



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y
ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL
ANÁLISIS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS
EN MATRICES ALIMENTARIAS CON ELEVADO
CONTENIDO GRASO**

**PRESENTADA POR:
DELIA CASTILLA FERNÁNDEZ**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. JUAN F. GARCÍA REYES
DR. D. DAVID MORENO GONZÁLEZ**

JAÉN, 28 DE NOVIEMBRE DE 2022

**NUEVAS APROXIMACIONES PARA EL ANÁLISIS DE
CONTAMINANTES ORGÁNICOS EN MATRICES ALIMENTARIAS
CON ELEVADO CONTENIDO GRASO**

Por

Delia Castilla Fernández

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA
UNIVERSIDAD DE JAÉN**

Fdo. D^a Delia Castilla Fernández,

Los Directores de la Memoria,

Fdo. Dr. Juan F. García Reyes
**Catedrático de Química Analítica de la
Universidad de Jaén**

Fdo. Dr. David Moreno González
**Investigador Postdoctoral del Departamento
de Química Física y Analítica de la
Universidad de Jaén**

VISADA en Jaén a 28 de noviembre de 2022

Los doctores Juan F. García Reyes, Catedrático de Universidad, y David Moreno González, Investigador Postdoctoral, ambos del área de Química Analítica de la Universidad de Jaén,

Informan:

Que la tesis titulada **“Nuevas aproximaciones para el análisis de contaminantes orgánicos en matrices alimentarias con elevado contenido graso”**, realizada por D^a Delia Castilla Fernández, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Jaén (Mención Internacional), ha sido desarrollada bajo su inmediata dirección y supervisión, en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén.

En Jaén, a 28 de noviembre de 2022

Fdo. Dr. Juan F. García Reyes
**Catedrático de Química Analítica de la
Universidad de Jaén**

Fdo. Dr. David Moreno González
**Investigador Postdoctoral del Departamento
de Química Física y Analítica de la
Universidad de Jaén**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida en los siguientes proyectos de investigación:

- “Ayudas predoctorales para la Formación de Personal Investigador”, con cargo a la Acción 4 del Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén 2017-2019 (Convocatoria 2018). Ref: PIPFP198
- “Ayudas para estancias breves del Personal Investigador en Formación encaminadas a la obtención del título de Doctor con mención internacional (Acción 5b)”, con cargo al Plan Operativo de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén 2021-2022.
- Proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO). Ref. CTQ-2015-71321-P.

ÍNDICE



RESUMEN	27
SUMMARY	37
OBJETIVOS.....	47
AIM OF THE THESIS	51
INTRODUCCIÓN.....	55
1. SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL MARCO DE LA LEGISLACIÓN EUROPEA	57
1.1. Riesgo químico	59
1.1.1. Aditivos alimentarios	60
1.1.2. Aromas	60
1.1.3. Materiales en contacto con alimentos	62
1.1.4. Contaminantes.....	64
1.1.5. Residuos	73
1.2. Legislación sobre contaminantes y residuos	78
1.2.1. Micotoxinas.....	78
1.2.2. BTEX	82
1.2.3. Plaguicidas.....	83
1.2.4. Medicamentos de uso veterinario	87
2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES Y RESIDUOS EN ALIMENTOS	93
2.1. Fundamentos	93
2.1.1. Técnicas cromatográficas.....	93
2.1.1.1 Cromatografía de gases	94
2.1.1.2 Cromatografía líquida	95
2.1.2. Espectrometría de masas como técnica de detección en métodos de separación cromatográfica	98
2.1.2.1 Fuentes de ionización	100
2.1.2.1.1 Fuentes de ionización acopladas a GC.....	101
2.1.2.1.2 Fuentes de ionización acopladas a LC: Electrospray.....	105
2.1.2.2 Analizadores.....	106
2.1.2.3 Espectrometría de masas en tándem: triple cuadrupolo y modos de adquisición	110

3. EFECTO MATRIZ	115
3.1. Definición	115
3.1.1. Causas	115
3.1.2. Cálculo del efecto matriz	119
3.2. Problemática de muestras alimentarias con alto contenido graso	122
3.3. Estrategias para minimizar el efecto matriz en muestras grasas	130
3.3.1. Tratamiento de muestra	130
3.3.1.1. Etapa de extracción.....	130
3.3.1.1.1. Precipitación de proteínas	131
3.3.1.1.2. Extracción líquido-líquido (LLE) y extracción sólido-líquido (SLE)	132
3.3.1.2. Etapa de purificación y limpieza del extracto	136
3.3.1.2.1. Extracción en fase sólida (SPE).....	137
3.3.1.2.2. Extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) y metodología QuEChERS.....	138
3.3.1.2.3. Sorbentes	147
3.3.1.2.3.1. Sílice modificada con grupos funcionales polares	148
3.3.1.2.3.2. Alúmina (Al_2O_3)	149
3.3.1.2.3.3. Florisil (MgO_3Si).....	149
3.3.1.2.3.4. Intercambio iónico.....	151
3.3.1.2.3.5. PSA (amina primaria secundaria).....	152
3.3.1.2.3.6. Sorbentes en fase reversa: C_{18}	154
3.3.1.2.3.7. Carbón grafitizado (GCB)	155
3.3.1.2.3.8. Dióxido de zirconio enlazado a sílice: Z-sep.....	157
3.3.1.2.3.9. EMR-Lipid	160
3.3.1.2.3.10. Sorbentes poliméricos y Oasis PRiME HLB	163
3.3.1.2.3.11. Polímeros de impronta molecular: MIPs	165
3.3.2. Modificaciones en el método LC-ESI-MS	166
3.3.2.1. Disminución del volumen de inyección	166
3.3.2.2. Modificación de las condiciones cromatográficas	167

3.3.2.3	Infusión post-columna	168
3.3.3.	Uso de fuentes de ionización alternativas	172
3.3.4.	Dilución directa (Dilute-and-Shoot)	175
4.	REFERENCIAS.....	177
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	221
	CHAPTER 1. Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS.....	223
1.	INTRODUCTION.....	231
2.	EXPERIMENTAL	232
2.1.	Chemicals, reagents, and apparatus.....	232
2.2.	Sample treatment	235
2.2.1.	Procedure I: Solvent extraction followed by pass-through SPE clean-up using HLB PRiME	235
2.2.2.	Procedure II: Solvent extraction followed by EMR-Lipid d-SPE clean-up	236
2.2.3.	LC-MS analysis and equipment.....	237
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	239
3.1.	Optimization of UHPLC-MS/MS method.....	239
3.2.	Evaluation of the sample treatment procedures.....	244
3.2.1.	Extraction efficiency.....	245
3.2.2.	Extract cleanliness and matrix effects	251
3.2.3.	Linearity, detection, and quantification limits and precision.	257
3.2.4.	Sample throughput.	262
3.3.	Analysis of market samples.....	262
4.	CONCLUSIONS.....	263
5.	REFERENCES	264
	CHAPTER 2. Appraisal of different clean-up strategies for the determination of fipronil and its metabolites in eggs by UHPLC-MS/MS.....	267
1.	INTRODUCTION.....	275
2.	EXPERIMENTAL	277
2.1.	Chemicals, reagents, and materials	277

2.2.	Extraction procedure	277
2.2.1.	Procedure I: HLB PRiME SPE	278
2.2.2.	Procedure II: EMR-Lipid d-SPE	279
2.2.3.	Procedure III: PSA d-SPE.....	279
2.3.	UHPLC-MS/MS analysis.....	280
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	282
3.1.	Optimization of UHPLC-MS/MS method.....	282
3.2.	Evaluation of the sample treatment procedures.....	283
3.2.1.	Extraction efficiency.....	283
3.2.2.	Matrix effect.....	286
3.2.3.	Linearity, limits of quantification and precision	290
3.2.4.	Analysis of market samples.....	292
3.3.	Comparison with other methods.....	292
4.	CONCLUSIONS.....	294
5.	REFERENCES	295
CHAPTER 3. Assessment of a specific sample clean-up for the multiresidue determination of veterinary drugs and pesticides in salmon using UHPLC-MS/MS.....		
1.	INTRODUCTION.....	307
2.	EXPERIMENTAL	308
2.1.	Chemicals, reagents, and apparatus.....	308
2.2.	Sample treatment	309
2.3.	Optimization of UHPLC-MS/MS method.....	310
2.4.	Method validation.....	311
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	313
3.1.	UHPLC-MS/MS method development	313
3.2.	Assessment of the proposed sample treatment.....	321
3.2.1.	Extraction efficiency.....	321
3.2.2.	Clean-up efficiency and matrix effects	328
3.3.	Analytical performance.....	338

3.4.	Comparison with other methods.....	345
3.5.	Analysis of market samples.....	350
4.	CONCLUSIONS.....	352
5.	REFERENCES.....	353
CHAPTER 4. Dilute-and-shoot versus clean-up approaches: A comprehensive evaluation for the determination of mycotoxins in nuts by UHPLC-MS/MS..... 357		
1.	INTRODUCTION.....	365
2.	EXPERIMENTAL.....	368
2.1.	Chemicals and materials.....	368
2.2.	Sample treatment.....	371
2.2.1.	The extraction procedure: SLE.....	371
2.2.2.	Clean-up approaches.....	373
2.2.3.	Dilution or pre-concentration of the SLE extract. No clean-up.....	379
2.2.4.	Gravimetric evaluation of co-extracted species.....	380
2.3.	UHPLC-MS analysis.....	380
2.4.	Validation of the proposed sample treatment: Dilute-and-Shoot.....	383
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	385
3.1.	UHPLC-MS/MS method development.....	385
3.2.	Assesment of sample treatment approaches.....	386
3.2.1.	Extraction efficiency evaluation.....	386
3.2.2.	Evaluation of clean-up and dilute-and-shoot efficiency, matrix effect, and matrix co-extractives removal.....	389
3.3.	Analytical performance of the proposed procedure: Dilute-and-Shoot approach.....	402
3.4.	Comparison with other methods.....	404
3.5.	Analysis of market samples.....	406
4.	CONCLUSIONS.....	407
5.	REFERENCES.....	408
CHAPTER 5. Evaluation of a novel controlled-atmosphere flexible microtube plasma soft ionization source for the determination of BTEX in olive oil by HS-GC-MS.... 413		
1.	INTRODUCTION.....	421

2. EXPERIMENTAL	423
2.1. Chemicals, reagents, and materials	423
2.2. Gas chromatography/mass spectrometry	423
2.3. Controlled-atmosphere flexible micro tube plasma ionization setup ...	424
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	426
3.1. Optimization of CA-F μ TP working conditions.....	426
3.2. Optimization of HS conditions	435
3.3. Analytical performance.....	437
3.4. Analysis of real samples	440
3.5. Comparison with GC-EI-MS.....	440
4. CONCLUSIONS.....	443
5. REFERENCES	444
CONCLUSIONES.....	447
CONCLUSIONS.....	453

RESUMEN



La seguridad alimentaria desempeña un papel clave en la protección de la salud humana, permitiendo que los alimentos que consumimos sean inocuos, nutritivos, asequibles y sostenibles. Dentro del amplio concepto de seguridad alimentaria, el riesgo químico es una de las áreas en las que se llevan controles más exhaustivos, debido a que existen multitud de sustancias nocivas para la salud que pueden encontrarse en los alimentos. Estos compuestos tóxicos pueden llegar a los alimentos por diferentes vías, principalmente de forma natural o a través de la actividad humana. El factor humano puede darse de diferentes formas: compuestos persistentes o residuos que se encuentren en el medio ambiente y que puedan estar en contacto con las especies productoras de alimentos, contaminantes que deriven de todo el proceso de producción de alimentos desde la materia prima o en forma de residuos procedentes de actividades que garanticen la viabilidad de cultivos y granjas.

Las sustancias que pueden poner más en riesgo la salud humana son los contaminantes y residuos, ya que tienen efectos crónicos o a largo plazo. La principal diferencia entre ambos conceptos se basa en que los residuos son sustancias que han sido intencionadamente añadidas por el ser humano, por ejemplo, debido a la aplicación de plaguicidas a los cultivos o la administración de medicamentos a los animales destinados a la producción de alimentos. Por otro lado, los contaminantes son sustancias que están presentes en el alimento pero que no han sido añadidas directamente. Es importante aclarar que los contaminantes pueden tener un origen natural, como las micotoxinas, pero también causas antropogénicas. Por ejemplo, sustancias muy volátiles como el benceno y sus compuestos derivados, que proceden de la combustión de los tan empleados combustibles fósiles, pueden llegar a estar presentes en los alimentos que consumimos.

Con esto en mente, existe una gran cantidad de compuestos que precisan ser vigilados, controlados y limitados en la cadena alimentaria. Las autoridades europeas trabajan para que muchos de ellos tengan fijado un límite máximo

aceptable y establecen unos reglamentos de obligado cumplimiento en todos los países miembros de la Unión Europea (UE). Estos límites establecidos en la UE están ligados, en muchos de casos, a estudios realizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Por lo que, a través de estos estudios de toxicología, metabolismo, evaluación del riesgo a largo plazo, etc., se establecen las concentraciones máximas consideradas seguras de contaminantes y residuos en alimentos. Así, en el caso de que en un alimento se supere el límite fijado en la UE, no se considera que su consumo sea seguro para la salud humana, con lo que se procede a la retirada del lote de dicho producto del mercado de todos los países miembros o al rechazo fronterizo, en el caso de importación. Las concentraciones en las que están regulados los residuos y contaminantes están en torno a las partes por billón (ppb), es decir, $\mu\text{g kg}^{-1}$ o $\mu\text{g L}^{-1}$. Por tanto, son necesarias técnicas altamente sensibles y específicas para detectar estos compuestos a concentraciones tan bajas. Para ello, normalmente la instrumentación empleada se basa en la cromatografía, de líquidos o gases, acoplada a espectrometría de masas.

Los avances en la instrumentación actual han hecho posible que cada vez se logre la detección y cuantificación de residuos y contaminantes a niveles más bajos, por ejemplo, con el empleo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Sin embargo, existe un aspecto clave que afecta a todo el proceso analítico denominado efecto matriz. Éste consiste en un cambio de la señal instrumental del analito debido a compuestos co-eluyentes que compiten con el analito en el proceso de ionización.

El efecto matriz es mucho más problemático en alimentos con un alto contenido graso, por encima de 2% de grasa. Estas matrices se caracterizan, además de tener un elevado contenido en lípidos, por estar compuestas de otras especies como carbohidratos y proteínas. Parte de estos componentes de la matriz normalmente son co-extraídos a la misma vez que el analito en la etapa de extracción. Por lo que, para los alimentos de alto contenido graso, en comparación con otros cuyo contenido es fundamentalmente agua, como frutas y verduras, el número de

especies co-extraídas es mayor y, consecuentemente, se obtiene un efecto matriz más elevado. Para minimizar el efecto matriz existen algunas alternativas, entre otras la adición de una etapa de limpieza del extracto, con el fin de retirar los interferentes co-extraídos, o el uso de fuentes de ionización alternativas que sean capaces de ionizar menos interferentes que compitan con la ionización del analito.

A raíz de la problemática expuesta, el propósito principal de esta tesis es estudiar soluciones para la disminución del efecto matriz en la determinación de residuos y contaminantes en matrices de alto contenido graso. Para ello, en esta tesis doctoral se han propuesto las siguientes metodologías:

- En el **primer capítulo** se propone la evaluación de dos procedimientos de tratamiento de muestra utilizando como etapa de limpieza dos sorbentes diferentes para la determinación de medicamentos de uso veterinario en leche, un alimento con un 2-5% de contenido graso. Se seleccionaron 66 medicamentos veterinarios de diferentes familias cuyos Log K_{ow} (coeficientes de partición octanol/agua) oscilaba entre -1 y 5. Ambos procedimientos se basan en una etapa de extracción con acetonitrilo acidificado con un pequeño porcentaje de ácido fórmico. En el primer caso, la etapa de limpieza o *clean-up* se lleva a cabo mediante un proceso de extracción en fase sólida (SPE) en modo *pass-through* utilizando el sorbente HLB PRIME que supone la abreviatura de "*Hidrophilic-Lipophilic Balanced Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use*" ("balance hidrofílico-lipofílico para la mejora en la robustez del proceso y facilidad de uso respecto al efecto matriz"). En segundo lugar, se evaluó el protocolo basando en una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) empleando el sorbente "*Enhanced Matrix Removal*" ("eliminación mejorada de la matriz"), comúnmente denominado mediante su acrónimo EMR-Lipid. La determinación se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de ultra-elevada eficacia/espectrometría de masas en tándem, utilizando una fuente

de electrospray para el acoplamiento de dichas técnicas (UHPLC-ESI-MS/MS). Los resultados obtenidos mostraron la idoneidad de ambos tratamientos de muestra en términos de efecto matriz, limpieza de extractos, recuperación, precisión y sensibilidad. Además, los límites de cuantificación (LOQs) también estaban muy por debajo de los niveles máximos de residuos establecidos por la UE. Sin embargo, el HLB PRiME fue ligeramente superior ya que presentaba un efecto matriz casi insignificante en la mayoría de los compuestos y el procedimiento implicaba menos pasos en comparación con la metodología EMR-Lipid d-SPE, con lo cual, el tiempo empleado en el tratamiento de muestra se reducía significativamente. Por último, esta metodología se empleó para el análisis de 24 muestras de leche, y se detectó danofloxacin por debajo de los límites de la UE.

