico se define como el intervalo de concentraciones donde el método analítico es aplicable [45]. La linealidad del método fue evaluada mediante la realización de curvas de calibración utilizando extractos de naranja diluidos 1:10 con metanol.

En primer lugar, se realizaron una serie de extracciones de blanco de naranja y el extracto obtenido se diluyó 10 veces con metanol. A partir de este extracto diluido se realizó la curva de calibración correspondiente con los puntos de concentración 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 µg/L. Las curvas de calibración se obtuvieron por mínimos

cuadrados, empleando el área de pico como respuesta analítica y representando dicha área frente a la concentración. Una vez obtenidos los resultados de la señal a las diferentes concentraciones y para asegurar la linealidad de las rectas se tomaron los criterios para la aceptación a priori de las mismas explicados en el Apartado 4.4.

En la Figura 11 se muestra la curva de calibrado, obteniendo una DERFR de 24.1 y %Lin de 96.5.



**Figura 11. Recta de calibrado con dilución de matriz 1:10**

Después de estudiar las rectas de calibrado se concluyó que el rango de trabajo lineal para la recta de calibrado estaba comprendido entre 50-500 µg/L.

#### **4.5.2. Veracidad**

La veracidad se define como el grado de concordancia existente entre un valor medio obtenido de una serie de resultados de ensayo y un valor verdadero o uno aceptado como tal [46,47].

Para evaluar la veracidad del método se fortificaron muestras de naranja ( $n = 5$ ) a 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de morfolina, que teniendo en cuenta que el método de extracción proporcionaba un factor de dilución de 2, y se trabajó con dilución 1:10 de la matriz, correspondían a 100  $\mu\text{g}/\text{L}$  cromatográficas, tras someter los fortificados al procedimiento de extracción.

A continuación se realizaron las extracciones según el método detallado en el Apartado 3.4, utilizando como disolvente de extracción metanol acidificado con ácido fórmico (1 %, v/v). Una vez realizadas las extracciones de las muestras se diluyó la matriz 1:10 con metanol.

Finalmente se llevo a cabo el análisis cromatográfico de las muestras obteniendo una media de las recuperaciones de 110.3 %, indicando que el método proporcionaba resultados veraces.

#### **4.5.3. Precisión**

La precisión se determinó mediante la repetibilidad o precisión intra-día, que se define como la precisión de un método en función de análisis independientes realizados por un mismo analista, en el mismo laboratorio, con la misma técnica, con el mismo instrumento y en un periodo corto de tiempo [48,49]. La repetibilidad se acepta como una medida de varianza interna y representa la máxima precisión que puede lograrse en unas condiciones de trabajo determinadas.

La repetibilidad se obtuvo mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (DER) de las tandas realizadas a 2000 µg/kg ( $n=5$ ).

Los resultados obtenidos mostraban una DER de 11.6 %, siendo inferior al 20 % normalmente considerado en análisis de residuos de plaguicidas, lo que indica la estabilidad del método.

#### **4.5.4. Límite de detección y límite de cuantificación**

El límite de detección (LOD) se define como la concentración de analito que origina una señal igual a la media de la señal ofrecida por una muestra blanco más tres veces la desviación estándar de dicha señal. Se trata, pues, de la concentración más baja de analito que puede detectarse, aunque no puede estimarse su concentración con exactitud [50,51]. Así, el LOD se calculó inyectando concentraciones decrecientes de morfolina en naranja, y se estimó como la mínima concentración que nos proporcionaba una relación señal-ruido (S/N) igual a 3. Atendiendo a los resultados obtenidos se obtiene un LOD de 100 µg/kg.

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración que origina una señal igual a la media de la señal ofrecida por una muestra blanco más diez veces la desviación estándar de dicha señal [50,51]. De esta forma, el LOQ se calculó inyectando concentraciones decrecientes de morfolina en naranja, y se estimó como la mínima concentración que nos proporcionaba una S/N igual a 10. Atendiendo a los resultados obtenidos se obtiene un LOQ de 1000 µg/kg.

#### **4.6. Análisis de muestras reales**

Una vez optimizado y validado el método analítico, éste fue usado para la monitorización del compuesto estudiado en 5 muestras de naranja procedentes de diferentes supermercados de la provincia de Almería. Para asegurar la calidad de los resultados obtenidos se aplicó un procedimiento de control de calidad interno que constó de:

- Empleo de rectas de calibrado en matriz, para compensar el efecto matriz.
- Análisis de un blanco en disolvente en cada grupo de muestras, para comprobar que no hay contaminación por parte del material utilizado.
- Análisis de un blanco de reactivo, preparado llevando a cabo todo el procedimiento de extracción pero sin utilizar muestra, de manera que se comprueba que los reactivos utilizados en el proceso están exentos de contaminación por analito.
- Análisis de un blanco de matriz, para asegurar que la matriz blanca no está contaminada con morfina.
- Análisis de muestras blancas fortificadas a 2000 µg/kg, para comprobar que los valores de recuperación de nuestro proceso analítico completo son aceptables, tanto de la parte de extracción como de la parte instrumental.

