

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Química y Física

Trabajo Fin de Máster. Máster Interuniversitario en Química.

Determinación simultánea de atropina y escopolamina en trigo sarraceno y productos similares mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem



Autor:

Jesús Santiago Marín Sáez

Tutor:

Roberto Romero González



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA

MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO ACADÉMICO:

CONVOCATORIA: 1ª

2ª

UNIVERSIDAD:

TÍTULO DEL TRABAJO:

Determinación simultánea de atropina y escopolamina en trigo sarraceno y productos similares mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem

ESTUDIANTE:

Jesús Santiago Marín Sáez

TUTOR(es):

Roberto Romero González

Fecha:

VºBº Tutor(es)

Fdo: Roberto Romero González

El Estudiante

Fdo: Jesús Santiago Marín Sáez

ÍNDICE

RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Alcaloides en el mundo moderno.....	10
1.2. Tipos de alcaloides	13
1.3. Metodología analítica para la determinación de alcaloides del tropano	19
<i>1.3.1. Técnicas de extracción</i>	<i>19</i>
<i>1.3.2. Técnicas cromatográficas</i>	<i>24</i>
<i>1.3.3. Métodos de detección</i>	<i>28</i>
2. OBJETIVOS	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. Patrones, reactivos y materiales	32
3.2. Equipos	32
3.3. Método de extracción evaluado	34
3.4. Muestras analizadas	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Optimización del método UHPLC-QqQ-MS/MS	35
4.2. Optimización del método de extracción.....	39
4.3. Validación del método analítico.....	42
<i>4.3.1. Linealidad y rango de trabajo.....</i>	<i>43</i>
<i>4.3.2. Efecto matriz</i>	<i>43</i>
<i>4.3.3. Veracidad y precisión.....</i>	<i>45</i>
<i>4.3.4. Límites de detección y cuantificación</i>	<i>46</i>
4.4. Aplicación del método al análisis de muestras reales	47
5. CONCLUSIONES	48
6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	49
7. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evolución de las ventas de productos sin gluten en Europa.	12
Tabla 2: Métodos de extracción usados en la determinación de alcaloides del tropano.	22
Tabla 3: Métodos de análisis utilizados para la determinación de alcaloides del tropano en diferentes matrices.	26
Tabla 4: Diferentes sistemas de detección usados para la determinación de alcaloides del tropano.	30
Tabla 5: Gradiente de elución empleado.	33
Tabla 6: Parámetros de la fuente de ionización.	33
Tabla 7: Parámetros UHPLC-QqQ-MS/MS empleados.	34
Tabla 8: Efecto de los sorbentes en la recuperación de escopolamina y atropina.	41
Tabla 9: Evaluación del efecto matriz usando el método ANCOVA.	44
Tabla 10: Recuperación, precisión intradía y precisión interdía.	45
Tabla 11: Límites de detección y cuantificación.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Número de personas celiacas en Estados Unidos.	12
Figura 2: Alcaloides con la estructura de la feniletilamina.	13
Figura 3: Principal alcaloide con la estructura de la tropolona.	14
Figura 4: Principales alcaloides piridínicos y piperidínicos.	14
Figura 5: Alcaloides isoquinoleínicos más importantes presentes en la amapola.	15
Figura 6: Alcaloides indólicos más importantes.	15
Figura 7: Alcaloides quinoleínicos más importantes.	16
Figura 8: Alcaloide imidazólico más importante.	16
Figura 9: Alcaloides xantínicos más importantes presentes en el café y té.	17
Figura10: Alcaloides tropánicos existentes y algunos de sus metabolitos.	18
Figura 11: Señales obtenidas durante la optimización del voltaje de <i>fragmentor</i> , energía de colisión y transiciones estudiadas.	36
Figura 12: Espectro de los iones producto obtenidos para atropina y escopolamina.	37
Figura 13: Cromatogramas obtenidos durante la optimización cromatográfica empleando distintas columnas.	39
Figura 14: Optimización del disolvente en la extracción de atropina y escopolamina.	40
Figura 15: Forma de pico para atropina y escopolamina aplicando distintas diluciones.	42
Figura 16: Evaluación del efecto matriz para la escopolamina en trigo sarraceno.	43

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer el desarrollo de este trabajo al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (ERDF) por el apoyo financiero.

También agradecer todo el esfuerzo puesto en mí y en la realización del trabajo a mi tutor con el que ya son unos años y espero que sean más ya que aparte de que tiene solución para todo, siempre tiene una sonrisa en su cara y buen humor aunque las cosas no le vayan del todo bien. Mi agradecimiento al resto del grupo de investigación que tanto me ha ayudado en todos estos meses.

Agradecer a mis padres todo el apoyo durante este largo año que me han tenido que aguantar y que en todo momento me han apoyado, han confiado en mí y han visto mi trabajo aunque no entendieran mucho. Y también a mi compañero de laboratorio y amigo durante dos meses, Chen, que, aunque no nos entendiéramos con el idioma siempre nos entendimos de la forma que podíamos. Por ello y por lo que aprendimos el uno del otro le agradezco esos dos meses.

Y por último agradecerle todo el apoyo a mi compañera y pareja Rosalía. Se lo agradezco por ayudarme como parte del grupo de investigación, como parte de mi familia y por último como la persona que hace que siga avanzando y que hace que esto y el futuro sea posible.

RESUMEN

Se ha desarrollado un método para la determinación de atropina y escopolamina en trigo sarraceno y productos relacionados. Como método de extracción se evaluó una modificación del QuEChERS (acrónimo de sus características de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe*). Durante la etapa de limpieza se evaluó la extracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE) empleando carbono negro grafitizado (*Graphitized Black Carbon*, GBC) y amina secundaria primaria (*Primary Secondary Amine*, PSA). El extracto se diluyó con agua (50:50, v/v) antes del análisis cromatográfico. El método fue validado y las recuperaciones (excepto las muestras de chía fortificadas a 10 µg/kg) variaron entre 75% y 92%. La precisión intra e interdía fue menor o igual al 17% (expresada como desviación estándar relativa). El límite de cuantificación de atropina y escopolamina fue de 0,4 y 2,0 µg/kg, respectivamente. Durante el análisis de muestras, se analizaron ocho tipos de muestras (trigo sarraceno, trigo, soja, harina de trigo sarraceno, macarrones de trigo sarraceno, amaranto, mijo y semillas de chía), aunque no se detectó ni atropina ni escopolamina en ninguna muestra con valores superiores a los límites de detección del método.

ABSTRACT

A method was developed for the determination of atropine and scopolamine in buckwheat and related products. A modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) extraction procedure was evaluated. Dispersive solid phase extraction (d-SPE) was studied during clean-up step, using graphitized black carbon (GBC) and primary secondary amine (PSA). The extract was diluted with water (50:50, v/v) prior to chromatographic analysis. The method was validated and recoveries (except chia samples spiked at 10 µg/kg) ranged from 75% to 92%. Intra and interday precision was lower than or equal to 17% (expressed as relative standard deviation). The limit of quantification of atropine and scopolamine was 0.4 and 2.0 µg/kg, respectively. Eight types of samples (buckwheat, wheat, soy, buckwheat flour, buckwheat noodle, amaranth grain, chia seeds and peeled millet) were analyzed. Target compounds were not found above the limits of detection of the method.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Alcaloides en el mundo moderno

El interés por las toxinas naturales producidas por hongos o plantas ha crecido en los últimos años debido a su toxicidad y sus efectos sobre la alimentación y la seguridad de los piensos animales y alimentos para los humanos. Son muchas las toxinas naturales, pero cabe destacar los alcaloides. Éstos son un grupo de compuestos que contienen átomos de nitrógeno básicos, que se producen de manera natural en las plantas, hongos, bacterias y animales. Muchos de estos compuestos son sustancias farmacológicamente activas o muy tóxicas [1]. Por ejemplo, su utilización farmacológica se ha empleado en el estudio de enfermedades como es el caso del Parkinson, ya que, algunos presentan acción antimuscarínica [2], actuando sobre las recepciones sinápticas y disminuyendo así los síntomas del Parkinson.

Existe una amplia variedad de alcaloides, estando este trabajo centrado en los alcaloides del tropano. Éstos se producen en las plantas de la familia de las *Solenaceae*, aunque las mayores concentraciones se encuentran en el género *Datura*. Estas plantas son malezas de campos de cultivo, terrenos baldíos, corrales y otros hábitats y producen cantidades variables de alcaloides del tropano [3].

La hiosciamina, y su mezcla racémica, atropina, así como la escopolamina son los alcaloides del tropano predominantes en el género *Datura* (aunque existen en toda la familia de las *Solenaceae*) y se sintetizan en todos los órganos de la planta. La evaluación del contenido de dichos alcaloides es esencial desde el punto de vista de uso médico, pero también para evitar un riesgo potencial de toxicidad para los seres humanos y los animales. En el ámbito médico, estos compuestos se usan para la medicación preanestésica [4], para inducir midriasis [5] (dilatación de las pupilas) en procedimientos oftalmológicos o para la terapia contra la intoxicación con plaguicidas organofosforados o agentes nerviosos [6], debido a sus efectos parasimpatolíticos, anticolinérgicos y antieméticos. Los mamíferos tienen una alta sensibilidad a los alcaloides anticolérgicos, especialmente a la atropina y la escopolamina, tanto en su forma racémica como en su forma enantiomérica, por lo que una pequeña cantidad de estos alcaloides puede producir síntomas de intoxicación severos [7].

El riesgo de contaminación por los alcaloides del tropano se ha visto aumentado en los últimos tiempos debido a dos factores:

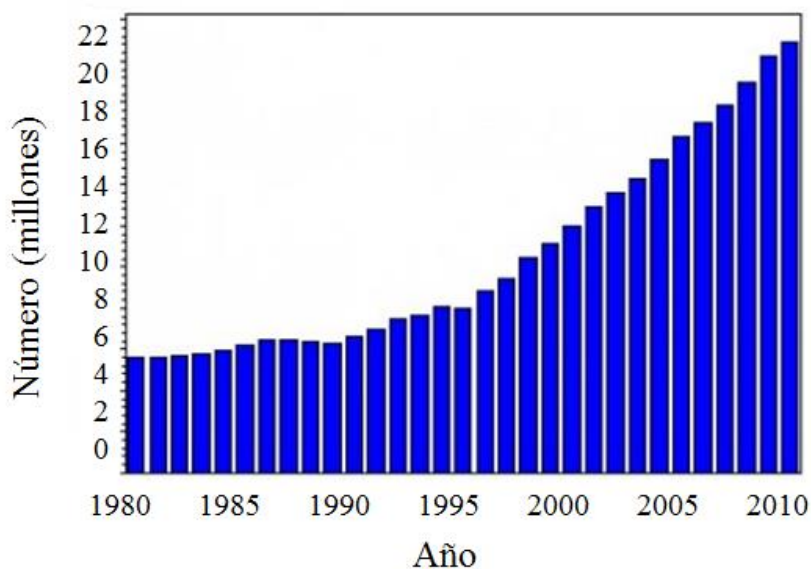
- Aunque el suministro de cualquier alimento público debe mantenerse a salvo de la contaminación accidental o deliberada durante la fabricación y comercialización de productos, en granos y semillas comerciales a granel, como el trigo, el centeno, soja, semillas de lino, maíz y cultivos de solanáceas, puede existir contaminación por diversos alcaloides. La contaminación suele estar causada por la proliferación en los cultivos de plantas de *D. stramonium*, *D. innoxia* y *D. ferox*, donde el manejo de la maleza, manejo post-cosecha y su control no se realizan adecuadamente [8], debido a que las semillas de estas plantas se confunden y tienen los mismos ciclos de maduración que los cultivos de granos, legumbres, cereales y pseudocereales [9]. Así, se han descrito casos por contaminación con este tipo de sustancias, como el ocurrido en Eslovenia en 2003 que involucró a 73 personas [10]. Por lo tanto, son sustancias que requieren de un control riguroso, y que despiertan cada vez más curiosidad, como lo demuestra un reciente estudio realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA) [8].

- Esta contaminación se puede producir también en el trigo sarraceno con el que se fabrican productos sin gluten [11]. Realmente el trigo sarraceno no se puede considerar un cereal por no pertenecer a la familia de las gramíneas sino a la de las poligonáceas. Desde la antigüedad, este trigo se empleaba en la elaboración de pasta (también llamada soba) en países como China o Japón por su increíble capacidad de adaptación a los climas fríos y continentales [12], pero en la actualidad se producen todo tipo de alimentos con trigo sarraceno [13]. Esto es así porque la sociedad actual está muy preocupada por su salud, habiendo aumentado mucho el consumo de productos sin gluten (**Tabla 1**) ya sea por necesidad, para celíacos que necesitan consumir productos sin gluten, como por la dieta, ya que los productos sin gluten se pueden consumir por cualquier persona sin obligarles a fijarse más en la composición y en la preparación de los alimentos, incrementándose el consumo de todo tipo de alimentos naturales, no congelados ni elaborados [14]. En este sentido, los productos fabricados a partir del trigo sarraceno, además de no contener gluten, tienen multitud de beneficios como propiedades nutricionales equilibradas, bajo perfil alergénico, son una buena fuente de proteínas y fibra y tienen propiedades antioxidantes notables [15].

Tabla 1: Evolución de las ventas de productos sin gluten en Europa [16].

Productos	Volumen (toneladas)		Valor (millones euros)	
	2012	2013	2012	2013
Congelados	740,6	2112,1	6,08	15,72
Pan	958,1	1388,0	9,13	12,79
Pasta	788,3	1055,4	3,67	4,57
Galletas	753,9	877,3	7,34	8,25
Harinas	512,6	660,1	2,33	3,03
Bollería	248,2	414,5	3,64	5,16
Cereales	241,6	254,7	1,91	2,03
Sustitutivos pan	89,0	143,3	1,82	2,68
Total	4332,4	6905,6	35,93	54,24

El número de celíacos ha aumentado en todo el mundo, sobre todo en Estados Unidos (**Figura 1**), por lo que debido a sus propiedades beneficiosas, estos productos también están siendo muy utilizados para comidas para bebés [17], previniendo los potenciales efectos del gluten.