- En el **segundo capítulo** se propone la reducción del efecto matriz en muestras de huevo para el análisis del plaguicida fipronil y tres de sus metabolitos (fipronil-sulfona, fipronil-sulfuro y fipronil-desulfinil), cuyos $\text{Log } K_{ow}$ oscilan alrededor de 4, mediante UHPLC-ESI-MS/MS. Para ello se propone una extracción tipo QuEChERS, acrónimo anglosajón de las palabras “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*” (“Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro”). Un huevo entero contiene un 12% de grasa, con lo que en la etapa de extracción sin etapa de limpieza se obtenía un efecto matriz medio, es decir un de un 20 a 50% de supresión. Por tanto, se estudiaron 3 estrategias para la etapa de limpieza: una SPE en modo *pass-through* utilizando HLB PRiME, una d-SPE empleando el protocolo EMR-Lipid o una d-SPE usando amina secundaria primaria (PSA), un sorbente empleado en la metodología QuEChERS convencional. Para la comparación de estos 3 sorbentes, se tuvo en cuenta el efecto matriz, la limpieza de los extractos, recuperación, precisión y LOQs. Teniendo en cuenta los sorbentes empleados, los LOQs obtenidos estaban por debajo de $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ para

todos los compuestos, muy por debajo del límite máximo del fipronil en huevo establecido por la UE ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Por otra parte, los sorbentes EMR-Lipid y PSA proporcionaron unas recuperaciones más elevadas. Mientras que sólo en el caso del EMR-Lipid, el efecto matriz fue insignificante para todos los analitos. Por tanto, el *clean-up* empleando el protocolo EMR-Lipid fue seleccionado como más conveniente y fue utilizado para el análisis de 50 muestras de huevo. En algunas de estas muestras, se detectaron residuos de fipronil y fipronil sulfona por debajo de sus LOQ.

- En el **tercer capítulo** se ha desarrollado un método para el análisis multiresiduo de plaguicidas y medicamentos veterinarios en muestras de salmón, el cual contiene un 14% de grasa, mediante UHPLC-ESI-MS/MS. En este trabajo, se han estudiado 65 plaguicidas y 41 medicamentos de uso veterinario cuyos valores de $\text{Log } K_{ow}$ se encuentran entre -1.4 y 5.5. La mayoría de estudios que proponen un análisis multiresiduo de plaguicidas y medicamentos veterinarios en matrices grasas de procedencia acuícola utilizan el método QuEChERS empleando C_{18} y/o PSA en la etapa de limpieza. Sin embargo, dada la alta concentración de especies co-extraídas, en ellos se obtiene un efecto matriz fuerte. Como posible solución para minimizar el efecto matriz y mejorar el rendimiento del tratamiento basado en QuEChERS para el análisis de estas matrices grasas, se evaluó por primera vez el sorbente EMR-Lipid en la etapa de limpieza. Se obtuvo que el sorbente EMR-Lipid proporcionó una interacción altamente selectiva y efectiva con los lípidos, obteniéndose excelentes resultados en términos de tratamiento de muestra, precisión y efecto matriz para la mayoría de los analitos. El efecto matriz fue despreciable para el 57% de los compuestos, mientras que el resto presentó un efecto matriz suave. La recuperación se encontraba dentro de los niveles recomendados por la UE para la mayoría de los compuestos y los LOQs alcanzados fueron inferiores a $3,7 \mu\text{g kg}^{-1}$, por debajo

de los límites establecidos. Aunque cabe destacar que la UE sí ha fijado límites máximos de residuo en medicamentos veterinarios en productos de origen animal, mientras que aún no se han establecido para residuos de plaguicidas en productos pesqueros, con lo que, en ausencia de este límite, se establece un máximo de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$. En consecuencia, se considera muy beneficiosa la incorporación de un sorbente de limpieza específico, como EMR-Lipid, a la metodología QuEChERS en lugar de los sorbentes clásicos, como PSA y C_{18} para analizar muestras de pescado con alto contenido graso. Finalmente, la metodología propuesta fue aplicada a 20 muestras de salmón, en las que se encontraron residuos de plaguicidas o medicamentos en 5 de ellas. Se obtuvieron algunos hallazgos notables, como presencia de metronidazol, sustancia no autorizada.

- El **cuarto capítulo** incluye un estudio de la eficacia de diferentes sorbentes comunes en la etapa de limpieza de matrices grasas para la determinación de micotoxinas, en frutos secos mediante UHPLC-ESI-MS/MS. Los analitos seleccionados fueron la ocratoxina A y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, cuyos $\text{Log } K_{ow}$ oscilan entre 0.4 y 4.4. Las nueces, matriz seleccionada para este estudio, contienen un 65% de grasa. Por ello, en otros estudios se obtiene con frecuencia un fuerte efecto matriz. Para solucionar este problema, después de una extracción sólido-líquido (SLE), se estudiaron 6 procedimientos de limpieza destinados a matrices grasas evaluando el efecto matriz, la limpieza de los extractos, la determinación gravimétrica de especies co-extraídas y las recuperaciones. Algunos de estos *clean-ups* se consistieron en una d-SPE empleando: EMR-Lipid, C_{18} , PSA o un sorbente basado en dióxido de zirconio enlazado a sílica denominado Z-sep⁺. También se estudiaron *clean-ups* basados en una SPE en modo *pass-through*, consistente en los cartuchos (v) HLB PRiME. Y otra estrategia basada en SPE convencional, pero empleando como sorbente polímeros de impronta

molecular (MIPs, de sus siglas en inglés “*Molecularly Imprinted Polymers*”) especialmente diseñados para la retención de las micotoxinas propuestas en el estudio. Sin embargo, se detectó que ninguno de estos procedimientos de limpieza reducía significativamente el efecto matriz obtenido en la etapa de SLE y permitía una correcta recuperación al mismo tiempo. En consecuencia, la adición de más pasos es ventajosa en términos de tiempo, precio y generación de residuos. Como alternativa, se estudió un procedimiento económico, simple y rápido (dilución directa o *Dilute-and-Shoot*), consistente en una simple extracción de la muestra seguida de una dilución previa a su análisis instrumental. Después de probar 10 factores de dilución y preconcentración diferentes, se determinó que la dilución 1:100 era la más conveniente, con lo que se procedió a su validación. Se obtuvieron efectos matriz despreciables o suaves para todos los analitos, además de obtenerse un LOQ de $1,9 \mu\text{g kg}^{-1}$, por debajo del límite más restrictivo de la UE para aflatoxinas en frutos secos. Los demás parámetros como la recuperación y precisión también fueron satisfactorios. Finalmente, esta metodología se aplicó para el análisis de 25 muestras de nueces, en las cuales no fue detectada la presencia de ninguna de las micotoxinas estudiadas.

- En el **quinto capítulo** se propone la determinación en aceite de oliva virgen de una familia de compuestos volátiles denominados BTEX, de las siglas de los compuestos que la forman: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (orto-, meta- y para- xileno). Para ello se utiliza como tratamiento de muestra la técnica de extracción por espacio de cabeza (*headspace*), y se emplea como técnica de determinación de los analitos cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La novedad de este trabajo reside en la evaluación del potencial de la fuente de ionización suave basada en un diseño de descarga miniaturizado llamado “*controlled-*

atmosphere flexible microtube plasma (“plasma de microtubo flexible en atmósfera controlada”), y abreviado CA-F μ TP para el análisis de BTEX. Además, la fuente de ionización propuesta se comparó con la fuente de impacto electrónico (EI, del inglés “*Electronic Impact*”). El empleo de CA-F μ TP es una alternativa interesante debido a que no se observa una gran fragmentación y ofrece una sensibilidad adecuada para estos compuestos monoaromáticos. El espectro obtenido se observa como especie más abundante el aducto con NO, [M+NO]⁺, con lo que la identificación de los BTEX se puede llevar acabo de una forma más selectiva. Finalmente, el potencial del sistema GC-CA-F μ TP-MS para la detección de BTEX se aplicó en el análisis de aceite de oliva obteniéndose un efecto matriz nulo o bajo para todos los analitos. Los límites de detección alcanzados empleando CA-F μ TP se encontraban por debajo de 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, lo que indica que su sensibilidad es equivalente a la obtenida mediante EI. La recuperación y precisión fue satisfactoria. Por último, se analizaron 10 muestras de aceite de oliva, detectando trazas de benceno y tolueno en una de las muestras, sin superar el límite máximo recomendado.

SUMMARY



Food safety plays a key role in protecting human health, ensuring that the food we eat is safe, nutritious, affordable and sustainable. Within the broad concept of food safety, the chemical risk is one of the areas in which more exhaustive controls are carried out. Owing to there are many harmful substances can be found in food so that human health can be endangered. These toxic compounds can reach food commodities through different routes, mainly naturally or through human activity. The human factor can affect in different ways: persistent compounds or residues found in the environment are in contact with food-producing species, contaminants that derive from the entire food production process from the raw material, or residues from activities that guarantee the viability of crops and farms.

The substances which more endanger human health are contaminants and residues due to their toxicity and chronic or long-term effects. The main difference between the two concepts is based on the fact that residues are substances that have been intentionally added by humans, for example, due to the application of pesticides to crops or the administration of veterinary drugs to food-producing animals. On the other hand, contaminants are substances that are present in food commodities but they have not been intentionally added. It is important to clarify that contaminants, such as mycotoxins, can have a natural origin or anthropogenic causes. For example, volatile substances such as benzene and derivatives, which come from the combustion of widely used fossil fuels, can be present in food products.

With this in mind, there are a large number of compounds that have to be monitored, controlled and limited in the food chain. The European authorities have fixed a maximum acceptable limit and established regulations in all European Union (EU) member countries. These limits established in the EU are based on scientific evidence, linked in many cases to studies carried out by the European Food Safety Authority (EFSA). Therefore, through these studies of toxicology, metabolism, long-term risk assessment, etc., the maximum concentrations considered safe for contaminants and residues in food are established. Thus, in the event that a food

product exceeds the limit set by the EU, it is not considered to be safe for human health. Therefore, the batch of mentioned product is withdrawn from the market of all member countries or border rejected in the case of an import. The concentrations in which residues and contaminants are regulated are around parts per billion (ppb), that is, $\mu\text{g kg}^{-1}$. Therefore, highly sensitive and specific techniques are necessary to detect these compounds at such low concentrations. For this, the employed instrumentation is normally based on liquid or gas chromatography coupled with mass spectrometry.

Advances in the current instrumentation have made possible to achieve lower detection and quantification concentration for residues and contaminants. For example, with the employment of tandem mass spectrometry (MS/MS). However, there is a crucial aspect that affects the entire analytical process: the matrix effect. It consists of a change in the instrumental signal of the analyte due to co-eluting compounds that compete with the analyte in the ionization process.

The matrix effect is much more problematic in foods with a high fat content, over 2% fat. These matrices are characterized by their high lipid content and also for being composed of other species such as carbohydrates and proteins. These matrix components can be co-extracted at the same time as the analyte in the extraction step. Therefore, for food products with a high fat content, compared to others whose content is mainly water, such as fruits and vegetables, the number of co-extracted species is greater. Consequently, a higher matrix effect is obtained. To minimize the matrix effect, there are some alternatives, among others: the addition of an extract cleaning step, in order to remove the co-extracted interferents, or the use of an alternative ionization source, which is capable to ionize less interferents that compete with the analyte.

Bearing all of this in mind, the main purpose of this thesis is to propose solutions to minimize the matrix effect for the determination of residues and contaminants in fatty matrices. Therefore, the following methodologies have been evaluated:

- The **first chapter** proposed the evaluation of two sample treatment procedures using two different sorbents as a clean-up step for the determination of veterinary drugs in milk, which contains 2-5% fat. 66 veterinary drugs from different families whose Log K_{ow} (octanol/water partition coefficients) ranged between -1 and 5 were selected. Both procedures are based on an extraction step with acidified acetonitrile with a small percentage of formic acid. In the first case, the clean-up stage is carried out by a solid phase extraction (SPE) in pass-through mode using the HLB PRiME sorbent, which is the abbreviation of “Hydrophilic-Lipophilic Balanced” “Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use”. Secondly, a dispersive solid phase extraction (d-SPE) protocol using the “Enhanced Matrix Removal” sorbent, commonly called by its acronym EMR-Lipid, was employed. The determination was carried out ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, using an electrospray source for the coupling both techniques (UHPLC-ESI-MS/MS). The obtained results showed the suitability of both sample treatments in terms of matrix effect, extract clean-up, recovery, precision, and sensitivity. In addition, the limits of quantification (LOQs) were also well below the maximum residue levels established by the EU. However, the HLB PRiME provided slightly better results. Owing negligible matrix effect was obtained for most of the compounds and the procedure involved fewer steps compared to the EMR-Lipid d-SPE methodology, thus, the sample preparation time was significantly reduced. Finally, this methodology was used for the analysis of 24 milk samples, in which some traces of danofloxacin were detected below the EU limits.
- The **second chapter** was focused on the reduction of the matrix effect in egg samples for the analysis of the pesticide fipronil and 3 of its metabolites (fipronil-sulfone, fipronil-sulfide and fipronil-disulfonyl), whose Log K_{ow} is

around 4, using UHPLC-ESI-MS /MS. For that purpose, QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe” extraction was proposed. A whole egg contains 12% fat. Therefore in the extraction step, a medium matrix effect is obtained if a clean-up procedure is not carried out, entailing 20 to 50% of suppression. Therefore, 3 different strategies for the clean-up step were studied: an SPE in pass-through mode using HLB PRiME, a d-SPE using the EMR-Lipid protocol or a d-SPE using primary secondary amine (PSA), an extended sorbent used in the QuEChERS methodology. For the comparison of these 3 sorbents, the matrix effect, cleanliness of the extracts, recovery, repeatability and LOQs were studied. Considering the 3 sorbents used, the LOQs obtained were below $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all compounds, below the maximum limit of fipronil in eggs established by the EU ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$). On the other hand, EMR-Lipid and PSA sorbents achieved higher recoveries. While only EMR-Lipid showed a negligible matrix effect for all analytes. Therefore, the clean-up using the EMR-Lipid protocol was selected as the most convenient. Finally, 50 chicken egg samples were analyzed. Fipronil and fipronil sulfone residues were detected below their LOQ among the analyzed samples.

- In the **third chapter**, a multi-residue method is developed for the analysis of pesticides and veterinary drugs in salmon, which contain 14% fat, by UHPLC-ESI-MS/MS. In this work, 65 pesticides and 41 veterinary drugs, whose Log K_{ow} values are between -1.4 and 5.5, were studied. The majority of the works that propose a multiresidue analysis of pesticides and veterinary drugs in fatty aquaculture matrices use QuEChERS with C_{18} and/or PSA sorbents for the clean-up. However, the high concentration of co-extracted species causes a strong matrix effect in those studies. As a possible solution to minimize the matrix effect and improve the performance of the QuEChERS method for the analysis of these fatty foods, the EMR-Lipid sorbent step was

evaluated for the first time in the clean-up step. EMR-Lipid was found to provide a highly selective and effective interaction with lipids, obtaining excellent results in terms of sample throughput, precision, and matrix effect for most analytes. The matrix effect was negligible for 57% of the compounds, while the rest presented a soft matrix effect. The recovery was within the levels recommended by the EU for most of the compounds and the LOQs were lower than $3.7 \mu\text{g kg}^{-1}$, below the maximum residue limits. Although it should be noted that the EU has set maximum residue limits for veterinary drugs in products of animal origin, while they have not yet established limits for pesticide residues in fishery products. So, in that case, a default value of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ is considered. Consequently, it is considered highly beneficial to include a specific clean-up sorbent, such as EMR-Lipid, into the QuEChERS methodology instead of classical sorbents, such as PSA and C_{18} for analyzing fatty fish samples. Finally, the proposed method was applied to 20 salmon samples, in which pesticide or drug residues were found in 5 of them. Some notable findings were obtained, such as the presence of metronidazole, an unauthorized substance.

- The **fourth chapter** evaluated the efficiency of different sorbents, frequently used in the clean-up step for fatty matrices, for the determination of mycotoxins in nuts by UHPLC-ESI-MS/MS. The selected analytes were ochratoxin A and aflatoxins B1, B2, G1 and G2, whose $\text{Log } K_{ow}$ ranged from 0.4 to 4.4. Walnuts, the matrix selected for this study, contain 65% fat. For this reason, in other studies a strong matrix effect is frequently obtained. To solve this problem, after a solid-liquid extraction (SLE), 6 clean-up procedures specially designed for fatty matrices were studied in terms of matrix effect, cleanliness of the extract, co-extractives removal efficiency, and recovery. Some protocols were based on a d-SPE using EMR-Lipid, C_{18} , PSA or a silica-bound zirconium dioxide-based sorbent called Z-sep⁺. In

addition, an SPE protocol in pass-through mode consisting of HLB PRiME cartridges. Furthermore, another strategy based on conventional SPE but using Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) as sorbent, which were specially designed for the retention of the mycotoxins proposed in the study. However, it was detected that none of these clean-ups effectively reduced the strong matrix effect obtained in the SLE step and obtained appropriate recovery at the same time. Consequently, the addition of more steps would not be profitable in terms of time consumption, price and waste generation. As an alternative, the straightforward, economical, simple and fast approach of “Dilute-and-Shoot” was tested. It consisted of simple extraction followed by a dilution prior to its analysis. After testing 10 different dilution and pre-concentration factors, it was determined that the 1:100 dilution was the most convenient, so it was validated. Negligible or soft matrix effects were obtained for all analytes. In addition, LOQ below $1.9 \mu\text{g kg}^{-1}$, lower than the most restrictive EU limit for aflatoxins in nuts. The other parameters, such as recovery and precision, were also satisfactory. Finally, this methodology was applied to the analysis of 25 walnut samples. None of the studied mycotoxins was detected in these market samples.