De los resultados obtenidos se puede indicar que no se encontró ninguna muestra concentraciones superiores al LOQ.

## **5. CONCLUSIONES Y PROPUESTAS SOBRE LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO.**

Las principales conclusiones que se pueden obtener del trabajo desarrollado son:

1. Se ha caracterizado la morfolina mediante espectrometría de masas de tipo triple cuadrupolo y se ha desarrollado y optimizado el método cromatográfico para su separación.
2. Se han desarrollado y evaluado diferentes variantes del método de extracción de la morfolina en cítricos propuesto por el CVUA. El método proporcionó mejores resultados cuando la extracción se hacía utilizando metanol acidificado al 1 % con ácido fórmico.
3. La metodología propuesta se presenta como una clara alternativa a la derivatización para la determinación de morfolina en muestras de cítricos. Se trata de un método sencillo y rápido, que no requiere etapas como la derivatización del compuesto o etapa de limpieza, minimizando el consumo de reactivos y tiempo necesario para el análisis de muestras reales.
4. El método desarrollado se ha validado en términos de linealidad, veracidad, precisión y límite de cuantificación. Durante la validación del método se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre 110.3 % con valores de DER de 11.6 %.

Como propuestas de continuación del trabajo sería recomendable:

- Mejorar el procedimiento de extracción con el objeto de conseguir un LOQ más bajo y de esta forma poder aplicar el método de análisis en laboratorios de rutina dándole así un valor comercial a los análisis realizados siguiendo este procedimiento.
- Optimizar el método en otras frutas y hortalizas como pueden ser la manzana, piña, calabacín, pepino, etc.... que pueden ser tratadas con ceras de recubrimiento.



## 6. REFERENCIAS

---

- [1] [http://europa.eu/pol/food/index\\_es.htm](http://europa.eu/pol/food/index_es.htm) (Último acceso julio 2011)
- [2] [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm) (Último acceso julio 2011).
- [3] [http://ec.europa.eu/news/agriculture/090717\\_es.htm](http://ec.europa.eu/news/agriculture/090717_es.htm) (Último acceso julio 2011).
- [4] J. Bello Gutiérrez. Ciencia de la bromatología. Principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos S.A. 2000. p. 127-143
- [5] Norma general del Codex para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995, Rev.7 2006.
- [6] <http://www.aesan.mspsi.es> (Último acceso julio 2011).
- [7] C. Barros Santos. Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso. 2ª Edición. Editorial Visión Libros. 2008. p. 20-21.
- [8] C. Hernández Díaz-Ambrona. La transformación industrial de la producción agropecuaria. Ministerio de Educación. 2004, p. 91.
- [9] M. Hernández Rodríguez, A. Sastre Gallego. Tratado de nutrición. Ediciones Díaz de Santos. 1999. p. 466.
- [10] M. Agustí Fonfría. Citricultura. Editorial Mundi-Prensa Libros. 2003. p. 409-411.
- [11] E. Gómez. V Curso internacional. Tecnología post-cosecha y procesado mínimo. Recubrimientos para frutas y hortalizas. Universidad Politécnica de Cartagena, España. 2011.
- [12] A. Contreras Oliva. Efecto de los tratamientos post-cosecha novedosos en la calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de cítricos. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de tecnología de alimentos. 2010. p. 23.
- [13] Directiva del Consejo de 21 de Diciembre de 1998, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios

- 
- destinados al consumo humano. (89/107/CEE). Diario Oficial nº L 55 de 24.2.2001. p. 59.
- [14] Directiva 94/35/CE del Parlamento Europeo y del Consejo 30 de junio de 1994 relativa a los edulcorantes utilizados en los productos alimenticios. Diario Oficial nº L 265 de 30.9.1998. p. 35.
- [15] Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 Junio de 1994 relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios. Diario Oficial nº L 237 de 10.9.1994. p. 3.
- [16] Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. Diario Oficial nº L 61 de 18.3.1995. p. 1.
- [17] Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE núm. 44, de 20.2.2002. p. 6756.
- [18] Orden SPI/681/2011, de 28 de marzo, por la que se modifican los anexos del Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE núm. 76, de 30.3.2011. p. 33049.
- [19] Directiva 2010/69/UE de la Comisión de 22 de octubre de 2010 por la que se modifican los anexos de la Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes. Diario Oficial nº L 279 de 23.10.2003. p. 22.
- [20] Food and Drug Administration (FDA). Title 21-food and drugs. Chapter 1 Food and drug administration. Department of health and human services. Subchapter b--Food for human consumption (continued). Part 172 - Food additives permitted for direct addition