**Figura 1:** Número de personas celíacas en Estados Unidos.

Otro punto a tener en cuenta es que, hasta que no se dieron los primeros casos de contaminación, los alcaloides del tropano “no existían” a los ojos del mundo, ya que no se consideraban peligrosos para el ser humano y ni siquiera había límites legales para ellos. Actualmente, la EFSA señala el límite legal para la especie *Datura* (ya sean sus semillas o partes de la planta), en mijo rojo y trigo sarraceno en 1000 mg/kg en piensos animales o productos ganaderos que puedan entrañar algún riesgo para los seres humanos [8,18], mientras que en alimentos destinados para el consumo de personas no existe un límite legal, sino unos valores establecidos de concentración crítica de 0,016 µg/kg peso corporal/día [8]. Así mismo, recientemente se ha fijado un límite legal en productos destinados a la alimentación de lactantes y niños de corta edad en alimentos a base de mijo, trigo sarraceno y derivados fijado en 1 µg/kg [19].

1.2. Tipos de alcaloides

Los alcaloides pueden ser heterocíclicos o no heterocíclicos, aunque los más importantes son los heterocíclicos. Estos se pueden clasificar de muchas formas, pudiéndose realizar una división eficaz atendiendo a su procedencia [20]:

➤ Alcaloides con la estructura de la feniletilamina: Están asociados con el grupo de los alcaloides isoquinólicos, porque su biosíntesis parte de la tetrahidroquinolina. Los más importantes son la mescalina (**Figura 2**), el primer alucinógeno caracterizado y sintetizado [21], y la efedrina (**Figura 2**), que normalmente se obtiene como una mezcla racémica por una desoxigenación (reacción de Nagai), con multitud de efectos alucinógenos, aunque algunos son beneficiosos para determinadas enfermedades [22].

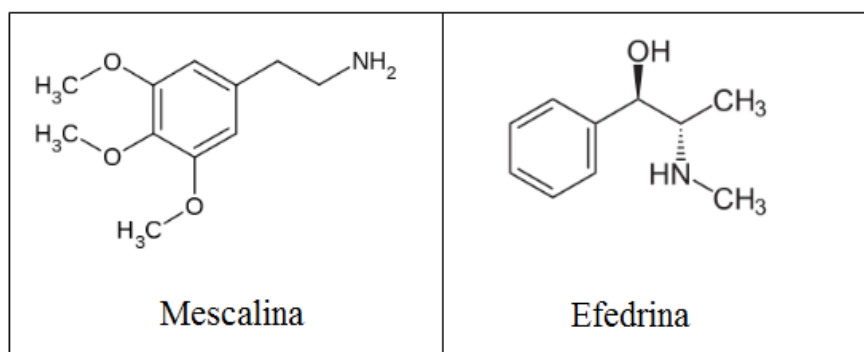


Figura 2: Alcaloides con la estructura de la feniletilamina.

➤ Alcaloides con la estructura de la tropolona: El principal es la colchicina (**Figura 3**), usado desde la antigüedad como antiinflamatorio, y ha demostrado ser eficaz para tratar enfermedades como la gota [23], esclerodermia, amiloidosis, cirrosis hepática, etc [24].

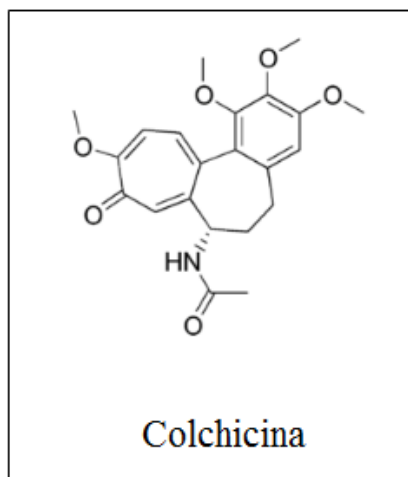


Figura 3: Principal alcaloide con la estructura de la tropolona.

➤ Alcaloides piridínicos y piperidínicos: A este grupo pertenecen la nicotina, conifina, lobelina y arecolina (**Figura 4**). Son tóxicos y afectan al sistema nervioso central, como el caso de la arecolina, estudiándose su efecto citotóxico e inmunotóxico [25].

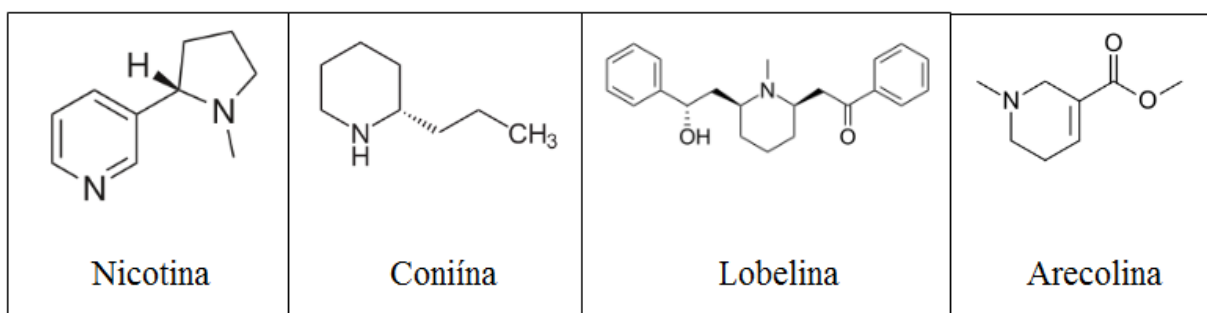


Figura 4: Principales alcaloides piridínicos y piperidínicos.

➤ Alcaloides isoquinoleínicos: En este grupo destacan los alcaloides obtenidos de la amapola [20], como morfina, heroína, codeína y tebaína, entre otros (**Figura 5**).

Algunos de estos alcaloides son difíciles de analizar ya que, por ejemplo la heroína, hidroliza a un metabolito, 6-monoacetilmorfina [26].

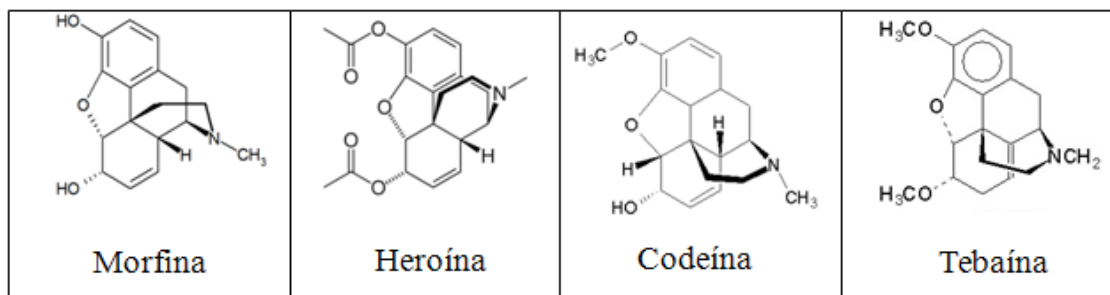


Figura 5: Alcaloides isoquinoleínicos más importantes presentes en la amapola.

➤ Alcaloides indólicos: Algunos de estos son reserpina, fisostigmina o ergotamina (**Figura 6**). Como todos los inhibidores de la acetilcolinesterasa, se han estudiado en la cura de enfermedades como el Alzheimer, el glaucoma y enfermedades relacionadas con problemas para la activación de la digestión entre otras [27].

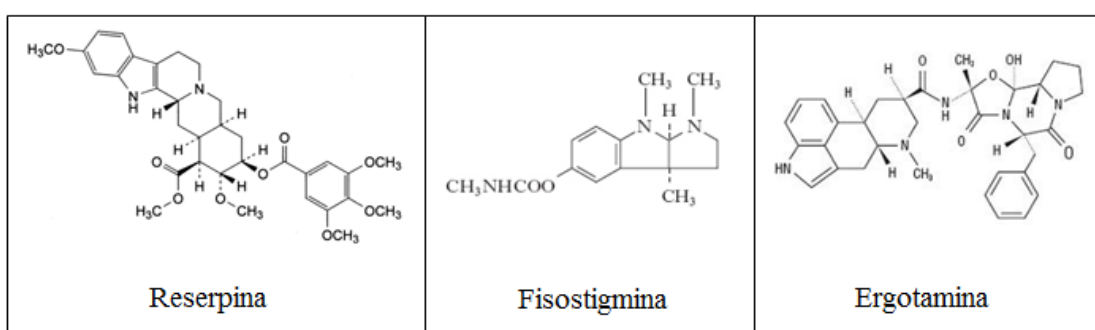


Figura 6: Alcaloides indólicos más importantes.

➤ Alcaloides quinoleínicos: A este grupo pertenecen la quinina y la quinidina (**Figura 7**). Destaca el caso de la quinina, usada como medicamento antimalaria junto con la artemisina [28], aunque también se han realizado investigaciones en las que actúa como anticancerígeno. Además se ha empleado para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda en niños [29].

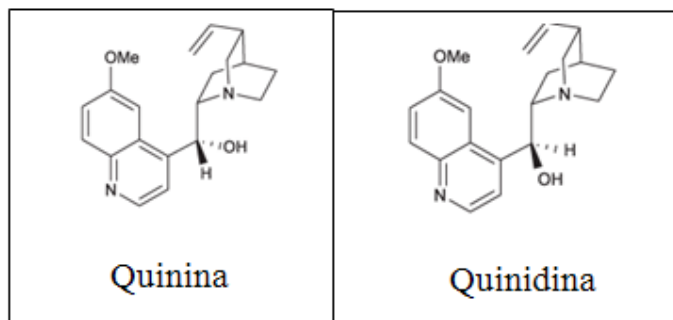


Figura 7: Alcaloides quinoleínicos más importantes.

➤ Alcaloides imidazólicos: Destaca la pilocarpina (**Figura 8**). Es como muchos de los alcaloides un colinérgico, por lo que afecta a los neurotransmisores del cerebro, produciendo por ejemplo epilepsia [30].

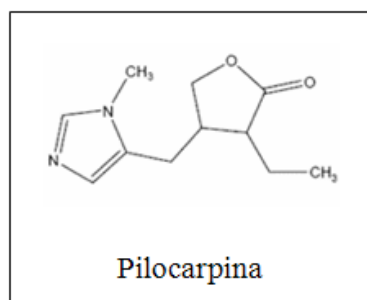


Figura 8: Alcaloide imidazólico más importante.

➤ Alcaloides xantínicos: A este grupo pertenecen los alcaloides del café y té como son cafeína, teofilina y teobromina (**Figura 9**). Estos alcaloides actúan como estimulante del sistema nervioso central, por ser antagonista de la adenosina, actuando como broncodilatador y diurético [31].

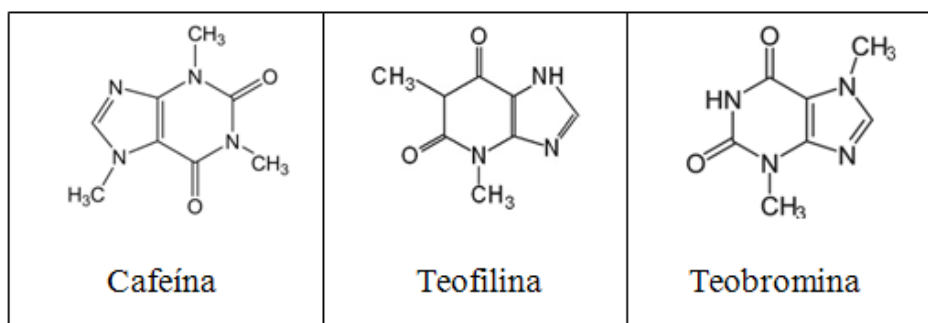


Figura 9: Alcaloides xantínicos más importantes presentes en el café y té.

➤ Alcaloides tropánicos: Entre estos alcaloides se encuentran los alcaloides objeto de estudio en este Trabajo Fin de Máster. En este grupo se encuentran cocaína, las catuabinas [32, 33], hiosciamina, que junto con su isómero forman la atropina, escopolamina y escopina (**Figura 10**). La cocaína, además de ser una droga que afecta al sistema nervioso central [34], comenzó a usarse como anestésico local para operaciones de cirugía menor de la boca y la nariz [35]. La cocaína tiene a su vez metabolitos. Los más importantes son la benzoilecgonina, que se genera por hidrólisis de la cocaína y su presencia en la orina indica el consumo de cocaína [36], y la ecgonina [37], procedente también de la hidrólisis de la cocaína. La (-)-hiosciamina es producida estereoespecíficamente en plantas de la familia de las solanáceas. Durante el proceso de extracción a partir de plantas la S-hiosciamina sufre racemización a una mezcla equimolar de S y R-hiosciamina, favorecida por la temperatura elevada y pH básico, dando lugar a la atropina [8,38]. La escopolamina presenta los mismos efectos para la salud que la atropina, siendo parasimpatolítica, anticolinérgica y antiemética [4-6]. Por último, la escopina, la cual se puede obtener por medio de la escopolamina [39], se usa para ayudar a las drogas o agentes terapéuticos a traspasar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro [40].