- The **fifth chapter** proposed the determination of a family of highly volatile compounds called BTEX, benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (ortho-, meta- and para- xylene) in virgin olive oil. For that purpose, the headspace extraction technique was used as a sample treatment followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (HS-GC-MS). The novelty of this work is the evaluation of the potential of the soft ionization source based on a miniaturized discharge design called “controlled-atmosphere flexible microtube plasma” (CA-F μ TP) for BTEX determination. In addition, the proposed ionization source was compared with the electronic impact (EI) ionization source. The use of CA-F μ TP is an

advantageous alternative because an intense fragmentation is not observed, and also it offers an adequate sensitivity for these monoaromatic compounds. The spectrum obtained shows the nitrosated ion $[M+NO]^+$ as the most abundant species. Therefore, the identification of BTEX could be considered more selective. Finally, the potential of the GC-CA-F μ TP-MS system for the detection of BTEX was applied in the analysis of olive oil and obtained matrix effect was negligible or soft for all the studied analytes. The LOQs using CA-F μ TP were below $1.0 \mu\text{g kg}^{-1}$, which indicates that its sensitivity is equivalent to that obtained by EI. Recovery and precision also presented satisfactory results. Finally, 10 olive oil samples were analyzed, detecting traces of benzene and toluene in one sample without exceeding the maximum recommended limit.

OBJETIVOS



El principal objetivo que persigue esta tesis doctoral es la evaluación de diferentes aproximaciones para minimizar el fuerte efecto matriz que normalmente se obtiene en el análisis de residuos y contaminantes en matrices con un alto contenido graso.

El efecto matriz aparece fundamentalmente debido a compuestos que interfieren en el proceso de ionización de los analitos. Es un inconveniente que se ve magnificado en el análisis de matrices grasas, debido a que son matrices complejas que contienen muchas especies que pueden ser co-extraídas, y por tanto, co-eluir con los analitos y afectar a su ionización. El efecto matriz influye en todo el proceso analítico ya que genera una alteración de sensibilidad, robustez, precisión, selectividad y veracidad. En cuanto a los analitos seleccionados para este trabajo, se han estudiado plaguicidas, medicamentos de uso veterinario, micotoxinas e hidrocarburos aromáticos monocíclicos (BTEX: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos) más relevantes y asociados cada una de las matrices grasas a determinar.

Por tanto, los objetivos principales que se persiguen en esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Desarrollar metodologías que cumplan con la legislación europea para la detección y cuantificación de contaminantes y residuos mediante en la cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Se utilizará fundamentalmente la cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem empleando electrospray como fuente de ionización (UHPLC-ESI-MS/MS). En el caso de los BTEX, caracterizados por una alta volatilidad, se utilizará cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
2. Evaluar y mejorar los diferentes métodos de tratamiento de muestra con el objetivo de minimizar el efecto matriz en matrices de alto contenido graso. Para ello se incluirán sorbentes altamente específicos para matrices grasas en la etapa de limpieza, posterior a la extracción de los analitos.

3. Evaluar la viabilidad de utilizar la metodología *Dilute-and-Shoot* para la reducción del efecto matriz y sus consecuencias en términos de sensibilidad para aplicaciones concretas. Este protocolo está basado en una simple dilución del extracto después de la etapa de extracción.
4. Evaluar fuentes de ionización alternativas que sean capaces de reducir el número de interferentes que compiten con el analito en el proceso de ionización, con el objetivo de reducir el efecto matriz.

AIM OF THE THESIS



The main objective pursued by this PhD is the evaluation of different approaches to minimize the strong matrix effect typically obtained in the analysis of residues and contaminants in fatty matrices.

The matrix effect appears mainly due to compounds that interfere in the ionization process of the analytes. This drawback is magnified in fatty matrices analysis because they are complex matrices that contain many species that can be co-extracted. Therefore, they can co-elute with the analytes and affect in their ionization process. So, the matrix effect influences the entire analytical process since it affects sensitivity, robustness, precision, selectivity and veracity. Regarding the selection of the analytes for this work, the most relevant compounds associated with each of the fatty matrices have been studied. Thus, representative pesticides, veterinary drugs, mycotoxins and monocyclic aromatic hydrocarbons (BTEX: benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) were selected.

Therefore, the main objectives of this doctoral thesis are as follows:

1. To develop methods that fulfil the European regulation criteria for the identification and quantification of contaminants and residues by chromatography coupled mass spectrometry. The most employed instrumentation was the ultra-high performance liquid chromatography coupled tandem mass spectrometry using an electrospray ionization source (UHPLC-ESI-MS/MS). However, for the determination of BTEX, a group characterized by their high volatility, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) would be employed.
2. To evaluate and improve the different sample treatment procedures in order to minimize the matrix effect for fatty matrices. For that purpose, some sorbents specially designed for fatty matrices will be evaluated for the *clean-up* step after the extraction step of the analytes.

3. To evaluate the viability of using the Dilute-and-Shoot approach to reduce the matrix effect and its consequences in terms of sensitivity for specific applications. This protocol consists of a simple dilution of the extract after the extraction step.
4. To evaluate alternative ionization sources capable of reducing the number of interferences that compete with the analyte in the ionization process, with the aim of reducing the matrix effect.

INTRODUCCIÓN



1. SEGURIDAD ALIMENTARIA EN EL MARCO DE LA LEGISLACIÓN EUROPEA

El aumento de la población mundial y nuevos hábitos alimenticios hacen que la producción de alimentos sea cada vez mayor. Debido a esto, el cuidado de la alimentación se vuelve especialmente importante. Se debe hacer hincapié en la calidad de los productos que llegan al consumidor y en que éstos no contengan sustancias que puedan perjudicar su salud. En este contexto aparece la seguridad alimentaria (*Food Safety*), cuyo objetivo principal es asegurar que los alimentos sean inocuos, nutritivos, asequibles y sostenibles [1]. La seguridad alimentaria desempeña un papel clave en la protección de la salud humana y debe estar basada en una evidencia científica sólida para la formulación de políticas y reglamentos [2]. Este concepto de seguridad alimentaria corresponde al término en inglés "*Food Safety*", sin embargo, no debe confundirse con el concepto "*Food Security*", ya que su traducción sería la misma y suelen dar confusión entre los hispanohablantes [3]. "*Food Security*" hace referencia a la disponibilidad y abastecimiento suficiente de alimentos para todas las personas, independientemente de su entorno social y económico o del lugar del mundo en el que habiten. Además, esta disponibilidad o abastecimiento de alimentos deben cumplir con los criterios de establecidos por la seguridad alimentaria ("*Food Safety*") de inocuidad, salubridad y propiedades nutricionales adecuadas [3,4].

La información científica constituye la base de la política de seguridad alimentaria, la cual implica el seguimiento de una serie de rigurosas normas para proteger la salud del consumidor a lo largo de toda la cadena alimentaria, así como el fomento de buenas prácticas en el sector alimentario. Para ello, la Unión Europea (UE) cuenta con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés: *European Food Safety Authority*), que se encarga de la evaluación científica, objetiva e independiente de los riesgos relacionados con los alimentos. Su colaboración con

los gobiernos resulta muy importante, ya que su asesoramiento es la base para la legislación. También, se encarga de recopilar de datos y conocimientos científicos para su posterior divulgación. En la UE, los alimentos deben cumplir unos requisitos para que se permita su comercialización, entre los que destacan no estar deteriorados o descompuestos, no contener sustancias nocivas que afecten a la salud del consumidor a corto y largo plazo ni tener posibles efectos tóxicos acumulativos [5]. Para ello, la UE ha establecido cuatro áreas fundamentales en las que focalizar la evaluación de la seguridad alimentaria [6]:

- **Higiene de los alimentos.** Implica la prevención sobre el peligro biológico de los alimentos (bacterias, virus, parásitos, priones, biotoxinas) a lo largo de todos los puntos de la cadena alimentaria. Debe evitarse la exposición del consumidor a este tipo de riesgo y asegurar la trazabilidad de los alimentos. Todos los operadores implicados en la producción, transformación, distribución y manipulación de alimentos deben cumplir procedimientos basados en los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC).
- **Salud animal.** Supone la prevención, vigilancia y control de las posibles enfermedades que puedan afectar a los animales. Establece controles sanitarios, tanto a las granjas como a los animales en libertad. Todos los movimientos de animales de granja dentro de la UE son monitoreados. Esto posibilita una trazabilidad en todo momento y la posibilidad de ejercer una acción de control inmediata en el caso de una posible expansión de una enfermedad y prevención de dicha expansión.
- **Salud vegetal.** Se basa en la detección y erradicación de plagas en una etapa temprana con el objetivo de evitar su propagación y asegurar semillas sanas. Es indispensable para obtener un sistema de agricultura sostenible, competitivo y para certificar que los productos de origen vegetal

procedentes de terceros países estén libres de enfermedades, especies invasoras y cualquier plaguicida no autorizado en la UE.

- **Riesgo químico.** Garantiza la protección del consumidor sobre el posible riesgo químico al que puede verse expuesto debido al consumo de alimentos. Para ello, los gobiernos deben establecer programas de monitoreo y control exhaustivo de sustancias nocivas que puedan encontrarse en los alimentos de forma natural, por el procesado, almacenamiento, distribución, manipulación o de cualquier otra manera. Existe una gran cantidad de sustancias que precisan ser vigiladas y limitar su presencia en la cadena alimentaria. Por lo que, para muchos de ellas se ha establecido un límite máximo aceptable, que, en el caso de ser superado en el alimento dado, exige la retirada del lote de dicho producto del mercado.

1.1. Riesgo químico

Los alimentos están compuestos de una gran variedad de compuestos químicos. Entre los que se encuentran los nutrientes, parte esencial de nuestra dieta, ya que muchos de ellos los humanos no somos capaces de obtenerlos de otra forma. Sin embargo, la producción alimentaria es extraordinariamente compleja y es posible que los alimentos contengan otras sustancias que puedan entrañar una serie de amenazas para la salud humana. Los productos de origen animal y vegetal presentan peligros intrínsecos a raíz de la posible contaminación microbiológica y química [7]. Además, otras sustancias químicas con propiedades toxicológicas pueden acabar involuntariamente en los alimentos, debido a la actividad humana. El ámbito más importante en la protección de la salud humana a través de los alimentos, es la evaluación del riesgo químico y medioambiental [7]. Para ello, la regulación se ha dividido según las diferentes vías por las que debe evaluarse el riesgo químico [8,9], las cuales se detallarán en los siguientes puntos de este apartado 1.1.

1.1.1. Aditivos alimentarios

Son compuestos añadidas intencionalmente a los alimentos en cualquier etapa de su producción, transporte, envasado o almacenamiento. Estas sustancias no se consumen como alimento en sí mismas ni se usan como ingredientes, su propósito es llevar a cabo una determinada función tecnológica en el alimento. Algunas de las diferentes funciones que desempeñan los aditivos en los alimentos son actuar como colorantes, edulcorantes, antioxidantes, conservantes, humectantes, antiaglomerantes, emulgentes, correctores de acidez, gases de envasado o potenciadores del sabor, entre otros [10]. En la UE todos los aditivos alimentarios se identifican con un número E y siempre deben de estar incluidos en las listas de ingredientes del alimento. Las etiquetas de los productos deben identificar la función del aditivo en el alimento terminado y la sustancia específica utilizada, ya sea haciendo referencia al número E apropiado o a su nombre [10,11]. La EFSA lleva a cabo evaluaciones de seguridad de los todos los aditivos alimentarios: información sobre las propiedades químicas y biológicas, toxicidad potencial y las estimaciones de la exposición alimentaria humana. Los aditivos alimentarios considerados seguros se recogen en el Reglamento (CE) N° 1333/2008, que establece cada uno de los compuestos que pueden ser utilizados en la UE y en qué concentraciones pueden estar presentes en algunos alimentos [9,10]. Por tanto, ninguna sustancia que no aparezca en dicho reglamento podrá ser utilizada como aditivo.

1.1.2. Aromas

Son sustancias que se añaden a los alimentos para dar o modificar su olor y/o sabor, las cuales no se utilizan como alimento en sí mismas. La legislación europea, en su Reglamento (CE) N° 1334/2008, distingue entre distintos tipos de aromas: sustancias y preparados aromatizantes, aromas naturales, aromas obtenidos mediante procedimientos térmicos, aromas de humo, precursores de aromas u otros aromas o mezclas de aromas [12]. La EFSA adopta regularmente opiniones

sobre cada grupo químico en las que evalúa la seguridad de las sustancias individuales mediante el análisis de los niveles de ingesta, su absorción, su metabolismo y su toxicidad. Por tanto, las sustancias aromatizantes que no den lugar a problemas de seguridad en sus niveles de ingesta diaria son las que se han incluido en el reglamento. No podrán comercializarse alimentos que contengan aromas que no figuren en el anexo I del Reglamento (CE) Nº 1334/2008; además, solo podrán añadirse a las categorías de alimentos mencionadas, en las condiciones de uso especificadas y deben presentar un correcto etiquetado. Algunos aromas están presentes de forma natural en los alimentos, debidos a procesos físicos de la materia prima. Para considerarse “natural” no debe haberse alterado intencionadamente la composición química de los componentes del aroma y solo podrá utilizarse cuando la fuente de aromas animal o vegetal se ha obtenido al menos en un 95% (p/p) a partir de la materia prima de que se trate. Estas sustancias identificadas de manera natural en los aromas (ej. cumarina o ácido cianhídrico), también están contempladas en el Reglamento (CE) Nº 1334/2008. Estas sustancias no deben añadirse tal cual a los alimentos y establece el contenido máximo de éstas, en niveles de mg kg^{-1} , en el alimento comercializado.

Por otra parte, los aromas de humo se regulan por separado del resto de los aromas, ya que consisten en mezclas complejas que incluyen sustancias no identificadas y que dan lugar a diferentes problemas de seguridad. El ahumado se usa tradicionalmente para ayudar a conservar ciertos alimentos como el pescado, la carne y los productos lácteos. Los aromatizantes de humo se producen mediante un proceso de pirólisis y cambian el sabor de los alimentos. En el anexo I del Reglamento (CE) Nº 2065/2003, se establece el contenido máximo de hidrocarburos policíclicos aromáticos [13]. Como alternativa al ahumado tradicional, diferentes aromas de humo son añadidos a los alimentos para darles el sabor ahumado. El Reglamento (UE) Nº 1321/2013 determina las sustancias autorizadas para este fin y sus niveles máximos en los distintos alimentos comercializados [14]. También

establece que, cuando se utilicen varios aromas de humo en un alimento, los niveles de cada uno se reducirán proporcionalmente.

1.1.3. Materiales en contacto con alimentos

Se incluyen todos los materiales y artículos destinados a entrar en contacto con alimentos, como envases y recipientes, utensilios y menaje de cocina. También tiene en cuenta los materiales en contacto con el agua destinada para consumo humano, como botellas, pero excluye los equipos fijos de suministro de agua públicos o privados. Así como, también están incluidos equipos de procesamiento (cafeteras, licuadoras o maquinaria de producción) y contenedores utilizados para el transporte de alimentos. Con lo cual, esta categoría engloba una gran variedad de materiales, incluyendo plásticos, papel, cartón, vidrio, cerámica, metal, silicona, madera e, incluso, las tintas. Estos materiales tienen una función muy importante, ya que facilitan el transporte, almacenamiento y manipulación de los alimentos, además de prolongar vida útil, higiene y fecha de caducidad. A pesar de estas ventajas, la seguridad de estos materiales en contacto con alimentos debe evaluarse, ya que los compuestos químicos pueden migrar de los materiales a los alimentos. El Reglamento (CE) N° 1935/2004 dicta que estos materiales no pueden liberar sus constituyentes a alimentos a niveles nocivos para la salud humana ni cambiar la composición, el sabor y el olor de los alimentos [15]. Además de la legislación general, existen reglamentos destinados a materiales específicos como:

- **Materiales activos e inteligentes.** Están destinados a mejorar la conservación y la vida útil de los alimentos. Están diseñados para incorporar intencionadamente componentes que liberarán o absorberán sustancias en el alimento envasado o en su entorno, por tanto, no son inertes [16]. Las normas específicas están contempladas en el Reglamento (CE) N° 450/2009, que prevé el establecimiento de una lista de sustancias permitidas para la fabricación de estos materiales.

- **Cerámica.** La Directiva 84/500/CE establece los niveles máximos de plomo y cadmio de materiales de cerámica destinados a estar en contacto con alimentos [17].
- **Película de celulosa regenerada.** Es una hoja delgada obtenida a partir de celulosa refinada procedente de madera o algodón no reciclados [18]. Sólo podrán utilizarse las sustancias contenidas en la Directiva 2007/42/CE; además, en él, se fijan las cantidades máximas autorizadas de ciertas sustancias utilizadas en la fabricación que pueden migrar al alimento (p. ej. mono- y di- etilenglicol, formaldehído o melamina).
- **Plásticos.** El Reglamento (UE) N° 10/2011 establece las normas sobre la composición del plástico en contacto con alimentos y detalla una lista de sustancias cuyo uso está permitido para la fabricación de estos plásticos [19]. Un punto muy importante de esta normativa es que fija los límites de migración específicos, esto es, la cantidad máxima que puede migrar a los alimentos de una sustancia permitida. Además, establece que la migración general a un alimento de todas las sustancias juntas no puede exceder el límite de migración general de 60 mg kg^{-1} de alimento o 10 mg dm^2 del material de contacto. También dicta qué elementos químicos no pueden estar presentes en la fabricación de plásticos y establece límites de migración específicos para los elementos permitidos. Existe un reglamento separado, para controlar los procesos de reciclaje de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, Reglamento (CE) N° 282/2008, ya que una vez que se han utilizado estos plásticos pueden haberse contaminado con otras sustancias [20].