- 
- to food for human consumption. Subpart c- Coatings, films and related substances. Sec. 172.235 morpholine. Code of Federal Regulations. Title 21, volume 3. Revised as of April 1, 2010.
- [21] <http://www.food.gov.uk/news/newsarchive/2010/oct/morph2> (Último acceso julio 2011).
- [22] <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc179.htm> (Último acceso julio 2011)
- [23] <http://www.chemspider.com> (Último acceso julio 2011).
- [24] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=8083> (Último acceso julio 2011).
- [25] D. Desaulniers, K. Leingartner, T. Zacharewski, W. G. Foster. Optimization of an MCF7-E3 Cell Proliferation Assay and Effects of Environmental Pollutants and Industrial Chemicals. *Toxicology in Vitro*. 1998. 12, p. 409-422.
- [26] Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional de la morfolina. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo (INSHT). Documentación límites exposición profesional (DELP) 50, 2010. <http://www.insht.es> (último acceso julio 2011).
- [27] M. Anastassiades, D. I. Kolberg, D. Mack, I. Sigalova, D. Roux, D. Füge. Quick method for the analysis of residues of highly polar pesticides in foods of plant origin involving simultaneous extraction with methanol and LC-MS/MS determination. Versión 5. November 2010. Laboratory for Chemical and Veterinary Analysis of Food (CVUA, Stuttgart, Germany)
- [28] R. Gilbert, R. Rioux. Ion Chromatographic Determination of morpholine and cyclohexylamine in aqueous solutions containing ammonia and hydrazine. *Analytical Chemistry*, 1984. 56, p. 109-111.

- 
- [29] F. Sachet, S. Lenz, H. Brauch. Analysis of primary and secondary aliphatic amines in waste water and surface water by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with 2, 4-dinitrofluorobenzene or benzenesulfonyl chloride. *Journal of Chromatography*, 1997. 764, p. 85-93.
- [30] R. Lindahl, A. Wästerby, J. Levin. Determination of morpholine air by derivatisation with 1-naphthylisothiocyanate and HPLC analysis. *The Analyst*, 2001. 126, p. 152-154.
- [31] M. Akyüz, Ş. Ata. Ion-pair extraction and GC-MS determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples. Adnan Menderes University, 4th AACD Congress, 29 Sept-3 Oct.2004, Kuşadası-Aydın, Turkey Proceedings Book 341, p. 623-628.
- [32] M. Fournier, J. Lesage, C. Ostiguy, H. Van Tra. Sampling and analytical methodology development for the determination of primary and secondary low molecular weight amines in ambient air. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008. 10, p. 379-386.
- [33] C. Lamarre, R. Gilbert, A. Gendron. Liquid chromatographic determination of morpholine and its thermal breakdown products in steam-water cycles at nuclear power plants. *Journal of Chromatography*, 1989. 461, p. 249-258.
- [34] [www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es\\_ES&cid=513206](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_ES&cid=513206) (Último acceso julio 2011).
- [35] J. T. Watson, O. D. Sparkman. *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. Editorial John Wiley and Sons. 2008. p. 663.
- [36] J. Hajslová, J. Zrostlíková. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*. 2003. 1000, p. 181-197.

- 
- [37] W. M. A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 2006. 25, p. 881-899.
- [38] A. Hill, S. L. Reynolds. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. *The Analyst*. 1999. 124, p. 953-958.
- [39] D. C. Harris. *Análisis químico cuantitativo*. Editorial Reverte. 2007. p. 88.
- [40] A. G. González, M. A. Herrador. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007. 26, p. 227-238.
- [41] D. A. Skoog, D. M. West. *Fundamentos de Química Analítica*. Cengage Learning Editores. 2005. p. 214.
- [42] C. Díez García. Tesis doctoral: Diseño y Aplicación de Métodos Multirresiduo de Herbicidas en Suelo y Cebada para el Control y Protección del Hábitat de la Avutarda. Universidad de Valladolid, Departamento de Química Analítica. Instituto tecnológico agrario de Castilla y León. 2008.
- [43] C. Chow Chan. *Analytical method validation and instrument performance verification*. Wiley. 2004. p. 28.
- [44] Document No. SANCO/10684/2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. 1. 1. 2010.
- [45] N. K. Aras, O. Yavuz Ataman. Trace element analysis of food and diet. *Royal Society of Chemistry*. 2006. p. 41.
- [46] C. Perruchet, M. Priel. Estimación de la incertidumbre. *Medidas y ensayos*. AENOR. 2000. p. 89.
- [47] A. Maroto Sánchez. Tesis doctoral: Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Universidad Rovira y Virgili. 2002. p.10.

- 
- [48] C. Mongay Fernández. Quimiometría. Editorial Universidad de Valencia. 2004. p. 27
- [49] M. I. Gómez del Río, J. Gómez del Río. Calibración e incertidumbre en los laboratorios químicos. Editorial UNED. 2007. p. 214.
- [50] M. Sogorb Sánchez, E. Vilanova Gisbert. Técnicas analíticas de contaminantes químicos aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias. Ediciones Díaz de Santos. 2004. p. 8.
- [51] B. Boyd, R. Boyd, C. Basic, R. Bethem. Trace quantitative analysis by mass spectrometry. John Wiley and Sons. 2008. p. 427.