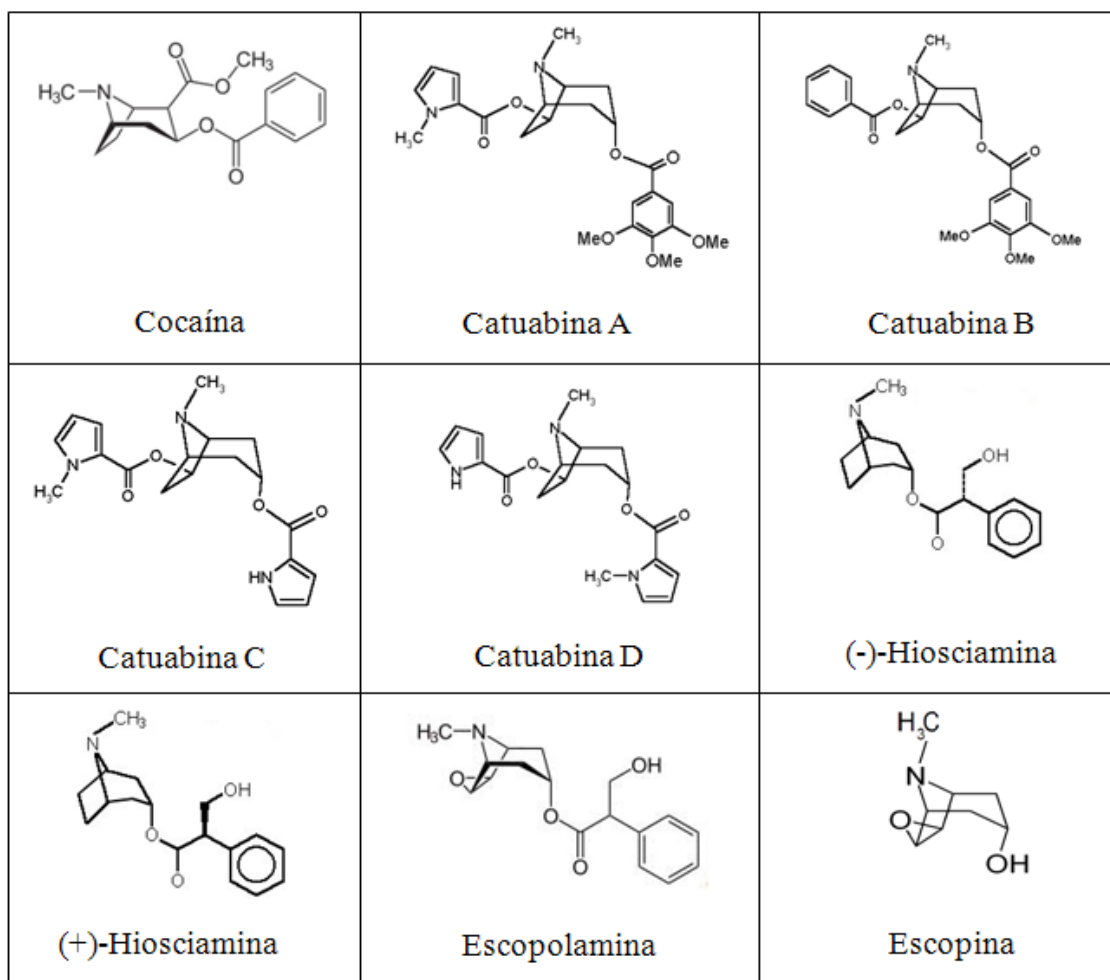


Figura10: Alcaloides tropánicos existentes y algunos de sus metabolitos.

Debido a los efectos perjudiciales en la salud que pueden ocasionar estos alcaloides, es necesario obtener tanto un método de extracción como un método de análisis adecuados para los principales alcaloides del tropano más abundantes como son la atropina y escopolamina.

1.3. Metodología analítica para la determinación de alcaloides del tropano

Debido al mayor consumo de productos derivados del trigo sarraceno y su posible contaminación con alcaloides del tropano, es necesaria la investigación de nuevos métodos que permitan un análisis de muestras rápido y fiable. En el presente trabajo se tratará la determinación de estos alcaloides mediante cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography-Triple Quadrupole-Tandem Mass Spectrometry*, UHPLC-QqQ-MS/MS).

1.3.1. Técnicas de extracción

Debido a la gran cantidad de alcaloides existentes, nos centraremos en los métodos de extracción dirigidos a los alcaloides del tropano, dependiendo de la matriz en la que se realiza la extracción, mostrándose en la **Tabla 2** un resumen de los distintos procedimientos realizados hasta la fecha.

Para matrices de fluidos corporales, como es el plasma sanguíneo, el procedimiento de extracción se basa en mezclar el plasma con acetonitrilo para conseguir la precipitación de las proteínas (desproteínización), seguido de una etapa de centrifugación. El sobrenadante obtenido se analiza directamente por cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*, LC) [41-43], obteniendo valores de recuperaciones que oscilan entre el 87 y el 122 %, mientras que la precisión (expresada como desviación estándar relativa) varía entre 2 y 13 %. Cuando el análisis de fluidos se realiza conjuntamente en muestras de plasma sanguíneo y orina, el procedimiento es diferente, dependiendo de si el análisis posterior se realiza por cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) o LC. En el caso de GC, primero la muestra se mezcla con una disolución de tampón borato, y después se realiza una extracción en fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) con diclorometano en un cartucho Extrelut. Por último se evapora el extracto obtenido y se redisuelve en el disolvente óptimo para su análisis, en este caso, conteniendo N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida [44]. Usando este procedimiento se obtienen buenas recuperaciones (entre 82 y 97 %) y precisión, tanto intra como interdía (1,09-8,55 %). Si el análisis se realiza por LC, la muestra se mezcla con HCl, se centrifuga y el sobrenadante se pasa por un cartucho de extracción en fase sólida Cleanert PCX con metanol y HCl. Después se evapora el extracto y se diluye en una mezcla de una disolución acuosa de formiato amónico 0,01 M:metanol (1:19 v/v) [45]. Empleando este método, para la mayoría de los compuestos se obtienen

recuperaciones comprendidas entre 64,2-133,0 %, tanto en sangre como orina, aunque algunos de ellos presentaban recuperaciones mucho menores, como el oximatrín o la citoxina, en torno al 40 %. Las precisiones obtenidas (tanto intra como interdía) variaban entre 0,4-14,6 %.

Otro tipo de matrices a estudiar son las procedentes de plantas, ya sean sus hojas, semillas o frutos. Con respecto a estas matrices hay una gran variedad de técnicas de extracción para los alcaloides del tropano. Muchos de estos estudios se centran en el análisis de plantas de la familia *Datura*, las cuales son las que contienen un mayor contenido en alcaloides del tropano [8]. Por ejemplo, cabe destacar la extracción usando la metodología QuEChERS (del acrónimo inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*), que se ha utilizado para la extracción de algunos alcaloides de suplementos dietéticos [46], analizándose una gran variedad de compuestos. En este estudio se modificaba dicho método de extracción dependiendo de si la muestra era sólida o líquida. Cuando la matriz era sólida, se adicionaban 10 mL de agua al 2 % de ácido fórmico a 1 g de muestra, añadiendo también *n*-hexano para eliminar los compuestos grasos, y posteriormente se realizaba la extracción QuEChERS con acetonitrilo sin acidificar. Sin embargo, si la matriz era líquida, se añadía directamente el acetonitrilo acidificado con ácido fórmico al 2 %. Después, en ambos procedimientos, se añadían 4 g de sulfato magnésico anhidro y 1 g de cloruro de sodio. Posteriormente también se realizaba un proceso para limitar los compuestos no polares que pueda contener la matriz, mediante una extracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, d-SPE) con sulfato de magnesio y C₁₈. Las recuperaciones obtenidas oscilaban entre 82-98 % y las precisiones eran menores al 25 % en todos los casos.

También se puede emplear la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonidos a muestras vegetales, empleando mezclas de metanol:agua 3:2 (v/v) [47], seguido de una etapa de centrifugación y filtración para obtener el sobrenadante que se usará en el análisis cromatográfico. Este procedimiento proporcionaba recuperaciones comprendidas entre 94,8-100,6 % y las precisiones variaban entre 0,03-3,53 %. Otras mezclas empleadas son acetonitrilo:agua 75:25 (v/v) acidificada al 0,5 % con ácido fórmico [48], añadiendo sulfato magnésico, cloruro de sodio, citrato de sodio dihidratado y hidrogenocitrato de sodio sesquihidratado, centrifugando y evaporando el sobrenadante, que posteriormente se reconstituye con una mezcla metanol:acetonitrilo 50:50 (v/v). Además se incluye una etapa de limpieza (d-SPE) con C₁₈, para eliminar el

material graso de las muestras de soja y lino. Con esta metodología se obtuvieron recuperaciones de 78-106 % y precisiones inferiores al 5 %.

A veces la muestra vegetal se puede liofilizar [49], y tras este proceso, los compuestos de interés se extraen de la muestra liofilizada con una mezcla cloroformo:metanol:hidróxido amónico concentrado 15:5:1 (v/v/v), empleando ultrasonidos y realizando este proceso 4 veces. El extracto obtenido se filtra en un embudo Büchner y se seca con sulfato de sodio anhidro. Tras esto, se reconstituye el residuo con metanol y una disolución tampón de fosfato, y se somete a ultrasonidos durante 40 minutos. A continuación se realiza una extracción en fase sólida, empleando un cartucho C₁₈ activado con 5 mL de metanol, 5 mL de agua bidestilada y 5 mL de disolución tampón fosfato. Las recuperaciones fueron de aproximadamente el 100 % y la precisión fue inferior al 6 % en todos los casos.

Por último, indicar que dentro de las matrices vegetales, en el trigo sarraceno no existen muchos estudios que se centren en la determinación de los alcaloides del tropano. Entre los pocos trabajos desarrollados hasta la fecha, se hace uso de métodos convencionales como la extracción Soxhlet, utilizando un tiempo de extracción de 60 min y empleando como disolvente *n*-hexano. La extracción se suele hacer en 2 ciclos, y el extracto se mezcla a continuación con una disolución de 0,5 mL de KOH al 5 % en metanol. Después se mezcla durante 24 h con 7 mL de CH₂Cl₂ y por último se lava el extracto con 2 mL de *n*-hexano, se disuelve en 2 mL de CH₂Cl₂, se seca bajo corriente de nitrógeno y se añade 0,1 mL de hexametildisilazano, manteniendo a 80 °C durante 15 min [50]. Este procedimiento proporciona valores adecuados de recuperación (\approx 100 %) y de precisión (intra e interdía), inferior al 9 %. En otras publicaciones la extracción se realiza mezclando la muestra con 5 volúmenes de metanol, se filtra y evapora, y finalmente el extracto se disuelve con una disolución 0,05 M HCl y una disolución saturada de amoniaco. Después se extrae con cloroformo y la fase orgánica se evapora y reconstituye con metanol para su posterior análisis cromatográfico [51]. En este caso no se indican los valores de recuperación ni de precisión obtenida.

Tabla 2: Métodos de extracción usados en la determinación de alcaloides del tropano.^a

Matriz	Nº compuestos	Técnica de extracción	Disolvente y condiciones de extracción	Referencia
Plasma	7	LLE	Acetonitrilo (desproteínezación) y centrifugación. Tiempo de extracción: 3 minutos Temperatura de extracción: T ^a ambiente	[41]
Plasma	2	LLE	Acetonitrilo (desproteínezación) y centrifugación. Tiempo de extracción: 23 minutos Temperatura de extracción: 37 °C	[42]
Plasma	3	LLE	Acetonitrilo (desproteínezación) y centrifugación. Tiempo de extracción: 15 minutos	[43]
Plasma y orina	3	SPE	SPE con diclorometano, evaporación y recomposición con N,O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida. 15 minutos, T ^a ambiente y 15 minutos, 80 °C	[44]
Plasma y orina	31	LLE y SPE	LLE con ácido clorhídrico, SPE con metanol y ácido clorhídrico, evaporación y recomposición con una mezcla de 0,01 M de formiato amónico:metanol (1:19 v/v). Tiempo de extracción: 7 minutos	[45]
Suplementos dietéticos	94	<u>Matriz sólida:</u> QuEChERS <u>Matriz líquida:</u> LLE	<u>Matriz sólida:</u> SLE con agua al 0,2 % de ácido fórmico, mezcla con hexano y QuEChERS con acetonitrilo. <u>Matriz líquida:</u> LLE con acetonitrilo al 2 % de ácido fórmico, seguido de mezcla con sulfato magnésico y cloruro de sodio. Tiempo de extracción: 38 minutos.	[46]
Materia vegetal	2	SLE	SLE con metanol:agua 3:2 (v/v) con ultrasonidos, centrifugación y filtración. Tiempo de extracción: 30 minutos	[47]

Semillas	7	QuEChERS con d-SPE	QuEChERS: acetonitrilo:agua 75:25 (v/v) ambos al 0,5 % ácido fórmico y sales, evaporación, recomposición con metanol:acetonitrilo 50:50 (v/v) y D-SPE con C ₁₈ . Tiempo de extracción: 42 minutos	[48]
Materia vegetal	4	SLE y SPE	SLE asistida por ultrasonidos con cloroformo: metanol: hidróxido amónico concentrado 15:5:1 (v/v/v). seguido de SPE con metanol, agua bidestilada y disolución de fosfato Tiempo de extracción: 60 minutos	[49]
Frutas, harina de trigo sarraceno y comidas preparadas	3	SLE	SLE con hexano y con dicloroetano. Tiempo de extracción: 26 horas y 15 minutos	[50]
Granos y derivados del trigo sarraceno	2	SLE y LLE	SLE con metanol, evaporación, recomposición con ácido clorhídrico y amonio y LLE con cloroformo seguido de recomposición con metanol. Tiempo de extracción: 15 minutos	[51]

^a Abreviaturas: d-SPE: Extracción en fase sólida dispersiva; LLE: Extracción líquido-líquido; SLE: Extracción sólido-líquido; SPE: Extracción en fase sólida.

1.3.2. Técnicas cromatográficas

Principalmente hay tres tipos diferentes de técnicas separativas para realizar el análisis de los alcaloides del tropano objeto de estudio: electroforesis capilar de zona (*capillary zone electrophoresis*, CZE) GC y LC tal y como se recoge en la **Tabla 3**.

Cuando se emplea CZE se utiliza un tampón fosfato a pH comprendido entre 5,4-8,2, con un capilar de 69 cm de longitud y un tiempo de análisis de 13 minutos [52]. También se han empleado capilares de 49 cm de longitud, usando una disolución reguladora a pH 7 de tampón fosfato con un 20 % de metanol (v/v) y un 30 % de acetonitrilo (v/v). El tiempo total de análisis es de 4 minutos [53].

Cuando se emplea GC, los estudios se realizan empleando una programación de temperaturas de 50 a 200-300 °C, usando helio como gas portador. El tiempo de análisis es de 6 y 8 minutos [44], siendo la columna de (fenilo)-metilpolisiloxano, o poli(dimetilsiloxi)poli(1,4-bis (dimetilsiloxi)fenilen)siloxano [50].

En cuanto a LC, los estudios son más variados y analizan más tipos de matrices, empleando principalmente fase reversa (fase estacionaria C₁₈) para la separación de atropina, mientras que para la separación de la mezcla racémica, es necesario el empleo de columnas quirales [42,54].