1.1.4. Contaminantes

Son sustancias químicas que no se han añadido intencionadamente por el hombre a los alimentos o piensos. La exposición a estas sustancias puede entrañar efectos adversos y toxicológicos, con lo que suponen un riesgo para los consumidores. Para proteger la salud pública y mantener los contaminantes en niveles toxicológicamente aceptables, la UE ha fijado el contenido máximo de determinados contaminantes en los alimentos en el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 [21]. Estas concentraciones máximas establecen un nivel estricto teniendo en cuenta el riesgo relacionado con el consumo del alimento, pero siendo razonable y alcanzable siguiendo buenas prácticas agrícolas, pesqueras o de fabricación. Cada concentración límite de un contaminante está referida a un alimento o grupo de alimentos concreto, ya que no todos los alimentos están expuestos a los mismos tipos de sustancias. Existe un gran número de sustancias que pueden encontrarse como contaminantes. A continuación, se detallan las más relevantes ordenadas en función de las diferentes fuentes o causas por las que llegan a los alimentos [21,22]:

- **Origen natural.** Los compuestos tóxicos que se pueden encontrar forma natural y sin la acción del hombre en algunos alimentos. Pueden originarse en el propio alimento, debido a su naturaleza, las condiciones climáticas o la estación del año, o proceder de su entorno natural. Algunos ejemplos de contaminantes de origen natural son los que se detallan a continuación.
El nitrato es un compuesto natural que forma parte del ciclo del nitrógeno, desempeña un papel importante en la nutrición y el funcionamiento de las plantas. Los niveles más altos de nitrato se encuentran en hojas mientras que los niveles más bajos ocurren en semillas o tubérculos. La exposición humana se da principalmente debido al consumo de vegetales, sobre todo cultivos de hojas como la lechuga y la espinaca. El nitrato por sí mismo no presenta toxicidad, ya que la mayoría del nitrato ingerido es excretado. Sin embargo, una pequeña parte se adsorbe y recircula por el organismo

convertido en sus metabolitos o productos de reacción que pueden contribuir a la formación de nitrosaminas, las cuales son cancerígenas [23]. La presencia de nitratos es un factor poco controlable, ya que depende de las condiciones climáticas. Se establece una cantidad, en niveles de mg kg^{-1} de NO_3 , que no puede superarse a la hora de la comercialización de ciertos vegetales, como lechuga, espinaca, rúcula y en la alimentación infantil [21].

Por otra parte, se encuentra el ácido erúcido, un ácido graso omega-9 monoinsaturado, que está presente en aceites vegetales destinados a consumo humano. Ingresa a la cadena alimentaria cuando el aceite de colza se usa en el procesamiento industrial de alimentos y en la cocina casera en algunos países. Se considera un contaminante natural y está regulado por la UE [15]. Aunque no es un problema de seguridad para la mayoría de los consumidores, puede derivar en problemas cardíacos a largo plazo en niños de hasta 10 años [24].

Entre los contaminantes más peligrosos para la salud, se encuentran las micotoxinas. Son compuestos tóxicos producidos de forma natural por diferentes tipos de hongos, entre los que se podrían destacar los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* o *Alternaria* [25,26]. Las micotoxinas se encuentran en las plantas como resultado de la defensa de la propia planta después de una infección fúngica o pueden ser producidas por el propio hongo [27]. Estos hongos crecen cuando las condiciones ambientales, humedad y temperaturas cálidas, son favorables para su crecimiento [28]. Las micotoxinas entran en la cadena alimentaria como resultado de la infección de los cultivos en sus etapas de crecimiento o después de la cosecha, por unas incorrectas condiciones de almacenamiento, transporte o procesamiento, o, incluso, por el consumo de productos de origen animal en los que el propio animal hubiese consumido algún alimento contaminado [25,29]. Tienen un impacto muy negativo en la salud, con efectos que van

desde los inmediatos, como intoxicaciones, hasta efectos a largo plazo y crónicos, como trastornos gastrointestinales y renales, inmunodeficiencias o cáncer [30,31]. Las micotoxinas son compuestos extremadamente estables [30,31]. Resisten al calor y el procesamiento de los alimentos, de hecho, no pueden ser completamente destruidas mediante estos procesos, aunque su concentración puede reducirse ligeramente [32-34]. Su presencia en los alimentos está muy vigilada y controlada por las autoridades europeas, las cuales han establecido los niveles máximos, en niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$, que se toleran alimentos como cereales, frutos secos, especias, café o vino. Además, se debe tener en cuenta que su presencia está ampliamente extendida en los cultivos. De hecho, la FAO (por sus siglas en inglés *Food and Agriculture Organization*) estimó que en el 25% se encuentran micotoxinas. Afirmación que ha sido recientemente cuestionada y validada por Eskola y colaboradores [35]. Estos autores señalan que, gracias al desarrollo de técnicas analíticas más sensibles y específicas, en torno al 60-80% de cultivos pueden estar contaminados. Afirmación que se basa en los datos obtenidos de diversos estudios de monitoreo de contaminantes realizados por fuentes oficiales, entre las que se incluye la EFSA [26]. En este sentido, la EFSA alerta que los cócteles de micotoxinas suponen un riesgo más a tener en cuenta, ya que en los alimentos pueden encontrarse mezclas de micotoxinas cuyos efectos pueden actuar de forma acumulativa o en sinergia, provocando efectos distintos a los inicialmente estimados [26,29,33]. Las micotoxinas pueden sufrir modificaciones, como resultado de la interacción hongo-planta o durante el procesamiento del alimento [26]. Las formas modificadas son resultado de la conjugación de la forma nativa de la micotoxina junto con un grupo polar, sulfato, o moléculas de glucosa, o glutatión [27]. Las micotoxinas modificadas pueden liberarse, hidrolizarse, biotransformarse o absorberse en el tracto gastrointestinal, principalmente como compuesto original. Por lo que, en ausencia de información sobre la

toxicidad de las micotoxinas modificadas, ésta se estima como la toxicidad de la forma original del compuesto [27]. En consecuencia, los humanos y los animales están frecuentemente expuestos a más de una micotoxina simultáneamente, debido a las mezclas producidas por varias micotoxinas, ya sea la estructura nativa o las formas modificadas de éstas, metabolitos o productos de transformación. Se han identificado varios cientos de micotoxinas diferentes, pero las más comúnmente detectadas y que presentan una mayor preocupación para la salud humana y el ganado incluyen: aflatoxinas, ocratoxinas, patulina, fumonisinas, zearalenona y desoxinivalenol [25,29,36].

Los alcaloides de cornezuelo son un tipo de micotoxinas producidas por hongos del género *Claviceps*. Se ha comprobado que aparecen principalmente en alimentos elaborados a base de centeno y sus derivados, aunque también pueden aparecer en menor medida en otros cereales. Estos compuestos, tienen efectos cardiovasculares y vasoconstrictores con lo que pueden presentar riesgos para la salud humana, sobre todo en niños, los cuales son grandes consumidores de cereales [37]. Por ello, su contenido máximo en cereales, en niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$, se ha incluido en la última versión del Reglamento (CE) N° 1881/2006.

- **Contaminación accidental por otras especies durante la cosecha.** En el entorno de los cultivos pueden crecer inintencionadamente algunas especies diferentes a las cultivadas. Normalmente, y debido a los métodos rápidos de recolección mecánica, los productores no son capaces de detectar la contaminación de sus cultivos con semillas u hojas de otras especies que han podido crecer aleatoriamente en ese periodo. Incluso, muchas veces estas semillas u hojas de otras especies pueden ser visualmente muy parecidas al cultivo en cuestión, con lo que es muy difícil detectar una contaminación sin un análisis específico. En ocasiones, la contaminación

accidental de los alimentos por especies contaminantes durante la recolección puede poner en peligro la salud de los consumidores. Semillas y hojas de diferentes géneros de alcaloides, como los alcaloides tropánicos [38] y los alcaloides de pirrolizidina [39], que pueden tener efectos farmacológicos o carcinógenos respectivamente. Estos alcaloides han sido detectados como especies contaminantes de cereales, té e infusiones de hierbas, semillas y hojas de varios géneros de alcaloides. Por tanto, la concentración máxima, en $\mu\text{g kg}^{-1}$, de alcaloides tropánicos y alcaloides de pirrolizidina en esos alimentos, también han sido incluidos en las últimas modificaciones del Reglamento (CE) Nº 1881/2006 [21,40].

○ ***Contaminación debida a las etapas de procesamiento de los alimentos.***

Esta categoría engloba a los diferentes contaminantes que pueden originarse al ser sometidos a todas las etapas por las que pasan los alimentos hasta su consumo. Son debidos a los cambios químicos de los alimentos debido a los diferentes procesos de producción, procesamiento, transporte, almacenamiento y, hasta, el cocinado.

Un ejemplo podrían ser los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), compuestos químicos que se forman principalmente por combustión incompleta o descomposición de materia orgánica inducida por calor. La principal vía de contaminación de los alimentos pueden ser los procesos de ahumado, calentamiento y secado, en que los productos de la combustión están en contacto directo con estos [21], estos procesos pueden darse en la industria o en el propio cocinado del producto por parte del consumidor. Aunque en menor medida, también pueden provenir de fuentes ambientales, especialmente el pescado y los productos de la pesca, contaminados, por ejemplo, a raíz de los vertidos de hidrocarburos de los barcos [21]. Los PAHs son compuestos insolubles en agua, con lo que son altamente solubles en alimentos grasos, algunos de ellos son genotóxicos y

pueden causar cáncer. Hay varios cientos de PAHs, de los que el panel de la EFSA identificó 16 de ellos como prioritarios [41]. Como consecuencia, en el año 2011 se modificó el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 con el objetivo de incluir un indicador de los 4 PAHs más representativos y peligrosos en los alimentos, y no solo el benzo[a]pireno, como se venía haciendo hasta esa fecha [42]. Los cuatro compuestos que conforman este indicador son la suma de benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno y criseno. En la modificación de ese reglamento, se incluyen alimentos que normalmente se someten a procesos de ahumado como carnes y pescados, además de alimentos para niños de corta edad y alimentos grasos como los aceites. Cabe destacar que el aceite de coco tiene sus propios límites máximos en relación a otros aceites, debido a que contiene niveles más elevados de benzo[a]antraceno y criseno y el proceso de refinado no es capaz de eliminarlos tan fácilmente como el resto de PAHs. También se incluye alimentos derivados del cacao, muy consumidos por los niños, porque la manteca de cacao presenta contenidos más elevados de PAHs que otros aceites y grasas. Ello es debido, básicamente, a los métodos inadecuados de desecación de los granos de cacao y a que la manteca de cacao no puede refinarse como otros aceites y grasas vegetales [42].

Debido a que la regulación se rige por los avances científicos en las técnicas de detección de los contaminantes, en los últimos años, el número de sustancias a vigilar se ha incrementado. Un ejemplo de este tipo podría ser el control de acrilamida en los alimentos que está llevando a cabo la UE en la última década. La acrilamida es un compuesto orgánico que se puede formar al cocinar, tostar o procesar los productos ricos en almidón a temperaturas elevadas, siempre superiores a 120 °C, y con poca humedad [43]. Se forma principalmente en los alimentos por la reacción de la asparagina (un aminoácido) con azúcares reductores (particularmente

glucosa y fructosa) como parte de la reacción de Maillard. Una vez que fue detectada su presencia en los alimentos, se estudiaron sus posibles efectos adversos para la salud humana. Se concluyó que la presencia de acrilamida aumenta potencialmente el riesgo de desarrollar cáncer para los consumidores de todos los grupos de edad [44]. Esta sustancia se suele encontrar en alimentos a base de cereales, patatas, pan y café. Por ello, el Reglamento (UE) N° 2017/2158 ha establecido niveles de referencia de acrilamida, en alimentos como en galletas y productos a base de cereales para lactantes y niños de corta edad. Actualmente, se está considerando fijar niveles máximos de acrilamida en determinados alimentos complementarios a los expuestos en el Reglamento (UE) N° 2017/2158.

- **Contaminantes ambientales.** Los alimentos también pueden estar expuestos a una gran diversidad de compuestos químicos presentes en el medio ambiente (suelo, agua y/o atmósfera).

Muchas de estas sustancias están catalogadas como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), conocidos por sus siglas en inglés POPs (*Persistent Organic Pollutants*), debido a que son sustancias muy estables y tuvieron un uso muy generalizado, son bioacumulables en los seres vivos, difícilmente degradables y pueden transportarse a larga distancia, pudiendo llegar a regiones en las que nunca se hubieran utilizado. Entre los POPs se encuentran varios contaminantes industriales como las dioxinas y los bifenilos policlorados (PCBs). Debido a sus propiedades toxicológicas similares, a menudo se consideran juntos en el contexto de la salud pública. Las dioxinas hacen referencia a dos grupos de compuestos: dibenzo-p-dioxinas policloradas (PCDD) y dibenzofuranos (PCDF). Las dioxinas no tienen ningún uso tecnológico o de otro tipo; pero se generan en una serie de procesos térmicos e industriales como subproductos no deseados y, a menudo, inevitables [45]. Por otro lado, los PCBs sí tuvieron un uso

generalizado en numerosas aplicaciones industriales, debido a sus buenas propiedades térmicas y se produjeron en grandes cantidades durante varias décadas hasta su prohibición, utilizándose como aceites lubricantes, dieléctricos, resinas aislantes, pinturas, entre otros múltiples usos. Las dioxinas y los PCBs se encuentran en niveles bajos en muchos alimentos. Sin embargo, debido a su persistencia su bioacumulación en la cadena alimentaria, especialmente en alimentos grasos de origen animal, continúa causando algunos problemas de seguridad y exige su regulación en los alimentos [21]. Aunque no causan efectos en la salud de forma inmediata, se ha demostrado que la exposición a largo plazo a estas sustancias causa una variedad de efectos adversos en numerosos sistemas del cuerpo humano (nervioso, inmunológico, reproductor y endocrino), y también pueden causar cáncer [45].

Otro tipo de contaminantes ambientales muy extendido son los hidrocarburos aromáticos monocíclicos, concretamente el grupo formado por benceno, tolueno, etilbenceno, y o-, m- y p-xilenos. Debido a sus componentes este grupo se denomina BTEX, y está caracterizado porque sus compuestos tienen un bajo punto de ebullición con lo cual se encuentran en estado gaseoso a temperatura ambiente. La principal fuente de emisión de estos compuestos es la combustión del petróleo crudo y derivados, ya sea en procesos industriales o en el uso de medios de transporte. También son producidos sintéticamente a partir del carbón, el gas natural y la biomasa [46]. Están considerados como compuestos cancerígenos, y afectan principalmente a órganos como el hígado [46-48]. Como consecuencia de su alta volatilidad, se encuentran ampliamente extendidos en el medio ambiente, lo cual es la razón principal de su transferencia a los alimentos. Aunque también pueden llegar a estos a través de los lubricantes de las máquinas utilizadas durante la cosecha y la producción de alimentos,

aditivos y materiales en contacto con alimentos [46]. Además, su carácter lipofílico hace que sean encontrados en alimentos de alto contenido graso y es posible su transferencia a productos derivados de estos, como es el caso de los aceites [49]. En este contexto, la acumulación de BTEX en el aceite de oliva virgen extra puede ser especialmente cuantiosa, debido al carácter lipofílico de estos compuestos. Los procesos de refinamiento en la obtención de aceites reducen la presencia de BTEX en el producto final. Sin embargo, por las propias características del producto, en los aceites de oliva virgen no se permite el empleo de procesos de refinación para su obtención, con lo que la presencia de BTEX es mayor [50,51].

Las sustancias perfluoroalquiladas (PFAs) son compuestos químicos artificiales que se fabrican y utilizan en una variedad de industrias. Poseen alta estabilidad térmica, y algunos de ellos tienen propiedades tensioactivas y repelentes de agua o grasa [52]. Contienen unos de los enlaces químicos más fuertes, carbono-flúor, con lo que resisten a la degradación cuando se usan y se incorporan y se transportan fácilmente en el medio ambiente [52]. Esto hace que puedan introducirse en la cadena alimentaria. Además, una fuente muy importante, y que actualmente está en proceso de regulación, es su uso frecuente en materiales en contacto con alimentos. Ya que se ha demostrado que los PFAs pueden migrar a los alimentos y están asociados con enfermedades del sistema endocrino, reproductor e inmunitario, así como con el cáncer [53]. La EFSA recientemente ha declarado que la esta exposición se da sobre todo a través del consumo de agua, pescado, fruta y huevos. La presencia total de PFAs en el agua de consumo humano está limitada a $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ desde 2020 [54].

Por otra parte, los *metales* pueden estar presentes de forma natural en el agua, suelo y/o atmósfera. Por ello, pueden llegar a los alimentos. Sin embargo, gran cantidad de metales llegan a los alimentos como resultado

de actividades humanas como la agricultura, gases expulsados por las industrias y/o los coches o por la contaminación durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Los metales a los que más estamos expuestos debido a la alimentación son plomo, cadmio, mercurio, arsénico y estaño. Debido a que su acumulación en el cuerpo puede provocar efectos nocivos a largo plazo, la cantidad máxima de estos cinco metales está regulada a niveles de mg kg^{-1} en una amplia variedad de productos alimenticios, tanto de origen animal como vegetal [21].

1.1.5. Residuos

Los residuos son restos de sustancias activas que son añadidas durante las prácticas agrarias y ganaderas. Se emplean fundamentalmente para satisfacer la alta demanda de alimentos actual, debida al incremento de la población mundial y nuevos hábitos alimenticios. La principal diferencia entre los contaminantes y los residuos en los alimentos se debe a que los residuos se refieren a sustancias que sí han sido añadidas intencionadamente por el hombre. Cabe destacar que los residuos no son compuestos químicos añadidos directamente al producto de consumo final, sino que son sustancias activas que se administran a las plantas o animales en las etapas de producción.

Sin embargo, la utilización de estas sustancias conlleva una transferencia al producto de consumo final. No pueden ser eliminadas completamente del alimento. Aunque se encuentren en niveles de trazas, a largo plazo, estos principios activos pueden conllevar efectos adversos para la salud de los seres humanos [55]. Por ello, muchos de estos compuestos tienen establecido unos Límites Máximos de Residuo (MRL, por sus siglas en inglés: "*Maximum Residue Limits*"), es decir, el contenido máximo de dicha sustancia que puede contener un alimento para considerarse inocuos para el consumo humano y poder comercializarse [56]. Estos MRLs son límites legales y que en ningún caso pueden superarse, ya que podrían suponer un

riesgo para la salud humana. Además, en algunos casos, se refieren sustancias cuyo uso no está permitido, es decir, sustancias prohibidas. Existen dos grupos diferenciados de sustancias que pueden encontrarse como residuos en los alimentos:

- **Plaguicidas.** Son sustancias formuladas con el fin de prevenir, controlar, combatir o destruir alguna plaga a lo largo de las etapas de producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos. Incluye las sustancias utilizadas como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, inhibidores de la germinación, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte [56,57]. Los diferentes plaguicidas están destinados, en la mayoría de los casos, a luchar contra un organismo dañino o enfermedades de los cultivos, aunque también cubren productos como los biocidas. Por tanto, existen diferentes categorías dependiendo del fin que persiguen y su mecanismo de acción: herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, bactericidas, nematocidas, alguicidas, molusquicidas, reguladores de crecimiento, repelentes, roenticidas, avicidas y biocidas [55,58]. Además de la sustancia activa per se, también es necesario tener en cuenta los efectos de los posibles productos de transformación a los que den lugar los plaguicidas y/o metabolitos que puedan generarse tras su uso [59].

En el entorno agrícola, el uso de plaguicidas es una práctica muy extendida. La exposición a largo plazo a los plaguicidas podría producir efectos crónicos en la salud, como trastornos endocrinos, problemas reproductivos, efectos neurológicos o cáncer [55,57,58,60,61]. El empleo de plaguicidas no sólo está limitado a alimentos de origen vegetal, algunos insecticidas y acaricidas se emplean en ganadería [62,63], lo que hace que también se encuentren residuos en alimentos de origen animal [62,64,65]. Además, el ganado

puede estar expuesto a los plaguicidas por la inhalación de aire contaminado o a través de la ingesta de piensos, alimentos o parte del suelo que estén contaminados [66].

Por estas razones, los plaguicidas pueden entrar fácilmente en la cadena alimentaria y llegar al ser humano. La salud humana podría estar en peligro si no se siguen las buenas prácticas agrícolas (GAP, de las siglas en inglés *Good Agricultural Practices*), es decir, cuando se aplican dosis de plaguicidas más altas de las permitidas o de sustancias no autorizadas. Aunque las GAP reducen la cantidad de residuos de plaguicidas en los alimentos, los plaguicidas aplicados a los cultivos conllevan inevitablemente la presencia de estos residuos en el producto final [59,60]. Además, hay que tener en cuenta que los plaguicidas se introducen fácilmente en la cadena alimentaria debido a su transferencia al medio ambiente, los piensos de animales productores de alimentos y los productos de origen animal y vegetal destinados a consumo humano [55]. Por esto, es extremadamente necesario que las GAP y el control de residuos con el fin de que la cantidad de plaguicidas sea mínima. Si esto no se cumple, pueden darse la situación de que los alimentos contengan residuos de más de un plaguicida. Esto puede conllevar efectos nocivos en la salud difíciles de predecir ya que, hasta hace una década, en los test toxicológicos normalmente sólo se evaluaba un único principio activo [55]. Actualmente la EFSA incluye el riesgo acumulativo en sus informes anuales sobre residuos de plaguicidas en alimentos y, además, alerta de que la exposición a una combinación de plaguicidas puede aumentar los efectos toxicológicos debido a sus diferentes modos de acción o una posible superposición o combinación de sus efectos [60,67-69].

- **Medicamentos de uso veterinario.** Los residuos de medicamentos veterinarios se definen como “todas las sustancias farmacológicamente

activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate” [70]. Un medicamento de uso veterinario es cualquier sustancia aplicada o administrada a un animal destinado a la producción de alimentos [56]. El uso de medicamentos veterinarios es necesario para prevenir, combatir y evitar la extensión de enfermedades en los individuos de una granja. Dependiendo del microorganismo contra el que luchen los medicamentos veterinarios se pueden dividir en diferentes clases: antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos. A su vez, dentro de estas diferentes clases, pueden encontrarse diferentes familias, por ejemplo, benzimidazoles dentro de los antihelmínticos; o tetraciclinas, quinolonas, penicilinas, macrólidos, o cefalosporinas, dentro de la familia de los antibióticos.

Al igual que con los plaguicidas, el empleo de medicamentos veterinarios tiene una innegable parte positiva, debido a que los productos de origen animal están al alcance de mayor número de personas, con los beneficios que estos conllevan, como la mayor ingesta de proteínas y vitaminas como la B12. Sin embargo, la administración de medicamentos a animales destinados a la producción de alimentos puede dejar residuos de antimicrobianos en los productos que llegan a los consumidores. Sobre todo, si se administran cantidades sin la supervisión profesional y/o el tiempo de espera no es el adecuado como para asegurar que el alimento está libre de residuos. Por tanto, estos compuestos o sus metabolitos se están introduciendo en la cadena alimentaria, lo que puede aumentar el riesgo de los humanos a crear resistencia a medicamentos o a que se desarrollen reacciones alérgicas en individuos hipersensibles, además de que algunos de ellos pueden tener posibles efectos tóxicos o carcinogénicos [71,72]. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud ha alertado

de que una de las 10 mayores amenazas de la salud mundial es el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (RAM) [73,74]. La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antihelmínticos, antifúngicos, antivíricos, o antipalúdicos, por ejemplo). Esta resistencia aparece con el tiempo de forma natural y es debida a modificaciones genéticas; pero, el problema actual reside en que este proceso natural se está viendo acelerado por el mal uso de los antimicrobianos [73,74]. Como consecuencia, los medicamentos se están volviendo ineficaces y, por tanto, las infecciones van a ser más persistentes, lo que conlleva un aumento en el coste de la atención sanitaria y el número de personas para quienes el tratamiento esté fallando o que morirán a causa de la infección. Por tanto, será más arriesgado llevar a cabo procedimientos médicos como las intervenciones quirúrgicas, incluidas las cesáreas, las prótesis de cadera, la quimioterapia contra el cáncer y el trasplante de órganos [73,74]. En 2017, se publicó la primera lista de antibióticos requeridos con urgencia, 12 clases de patógenos prioritarios, algunos de ellos causantes de infecciones frecuentes como la neumonía o las infecciones en las vías urinarias, que son cada vez más resistentes a los antibióticos existentes y requieren con urgencia nuevos tratamientos. Es especialmente alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes y panresistentes (denominadas también superbacterias) que provocan infecciones que no pueden tratarse con los medicamentos antimicrobianos al uso, como los antibióticos. Ya que la mayoría de los fármacos que se están desarrollando son modificaciones de clases de antibióticos ya existentes, como nuevas generaciones de cefalosporinas y quinolonas. Por este motivo, las soluciones que ofrecen son solamente a corto plazo o incluso ya las terceras generaciones ofrecen una resistencia significativa [73,74].

Los vertidos de residuos y aguas tratados incorrectamente pueden liberar al medio ambiente antimicrobianos biológicamente activos, organismos resistentes a los antimicrobianos, antimicrobianos no metabolizados y productos que pueden causar resistencias a los antimicrobianos (por ejemplo, genes que confieren resistencia) [75]. Por lo que la principal estrategia para controlar esta propagación desde los sistemas de salud humana y la seguridad alimentaria es utilizar los antimicrobianos de forma responsable y sostenible en los seres humanos, los animales terrestres y acuáticos, y los cultivos y vegetales. Además, se deben aplicar medidas adecuadas para tratar y eliminar de forma segura los residuos. Dado que una parte fundamental del problema es que la RAM puede producirse por el consumo de alimentos de origen animal, se están tomando medidas como: la reducción del uso en animales enfermos de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica para el ser humano o la no administración de medicamentos a animales sanos para prevenir una enfermedad si esta no ha sido diagnosticada en otros animales o población de peces con los que comparten el mismo espacio [76].

1.2. Legislación sobre contaminantes y residuos

1.2.1. Micotoxinas

Para proteger la salud pública y mantener los contaminantes en niveles toxicológicamente aceptables, el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Este ha sido modificado en múltiples ocasiones debido al desarrollo de las técnicas analíticas, cada vez más sensibles, lo que ha podido proporcionar más evidencias científicas de sustancias presentes como contaminantes [77]. Sigue en constante actualización debido a que la Comisión Europea insta a las autoridades alimentarias nacionales,

las instituciones de investigación, el mundo académico, los explotadores de empresas alimentarias, entre otros, a que presenten datos sobre la presencia de contaminantes [78]. Los datos recopilados sobre la aparición de contaminantes en alimentos y piensos son la base sobre la que la EFSA redacta sus dictámenes.

Los niveles máximos de micotoxinas dependen del alimento en el que se encuentren y del compuesto concreto, vienen detallados en la **Tabla 1**. Cabe destacar que, debido a los peligrosos efectos a largo plazo, todas ellas están reguladas a niveles muy bajos, $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tabla 1. Niveles máximos permitidos de las micotoxinas legisladas en el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 [77].

Aflatoxinas (AFs)	
<i>Frutos secos, cereales y frutas desecadas</i>	AFB1 < 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ \sum AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 < 4 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Higos secos</i>	AFB1 < 6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ \sum AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 < 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Espicias, maíz y arroz</i>	AFB1 < 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ \sum AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 < 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Leche</i>	AFM1 < 0.050 $\mu\text{g kg}^{-1}$
<i>Alimentos para lactantes y niños de corta edad a base de cereales o de productos lácteos o alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales</i>	AFB1 < 0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ AFM1 < 0.025 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Ocratoxina A (OTA)	
<i>Cereales</i>	< 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ destinados a consumo humano < 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no elaborados < 8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ trigo sin gluten no destinado a venta directa
<i>Vino, zumo de uva y uvas pasas</i>	< 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ < 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ uvas pasas
<i>Espicias y regaliz</i>	entre 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ – 80 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en función de la matriz
<i>Café</i>	< 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ café tostado en grano o molido < 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ café soluble
<i>Alimentos para lactantes y niños de corta edad a base de cereales o de productos lácteos o alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales</i>	< 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Patulina	
<i>Productos sólidos elaborados con manzanas</i>	< 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Tabla 1. Niveles máximos permitidos de las micotoxinas legisladas en el Reglamento (CE) Nº 1881/2006 [77].

Zumos de frutas, sidra y bebidas espirituosas	< 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Alimentos infantiles que no contengan cereales	< 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Deoxinivalenol	
Pan y productos de panadería	< 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Pasta seca, cereales y harina de cereales	< 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Cereales no elaborados	< 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Alimentos para lactantes y niños de corta edad a base de cereales	< 0.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Zearalenona	
Pan y productos de panadería a base de maíz	< 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Aceite de maíz refinado	< 400 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Cereales y maíz no elaborado	< 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ consumo directo y harinas de cereales < 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ distintos del maíz
Alimentos para lactantes y niños de corta edad a base de cereales o a base de maíz	< 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Fumonisinias (suma de B1 y B2)	
Cereales para el desayuno a base de maíz	< 800 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Maíz	< 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ consumo directo < 4000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ no elaborado
Alimentos para lactantes y niños de corta edad a base de maíz	< 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Una vez mencionados los límites máximos aceptables de micotoxinas en los alimentos en la UE, cabe destacar que, al tratarse de concentraciones tan bajas, la UE ha establecido varias guías para enfocar su proceso analítico. En el reglamento (CE) Nº 401/2006, se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en alimentos [79]. En este reglamento, se especifican los requerimientos como valores recomendados para la recuperación de las distintas micotoxinas según el rango de concentración validado para el método. Por ejemplo, para AFs y OTA en niveles entre 1 y 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, la recuperación debe estar entre el 70 y 110%. Para el cálculo de la exactitud del método se debe tener en cuenta precisión y veracidad [80]. Cuando no se dispone de materiales de referencia certificados, la veracidad puede evaluarse en términos de recuperación

[80]. La precisión se medirá en torno a la repetibilidad (*intraday*) y la reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia o *interday*). Para el cálculo de la recuperación y la repetibilidad se deben fortificar al menos 18 muestras blancas, 6 muestras (réplicas experimentales) por cada uno de los siguientes niveles de concentración: 1, 1.5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido. Cada una de estas 6 réplicas experimentales por nivel de concentración se analizan una vez para el cálculo de la recuperación. Estas mismas 6 muestras se inyectan hasta 3 veces en la misma secuencia (réplicas instrumentales) para calcular la repetibilidad. Para calcular la reproducibilidad intralaboratorio se realizan 6 réplicas experimentales de cada uno de los niveles de concentración mencionados anteriormente en diferentes condiciones experimentales dentro del laboratorio, como pueden ser diferentes días, diferente número de lote de los materiales, diferentes condiciones ambientales, etc. De acuerdo a la Decisión de la Comisión 2002/657/EC, las micotoxinas que tengan como lo límites aceptables se encuentran entre 10 y 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ la precisión intralaboratorio no puede ser mayor del 20% de RSD. En el caso de las micotoxinas con límites entre 100 y 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ o superior a 1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, los valores de %RSD no superarán el 15 y 10% respectivamente. También se ha establecido la guía para el cálculo de los límites de detección (LODs) y límites de cuantificación (LOQs) de los contaminantes más peligrosos, como dioxinas y PCBs, PAHs, metales y micotoxinas [81].

Por último, la guía SANTE/12089/2016 [82], hace referencia a los criterios de identificación de micotoxinas y que complementa al reglamento (CE) N° 401/2006. En esta guía SANTE se establece que las técnicas de análisis recomendadas son cromatografía de líquidos de (ultra)elevada eficacia ((U)HPLC) y cromatografía de gases (GC) acopladas a detectores de espectrometría de masas (MS); mientras que los detectores de ultravioleta (UV) están desaconsejados por no tener la selectividad adecuada, aunque los detectores de fluorescencia sí pueden ser utilizados. Considerando el método cromatográfico, en los extractos procedentes de la

muestra se permite una desviación en los tiempos de retención (Rts) de ± 0.1 min respecto a los patrones en puros en disolvente. En el caso de patrones internos marcados isotópicamente con ^{13}C , la desviación en cuanto al Rt del estándar no puede superar los ± 0.05 min. En cuanto a los requerimientos relativos a la detección por MS se establece un número mínimo de iones identificados según el detector utilizado. En el caso de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), además se debe calcular la relación o *ion ratio*, procedente del inglés. Esta se define como el cociente entre el área del producto menos intenso (ion de confirmación) dividida entre el área del producto más intenso (ion de cuantificación). Una vez calculados los ratios de los iones, el ion ratio obtenido para cada extracto en matriz debe coincidir con el de un patrón estándar en disolvente al mismo nivel de concentración dentro de la misma secuencia, con un error relativo del $\pm 30\%$ [82]. Este criterio se aplica tanto a una muestra o en un extracto fortificado.

1.2.2. BTEX

La UE ya mostró su interés en su presencia en los alimentos, en especial el aceite de oliva, hace décadas [83]. Actualmente, la EFSA está preparando, y se prevé que publique a finales de 2022, una nueva opinión sobre la presencia en alimentos de hidrocarburos aromáticos de aceite mineral (MOAH). Dentro de este grupo se incluyen los hidrocarburos mono- y poli- aromáticos, entre los cuales se encontrarían los BTEX [84]. La UE recomienda reducir al mínimo la presencia de MOAH en los alimentos [46] y, en 2019, la EFSA ya alertó de la peligrosidad de estos contaminantes en grupos de riesgo como los bebés y niños [85]. Aunque actualmente no existe una legislación específica para BTEX existen niveles máximos recomendados de $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$ [47], que coinciden con los límites para MOAH que el comité PAFF (*Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed*) ha fijado recientemente en alimentos con efecto inmediato desde abril de 2022 [86]. Estos límites son diferentes y se establecen según el contenido graso del alimento [86]:

- 0.5 mg kg⁻¹ para alimentos bajos en grasa o aceite (\leq 4% grasa).
- 1 mg kg⁻¹ para alimentos con mayor contenido de grasa o aceite ($>$ 4% grasa).
- 2 mg kg⁻¹ para grasas y aceites.

1.2.3. Plaguicidas

Aunque las GAP reduzcan la cantidad de residuos de plaguicidas en los alimentos, inevitablemente, cuando éstos se aplican a los cultivos, entran en la cadena alimentaria, lo que conlleva su presencia en el producto de consumo final [59]. Para garantizar la seguridad de los consumidores, la presencia de residuos de plaguicidas está ampliamente reglada en la UE. Se han establecido MRLs en diferentes matrices: agua para consumo humano [87], alimentación infantil [88] y alimentos de origen vegetal y animal [89]. El agua es la mayor fuente de exposición a plaguicidas [60], por lo que los niveles máximos de éstos en agua de consumo humano son de los más restrictivos (0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ para un único plaguicida y 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la concentración total de plaguicidas en una muestra) [87]. El más amplio es el Reglamento (CE) N° 396/2005 [89], cuyo objetivo es cubrir la seguridad de todos los grupos de consumidores, abarca los plaguicidas utilizados actualmente o anteriormente en la agricultura dentro o fuera de la UE (alrededor de 1100 sustancias) [90]. Hasta 315 frutas, verduras y productos crudos de origen vegetal está regulados por este reglamento [89]. Además, también incluye matrices animales como carne, leche o huevos, aunque no se incluyen alimentos de origen animal como el pescado. En cambio, la legislación de EE.UU. sí contempla que los residuos de plaguicidas puedan llegar al medio acuático mediante la contaminación ambiental, con lo que existen MRLs de plaguicidas en pescado [91,92]. Los MRLs de plaguicidas están en continua revisión por las autoridades europeas desde que se elaboró la primera versión del reglamento en 2005. Dado la gran cantidad de combinaciones alimento-plaguicida que están reguladas, el vigente Reglamento (CE) N° 396/2005 consta de más de 3500 páginas; con el objetivo de simplificar la búsqueda, existe una base de datos

de libre acceso [93], donde aparecen las sustancias con cada uno de sus MRLs en los alimentos en los que están legisladas, y, si es el caso, cuál es el periodo de tiempo hasta el que estará vigente su uso. También se encuentran sustancias no aprobadas para su uso, ni que se debieran encontrar en los productos de consumo humano. Si un plaguicida no está específicamente mencionado, existe un MRL por defecto de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ en el alimento. El cumplimiento de estos MRLs está sometido a un control oficial en la UE, de modo que desde el año 2008 se regula de forma trianual qué alimentos de los 30 más consumidos se muestrearán para dicho control. Con estos datos, la EFSA publica un informe anual sobre residuos de plaguicidas en los alimentos en el que se detalla si las muestras analizadas se encuentran dentro de los límites permitidos y qué plaguicidas son los más encontrados en cada una de las matrices, así como el control del riesgo a la exposición a estas sustancias [94].