Cuando el análisis se lleva a cabo en fluidos corporales, especialmente plasma, se emplea la columna Atlantis T3 C₁₈, usando como fases móviles una fase acuosa compuesta por una disolución de formiato amónico (0,1 %) y una fase orgánica compuesta de una mezcla acetonitrilo:agua 80:20 (v/v) al 0,1 % de formiato amónico. El tiempo de análisis en este caso es de 8,5 minutos [41].

En relación al análisis de estos compuestos en plantas o semillas, algunos artículos se centran directamente en el análisis de las plantas del género *Datura*, las cuales son las plantas que más cantidad de alcaloides del tropano producen. Para ello, utilizan columnas de C₁₈ como Luna C₁₈ [55], empleando disoluciones tampón fosfato a pH 3,5 al 1 % de isopropanol como fase acuosa y acetonitrilo como fase orgánica, con un tiempo de análisis de 35 minutos. También se ha empleado la columna Ascentis Express C₁₈, donde se usa agua acidificada al 1 % con ácido fórmico y metanol al 1 % de ácido fórmico como fase acuosa y orgánica respectivamente [47] o mezcla metanol:agua (7:93 v/v) como fase acuosa y metanol al 2 % de ácido fórmico como fase orgánica [56]. En este caso los tiempos de análisis fueron de 23 y 15 minutos

respectivamente. Por último también se han utilizado columnas como Hypersil GOLD PFP [57], empleando agua al 0,1 % de tampón fosfato y acetonitrilo como fases acuosa y orgánica respectivamente, con un tiempo de análisis de 12 minutos.

Aparte del análisis directo de partes de las plantas del género *Datura*, los estudios pueden estar dirigidos a alimentos contaminados o que corren el riesgo de contaminarse con semillas o partes de la planta *Datura*. Así tenemos el caso de harinas [51], donde también se usa la columna de C₁₈, usando una disolución acuosa 20 mM de acetato amónico y acetonitrilo como fase orgánica, obteniéndose un tiempo total de análisis de 12 minutos. En el análisis de suplementos alimenticios, miel, piensos, etc. [58], se emplea la columna Atlantis T3 y como fases móviles se utiliza una fase acuosa de agua 2 mM de formiato amónico y 0,5 mM de ácido fórmico y una fase orgánica de metanol:agua 95:5 (v/v), 2 mM de formiato amónico y 0,5 mM de ácido fórmico, presentando un tiempo de análisis de 9 minutos. Por último el análisis de suplementos dietéticos con riesgo de contaminación por este tipo de compuestos [46], se ha llevado a cabo usando la columna Acquity UPLC HSST3, y como fases móviles una fase acuosa con una concentración 5 mM de formiato amónico y una fase orgánica de metanol 5 mM de formiato amónico, siendo en este último caso el tiempo de análisis de 15 minutos.

Por último, indicar los estudios que mediante LC se centran en la determinación de los enantiómeros de la hiosciamina entre otros alcaloides del tropano. En esta caso, la separación se realiza empleando columnas quirales. Este es el caso del estudio que emplea la columna Chirobiotic V [54], con una fase móvil que va cambiando desde una mezcla metanol:ácido acético:triethylamina 100:0,05:0,04 (v/v/v) a una mezcla metanol:ácido acético:triethylamina 100:0,05:0,1 (v/v/v). Su tiempo de análisis es de 30 minutos. Otra columna empleada en estas separaciones es la Chiral AGP [42], empleando una fase acuosa de 0,01 M de formiato amónico y fase orgánica de acetonitrilo:agua al 0,01 M de formiato amónico 25:75 (v/v). Su tiempo de análisis es de 50 minutos.

Tabla 3: Métodos de análisis utilizados para la determinación de alcaloides del tropano en diferentes matrices.^a

Compuestos separados	Matriz	Técnica separativa	Fase estacionaria, longitud y diámetro de la columna (mm) y tamaño de partícula (μm)	Fase móvil	Tiempo de análisis (min)	Ref
4	Plantas, muestra liofilizada	CZE	Capilar de sílica, 670x0,075 mm	Buffer de fosfato (pH = 5,4-8,2).	13,0	[52]
3	Planta	CZE	Capilar de sílica recubierto con óxido de grafeno, 490x0,075 mm y 75 μm	Buffer de fosfato (pH = 7), con 20 % metanol, y 30 % acetonitrilo	4,0	[53]
2	Plasma y orina	GC	Capilar HP-5MS, 30 m x 0,25 mm y 0,25 μm	Helio, 0,8 mL/min (Gas portador)	6,0	[44]
3	Frutas, harinas y comidas preparadas	GC	Capilar DB-5MS-UI, 30 m x 0,25 mm y 0,25 μm	NI	8,0	[50]
7	Plasma	HPLC	Atlantis T3 C ₁₈ , 150x4,6 mm y 5 μm	<u>A:</u> Agua con 0,1 ácido fórmico <u>B:</u> Mezcla acetonitrilo:agua 80:20 (v/v) con 0,1 % ácido fórmico	8,5	[41]
2	Planta	HPLC	Luna C ₁₈ , 250x2 mm y 5 μm	<u>A:</u> Disolución fosfato con 1 % de isopropanol <u>B:</u> Acetonitrilo	35,0	[55]
2	Planta	HPLC	Ascentis Express C ₁₈ , 50x2,1 mm y 2,7 μm	<u>A:</u> Agua con 0,1 ácido fórmico <u>B:</u> Metanol al 1 % de ácido fórmico	23,0	[47]
2	Planta (néctar)	HPLC	Ascentis Express C ₁₈ , 50x2,1 mm y 2,7 μm	<u>A:</u> Mezcla agua:metanol 93:7 (v/v) con 2 % ácido fórmico <u>B:</u> Metanol con 2 % ácido fórmico	15,0	[56]
2	Planta	UHPLC	Hypersil GOLD PFP, 100x2,1 mm y 1,9 μm	<u>A:</u> Tampón 2 mM fosfato <u>B:</u> Acetonitrilo	12,0	[57]

Determinación de atropina y escopolamina en trigo

2	Trigo sarraceno	HPLC	LUNA C ₁₈ , 250x2 mm y 5 µm	<u>A</u> : Agua 20 mM de acetato amónico <u>B</u> : Acetonitrilo	12,0	[51]
118	Suplementos alimenticios, miel, piensos y maíz	HPLC	Atlantis T3 C ₁₈ , 100x3 mm y 3 µm	<u>A</u> : Agua 2 mM de formiato amónico <u>B</u> : Agua: metanol 5:95 (v/v) 2 mM de formiato amónico	9,0	[58]
93	Suplementos dietéticos	UHPLC	Acquity UPLC HSS T3, 100x2,1 mm y 1,8 µm	<u>A</u> : Agua 5 mM de formiato amónico <u>B</u> : Metanol 5 mM de formiato amónico	15,0	[46]
4	Plasma	HPLC	Chirobiotic V, 250x4 mm y 5 µm	Metanol:ácido acético:triethylamina 100:0,05:0,04 (v/v/v) y 100:0,05:0,1 (v/v/v)	30,0	[54]
2	Plasma	HPLC	Chiral AGP, 150x2 mm y 5 µm	<u>A</u> : Agua 0,01 M formiato amónico <u>B</u> : Acetonitrilo:agua 0,01 M formiato amónico 75:25 (v/v)	50,0	[42]

^a Abreviaturas: GC: Cromatografía de gases; HPLC: Cromatografía de líquidos de alto rendimiento alta eficacia; NI: No indicado; UHPLC: Cromatografía de líquidos de ultra alta eficacia.

1.3.3. Métodos de detección

En cuanto a la detección de alcaloides del tropano, la mayoría de artículos, ya sea por GC, LC o CZE suelen emplear como detección la espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS).

Cuando el análisis se realiza por CZE, también se ha empleado un detector convencional como ultravioleta (UV) [52], siendo la linealidad para los tres compuestos analizados (atropina, escopolamina y ácido trópico) buena, obteniendo un coeficiente de regresión mayor a 0,996 y el límite de detección de 1 µg/mL. También se ha empleado un detector de fotodiodos (*Photodiode array*, PDA) [53], siendo la linealidad para los tres compuestos analizados buena, obteniendo un coeficiente de regresión mayor a 0,998 y el límite de detección fue de 0,5 µg/mL.

Cuando se realiza el análisis por GC, la detección se realiza por MS [44,50,55], ionizando la muestra por ionización electrónica (*Electron Ionization*, EI). Los valores obtenidos respecto a la linealidad fueron adecuados con coeficientes de correlación en todos los casos superiores a 0,997 y rangos de linealidad que variaban de entre 1 y 5000 µg/kg, dependiendo del estudio. Los límites de detección varían entre 0,3 y 1 µg/kg [50] y 5 µg/kg [44] y los de cuantificación entre 1 y 10 µg/kg [50].

Por último, cuando la técnica de análisis es LC, la detección se puede llevar a cabo empleando el detector de diodos (*Diodes Array Detector*, DAD), para la identificación de los picos correspondientes a los analitos objeto de estudio [49]. La linealidad obtenida fue correcta con coeficientes de regresión superiores en todos los casos a 0,999 y rangos de linealidad de 4-100 µg/mL.

Cuando se emplea MS, aunque hay algunos casos en el que se usa la ionización química a presión atmosférica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) en modo positivo [54], la ionización usada en la mayoría de los casos es la ionización por electronebulización (*Electrospray*, ESI). La mayoría de los trabajos emplean espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de baja resolución [41-43,45,48,57], aunque también se ha utilizado la espectrometría de masas de alta resolución, empleando como analizador el Orbitrap-MS [46,58].

Cuando se emplea la espectrometría de masas en tándem, se han utilizado distintos analizadores como el de trampa de iones acoplada a cuadrupolo (QTrap) [41,42]. Los límites de detección y cuantificación con este analizador son los más bajos

estudiados, oscilando entre 0,004-0,01 y 0,05-0,8 [$\mu\text{g}/\text{kg}$], respectivamente. En estos casos la linealidad era adecuada con coeficientes de determinación mayores a 0,999 y con rangos de linealidad entre 1,56-50 y 1,95-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente. También se ha empleado como analizador el triple cuadrupolo (QqQ) [43,45,48,57]. Los límites de detección obtenidos variaban entre 0,2 y 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que los de cuantificación oscilaban entre 0,08 y 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La linealidad para todos ellos era correcta con coeficientes de determinación mayores a 0,99.

Por último, cuando se usa el analizador Orbitrap-MS [46,58] y debido a que la sensibilidad de estos equipos suele ser menor a la de equipos QqQ y QTrap, los límites de detección fueron de 10-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ mientras que los de cuantificación de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La linealidad es adecuada y los rangos de linealidad, al igual que los límites, fueron altos, entre 50-600 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En la **Tabla 4** se muestra un resumen de los artículos estudiados, mostrando distintos parámetros característicos como rango lineal y límites de detección y cuantificación.

Tabla 4: Diferentes sistemas de detección usados para la determinación de alcaloides del tropano.^a

Matriz	Detector y fuente de ionización	Rango de linealidad (µg/kg)	Límite de detección (µg/kg)	Límite de cuantificación (µg/kg)	Ref
Plantas, muestra liofilizada	UV	2,5-70, 5-140 y 7,5-210	1,0-1,5	NI	[52]
Planta	UV	0,5-200	0,5	NI	[53]
Plasma y orina	MS-Q (ESI)	10-5000	5,0	NI	[44]
Frutas, harinas de trigo sarraceno y comidas preparadas	MS-Q (EI)	1-1000	0,3 y 1,0	1 y 10	[50]
Materia vegetal	PDA y DAD	4-100 y 8-200	0,3 y 0,6	NI	[49]
Planta	MS-Q (APCI)	0,25-200	0,03 y 0,1	NI	[54]
Plasma	MS/MS-QTrap (ESI)	0,049-3,125 y 1,563-50	0,004 y 0,01	0,05, 0,1 y 0,8	[41]
Plasma	MS/MS-QTrap (ESI)	0,98-500	NI	0,5	[42]
Plasma	MS/MS-QqQ (ESI)	0,08-20 y 0,2-40	NI	0,08 y 0,21	[43]
Plasma y orina	MS/MS-QqQ (ESI)	0,5-400, 1-400 y 4-400	0,2-1,0	0,5-4	[45]
Semillas	MS/MS-QqQ (ESI)	5-80	0,7-0,8	2,2-2,5	[48]
Planta	MS/MS-QqQ (ESI)	1-1000	0,5	1	[57]
Suplementos dietéticos	MS-Orbitrap (ESI)	50-600	10,0	50	[46]
Suplementos alimenticios, miel, piensos y maíz	MS-Orbitrap (ESI)	50-600	10,0-50,0	NI	[58]

^a Abreviaturas: APCI: Ionización química a presión atmosférica; DAD: Detector de diodos en línea; EI: Ionización electrónica; ESI: Ionización por electronebulización; MS: Espectrometría de masas; MS/MS: Espectrometría de masas en tándem; NI: No indicado; PDA: Detector de matriz de fotodiodos; Q: Cuadropolo simple; QqQ: Triple cuadrupolo; UV: Espectroscopía ultravioleta.

2. OBJETIVOS

En la actualidad el desarrollo de comidas más saludables y sin sustancias difíciles de digerir, como el gluten, está propiciando el uso de nuevas materias primas y productos menos procesados. Este es el caso del trigo sarraceno, con el que además de productos sin gluten se elaboran comidas infantiles. Sin embargo, en ocasiones este trigo puede verse alterado por contaminación con semillas de plantas de la familia de las *Solenaceae*, que contienen alcaloides del tropano que pueden provocar efectos dañinos en la salud del consumidor.

Por ello, el objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un método que permita la determinación de los compuestos mayoritarios responsables de la toxicidad de estas semillas, como son atropina y escopolamina.

Para alcanzar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Búsqueda bibliográfica, abarcando los alcaloides del tropano y los métodos de extracción, cromatográficos y de detección existentes para llevar a cabo la determinación de estas sustancias.
- Desarrollo de un método instrumental para determinar atropina y escopolamina mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- Optimización de un método de extracción capaz de separar los analitos en trigo sarraceno y matrices similares a ésta mediante una extracción QuEChERS (acrónimo de sus características en inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe*) modificada.
- Validación del método analítico mediante el estudio de diversos parámetros como linealidad, efecto matriz, veracidad, precisión intra e interdía, límite de detección y cuantificación, y especificidad
 - Aplicación del método a muestras reales
 - Redacción de este Trabajo Fin de Máster.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Patrones, reactivos y materiales

El patrón de escopolamina hidrobromuro trihidratado fue proporcionado por ACROS Organics (Erembodegem, Bélgica) y el de atropina por Sigma Aldrich (San Louis, MO, EE.UU).