En cuanto a validación de métodos analíticos para la determinación de plaguicidas en alimentos, la UE tiene una de las legislaciones más rigurosas y se actualiza bianualmente [95]. La guía SANTE es la que establece los requisitos de validación de métodos y control de calidad analítico para comprobar el cumplimiento de MRLs. Esta guía garantiza la calidad y la comparabilidad de los resultados analíticos, que se logre una precisión aceptable, evita falsos positivos o falsos negativos. Su cumplimiento y la implementación específica se apoyan en la certificación por la norma ISO/IEC 17025. La guía SANTE establece que los métodos de análisis para la identificación y cuantificación de plaguicidas deben ser GC o (U)HPLC acoplados a MS, debido a que otros detectores no proporcionan una identificación inequívoca. Estos criterios para la identificación requieren que los Rts no se desvíen más de ± 0.1 min respecto a los patrones puros en disolvente usando GC o (U)HPLC. Además, la identificación se basa en la correcta selección de iones de la detección por MS. Los iones moleculares, las moléculas (de)protonadas o los iones aducto son muy característicos del analito y deben incluirse si es posible. Los iones con un valor de m/z alto son más selectivos que los iones con m/z por debajo de 100. Sin embargo,

los iones m/z de alta masa que surgen de la pérdida de agua o de fragmentos comunes pueden ser de poca utilidad. Aunque los iones procedentes de patrones isotópicos característicos, especialmente los que contienen Cl o Br, pueden ser particularmente útiles, los iones seleccionados no deben originarse exclusivamente en la misma parte de la molécula del analito. Además, siempre se debe tener en cuenta que los R_t s de los iones producto deben coincidir con el R_t de su ion precursor. Dado que existen diferentes tipos de analizadores, se establecen un número mínimo de iones identificados según el analizador utilizado. Para MS de baja resolución se requieren 3 iones y para experimentos en MS/MS 2 iones. Además, en MS/MS, las ratios de los iones producto en extracto en matriz deben coincidir con el de un patrón en disolvente con un error relativo del $\pm 30\%$. En análisis con alta resolución son necesarios dos iones, uno de los cuales un ion producto, con un error de masa relativo menor de 5 ppm. Además de los criterios de identificación, los métodos cuantitativos deben ser validados en términos de linealidad sensibilidad, LOQ, precisión, y recuperación. Ésta última deberá ser siempre evaluada a no ser que la técnica analítica no permita la recuperación, por ejemplo, extracción mediante espacio de cabeza. Por otra parte, la recuperación debe ser evaluada en el nivel de LOQ y/o MRL y, al menos, un nivel de 2 a 10 veces superior a éstos, además de realizarse al menos 5 réplicas y que tengan una RSDr menor al 20%. Algunos analitos cuya recuperación no esté en el rango 70-120% pero presenten unos valores de precisión consistentes ($\leq 20\%$) podrán ser tenidos en cuenta en el método de análisis cuantitativo, siempre y cuando la recuperación no sea menor de 30% y mayor de 140%. Cabe destacar que, en la última versión de la guía SANTE, se ha hecho más hincapié en el efecto matriz y se señala que debe ser corregido si es superior a $\pm 20\%$. A modo de resumen, los criterios de validación de los métodos para la cuantificación de plaguicidas según la guía SANTE 11312/2021 aparecen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros analíticos para la validación de métodos para la cuantificación de plaguicidas de acuerdo a la guía SANTE 11312/2021 [95].

Parámetro	Definición	Criterio
Linealidad	Al menos 5 puntos en las rectas de calibrado	$\leq \pm 20\%$ Desviación de concentraciones de la recta de calibrado con el valor real
LOQ	Valor más bajo de extracto fortificado que cumpla los criterios de identificación, recuperación y precisión	\leq MRL
Reporting Limit (RL)	Concentración más baja a la que los analitos se pueden determinar correctamente	$RL \geq LOQ$
Efecto Matriz	% de supresión o incremento entre un extracto de muestra fortificado y un estándar en disolvente a la misma concentración	$< \pm 20\%$ Debe ser corregido
Recuperación	$\frac{\text{Área pico muestra fortificada al inicio}}{\text{Área pico muestra fortificada al final}} \times 100$ Evaluada en el LOQ o MRL y un nivel 2-10 superior.	70 – 120 % $RSD_r \leq 20\%$ ($n \leq 5$)
Precisión (RSD_r) (repetibilidad, intraday)	% RSD de las muestras fortificadas al inicio	$\leq 20\%$ ($n \leq 5$)
Precisión (RSD_{WR}) (reproducibilidad intralaboratorio, interday)	% RSD de una muestra fortificada al inicio actuando como control (QC) en diferentes días y/o batches	$\leq 20\%$
Robustez (on-going quality control)	Vulnerabilidad de un método analítico a fluctuaciones de las condiciones experimentales QC a lo largo de los diferentes días y/o batches de análisis que cumplan los criterios de recuperación y precisión RSD_{WR}	On-going QC 70 – 120 % $RSD_{WR} < 20\%$

Tabla 2. Parámetros analíticos para la validación de métodos para la cuantificación de plaguicidas de acuerdo a la guía SANTE 11312/2021 [95].

Parámetro	Definición	Criterio
Selectividad	Capacidad del método de discernir el analito del resto de compuestos	Elegir iones m/z característicos del analito
Especificidad	Capacidad de detección inequívoca del analito $\frac{\text{Área } QC}{\text{Área blanco de matriz}}$	≤ 30% del RL
Veracidad (<i>truenes, bias</i>)	Concordancia entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y el valor de referencia aceptado $\text{valor experimental} - \text{valor real}$	Lo más próximo a 0
Exactitud (<i>Accuracy</i>)	Criterio que mide que el valor medio sea lo más parecido al valor real	Precisión + veracidad
Tiempo de retención	De la muestra respecto del patrón estándar puro en disolvente	± 0.1 min
<i>Ion ratio</i>	$\frac{\text{ion producto de confirmación } (q)}{\text{ion producto de cuantificación } (Q)}$ Comparación entre el <i>ion ratio</i> en matriz debe coincidir con un patrón estándar en disolvente	Error relativo del ±30%.

1.2.4. Medicamentos de uso veterinario

A pesar de la correcta utilización de los medicamentos por parte de los veterinarios profesionales en animales destinados a la alimentación humana, su administración es inevitable para aquellos individuos que estén enfermos. Los residuos de medicamentos de uso veterinario están regulados en la UE desde 1990 [70]. El Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión es el que está vigente en la actualidad y deroga el Reglamento (CEE) N° 2377/90, ordena los compuestos atendiendo

solamente a un orden alfabético, para simplificar la clasificación de las sustancias farmacológicamente activas que se usan como medicamentos veterinarios. Clasifica las sustancias en dos grupos: sustancias autorizadas y sustancias prohibidas [96]. Dentro de las sustancias autorizadas, se enumeran las sustancias en las que no es necesario restringir su uso y las que tienen establecido un MRL, para cada alimento y animal: grasa, músculo, piel, hígado, riñón, leche y huevos. Por último, aparecen las sustancias prohibidas para su uso en animales: cloranfenicol, clorpropamicina, colchicina, dapsona, dimetridazol, metronidazol, ronidazol y nitrofuranos. Con lo cual no se establece un MRL para estas sustancias ya que su concentración en los productos alimenticios de origen animal debe ser nula. En teoría debe ser cero para las sustancias prohibidas; pero como ese nivel no puede llegar a ser medido, el Reglamento (UE) 2019/1871 establece los valores de referencia (VRI) que oscilan entre $0.15 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el cloranfenicol y $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ para nitrofuranos y sus metabolitos [97]. Cabe destacar que, en este reglamento, no se encuentran reguladas las sustancias que causan un efecto hormonal, tireostático y sustancias con efecto anabolizante. Posteriormente, en la Directiva 96/23/CE del Consejo se establecieron las sustancias no autorizadas entre las que se encuentran esteroides, β -agonistas y agentes antitiroideos, entre otros [98]; además, prevé la detección de grupos de residuos según el tipo de animal. El Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo también pone de manifiesto que no se pueden utilizar otros medicamentos de uso veterinario que no estén recogidos en la legislación vigente [99]. Insiste también en que una sustancia farmacológicamente activa solo puede comercializarse y utilizarse en animales productores de alimentos si ha sido objeto de una evaluación favorable y que deben establecerse MRLs cuando se considere necesario para proteger la salud humana [99].

En lo relativo a los métodos de análisis, recientemente se ha elaborado el Reglamento (UE) N° 2021/808 [100]. Este reglamento sustituye a la Decisión de la Comisión 2002/657/CE [80] que tenía un ámbito de aplicación más amplio; mientras

que el nuevo reglamento está centrado exclusivamente en la determinación de residuos de sustancias farmacológicamente activas en alimentos de origen animal. Establece los criterios para cuantificar de manera inequívoca las sustancias en el nivel MRL en sustancias autorizadas y en el valor de referencia o en la concentración más baja razonable para las sustancias prohibidas. Para la cuantificación se deben utilizar técnicas separativas de LC o GC, aunque también pueden emplearse la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), siempre que el R_t o el tiempo de migración entre los extractos y el estándar puro en disolvente no superen ± 0.1 min. No serán adecuadas las técnicas separativas que no estén acopladas a un detector de MS, excepto para sustancias autorizadas en algunos casos podrán utilizarse detectores de diodos en serie (DAD) o fluorescencia. El error de masa relativo del analito en espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) no podrá ser menor de 5 ppm (o en el caso de $m/z < 200$, inferior a 1 mDa). El ion precursor será preferiblemente el ion molecular o molécula (de)protonada, los aductos característicos, los iones producto característicos o uno de sus iones del perfil isotópico. Para los iones producto, siempre que sea posible, se omitirán las transiciones no selectivas (el catión de tropilio o la pérdida de agua) y su abundancia se determinará a partir del área o la altura del pico. El *ion ratio* se expresa como porcentaje de la intensidad del ion producto más abundante y se determinará comparando espectros o integrando las señales de los cromatogramas de iones extraídos. Debe cumplirse que el ion ratio entre los extractos de matriz y el estándar puro en disolvente no se diferencien más de un $\pm 40\%$. Además, para la correcta detección de sustancias autorizadas y prohibidas, debe cumplirse que tengan mínimo 4 y 5 puntos de identificación respectivamente. Los puntos de identificación vienen detallados en la siguiente **Tabla 3**:

Tabla 3. Puntos de identificación por técnica para el análisis de medicamentos veterinarios de acuerdo al Reglamento (UE) 2021/808 [100].

Técnica	Puntos de identificación
Separación (GC, LC, SFC, CE)	1
Ion LR-MS	1
Ion producto LR-MS	1.5
Ion HR-MS	1.5
Ion producto HR-MS	2.5

Respecto a los siguientes parámetros de validación de métodos cuantitativos: linealidad, especificidad, recuperación y efecto matriz; los criterios adoptados por el Reglamento (UE) N° 2021/808 son equivalentes a los establecidos en la guía SANTE para plaguicidas (**Tabla 2**). En cuanto al cálculo de la precisión y la veracidad se deberán analizar un mínimo de 6 alícuotas de muestra blanca fortificada a diferentes niveles. Los valores aceptables de RSD de precisión se encuentran entre el 22-25% para niveles de concentración en muestra de 1000 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, por debajo de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ la RSD podrá ser de hasta el 30%. Dependiendo de la sustancia de la que se trate, los niveles de fortificación para los cálculos de precisión y veracidad pueden ser:

- **Sustancias autorizadas.**
 - MRL.
 - 1.5 veces el MRL.
 - La concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0.1 y 0.5 veces el MRL.
- **Sustancias prohibidas.**
 - Con VRI establecido (nivel mínimo que puede llegar a ser medido):
 - VRI.

- 1.5 veces el VRI.
- La concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0.5 y 1 veces el VRI.
- Sin VRI establecido:
 - Nivel mínimo de calibrado (NMC).
 - 2 x NMC.
 - 3 x NMC.

Además, el Reglamento UE 2021/808 no establece niveles de LODs o LOQs, sino que se emplean los términos: capacidad de detección del cribado ($CC\beta$) y límite de decisión para confirmación ($CC\alpha$).

El $CC\beta$ es el contenido mínimo de analito que puede ser cuantificado en una muestra. Se emplea únicamente para análisis de cribado. Para cálculo el $CC\beta$ se fortifican muestras blancas en la concentración del límite permitido (MRL, VRI o NMC) y por debajo de éste. Se seleccionando la mínima concentración que cumpla los criterios de identificación, la cual se denomina: concentración de cribado. Después se calcula el $CC\beta$ que es igual a la concentración de cribado más 1.64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de la concentración de cribado.

$$CC\beta = [\text{concentración de cribado}] + 1.64 \times \sigma_{\text{concentración de cribado}}$$

Cuando se sospecha que hay un resultado no conforme respecto a la concentración mínima que puede cuantificarse ($CC\beta$), o simplemente se pretende hacer un análisis cuantitativo que confirme inequívocamente la presencia del residuo se utiliza el $CC\alpha$ (límite de decisión para confirmación).

El $CC\alpha$ es el límite a partir del cual se puede concluir que una muestra ha superado el límite permitido, es decir, no es conforme a la regulación europea. En el caso de sustancias farmacológicamente activas prohibidas, el error α será igual o inferior al

1 %. Para todas las demás sustancias, el error α será igual o inferior al 5 %. El límite de decisión para confirmación se calcula de la siguiente forma:

$$CC\alpha = [\text{concentración en el límite}] + k \times \sigma_{\text{concentración en el límite}}$$

Donde:

- **[concentración en el límite]**
 - Hace referencia a la concentración en el MRL o en el nivel más bajo del calibrado (NMC) para sustancias autorizadas y en el VRI o NMC para sustancias prohibidas.
- ***k***
 - Es el factor de cobertura.
 - Para sustancias autorizadas: $k = 1.64$
 - Para sustancias prohibidas: $k = 2.33$
- **$\sigma_{\text{concentración en el límite}}$**
 - La desviación estándar se refiere a la concentración en el límite en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio.

El resultado del análisis de una muestra se considerará no conforme a la legislación cuando sea igual o superior a la concentración $CC\alpha$.

2. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES Y RESIDUOS EN ALIMENTOS

2.1. Fundamentos

2.1.1. Técnicas cromatográficas

El término cromatografía fue usado por primera vez en 1906 y derivaba de dos palabras griegas: *chroma* (color) y *graphein* (escritura) [101]. La cromatografía es un método físico de separación de especies de una mezcla en la cual las diferentes moléculas se distribuyen según su afinidad entre dos fases inmiscibles, la fase estacionaria y la fase móvil [102]. Dichas fases son las partes más importantes de un sistema cromatográfico y son responsables de la separación de los compuestos. La fase estacionaria se encuentra en una columna y la fase móvil es un fluido (líquido, gas o fluido supercrítico) que está constantemente pasando por la columna en una dirección determinada [103]. La velocidad de cada uno de los componentes dentro de la columna es función de su distribución entre las dos fases que permanecen en equilibrio. Los compuestos con una mayor afinidad con la fase estacionaria se mueven más lentamente que los componentes que poseen una mayor afinidad para la fase móvil. Esta afinidad de los compuestos entre una fase u otra se debe fundamentalmente a su estructura y propiedades químicas [103]. En casos extremos, los analitos que posean una afinidad total para la fase móvil y no interactuarán con la fase estacionaria, no se separarán y llegarán muy rápido y al mismo tiempo al detector. Por el contrario, los analitos que interactúen fuertemente con la fase estacionaria, quedarán retenidos en la columna, sin salir de ella, ya que no interactuarán con la fase móvil. Idealmente, los casos extremos no se darán y cada analito se moverá a una velocidad determinada y distinta de los demás, con lo que se consigue la separación de los componentes de la muestra. El tiempo que tarda en salir cada analito de la columna se denomina tiempo de

retención. Es característico de cada componente de la mezcla y será reproducible siempre que el análisis se haga bajo las mismas condiciones.

2.1.1.1 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación de las especies según sus diferentes afinidades entre la fase estacionaria y una fase móvil en estado gaseoso, denominada gas portador, la cual debe ser inerte (normalmente los más utilizados son Ar, He, N₂ y H₂) [103,104].

Los compuestos analizados por GC deben cumplir una serie de características. En primer lugar, y la más importante, es que los analitos deben estar en fase gaseosa, lo cual implica que deben ser, o poder transformarse en especies volátiles. Además, los analitos deben ser térmicamente estables. Es necesario que su estructura no varíe a pesar de altas temperaturas de separación utilizadas. Por último, los compuestos deben tener una baja polaridad [103].

Si bien es cierto que es imprescindible que los analitos estén en estado gaseoso para ser analizados por GC, aparte de muestras gaseosas, se pueden analizar muestras en estado líquido o sólido. Mediante la técnica de espacio de cabeza (o *headspace*, por sus siglas en inglés), en la cual se establece un equilibrio sólido o líquido/vapor y se inyecta la fase gaseosa en el cromatógrafo, se pueden analizar los compuestos volátiles de muestras sólidas o líquidas. A veces, también es posible analizar muestras en estado sólido mediante la conversión de ciertas sustancias en otras más volátiles gracias a procesos de pirólisis, en los que se calienta la muestra hasta su descomposición y se analiza la fracción gaseosa generada. Por otra parte, las muestras también pueden ser inyectadas en estado líquido. Los analitos pueden estar contenidos en un disolvente, tras un proceso de tratamiento de muestra. Es importante que el disolvente elegido tenga bajo punto de ebullición que se convierta rápidamente en gas en el portal de inyección [104,105].

Algunos analitos no son lo suficientemente volátiles para poder ser analizados por GC, pero existen diferentes estrategias para hacer posible este análisis. Una de las

más comunes es la derivatización de los compuestos. Ésta consiste en realizar una reacción química que posibilite la transformación de los analitos en otras especies que puedan ser separadas y detectadas de manera más eficaz, por ejemplo, obteniéndose productos que tengan un menor punto de ebullición o estabilizando compuestos termolábiles [104].

Por último, una parte muy importante en el análisis por GC es la programación de la temperatura. Existen dos modos: isotérmico (temperatura constante durante todo el análisis) y en gradiente de temperatura (aumento de la temperatura a lo largo del tiempo de análisis). El modo en gradiente se emplea para mejorar la separación y modificar la velocidad del análisis. A mayor temperatura de la columna, aumenta la presión de vapor de los analitos, con lo que crece su tendencia a pasar a fase gaseosa. Lo que da como resultado una disminución de los tiempos de retención ya que los analitos se desplazan por la columna a mayor velocidad a la que lo harían en modo isotérmico [103,104]. Además, en compuestos con alto peso molecular, la forma de pico mejora ya que se obtienen picos más estrechos. En el caso de muestras complejas, la programación de temperatura se utiliza para modular la separación de los compuestos con gran variedad de puntos de ebullición [104].

2.1.1.2 Cromatografía líquida

En la cromatografía líquida (LC), los compuestos también son separados debido a su afinidad entre las fases estacionaria y móvil. La separación se debe, en gran medida, a la diferencia entre la polaridad relativa de cada uno de sus componentes de la muestra con respecto a las fases cromatográficas. Por tanto, el conocimiento de las polaridades, tanto de los analitos como de las fases móvil y estacionaria, son esenciales para lograr una separación adecuada [103]. La cromatografía de líquidos tradicional se caracteriza por ser una técnica de separación en la que la elución se realiza por gravedad y, normalmente, tiene fines preparativos. Por el contrario, y gracias a la automatización de la técnica y las características de la fase estacionaria, la cromatografía líquida de elevada eficacia (HPLC, del inglés *high performance liquid*

chromatography) es capaz de operar a altas presiones (50-350 bar) para realizar la separación de la mezcla [101]. Esto se consigue gracias a la utilización de una o varias bombas que proporcionan un flujo estable de fase móvil y una reducción en el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. La muestra también debe ser introducida en estado líquido.

En LC, la fase estacionaria consiste en partículas (sólidas o porosas) en estado sólido o líquido que están inmobilizadas o adheridas en las paredes de una columna [101]. Cuando la fase estacionaria es un líquido, debe estar adherido sobre un sólido que puede actuar o no en el mecanismo de separación [103]. Las dimensiones de las columnas de HPLC hacen referencia a la longitud y diámetro de la columna y el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Así, normalmente las dimensiones utilizadas en HPLC varían entre 30-250 mm de longitud, un diámetro interno de 2.1-4.6 mm y un tamaño de partícula de 2 a 5 μm . Existen dos diferentes empaquetamientos de las partículas de fase estacionaria. Por un lado, las partículas totalmente porosas o partículas con un núcleo sólido y recubiertas de una capa porosa (*core-shell*). El empaquetamiento tipo *core-shell* crea una capa porosa homogénea y resistente sobre el núcleo sólido. En comparación con las partículas totalmente porosas, se obtiene un menor ensanchamiento de banda, con lo que aumenta la resolución de los picos.

Por otra parte, como su nombre indica, la fase móvil es un disolvente, o mezcla de varios, en estado líquido. Normalmente se utilizan dos disolventes de distinta polaridad para controlar la salida de la fase estacionaria de los analitos, para ello se pueden utilizar dos diferentes modos de elución. En el modo isocrático, la composición de la fase permanece constante durante todo el tiempo de análisis. Por el contrario, en el modo de elución en gradiente, la composición de la fase móvil va cambiando a lo largo del análisis, la fuerza de elución de la mezcla de disolventes va aumentando para lograr eluir los analitos más retenidos en la columna cromatográfica. Los mecanismos de separación en HPLC se basan en interacciones

dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno, intercambio iónico, o exclusión por tamaño. Existen varios modos en la cromatografía líquida, que aparecen ejemplificados en la **Tabla 4** [101,103]:

Tabla 4. Modos de separación en HPLC.

Abreviatura	Modo de LC	Fase estacionaria	Fase móvil	Analitos
NPLC	Cromatografía de fase normal	Polar (sílice enlazada a grupos amino, ciano, diol)	No polar (disolventes orgánicos: etanol, acetato de etilo, tetrahidrofurano, hexano)	Compuestos orgánicos no solubles en agua. Isómeros.
RPLC	Cromatografía de fase reversa	No polar (sílice enlazada a grupos fenilo, hidrocarburos)	Polar (agua, y disolventes orgánicos solubles en agua: acetonitrilo, metanol)	Moderadamente polares. Solubles en agua. Cargados.
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica	No polar (sílice enlazada a polares: grupos amino, amida, diol, zwitteriónicos)	Polar (disolventes orgánicos solubles en agua: acetonitrilo, etanol, metanol; y agua)	Altamente polares. Solubles en agua.
IEC	Cromatografía de intercambio iónico	Grupos cargados (anión o catión)	Soluciones tampón acuosas	Iónicos
SEC	Cromatografía de exclusión molecular	Gel de exclusión molecular Columna inerte	Disolventes acuosos u orgánicos	Moléculas de gran tamaño Separación en función del peso molecular

En los últimos 15 años los avances en cromatografía de líquidos han sido notables, la introducción de instrumentos de ultra elevada eficacia, UHPLC (*ultra-high performance liquid chromatography*), ha incrementado la sensibilidad y la velocidad en los análisis, así como la resolución de los picos cromatográficos. Estas mejoras han sido posibles gracias a que en la técnica UHPLC, a diferencia de HPLC, se utilizan columnas cromatográficas cuyas partículas de fase estacionaria tienen un tamaño inferior a 2 μm . Así, las presiones que soportan estos equipos, las cuales pueden llegar hasta los 1000 bar, son mayores también que en HPLC. La sensibilidad de los

análisis también aumenta debido a que se produce un menor ensanchamiento de banda durante la interacción de los analitos con las partículas de menor tamaño [101].

2.1.2. Espectrometría de masas como técnica de detección en métodos de separación cromatográfica

La separación cromatográfica es esencial a la hora de determinar contaminantes en alimentos. Pero, al ser una técnica separativa, necesita de un detector para poder identificar y cuantificar las sustancias. La identificación de los compuestos se lleva a cabo primeramente mediante la cromatografía, a través del tiempo de retención característico de cada analito. Sin embargo, esto no posibilita siempre la identificación inequívoca de la sustancia ya que podrían darse diversas situaciones:

- Elución de otros compuestos con el mismo tiempo de retención del analito, dando lugar a un falso positivo.
- Co-elución de sustancias interferentes junto con el analito, lo cual daría lugar a una modificación la intensidad de la señal.
- Dos compuestos de interés, analitos, con el mismo tiempo de retención imposibilitaría la diferenciación entre ambos.

Dichas situaciones pueden darse cuando el detector utilizado no es selectivo. Por tanto, no es una herramienta veraz a la hora de determinar si cierta sustancia potencialmente peligrosa está presente en el alimento analizado. Como ejemplo de este tipo de detectores, se podrían mencionar UV, fluorescencia (acoplados a LC) y de ionización de llama (acoplados a GC).

Teniendo esto en cuenta, uno de los grandes avances en las técnicas separativas fue su acoplamiento a la detección por espectrometría de masas. Esta técnica de identificación consiste en el estudio de iones en fase gaseosa a partir del analito, el cual se caracteriza de acuerdo con su relación masa/carga (m/z), su abundancia y/o

su fragmentación en iones característicos [103,106]. La MS no solo proporciona información estructural de la molécula, sino que también puede proporcionar el peso molecular y la composición elemental del analito [107]. Otra ventaja es su sensibilidad, se puede obtener la identificación a partir de cantidades de analito del orden de picogramos (pg). Además, puede utilizarse para proporcionar información cuantitativa, normalmente a niveles bajos, con gran exactitud, precisión y rapidez ya que los compuestos deben ser identificados conforme salen de la columna [107].

En un espectrómetro de masas se dan siempre una serie de procesos fundamentales. En primer lugar, es necesaria una fuente de ionización, capaz de generar los iones que seguidamente serán separados por su relación masa/carga en el analizador. En algunos instrumentos los iones separados por el primer analizador son fragmentados y dichos fragmentos son también separados por un segundo analizador (espectrometría de masas en tándem). Por último, es necesario un detector que sea capaz de medir la señal de los iones a la salida del analizador, medir su abundancia y convertirlo en una señal eléctrica [108]. Cabe destacar que el analizador y el detector se encuentran siempre en condiciones de alto vacío. Para alcanzar este valor se emplean varios tipos de bombas (rotatorias y turbobombas) [103]. El vacío es necesario para que los iones formados de ionización puedan llegar al analizador, ya que la distancia media que recorre un ion entre colisiones, denominado el camino libre medio, a presión atmosférica es de unos 10^{-8} m. Por tanto, es poco probable que los iones alcancen el detector en estas condiciones. Dado que el camino libre medio es inversamente proporcional a la presión, reducirla a 10^{-6} Torr aumentará el camino libre medio a alrededor de 10 m y, por lo tanto, permitirá que los iones lleguen al detector del espectrómetro de masas [109].

Los siguientes subapartados desarrollarán de los diferentes tipos de analizadores y fuentes de ionización empleados a lo largo de esta memoria. En la mayoría de los capítulos, se ha utilizado cromatografía de líquidos de ultra elevada eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS), empleando como

interfase una ionización por electrospray (ESI). Con el objetivo de enriquecer más la discusión de estos capítulos, se ha utilizado la espectrometría de masas de alta resolución, también una fuente de ionización por ESI para su acoplamiento con LC. En el capítulo 5, la técnica de separación empleada es la GC acoplada a un detector de baja resolución, trampa de iones, y utilizando como fuente de ionización suave basada en plasma de microtubo flexible en atmósfera controlada. En este capítulo, también se utilizó como la ionización por impacto electrónico ionización (EI por sus siglas en inglés: *Electron Impact*) la cual produce una ionización fuerte y, como consecuencia, una gran fragmentación.

2.1.2.1 Fuentes de ionización

Para el acoplamiento entre el cromatógrafo, tanto de líquidos como de gases, y el espectrómetro de masas es necesaria una interfase que logre transformar las moléculas procedentes de la salida del cromatógrafo en iones capaces de ser detectados por MS. Hay que tener en cuenta las diferentes características de la GC y LC, con procesos de ionización diferentes. En GC se producen iones a partir de un flujo de gas donde los analitos están evaporados. Sin embargo, en HPLC, durante el proceso de ionización es necesario evaporar la fase móvil, en estado líquido, y formar los iones.

Existen varias fuentes de ionización, y el uso de una u otra muchas veces depende de las propiedades del compuesto o de la muestra que se quiere analizar. Las fuentes de ionización pueden operar en condiciones de alto vacío (por ej. EI) o, por el contrario, operar a presión atmosférica. En la ionización por EI las muestras gaseosas y con alta presión de vapor se introducen directamente en la fuente; sin embargo, las líquidas y sólidas se suelen calentar para incrementar su presión de vapor y así poder realizar el análisis [108]. Por otra parte, entre las técnicas de ionización a presión atmosférica (API) más representativas se encuentran la ionización por ESI y la fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) [103,108]. Actualmente, estas técnicas de ionización basadas en plasma presentan

un gran auge y se han desarrollado varias fuentes de ionización como plasma de baja temperatura (LTP) o ionización de descarga de barrera dieléctrica (DBDI).

2.1.2.1.1 Fuentes de ionización acopladas a GC

La fuente de ionización por EI es la técnica más empleada tradicionalmente en el acoplamiento GC-MS, ya que ofrece una alta reproducibilidad y robustez, además, puede utilizarse para analizar una amplia gama de analitos con diferentes polaridades y pesos moleculares [110].

La EI es una técnica de ionización energética que opera a presiones de alto vacío. Esta fuente de ionización consiste en que las moléculas de analito en estado gaseoso colisionan con electrones de alta energía 70 eV. Al colisionar las moléculas con estos electrones energéticos, se produce su ionización y, dada la alta energía de los electrones, también se produce un gran número de fragmentaciones en la molécula. Aunque también se da el proceso más simple que es que el analito se ionice a través de la pérdida de un electrón. Como consecuencia se genera el denominado ion molecular, catión radical $[M^{+\bullet}]$, con una relación m/z que se corresponde con la masa nominal del compuesto. Aunque, en ocasiones la fragmentación es tan fuerte que no se llega a poder detectar el ion molecular, ya que este se fragmenta rápidamente obteniéndose fragmentos de iones de menor m/z . Dichos fragmentos, y el ion molecular si lo hubiese, originan lo que se denomina como patrón de fragmentación [108], el cual es espectro de masas obtenido tras la ionización por EI. El patrón de fragmentación depende de la estructura química y se aplica de forma rutinaria para identificar los analitos. Una de las mayores ventajas de la ionización por EI, es que el patrón de fragmentación es muy reproducible y característico de cada sustancia. Gracias a esto es posible identificar el compuesto mediante la comparación del espectro obtenido con bases de datos espectrales, aunque se empleen diferentes equipos [108,109].

Sin embargo, la identificación de ciertos compuestos cuyo patrón de fragmentación no sea específico, sea o no conocido, podría derivar en un proceso mucho más tedioso y menos sensible [111,112]. Como alternativa a esta alta fragmentación producida en EI, las fuentes que operan a presión atmosférica podrían solventar el problema. Las API son fuentes de ionización suaves, es decir, en los procesos de ionización se produce mucha menor fragmentación. El acoplamiento GC-MS más empleado normalmente, cuando se desea obtener una fragmentación suave, es mediante la fuente de ionización de APCI. La cual se basa en un proceso de ionización en el que interviene un calefactor y un potencial alto mediante un electrodo de descarga corona que ioniza el gas nebulizador formando un plasma, debido al cual las moléculas de la muestra se ionizan mediante procesos de transferencia de protones [103,108]. Como alternativa, las fuentes API basadas en plasma, como LTP y DBDI, han tenido un gran auge en los últimos años gracias a sus prometedoras características como alta sensibilidad, rápida velocidad de análisis y adecuada capacidad para detectar cualitativa y cuantitativamente analitos en una gran variedad de aplicaciones [113-115]. Considerando los niveles tan bajos a los que se encuentran legislados los residuos químicos en alimentos, la presencia de iones moleculares es claramente deseable. Sobre todo, en el caso de compuestos que coeluyan, en los que la detección de un compuesto podría ocultarse bajo el patrón de fragmentación de un compuesto de interferencia más abundante [116].

El DBDI podría considerarse como una de las fuentes de ionización basadas en plasma más representativas [117]. La Descarga de Barrera Dieléctrica (DBD) es un método de generación de plasma frío capaz de ionizar diferentes gases de trabajo (p. ej. helio, argón o aire) en un amplio rango de presiones. Es capaz de producir electrones de alta energía que darán lugar a átomos excitados que originarán iones positivos y negativos [118]. Está caracterizada por la presencia de una capa o barrera de material dieléctrico, que cubre por lo menos uno de los electrodos y que puede funcionar a presión atmosférica [117]. En la fuente de DBDI, la DBD se forma entre

dos electrodos anulares situados en la parte externa de un capilar de vidrio, el cual actúa como barrera dieléctrica, separando los electrodos del plasma generado. La fuente DBDI presenta distintos mecanismos de ionización, que incluyen la captura de electrones y la transferencia de protones [118].

Se han propuesto varias estrategias para aumentar la sensibilidad de estas fuentes como: qué gas se utiliza para generar el plasma, la distancia hasta la entrada del MS, la geometría o la utilización de una atmósfera controlada. Para una fuente de DBDI, Vogel y colaboradores demostraron en 2019 que un aumento significativo en la sensibilidad y, por lo tanto, la mejora de los límites de detección cuando se utilizaba una atmósfera controlada (CA, por sus siglas en inglés *Controlled Atmosphere*) [119]. Dentro de este estudio, se encontraron dos ventajas. La primera consistió en que la CA redujo significativamente el ruido químico en el espectrómetro de masas. La otra consistía en que la atmósfera se podía adaptar a una determinada clase de analitos, por lo tanto, podría manipular las vías de reacción química, lo que propiciaría el proceso de ionización deseado.