Como reactivos líquidos se usó ácido fórmico (Fisher Scientific, Erembodegem, Bélgica), metanol (Fluka, Steinheim, Suiza), acetonitrilo, ácido acético glacial y acetona (J.T. Baker, Deventer, Holanda), todos ellos de calidad HPLC.

Como reactivos sólidos se usó acetato sódico, sulfato magnésico con una pureza \geq 98% (Sigma-Aldrich), formiato amónico, con una pureza \geq 99% (Fluka), cloruro sódico y florisil, de pureza \geq 98% (J.T. Baker), amina primaria secundaria (*Primary Secondary Amine*, PSA), carbono grafitizado negro (*Graphitized Black Carbon*, GBC) (Scharlab, Barcelona, España) y Z-sep⁺ (Supelco, San Luis, MO, EE.UU), de calidad HPLC y acetato amónico con una pureza de 97% (Panreac, Barcelona, España).

3.2. Equipos

La preparación de las muestras se realizó usando una balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo, Greinfesee, Suiza), para la pesada de las muestras, un vortex IKA 4 Basic (Staufen, Alemania) para la extracción de los componentes de interés, y una centrifuga J.P Selecta Centronic-BL-II (Abrera, Barcelona).

En el análisis cromatográfico de la atropina y escopolamina se usó un cromatógrafo de líquidos de Agilent de la serie 1290 RRLC (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.), equipado con un inyector automático (G4226A), una bomba binaria (G4220A), un compartimento termostatzado para la columna (G1316C) y un inyector automático termostatzado (G1330B). Durante el proceso de optimización cromatográfica se evaluaron diferentes columnas como Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,8 μ m de tamaño de partícula) (Agilent Technologies, Santa Clara EE.UU.), Hypercarb C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 5 μ m de tamaño de partícula) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y una Hypersil GOLD aQ C₁₈ (100 mm x 2,1 mm, 1,9 μ m de tamaño de partícula) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), seleccionando finalmente la columna Zorbax Eclipse Plus C₁₈. El software usado fue

proporcionado por Agilent y constaba de distintos módulos coordinados por Masshunter Workstation: Data Acquisition, Quantitative Analysis y Qualitative Analysis.

Los analitos fueron separados con una fase móvil formada por acetonitrilo como eluyente A y una disolución acuosa de ácido fórmico al 0,01% (v/v) como eluyente B. El flujo de la fase móvil fue de 0,3 mL/min y el gradiente de elución se muestra en la **Tabla 5**. Por último, el volumen de inyección de la muestra fue de 5 µL.

Tabla 5: Gradiente de elución empleado.

Tiempo (min)	0	1	5	6	7	8	10
% Eluyente B	90	90	50	0	0	90	90

Junto con el cromatógrafo de líquidos, se usó un espectrómetro de masas tipo Triple Cuadrupolo de Agilent (6460A), con sonda de iones tipo *Jet Stream* ESI (G1958-65138) en modo positivo, como fuente de ionización, mostrándose en la **Tabla 6** los parámetros más característicos de la fuente durante el proceso de ionización. En la celda de colisión se empleó nitrógeno (Praxair, Danbury, EE.UU.), con una pureza del 99.9 %.

Tabla 6: Parámetros de la fuente de ionización.

Voltaje del capilar (V)	+4000
Temperatura del gas de secado (°C)	325
Temperatura del gas de cortina (°C)	400
Flujo del gas de secado (mL/min)	10
Flujo del gas de cortina (mL/min)	10
Presión del nebulizador (psi)	25

Los parámetros específicos MS/MS de los compuestos incluidos en este estudio se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Parámetros UHPLC-QqQ-MS/MS empleados.

Compuesto	Ventana tiempo retención (min)	Ión precursor (m/z)	Ión producto(m/z)	Relación de iones (%)
Escopolamina	3,15-3,30	304,2 (90) ^a	<i>156,1 (12)^{bc}</i>	
			138,1(16)	98
			121,1 (16)	40
			103,0 (40)	56
Atropina	3,60-3,80	290,2 (70)	<i>124,1 (20)</i>	
			93,1 (28)	42
			91,1 (48)	21
			77,1 (50)	26

^a Voltaje de *fragmentor*

^b Energía de colisión (eV) entre paréntesis

^c La transición señalada en cursiva se usó con fines de cuantificación

3.3. Método de extracción evaluado

Debido a su gran versatilidad, se evaluó la extracción usando la metodología QuEChERS (acrónimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged* y *Safe*) en su variante desarrollada para la extracción de sustancias de muestras con bajo contenido acuoso o semillas. El procedimiento es el siguiente:

1. Se pesan 5 g de muestra y se mezclan con 10 mL de agua Milli-Q.
2. Se agita durante un minuto y se añaden 10 mL de acetonitrilo al 1 % de ácido acético.
3. Se agita durante 1 minuto y se añaden 4 g de sulfato magnésico y 1 g de acetato amónico.
4. Se agita 1 minuto y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos.
5. Se toma 1 mL del sobrenadante y se mezcla con 25 mg de PSA y con 25 mg de GBC.
6. Se agita y se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos.
7. Se toman 500 µL del sobrenadante en un vial y se mezclan con 500 µL de agua Milli-Q, para posteriormente realizar el análisis cromatográfico.

3.4. Muestras analizadas

De acuerdo con el informe de la EFSA [8], se seleccionaron muestras de cereales con posibilidad de contaminación por alcaloides del tropano así como otros alimentos de moda en la actualidad que podrían verse contaminados durante su procesado. Las muestras seleccionadas fueron: trigo sarraceno, harina de trigo sarraceno y pasta de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), harina de soja (*Glycine max*), trigo (*Triticum*), amaranto (*Amaranthus*), chía (*Salvia hispánica*) y mijo (*Panicum miliaceum*). Estas muestras se adquirieron en supermercados locales ubicados en Almería (España). Las muestras fueron molidas en polvo antes del análisis. Estas muestras se usaron como muestras blancas para lograr la optimización de la extracción y la validación del método.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización del método UHPLC-QqQ-MS/MS

En primer lugar se procedió a la optimización de las condiciones espectrométricas MS/MS, mediante la perfusión de atropina y escopolamina, preparando para ello una disolución de cada uno de los analitos de interés a una concentración de 5 mg/L en metanol. Dichas disoluciones se inyectaron en el equipo de triple cuadrupolo usando como fase móvil agua al 0,1 % de ácido fórmico y acetonitrilo, a un flujo de 0,15 mL/min. En primer lugar se optimizó el voltaje de *fragmentor* para seleccionar las mejores condiciones para el ion precursor, seleccionando el valor mínimo que proporcionaba una señal constante y de mayor intensidad, evaluando valores de voltaje comprendidos entre 50-110 V (**Tabla 7**). A continuación se optimizó la energía de colisión para la selección de los iones producto, mediante la ruptura de los iones precursores en la celda de colisión a energías comprendidas entre 10-50 eV (**Figura 11, Tabla 7**).

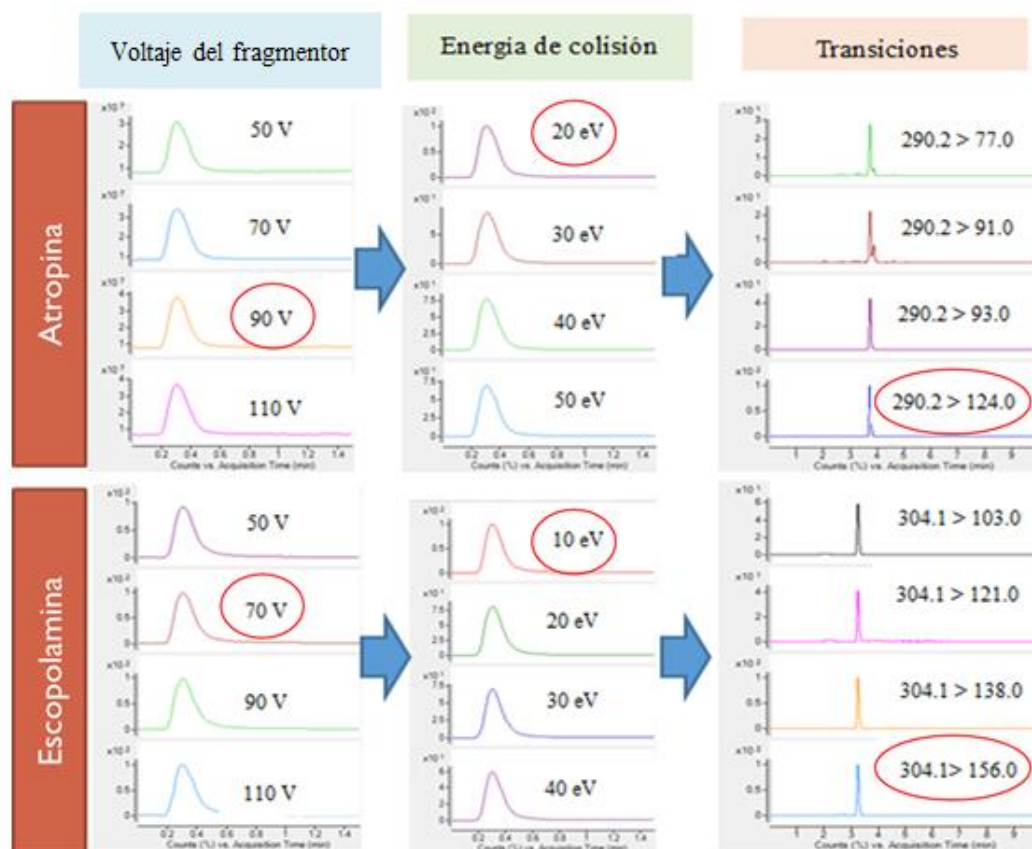


Figura 11: Señales obtenidas durante la optimización del voltaje de *fragmentor*, energía de colisión y transiciones estudiadas.

Por último, se seleccionaron las mejores transiciones atendiendo a aquellas que tuvieran una mayor relación masa-carga (m/z) (mayor selectividad) y una mayor intensidad (mayor sensibilidad).

En la **Figura 12** se muestra los espectros obtenidos al realizar un barrido de los iones producto para los dos compuestos, así como la estructura y posible fragmentación de la molécula de los analitos incluidos en este estudio.

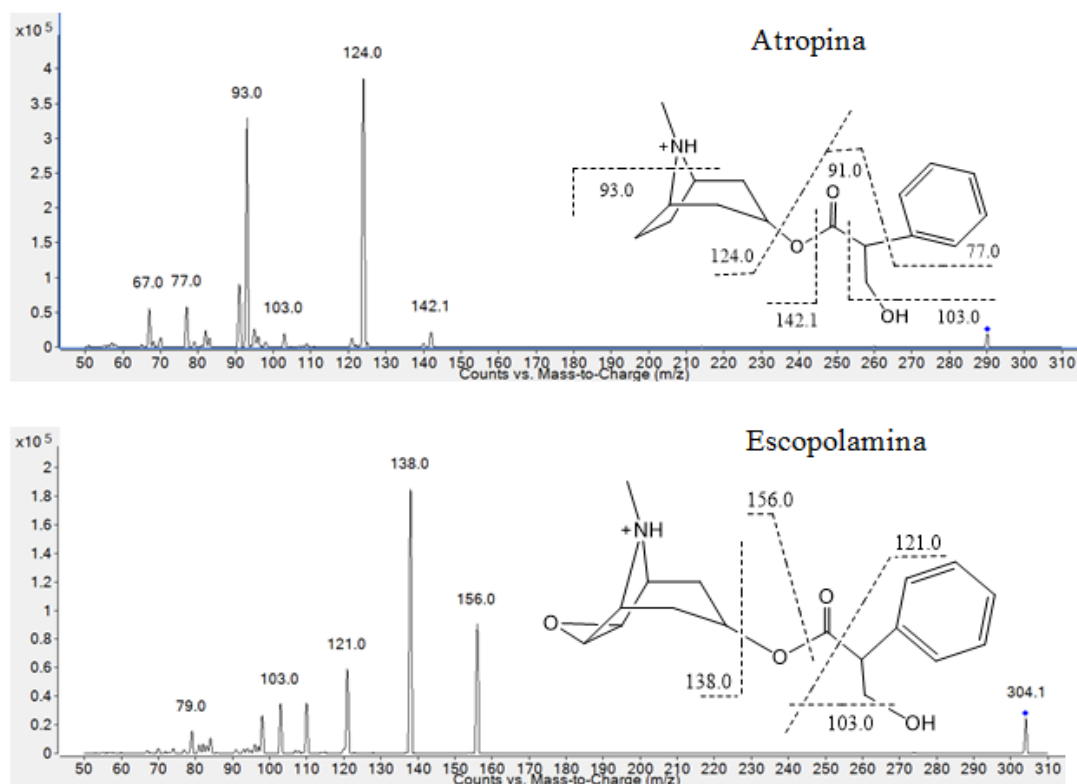


Figura 12: Espectro de los iones producto obtenidos para atropina y escopolamina.

La fragmentación del ión molecular protonado de la atropina a m/z 290,2 produjo 7 iones producto a m/z 142,1, 124,0, 103,0, 93,0, 91,0, 77,0, y 67,0. El ion producto a m/z 142,1 se formó por la pérdida de ($C_9H_8O_2$, 148 Da) de la molécula protonada. El ion producto más abundante, a m/z 124,0 fue producido por la pérdida de ácido trópico ($C_9H_{10}O_3$, 166 Da), y el ion a m/z 93,0, por pérdida de NH_2CH_3 (31 Da). El ión a m/z 103,0 se formó por la pérdida de H_2O del fragmento $C_8H_{10}O$ (121 Da). Los iones a m/z 91,0, 77,0 y 67,0 corresponden a los iones $C_3H_7O_3^+$, $C_6H_5^+$ y $C_5H_7^+$, respectivamente.

La fragmentación del ión molecular protonado de la escopolamina a m/z 304,1 produjo 7 iones producto a m/z 156,0, 138,0, 121,0, 110,0, 103,0, 98,0, y 79,0. Los iones producto a m/z 156,0 y 138,0 se formaron por la pérdida de $C_9H_8O_2$ (148 Da) y ácido trópico ($C_9H_{10}O_3$, 166 Da) de la molécula protonada, que son pérdidas similares a las observadas para la atropina. Los iones a m/z 121,0 y 103,0 fueron producidos por pérdida de $C_9H_{13}NO_3$ (183 Da) y $C_9H_{15}NO_4$ (201 Da), respectivamente. Los iones a m/z 110,0 y 79,0 fueron producidos por reordenamiento y pérdida de CO (28 Da) y C_2H_5NO (59 Da) del fragmento $C_8H_{12}NO$ (138 Da). Por último, el ión a m/z 98,0 corresponde al fragmento $C_6H_{12}N^+$.

A partir de estos fragmentos, se seleccionaron cuatro iones producto para atropina y escopolamina, usándose el de mayor m/z para la cuantificación del compuesto y el resto para una adecuada detección e identificación de los mismos (**Tabla 7**).

Para la separación cromatográfica se evaluaron diferentes columnas a partir de la inyección de disoluciones de analitos preparados en disolvente. Debido a que en la mayoría de los estudios se emplean columnas de C_{18} [41,47,55], primero se probó la columna Hypersil GOLD aQ, ya que esta se usa en un estudio donde se analizan los mismos analitos de interés que en este estudio (atropina y escopolamina) en muestras vegetales [57]. Se inyectaron los analitos a una concentración de 200 $\mu\text{g/L}$. La fase móvil empleada fue agua al 0,1 de ácido fórmico y acetonitrilo, con un gradiente de 17 minutos que empezaba con el 90 % de agua y cambiaba a 0 % en 11 minutos para finalmente volver al 90 % en 4 min. Pese a que la sensibilidad obtenida fue buena, la forma de pico no era adecuada, tal y como se puede observar en la **Figura 13**.

A continuación se probó con una columna Hypercarb. Entre las fases móviles probadas, la compuesta por agua y metanol, ambos al 0,1 % de ácido fórmico fue la que proporcionó mejores resultados. Se usó el mismo gradiente empleado con la columna Hypersil y la concentración de los analitos fue la misma (200 $\mu\text{g/L}$). A pesar de que la sensibilidad y forma de pico eran adecuadas, los compuestos presentaban tiempos de retención superiores a los obtenidos con la columna Hypersil. Por ello, se probó con la columna Zorbax Eclipse Plus C_{18} . Para esta columna, la concentración de la disolución de los analitos de interés fue de 50 $\mu\text{g/L}$. Se usó agua al 0,1 % de ácido fórmico como fase acuosa, y metanol y acetonitrilo como fase orgánica, obteniendo mejores resultados con el acetonitrilo. En cuanto al gradiente empleado, fue el mostrado en la **Tabla 5**. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 13**.

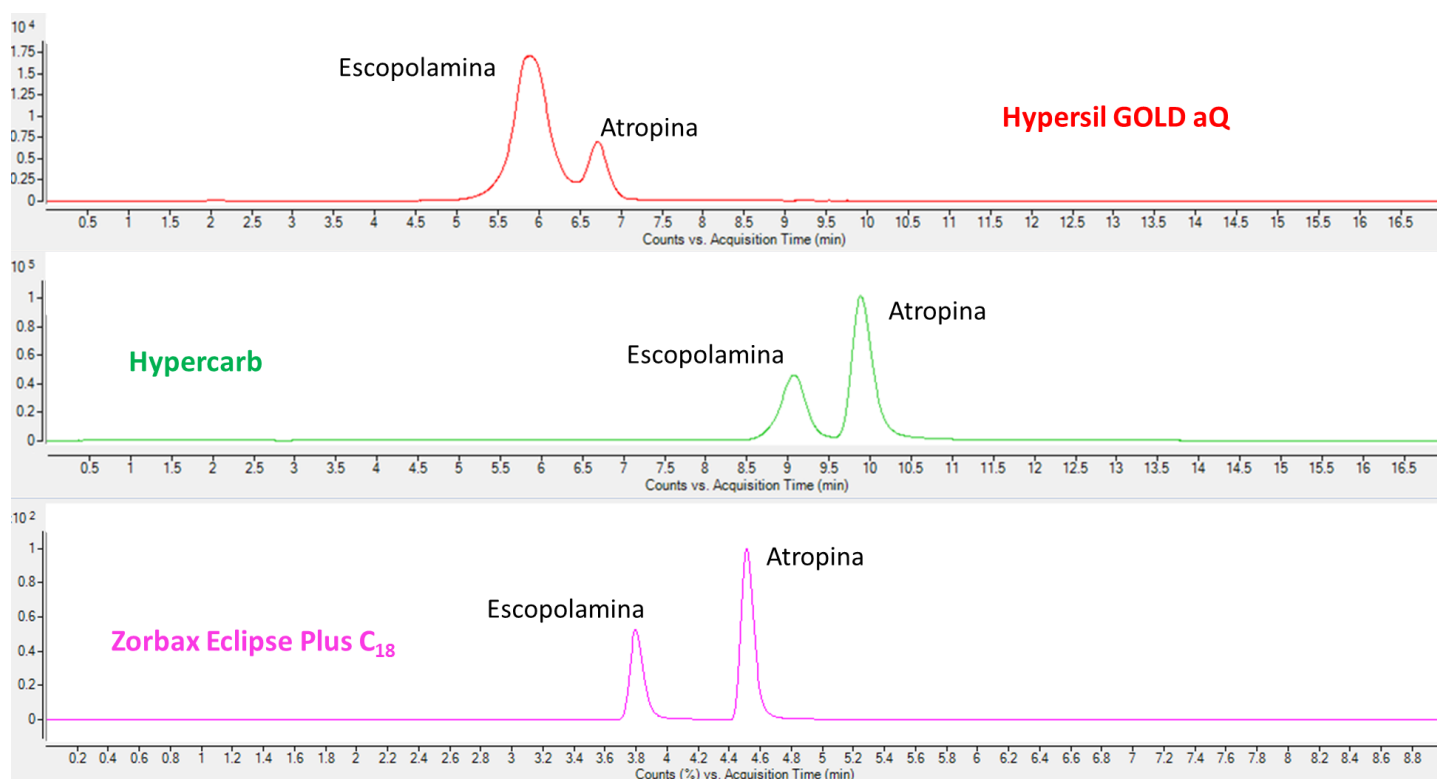


Figura 13: Cromatogramas obtenidos durante la optimización cromatográfica empleando distintas columnas.

Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron con la Zorbax Eclipse Plus C₁₈, ya que además de obtener una mejor separación cromatográfica sin coelución de los analitos, la sensibilidad es mayor (debe tenerse en cuenta que la concentración es 4 veces menor que la evaluada con la Hypersil GOLD aQ y la Hypercarb).

4.2. Optimización del método de extracción

Como se ha comentado anteriormente, se realizó una extracción de los compuestos objeto de estudio siguiendo la metodología QuEChERS. La optimización del método se llevó a cabo en trigo sarraceno fortificado con los compuestos de interés a una concentración de 100 µg/kg.

Para ello, en primer lugar se pesaron 5 g de muestra y se mezclaron con 10 mL de agua, ya que, en matrices con muy bajo porcentaje en agua, como el trigo, se ha comprobado que la adición de 10 mL de agua mejora la extracción [59]. Tras agitar en un vortex, se mezcla con acetonitrilo. Debido a que el coeficiente de partición entre la fase acuosa y la orgánica de estos compuestos depende en gran medida del pH [60], se

le añadieron al disolvente de extracción diferentes agentes como fue ácido acético y acetato amónico (1% en ambos casos), mostrándose en la **Figura 14** los resultados obtenidos.

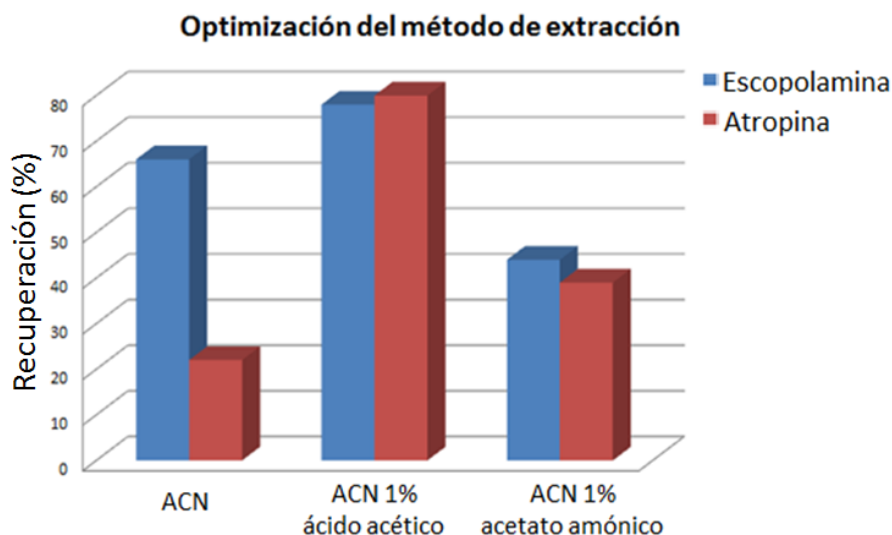


Figura 14: Optimización del disolvente en la extracción de atropina y escopolamina.

Como se puede observar las únicas recuperaciones superiores al 70%, tanto para escopolamina y atropina, se obtenían cuando se usaba como disolvente de extracción acetonitrilo al 1% de ácido acético, por lo que en las siguientes experiencias se empleó como agente extractante.

A continuación se evaluó la naturaleza de las sales que propiciaban la separación entre fases (orgánica y acuosa). Para ello, se llevó a cabo la extracción, empleando 3 mezclas de sales diferentes:

1. 4 g de sulfato magnésico y 1 g de cloruro sódico
2. 4 g de sulfato magnésico y 1 g de acetato sódico
3. 4 g de sulfato magnésico y 1 g de acetato amónico

De las tres, la combinación que proporcionaba mejores resultados es la adición de 4 g de sulfato magnésico y 1 g de acetato amónico, por lo que se empleó en posteriores experiencias.

Una etapa importante en la metodología QuEChERS es la etapa de limpieza o *clean-up*, con la que se pretende eliminar sustancias co-extraídas y que luego pueden

dificultar la correcta identificación de los analitos de interés. En la metodología QuEChERS, esta etapa de limpieza se basa en la D-SPE, en la que a un pequeño volumen de extracto se le adiciona una pequeña cantidad de sorbente para eliminar sustancias de la matriz coextraídas [61-64]. En este caso se probaron diferentes sales de limpieza como PSA, GBC, florisil y Z-sep⁺, ya que son las sales más comúnmente aplicadas. Todas las sales se probaron a 50 mg, excepto PSA y GBC que también se probaron a menores cantidades (5, 10 y 25 mg). En la **Tabla 8** se muestran los resultados obtenidos

Tabla 8: Efecto de los sorbentes en la recuperación de escopolamina y atropina.

Compuesto	Cantidad	Sorbente				
		PSA	GBC	Z-sep ⁺	Florisil	PSA+GBC
Escopolamina	0	74 (2,9)				
	5	87 (3,5) ^a	66 (1,2)			
	10	88 (4,2)	68 (3,1)			
	25	92 (4,6)	75 (2,6)			93 (3,6)
	50	90 (3,5)	73 (2,1)	52 (3,9)	63 (4,3)	
Atropina	0	79 (4,4)				
	5	80 (3,9)	65 (3,8)			
	10	81 (2,2)	68 (4,6)			
	25	83 (0,9)	74 (2,3)			91 (3,2)
	50	80 (12,5)	71 (4,1)	54 (3,9)	52 (3,9)	

^a Precisión obtenida entre paréntesis, empleando 3 réplicas.

Como se puede observar, cuando los sorbentes empleados fueron Z-sep⁺ o florisil las recuperaciones obtenidas fueron menores al 70% tanto para atropina como para escopolamina, mientras que las recuperaciones mejoraron significativamente usando PSA y GBC.

Así mismo, se puede observar que las mejores recuperaciones se obtuvieron con 25 mg PSA y GBC. Es por ello por lo que se decidió probar conjuntamente las dos sales, obteniendo de esta forma las mejores recuperaciones, especialmente para atropina.

A pesar de esta etapa de limpieza, se observó que la forma de pico obtenida para la atropina no era ideal y el pico salía desdoblado. Por esto, se decidió diluir el sobrenadante obtenido con agua Milli-Q a diferentes proporciones (10:90, 25:75, 50:50, 75:25 y 90:10 (v/v) agua:sobrenadante) comparando los resultados con los obtenidos sin diluir el extracto. Los picos cromatográficos obtenidos se muestran en la **Figura 15**.

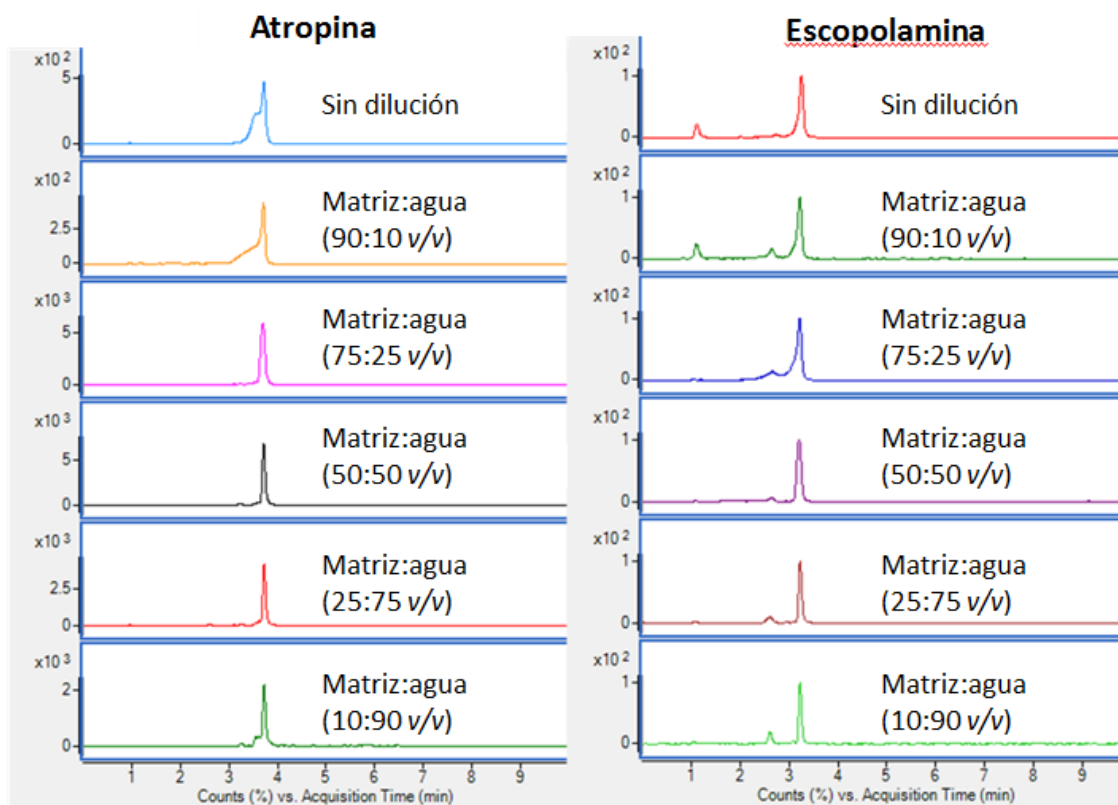


Figura 15: Forma de pico para atropina y escopolamina aplicando distintas diluciones.

Se puede observar que la dilución que proporciona una mejor forma de pico y mejor sensibilidad es la obtenida con un 50 % de agua y un 50 % de extracto, no viéndose afectada en gran medida la escopolamina.

4.3. Validación del método analítico

Seguidamente se procedió a la validación de la metodología propuesta, evaluándose diversos parámetros descritos a continuación.

4.3.1. Linealidad y rango de trabajo

El rango lineal se obtiene estudiando las curvas de calibrado en matriz a concentraciones cromatográficas de 0,1 a 100 µg/L para atropina y de 5 a 100 µg/L para escopolamina, obteniendo coeficientes de determinación de 0,9965 y 0,9961 para escopolamina y atropina respectivamente.

El rango de trabajo es decir, el intervalo de concentraciones en matriz en los que se pueden cuantificar los analitos objeto de es de 0,04 y 40 µg/kg para la atropina y de 2 a 40 µg/kg para la escopolamina.

4.3.2. Efecto matriz

El efecto matriz se ha calculado evaluando la relación entre las pendientes del calibrado en matriz para las distintas matrices (trigo sarraceno, harina de trigo sarraceno, pasta de trigo sarraceno, harina de soja, trigo, amaranto, chía y mijo) y en disolvente a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 100 µg/L para atropina y 5 y 100 µg/L, observando una gran diferencia entre ambas rectas para todas las matrices, a pesar de la introducción de una etapa de dilución final del extracto. En la **Figura 16** se observa la diferencia entre el calibrado en matriz de una de las muestras de trigo sarraceno y el calibrado en disolvente

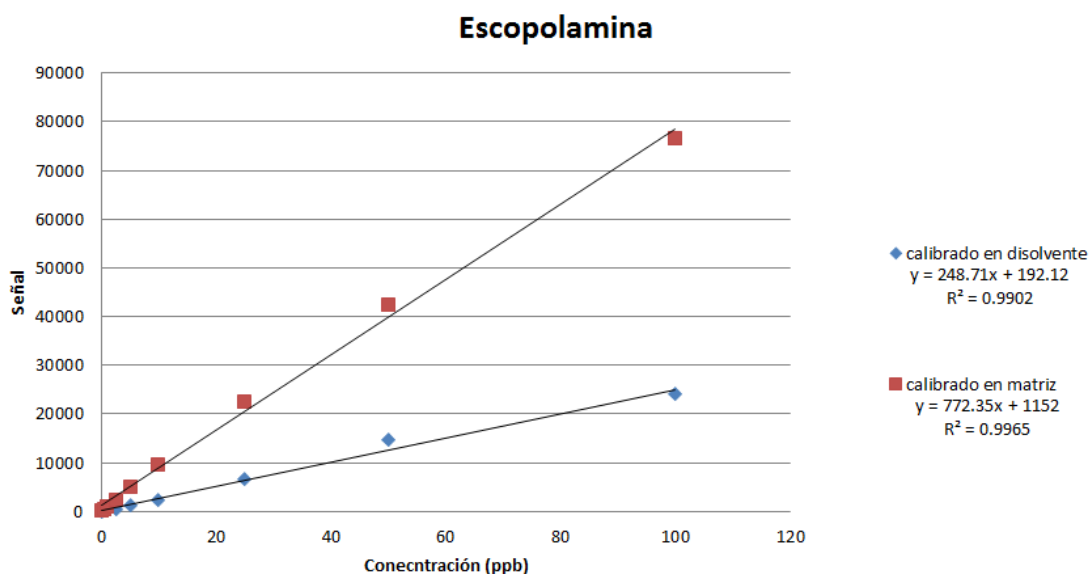


Figura 16: Evaluación del efecto matriz para la escopolamina en trigo sarraceno.

A continuación se evaluó si el efecto matriz era el mismo para todas las matrices incluidas en este estudio. Por lo tanto, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) [65], mostrándose los resultados obtenidos en la **Tabla 9**.

Tabla 9: Evaluación del efecto matriz usando el método ANCOVA.

Matriz	Pendiente ^a	
	Escopolamina	Atropina
Disolvente	192,12	1321,22
Trigo sarraceno 1	756,35 [*]	1925,42 [*]
Trigo sarraceno 2	772,35 [*]	1959,19 [*]
Pasta (trigo sarraceno)	691,63	1895,94 [*]
Amaranto	759,61 [*]	1980,25 [#]
Mijo	865,54 [#]	2458,96 ⁺
Chía	932,98 [#]	2569,67 ⁺
Soja	748,31 [*]	1801,92 [#]
Valor de p^b	$< 0,01$	$< 0,01$

^a Las pendientes con diferentes superíndices son estadísticamente diferentes ($p < 0,05$)

^b La pendiente en disolvente no está incluida en el análisis estadístico

Lo primero que se puede observar es que al igual que ocurría entre disolvente y matriz, existe una diferencia significativa entre matrices, por lo que no es posible la utilización de una matriz representativa para la adecuada cuantificación de estas matrices. Por otra parte, se observan que algunas matrices presentan pendientes estadísticamente iguales entre sí, como sucede para la escopolamina en las matrices de trigo sarraceno, amaranto y chía ($p = 0,36$). Para la atropina, las matrices estadísticamente iguales son el trigo sarraceno y sus productos derivados (pasta hecha con alforfón) ($p = 0,25$), amaranto y soja ($p = 0,08$) y mijo y chía ($p = 0,14$).

De esta forma se concluye que cuando se analice trigo sarraceno o productos derivados de éste se podrá usar una de las matrices como representativa para la cuantificación de atropina y escopolamina, pero cuando se trate de otras matrices (como soja, mijo, amaranto y chía), será necesario realizar una recta de calibrado en estas para realizar la cuantificación.

4.3.3. Veracidad y precisión

La veracidad fue evaluada en términos de recuperación de los analitos de interés. Los resultados (**Tabla 10**) se obtuvieron del análisis de muestras fortificadas a 2 niveles de concentración para todas las matrices (10 y 50 µg/kg) y a 4 niveles de concentración para la matriz de trigo sarraceno (10, 25, 50 y 100 µg/kg), realizando 5 réplicas de cada uno de los fortificados.

También se evaluó la repetibilidad del método en términos de precisión intradía, fortificando cinco réplicas a 10, 25, 50 y 100 µg/kg (**Tabla 10**).

Aparte de la repetibilidad del método, también se evaluó la precisión intermedia (precisión interdía), realizando experiencias de fortificación de 5 réplicas a los 4 niveles de concentración de la precisión intradía, durante 2 semanas en días alternos (**Tabla 10**). Indicar que la precisión intermedia solo se evaluó en la matriz de trigo sarraceno.

Tabla 10: Recuperación, precisión intradía y precisión interdía.

Compuesto	Matriz	Recuperación (%)				Precisión intradía (n=5)			
		10 µg/kg	25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg	10 µg/kg	25 µg/kg	50 µg/kg	100 µg/kg
Escopolamina	Trigo	80	79	77	77	4(5) ^a	3(4)	4(4)	2(5)
	Mijo	88	-	88	-	4	-	1	-
	Soja	76	-	76	-	3	-	4	-
	Chía	50	-	81	-	11	-	9	-
Atropina	Trigo	84	88	80	80	9(10)	3(2)	4(4)	3(5)
	Mijo	92	-	90	-	4	-	2	-
	Soja	80	-	80	-	6	-	5	-
	Chía	66	-	75	-	17	-	10	-

^a Valores de precisión interdía entre paréntesis (n = 5).

Tanto para atropina como para escopolamina las recuperaciones son adecuadas ya que se encuentran en el rango de 70-120 % [66], excepto para la chía a bajas concentraciones, que es de 50 % para escopolamina y 66 % atropina, posiblemente debido a la naturaleza grasa de esta semilla. Las recuperaciones obtenidas en trigo para atropina y escopolamina son similares a las encontradas en bibliografía [48,50].

Para la precisión intradía se obtuvieron valores entre 1-6 %, excepto para la chía a bajas concentraciones. A pesar de dar valores más elevados (<17 %) éstos se encuentran dentro de lo que se considera adecuado para análisis de trazas [66].

Por último indicar que los valores obtenidos para la precisión interdía son adecuados, no superándose el 10 %.

Finalmente indica que debido a que tanto la precisión intradía como la interdía son correctas, se puede aceptar la aplicación de un factor de corrección en la chía a bajas concentraciones para realizar la cuantificación de los compuestos de interés.

4.3.4. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron analizando la mínima concentración de los analitos en los que la relación señal/ruido fuera mayor o igual a 3 para el límite de detección y a 10 para el de cuantificación. Se inyectaron disoluciones de matriz fortificadas a las concentraciones de 0,01 a 5 µg/kg. Las transiciones usadas para la determinación del límite de detección y cuantificación fueron 209,2>93,0 y 304,1>138,0, para atropina y escopolamina respectivamente.

Los resultados se muestran en la **Tabla 11** y los límites obtenidos son lo suficientemente bajos para la determinación de los compuestos de interés en alimentos contaminados con este tipo de compuestos. Además, estos valores están por debajo de los límites de cuantificación encontrados en otras investigaciones de análisis de trigo [48, 50, 51], donde los límites estaban entre 2,2 y 30 µg/kg, y por debajo del límite legal en productos de consumo de lactantes o niños pequeños [19].

Tabla 11: Límites de detección y cuantificación.

Compuesto	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
Escopolamina	0,2	2,0
Atropina	0,04	0,4

4.4. Aplicación del método al análisis de muestras reales

Una vez optimizado y validado el método se procedió al análisis de muestras reales, que fueron: trigo sarraceno, harina de trigo sarraceno, macarrones hechos con trigo sarraceno, trigo, soja, amaranto, chía y mijo. Para el análisis de estas muestras reales se llevó a cabo un control de calidad interno, en el que se incluían una recta de calibrado de concentraciones entre 0,04 y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, para atropina y escopolamina respectivamente, a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ realizada en matriz y muestras fortificadas a 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, así como la inyección de un blanco de reactivo y un blanco de matriz [67].

En el análisis de las muestras no se encontraron los compuestos de interés en ninguna de las matrices a concentraciones superiores a los límites de detección.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado son:

- Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de atropina y escopolamina en trigo y productos derivados, soja, mijo y chía mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
- Se ha optimizado un método basado en el método QuEChERS para la extracción de los compuestos de interés.
- Se ha optimizado un método cromatográfico para conseguir la correcta separación de los compuestos.
- El método optimizado se ha validado mediante el cálculo de linealidad, rango de trabajo, efecto matriz, veracidad, precisión intra e interdía, límite de detección y límite de cuantificación.
- El método validado se ha aplicado al análisis de muestras reales para la determinación cuantitativa de atropina y escopolamina.

5. CONCLUSIONS

The main conclusions of this study are:

- A new analytical method has been developed for the determination of atropine and scopolamine in buckwheat and wheat products, soy, millet and chia by UHPLC-QqQ-MS/MS.
- A QuEChERS-based procedure has been optimized for the extraction of the target compounds.
- A chromatographic method has been optimized to achieve a suitable separation of the compounds.
- The optimized method has been fully validated, calculating linearity, working range, matrix effect, trueness, inter and intraday precision and lower limits.
- The validated method has been applied to the analysis of real samples for quantitative determination of atropine and scopolamine.

6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

En función de los resultados obtenidos, se señalan las posibles líneas de continuación del trabajo:

✓ Ampliar el método optimizado a la separación quiral de los enantiómeros (-)-hiosciamina y (+)-hiosciamina.

✓ Ampliar el número de compuestos analizados con este método a más compuestos pertenecientes a la familia de los alcaloides del tropano.

✓ Aumentar el número de matrices analizadas como cereales, alimentos para bebés y piensos a base de granos de cereales, productos alimenticios a base de hierbas y té e infusiones de acuerdo con las directrices de la EFSA, y que pueden contener estos productos debido a problemas de contaminación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Petruczynik, A.; Waksmundzka-Hajnos, M. High performance liquid chromatography of selected alkaloids in ion-exchange systems. *Journal of Chromatography A*, **2013**, *1311*, 48-54.
- [2] Fahn, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. *Movement Disorders*, **2015**, *30*, 4-18.
- [3] Naudé, T. W. *Datura* spp. and other related plants. In: Gupta RC, editor. *Veterinary toxicology: basic and clinical principles*, Elsevier, UK, **2007**, *70*, 892-906.
- [4] Gervais, H. W.; Gindi, M. E.; Rademacher, P. R.; Volz-Zang, C.; Palm, D.; Duda, D.; Dick, W. F. High-performance liquid-chromatographic tandem-mass spectrometric methods for atropinesterase-mediated enantioselective and chiral determination of R- and S-hyoscyamine in plasma, *Analytica Chimica Acta*, **1997**, *7*, 13-18.
- [5] Kaila, T.; Korte, J. M.; Saari, K. M. Systemic bioavailability of ocularly applied 1% atropine eyedrops. *Acta Ophthalmologica*, **1999**, *77*, 193-196.
- [6] Nyberg, A. G.; Cassel, G.; Jeneskog, T.; Karlsson, L.; Larson, R.; Lundström, M.; Palmer, L.; Persson, S. A. Pharmacokinetics of HI-6 and atropine in anaesthetized pigs after administration by a new autoinjector. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, **1995**, *16*, 635-651.
- [7] Müller, J.; Wanke, K. Toxic psychoses from atropine and scopolamine. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie*, **1998**, *66*, 289-295.
- [8] EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Tropane alkaloids (from *Datura sp.*) as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*, **2008**, *691*, 1-55.
- [9] Miraldi, E.; Masti, A.; Ferri, S.; Barni Comparini, I. Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia*, **2001**, *72*, 644-648.
- [10] Perharič, L.; Koželj, G.; Družina, B.; Stanovnik, L. Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: A case study from Slovenia. *Food Additives and Contaminants*, **2013**, *30*, 321-330.
- [11] <http://www.nolaboreo.es/publicaciones/articulos/pdf/101228TrigoSarraceno.pdf> (última revisión 26/05/2016)

- [12] Zhang, Z. Promoting conservation through sustainable use of underutilized crops in livelihood development - A case for buckwheat. In: Molina, A. B.; Xu, L. B.; Roa, V. N.; Van den Bergh, I.; Borromeo, K. H. Advancing banana and plantain R and D in Asia and the Pacific, *IPGRI, Italy*, **2005**, vol. 13, 231-240.
- [13] Trigo sarraceno: el hermano celiaco del trigo
<http://extraterrestreceliaco.blogspot.com.es/2014/02/trigo-sarraceno-el-hermano-celiaco-del.html> (última revisión 26/05/2016)
- [14] Sin gluten: un nicho que crece por necesidad o preferencia,
<http://www.elobservador.com.uy/sin-gluten-un-nicho-que-crece-necesidad-o-preferencia-n659159> (última revisión 17/05/16).
- [15] Li, S.; Zhang, Q. H. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2001**, 41, 451-464.
- [16] Alimentos sin alérgenos: Crecimiento sin límite
<http://www.alimarket.es/noticia/180088/Alimentos-sin-alergenos--Crecimiento-sin-limite> (última revisión 26/05/2016)
- [17] Pomeranz, Y. Buckwheat: Structure, composition, and utilization. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **1983**, 19, 213-258.
- [18] Boletín Oficial del Estado: Modificación del Anexo del Real Decreto 465/2003, de 25 de abril, sobre las sustancias indeseables en la alimentación animal, 2009, <http://www.boe.es/boe/dias/2009/06/10/pdfs/BOE-A-2009-9628.pdf> (última revisión 15/05/16).
- [19] European Union. Reglamento (UE) 2016/239 de la comisión, ley 45, *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2016, 3-5.
- [20] Popl, M.; Fahrnich, J.; Tatar, V. Chromatographic analysis of alkaloids. *Chromatographic Science Series*, **1990**, 53, 1-25.
- [21] Appendino, G.; Minassia, A.; Tagliatela-Scafati, O. Recreational drug discovery: natural products as lead structures for the synthesis of smart drugs. *Natural Product Reports*, **2014**, 31, 880-904.
- [22] Wang, M. W.; Ye, R. D.; Zhu, Y. Pharmacology in China: a brief overview. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2013**, 34, 532-533.
- [23] Dalbeth, N.; Lauterio, T. J.; Wolfe, H. R. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clinical Therapeutics*, **2014**, 36, 1465-1479.

- [24] Fournier-Dit-Chabert, J.; Vinader, V.; Santos, A. R.; Redondo-Horcajo, M.; Dreneau, A.; Basak, R.; Cosentino, L.; Marston, G.; Abdel-Rahman, H.; Loadman, P. M.; Shnyder, S. D.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Falconer, R. A.; Pors, K. Synthesis and biological evaluation of colchicine C-ring analogues tethered with aliphatic linkers suitable for prodrug derivatisation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2012**, *24*, 7693-7696.
- [25] Dasgupta, R.; Saha, I.; Pal, S.; Bhattacharyya, A.; Sa, G.; Nag, T. C.; Das, T.; Maiti, B.R. Immuno suppression, hepatotoxicity and depression of antioxidant status by arecoline in albinomice. *Toxicology*, **2006**, *227*, 94-104.
- [26] Bencharit, S.; Morton, C. L.; Xue, Y.; Potter, P. M.; Redinbo, M. R. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2003**, *10*, 349-356.
- [27] Saify, Z. S.; Sultana, N. Role of acetylcholinesterase inhibitors and alzheimer disease. *Drug Design and Discovery in Alzheimer's Disease*, **2015**, 387-425.
- [28] Chinsembu, K. C. Plants as antimalarial agents in Sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, **2015**, *152*, 32-48.
- [29] Zaker, F.; Safaei, A.; Nasiri, N.; Abdollahzadeh, M.; Pazhakh, V. The association of NAD(P) H: Quinine oxidoreductase gene polymorphisms with pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Laboratory Medicine*, **2012**, *43*, 256-261.
- [30] Römermann, K.; Bankstahl, J. P.; Löscher, W.; Bankstahl, M. Pilocarpine-induced convulsive activity is limited by multidrug transporters at the rodent blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **2015**, *353*, 351-359.
- [31] Fisone, G.; Borgkvist, A.; Usiello, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2004**, *61*, 857-872.
- [32] Graf, E.; Lude, W. Alkaloids from erythroxyllum vacciniifolium MARTIUS, I: Isolation of catuabine A, B, and C. *Archiv der Pharmazie*, **1997**, *310*, 1005-1010.
- [33] Zanolari, B.; Guilet, D.; Marston, A.; Queiroz, E. F.; de Queiroz Paulo, M.; Hostettmann, K. Tropane alkaloids from the bark of Erythroxyllum vacciniifolium. *Journal of Natural Products*, **2003**, *66*, 497-502.
- [34] Soar, K.; Dawkins, L.; Page, F.; Wooldridge, J. Recreational cocaine use is associated with attenuated latent inhibition. *Addictive Behaviors*, **2015**, *50*, 34-39.

- [35] López-Valverde, A.; De Vicente, J.; Martínez-Domínguez, L.; De Diego, R. G. Local anaesthesia through the action of cocaine, the oral mucosa and the Vienna group. *British Dental Journal*, **2014**, *217*, 41-43.
- [36] Dasgupta, A.; Mahle, C.; McLemore, J. Elimination of fluconazole interference in gas chromatography/mass spectrometric confirmation of benzoylecgonine, the major metabolite of cocaine using pentafluoro propionyl derivative. *Journal of Forensic Sciences*, **1996**, *41*, 511-513.
- [37] Liua, Y.; Zhenga, B.; Strafforda, S.; Oruguntyb, R.; Sullivanb, M.; Gusb, J.; Heidbredera, C.; Fudalaa, P. J.; Nasser, A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite (-)ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma samples. *Journal of Chromatography B*, **2014**, *961*, 77-85.
- [38] Nakanishi, F.; Sasaki, K.; Shimomura, K. Isolation and identification of littorine from hairy roots of *Atropa belladonna*. *Journal: Plant Cell Reports*, **1998**, *18*, 249-251.
- [39] Gottfried, W.; Schmidt, K. H. Die darstellung von scopina us scopolamin. *Tetrahedron Letters*, **1967**, *8*, 1283-1284.
- [40] Wang, X.; Li, J.; Xu, C.; Li, Y.; Gong, T.; Sun, X.; Fu, Y.; He, Q.; Zhang, Z. Scopine as a novel brain-targeting moiety enhances the brain uptake of chlorambucil. *Bioconjugate Chemistry*, **2014**, *25*, 2046-2054.
- [41] John, H.; Binder, T.; Höchstetter, H.; Thiermann, LC-ESI MS/MS quantification of atropine and six other antimuscarinic tropane alkaloids in plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, *396*, 751-763.
- [42] John, H.; Eyer, F.; Zilker, T.; Thiermann, H. High-performance liquid-chromatographic tandem-mass spectrometric methods for atropinesterase-mediated enantioselective and chiral determination of R- and S- hyoscyamine in plasma. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, *680*, 32-40.
- [43] Zhang, P.; Li, Y.; Liu, G.; Sun, X.; Zhou, Y.; Deng, X.; Liao, Q.; Xie, Z. Simultaneous determination of atropine, scopolamine, and anisodamine from *Hyoscyamus niger* L. in rat plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetics study. *Journal of Separation Science*, **2014**, *37*, 2664-2674.

- [44] Namera, A.; Yashiki, M.; Hirose, Y.; Yamaji, S.; Tani, T.; Kojima, T. Quantitative analysis of tropane alkaloids in biological materials by gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic Science International*, **2002**, *130*, 34-43.
- [45] Zhang, C.; Wu, H.; Huang, X.; Zhu, Z.; Luo, H.; Huang, F.; Lin, X. Simultaneous Determination of Toxic Alkaloids in Blood and Urine by HPLC–ESI–MS/MS. *Chromatographia*, **2012**, *75*, 499-511.
- [46] Vaclavik, L.; Krynitsky, A. J.; Rader, J. I. Targeted analysis of multiple pharmaceuticals, plant toxins and other secondary metabolites in herbal dietary supplements by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole-orbital ion trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **2014**, *810*, 45-60.
- [47] Jakabová, S.; Vincze, L.; Farkas, Á.; Kilár, F.; Boros, B.; Felinger, A. Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A*, **2012**, *1232*, 295-301.
- [48] Jandrić, Z.; Rathor, M. N.; Švarc-Gajić, J.; Maestroni, B. M.; Sasanya, J. J.; Djurica, R.; Cannavan, A. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of tropane alkaloids and glycoalkaloids in crops. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, **2011**, *28*, 1205-1219.
- [49] Kursinszki, L.; Hank, H.; László, I.; Szke, E. Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 β -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2005**, *1091*, 32-39.
- [50] Caligiani, A.; Palla, G.; Bonzanini, F.; Bianchi, A.; Bruni, R. A validated GC-MS method for the detection of tropane alkaloids in buckwheat (*Fagopyron esculentum* L.) fruits, flours and commercial foods. *Food Chemistry*, **2011**, *127*, 204-209.
- [51] Perharič, L.; Koželj, G.; Družina, B.; Stanovnik, L. Risk assessment of buckwheat flour contaminated by thorn-apple (*Datura stramonium* L.) alkaloids: a case study from Slovenia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2013**, *30*, 321-330.
- [52] Eeva, M.; Salo, J. P.; Oksman-Caldentey, K. M. Determination of the main tropane alkaloids from transformed *Hyoscyamus muticus* plants by capillary zone electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **1998**, *16*, 717-722.

- [53] Ye, N.; Li, J.; Gao, C.; Xie, Y. Simultaneous determination of atropine, scopolamine, and anisodamine in *Flos daturae* by capillary electrophoresis using a capillary coated by graphene oxide. *Journal of Separation Science*, **2013**, *36*, 2698-2702.
- [54] Siluk, D.; Magerc, D. E.; Gronich, N.; Abernethy, D.; Wainer, I. W. HPLC-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric method for enantioselective determination of R,S-propranolol and R,S-hyoscyamine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, **2007**, *859*, 213-221.
- [55] Temerdashev, A. Z.; Kolychev, I. A.; Kiseleva, N. V. Chromatographic determination of some tropane alkaloids in *Datura metel*. *Journal of Analytical Chemistry*, **2012**, *67*, 960-966.
- [56] Boros, B.; Farkas, A.; Jakabova, S.; Bacskay¹, I.; Kilár, F.; Felinger, A. LC-MS quantitative determination of atropine and scopolamine in the floral nectar of *Datura* species. *Chromatographia Supplement*, **2010**, *71*, S43-S49.
- [57] Ricard, F.; Abe, E.; Duverneuil-Mayer, C.; Charlier, P.; Grandmaison, G.; Alvarez, J. C. Measurement of atropine and scopolamine in hair by LC-MS/MS after *Datura stramonium* chronic exposure. *Forensic Science International*, **2012**, *223*, 256-260.
- [58] Mol, H. G. J.; Van Dam, R. C. J.; Zomer, P.; Mulder, P. P. J. Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, **2011**, *28*, 1405-1423.
- [59] Walorczyk, S. Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2007**, *1165*, 200-212.
- [60] Miyazaki, T.; Yomota, C.; Okada, S. Partition behavior of tropane alkaloids between organic solvents and water. *J. Pharm. Soc. Japan*, **1993**, *113*, 376-384.
- [61] Herrmann, S. S.; Poulsen, M. E. Clean-up of cereal extracts for gas chromatography-tandem mass quadrupole mass spectrometry pesticide residues analysis using primary secondary amine and C₁₈. *Journal of Chromatography A*, **2015**, *1423*, 47-53.
- [62] González-Curbelo, M. Á.; Herrera-Herrera, A. V. Sample-preparation methods for pesticide-residue analysis in cereals and derivatives. *Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, *38*, 32-51.

- [63] Grande-Martínez, Á.; Arrebola-Liébanas, F. J.; Martínez-Vidal, J. L.; Hernández-Torres, M. E.; Garrido-Frenich, A. Optimization and validation of a multiresidue pesticide method in rice and wheat flour by modified QuEChERS and GC-MS/MS. *Food Analytical Methods*, **2015**, *9*, 548-563.
- [64] He, Z.; Wang, L.; Peng, Y.; Luo, M.; Wang, W.; Liu, X. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food Chemistry*, **2015**, *169*, 372-380.
- [65] Garcia-Campaña, A.; Cuadros-Rodríguez, L.; Aybar-Muñoz, J.; Alés-Barrero, F. Chemometric Protocol to Validate an Analytical Method in the Presence of Corrigible Constant and Proportional Systematic Errors. *Journal of AOAC International*, **1997**, *80*, 657-664.
- [66] European Commission. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
- [67] EC. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union*, **2002**, *221*, 8-36.