Por otro lado, Brandt y colaboradores presentaron un diseño de descarga miniaturizado llamado plasma de microtubo flexible (F μ TP) [120], un cambio de configuración en el diseño de su fuente DBDI. El F μ TP consiste en una descarga pequeña, fácil y segura de manejar. Por sus reducidas dimensiones y naturaleza flexible, puede incorporarse sin mayor esfuerzo a configuraciones existentes. A bajas concentraciones, el F μ TP aún produce una mayor eficiencia de ionización que otros métodos establecidos basados en plasma, como DBDI o LTP [120].

Para explicar las ventajas de esta nueva ionización sería mejor comenzar con las principales características de DBDI y F μ TP. Brevemente, el DBDI consiste en un capilar de vidrio y electrodos en forma de anillo ubicados a su alrededor, uno está puesto a tierra y el otro está alimentado por una alta tensión alterna. El plasma opera con un caudal de helio de 1 mL min⁻¹. Mientras que el F μ TP consiste en un

capilar de sílice fundida revestido instalado en una poliéter éter cetona (PEEK). Un alambre de tungsteno actúa como un electrodo de alto voltaje que se coloca en el capilar de sílice fundida. Por el contrario, no es necesario un electrodo conectado a tierra. El gas de plasma de helio fluye a través del capilar de sílice fundido y, por lo tanto, siempre está en contacto con el electrodo de alambre. De hecho, toda la superficie interna del tubo actúa como un “electrodo virtual”. Por tanto, la principal diferencia de la ionización que utiliza $F\mu TP$ es que no consta de un electrodo conectado a tierra a diferencia de una fuente DBDI.

Por lo tanto, las ventajas del uso del nuevo enfoque de fuente de ionización $F\mu TP$ descritas en 2020 por Vogel y colaboradores [116]:

- Mayor eficiencia de ionización incluso que las clásicas fuentes API de ionización suave basadas en plasma, LTP y DBDI. Con esta configuración, $F\mu TP$, los analitos observados están ligeramente fragmentados y, por tanto, identificados más fácilmente. Debido a la atmósfera controlada, se puede despreciar la influencia de la atmósfera circundante, lo que genera menos efectos de matriz en la medida.
- Reducción del consumo de Helio en 1 orden de magnitud, lo que conlleva una mejora en la seguridad en el manejo del dispositivo, ya que el electrodo de alto voltaje está completamente cubierto por el tubo.
- Posibilidad de implementarse fácilmente sin mayor esfuerzo para las configuraciones existentes (por ejemplo, LC, GC).

2.1.2.1.2 Fuentes de ionización acopladas a LC: Electrospray

Para realizar el acoplamiento entre el cromatógrafo de líquidos y el espectrómetro de masas es necesaria una fuente de ionización, ya que los compuestos salen de la columna en estado líquido y el equipo de masas trabaja con la muestra en estado gaseoso.

La fuente de ionización por ESI es la más extendida en la actualidad. Se caracteriza por realizarse a presión atmosférica y producir una ionización suave, la cual se basa en la producción de iones con muy poca fragmentación. Es capaz de ionizar moléculas no volátiles, térmicamente inestables, compuestos polares e, incluso, de masa elevada. Además, la fuente ESI se caracteriza por su alta sensibilidad y es apropiada para aplicaciones cuantitativas [103,108,109].

Esta técnica consiste en la aplicación de una diferencia de potencial en el terminal del capilar metálico que transporta la fase móvil y la entrada al espectrómetro de masas. Esta diferencia de potencial unida al gradiente de presión que se produce (ya que la ionización se produce a presión atmosférica pero el espectrómetro de masas trabaja en alto vacío para evitar colisiones entre las moléculas) son los encargados de que los iones formados entren en el MS [108].

El primer paso consiste en la formación de un cono de líquido (Cono de Taylor) en la punta del capilar que, debido a la acción de un gas de nebulización y de la diferencia de potencial aplicada, genera un spray de gotas cargadas. Generalmente, el gas que se emplea en las fuentes de ionización por ESI es N_2 . Seguidamente, un gas de secado es el encargado del proceso de desolvatación, es decir, de evaporar el disolvente de la fase móvil y los posibles aditivos que contenga, los cuales deben también ser volátiles. Por tanto, al evaporar parte del disolvente, las gotas disminuyen de tamaño. Esto hace que vaya aumentando la densidad de carga eléctrica dentro de la gota y, debido a la diferencia de potencial existente, los iones son atraídos hacia la superficie de la misma. Cuando las fuerzas de repulsión

electrostática de las cargas del mismo signo en la superficie de la gota son mayores que la tensión superficial que mantiene unidas las gotas en forma esférica (límite de Rayleigh), se produce la fisión de las gotas (explosiones de Coulomb) en otras más pequeñas. Estas seguirán sufriendo el mismo proceso sucesivamente hasta la formación de iones cargados, que son los que entrarán en el espectrómetro de masas [103,108,109]. Cabe destacar que el disolvente utilizado procede de la fase móvil de LC. En muchas ocasiones, esta fase móvil lleva unos aditivos que favorecen la ionización de los analitos. El uso de aditivos ácidos (ácido fórmico o acético), básicos (amoníaco) o disoluciones tampón (formiato o acetato de amonio) favorece la protonación o deprotonación de los analitos.

2.1.2.2 Analizadores

Una vez que los iones se han formado en la fuente de ionización, los analizadores de masas son los encargados de separarlos en función de su relación masa/carga (m/z). Existen diversos analizadores de masas, de forma que la separación m/z se rige según diferentes principios. Así los diferentes analizadores varían según su resolución, exactitud de masa, rango dinámico y capacidad de realizar experimentos de MS en tándem. Aunque cabe destacar que todos tienen en común que usan campos eléctricos y/o magnéticos que pueden ser estáticos o dinámicos [108].

- **Cuadrupolo (Q).** El analizador de cuadrupolo es un dispositivo que utiliza la estabilidad de las trayectorias en campos eléctricos oscilantes para separar iones de acuerdo con sus relaciones m/z [108]. Como su nombre indica, consiste en cuatro barras metálicas dispuestas en paralelo, conectadas dos a dos eléctricamente. Sobre estas barras se aplica un voltaje de compensación de corriente continua (DC) y un voltaje de radiofrecuencia (RF). Los iones producidos en la fuente de ionización se introducen en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de una diferencia de potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. Así, los iones describen una trayectoria que depende directamente de su

relación m/z . Además, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación m/z concreta que es dirigida hacia el detector. Los iones que presenten esa relación seguirán una trayectoria estable y avanzarán hacia el detector y el resto presentarán trayectorias no estables por lo que saldrán del cuadrupolo chocando con las barras metálicas.

El cuadrupolo se clasifica como un dispositivo de baja resolución, es decir, es capaz de medir la relación m/z de un ion al número entero más próximo y, por lo tanto, no puede proporcionar la composición elemental de un ion. Además, son instrumentos de relativo bajo coste, facilidad de uso y muy robustos [109].

- **Trampa de iones: QIT y LIT.** La trampa de iones cuadrupolar, normalmente denominada trampa de iones (IT), es básicamente un cuadrupolo en tres dimensiones [108,109]. Y, al igual que los analizadores de cuadrupolo, se trata de un analizador de baja resolución y de rápido escaneo.

Una IT es un dispositivo que utiliza un campo eléctrico oscilante para almacenar iones que funciona mediante el uso de un campo cuadrupolar de RF que atrapa iones en dos o tres dimensiones. Por ello, de forma análoga, existen las trampas de iones 2D o 3D, respectivamente. En ambas, el gas helio está presente para controlar la trayectoria de los iones dentro de la trampa y pueden llevar a cabo experimentos de MS^n [103].

El instrumento clásico era la trampa de iones 3D, la trampa de iones cuadrupolar (QIT). Ésta es capaz de confinar los iones en estado gaseoso durante periodos de tiempo relativamente largos a través de campos eléctricos cuadrupolares tridimensionales oscilantes. La QIT está formada por un electrodo anular (o circular) y un par de electrodos colectores, uno superior (de entrada) y otro inferior (de salida), los cuales crean el campo cuadrupolar 3D. El haz de iones penetra a través de la rejilla del electrodo

colector superior y los iones quedan confinados en el electrodo anular. Debido al campo cuadrupolar, los iones confinados siguen una trayectoria oscilante estable, la cual depende del movimiento exacto de cada ion a los voltajes aplicados y de su relación m/z . En el momento que se aplica un voltaje específico al electrodo de anillo, los iones con un valor m/z específico se transmitirán al detector. Se realiza un barrido de radiofrecuencias creciente, por tanto, al alterar el valor de tensión, se provoca la desestabilización resonante de los iones confinados, que abandonan la cavidad anular secuencialmente a través de la rejilla del electrodo colector inferior, en un orden de m/z creciente los iones pasan al detector.

Para solventar algunas limitaciones de la trampa de iones 3D se desarrollaron trampas de iones lineales (LIT), cuya geometría es más similar a los analizadores tipo cuadrupolo [108]. En la trampa de iones lineal, también conocida como trampa de iones 2D, un cuadrupolo de cuatro barras se utiliza para confinar los iones radialmente y usa un potencial eléctrico estático en los electrodos finales para confinar los iones axialmente. La ausencia del campo eléctrico cuadrupolar en la dirección axial asegura que se pierdan menos iones durante el proceso de llenado y vaciado de la trampa. Los iones quedan confinados a través de un campo de radiofrecuencia bidimensional, que proporciona el cuadrupolo. La diferencia fundamental de las trampas iones 2D respecto a las 3D QIT es que su mayor tamaño permite almacenar muchos más iones que un QIT [107,108]. Esta mayor capacidad de captura se combina con la capacidad de contener muchos más iones antes, lo cual se debe a que existe un menor efecto espacio-carga, ya que los iones son focalizados a lo largo de la línea central, en lugar de alrededor de un punto [108]; además de una velocidad de escaneo más rápida [107]. Todo esto hace que la sensibilidad de las LIT sea 10 veces superior que las QIT [108].

- **Tiempo de vuelo (TOF).** El analizador de tiempo de vuelo (del inglés “Time Of Flight”) se basa en la diferencia de velocidad que poseen los iones de distinta m/z para recorrer el tubo al aplicar un determinado voltaje en condiciones de alto vacío. Debido a esta diferencia de velocidad de los distintos iones para recorrer el mismo espacio, el tiempo en el que llegan al detector varía según su m/z .

El principio en el que se basa el analizador TOF, y por el cual los iones llegan en diferentes momentos al detector, es que los iones al aplicar un mismo voltaje poseen una misma energía cinética la cual está vinculada a la relación masa/carga de cada uno de los iones. Con lo que la velocidad está determinada por la ecuación de la energía cinética [103]: $E = \frac{1}{2} \cdot m/z \cdot v^2$. Debido a esto los iones con menor m/z (más ligeros) se desplazan a mayor velocidad que los que poseen mayor m/z (más pesados). La resolución de estos analizadores es mucho mayor que en los cuadrupolos. Se puede incrementar la resolución si se aumenta la longitud del tubo de vuelo, de manera que los iones necesiten más tiempo para desplazarse desde la fuente al detector. Esto se consigue utilizando espejos de iones, denominados reflectrones. Estos elementos también ayudan a corregir las pequeñas variaciones en la energía cinética de los iones, evitando el efecto que esto puede ocasionar en la resolución. Estos analizadores son instrumentos de escaneo muy rápido, limitados por el tiempo que tarde el ion más pesado en llegar al detector [103].

La ventaja principal del analizador TOF es su gran capacidad para diferenciar entre relaciones m/z muy próximas, es decir, su exactitud de masa. Son capaces de determinar hasta cuatro cifras decimales y con la posibilidad de obtenerse así una exactitud de masa relativa por debajo de los 2 ppm con una calibración adecuada [107]. La medida de masa exacta es muy útil para determinar la composición elemental de los iones padre y de sus

fragmentos, además de utilizarse para identificar especies desconocidas y para diferenciar entre compuestos isobáricos (dos compuestos diferentes con la misma masa nominal pero composición elemental diferente y, por lo tanto, masas exactas diferentes) [107].

2.1.2.3 Espectrometría de masas en tándem: triple cuadrupolo y modos de adquisición

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se caracteriza por emplear, como mínimo, dos etapas en el análisis. Consiste en descomponer los iones seleccionados (ion precursor) en sus fragmentos (iones producto), lo cual aporta una información valiosa sobre la estructura de la molécula y puede usarse con fines de cuantificación del analito. La espectrometría de masas en tándem puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: en el tiempo y en el espacio.

La MS/MS en el tiempo se caracteriza por sucederse una serie de procesos dentro del mismo analizador. Es un modo típico de analizadores de trampa de iones, ya que es capaz de almacenar el ion precursor seleccionado en la trampa y todos los demás iones se expulsan. A continuación, el ion seleccionado se activa y fragmenta. Después, los fragmentos se escanean para generar el espectro MS/MS o MS² del ion precursor. Siempre que haya suficientes iones disponibles en la trampa, este proceso puede extenderse reteniendo selectivamente uno de los iones del fragmento y repitiendo el proceso de fragmentación para generar el espectro MS/MS/MS o MS³ [121,122], este proceso puede repetirse hasta llegar a MSⁿ. Normalmente, con un ion aislado y fragmentado secuencialmente se podría llegar hasta MS⁷ o MS⁸ [123]. Aunque, se producen pérdidas mínimas de iones en cada paso del proceso; las limitaciones prácticas, como fragmentos de masa diminutos y fragmentos múltiples, son los que limitan el número de pasos que se pueden realizar [123].

Por otra parte, otra alternativa para realizar experimentos de MS/MS es la combinación de varios analizadores, lo cual incrementa la versatilidad de la detección, sensibilidad y selectividad [108,123]. Esta configuración se denomina MS/MS en el espacio, consiste en poner en serie varios analizadores, normalmente dos. El instrumento característico en de la espectrometría de masas en tándem es el triple cuadrupolo (QqQ). Éste está formado por 3 elementos: Q1, Q2 y Q3. Consta de dos analizadores de tipo cuadrupolo, Q1 y Q3. El otro elemento, Q2, no es un cuadrupolo propiamente dicho, es una celda de colisión. Lo más habitual es que la por la celda de colisión pase un gas inerte, por ejemplo Argón, que produce una disociación por colisión inducida (CID, de sus siglas en inglés: *Collision Induced Dissociation*) del ion seleccionado [103,108]. De nuevo, los experimentos de MS/MS se realizan filtrando la masa del ion precursor en el Q1, por lo que sólo los iones seleccionados llegarán a Q2 donde se aplicará una energía capaz de fragmentar el ion precursor. La energía aplicada en Q2 puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos y/o diferentes relaciones de intensidad entre ellos. Por último, los iones producto generados serán transmitidos a Q3, el cual podrá escanearlos todos o seleccionar masas de interés. Existen otras combinaciones de analizadores capaces de realizar experimentos MS/MS como por ejemplo Q-TOF y Q-Orbitrap [103,108]. Dichos analizadores híbridos tienen la misma configuración que un QqQ, pero en lugar de tener un cuadrupolo en Q3 tienen un analizador de alta resolución. Teniendo en cuenta la configuración de un analizador MS/MS y tomando como base el triple cuadrupolo, empleado mayormente en esta tesis doctoral; el analizador de triple cuadrupolo puede operar en los siguientes modos de adquisición [103,108,109,124,125]:

- **Precursor ion scan (Barrido de iones precursor).** Consiste en buscar todos los precursores que dan lugar a un ion producto de m/z específico. El detector registra señal si los iones transmitidos por Q1, al fragmentarse,

originan el producto monitorizado en Q3. Este experimento no se puede llevar a cabo en instrumentos de triple cuadrupolo, y no en otros instrumentos de MS/MS en el espacio ni en una trampa de iones.





- **Product ion scan (Barrido de iones producto).** Permite saber todos los iones producto en los que se fragmenta un determinado ion precursor. Se selecciona un ion con m/z específico en Q1, se fragmenta en Q2 y Q3 escanea todos los iones producto que son los que llegan al detector. Este modo de adquisición si puede utilizarse en todos los instrumentos de MS/MS.
- **Neutral loss scan (Barrido de pérdidas neutras).** Este modo selecciona todos los iones precursores m/z que tienen una pérdida de masa determinada, debida a la fragmentación. En este modo, Q1 y Q3 escanean de manera vinculada de una forma en que la diferencia de m/z entre Q1 y Q3 se corresponde con la masa de un fragmento neutro que se haya perdido en la fragmentación dentro Q2. Así, para una diferencia de masa x , cuando un ion de masa m , pasa por Q1, la detección ocurre si este ion ha producido un fragmento de ion de masa $(m - a)$ cuando sale de la celda de colisión. Este modo de adquisición es especialmente útil cuando se pretenden determinar analitos de la misma familia de compuestos, ya que, si comparten un grupo funcional y lo pierden en la celda de colisión, podrán detectarse fácilmente. Por ejemplo, en la ionización química, el ion molecular del alcohol pierde una molécula de agua. Por lo tanto, los alcoholes pueden detectarse seleccionando una pérdida de 18 unidades de masa.
- **Selected Reaction Monitoring ó Multiple Reaction Monitoring (Monitorización de transiciones MS/MS).** Los modos de adquisición modo *Selected Reaction Monitoring* (SRM) ó *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) se caracterizan por monitorizar transiciones precursor-producto. Ambos tienen en común la selección de un ion precursor m/z en Q1 y, una vez que

llegan a cámara de colisión (Q2) aplicar una determinada energía para que la CID produzca la fragmentación. La diferencia entre ambos modos se da en Q3. En el modo MRM, normalmente el más utilizado, se escanean múltiples iones producto a unas m/z seleccionadas. El incremento de la sensibilidad de esta técnica se debe al gran aumento de la selectividad en la detección del analito, ya que permiten descartar transiciones precursor-producto que interfieran en el análisis y enfocar en las transiciones más específicas de los compuestos de interés. Dado que la fragmentación está relacionada, hasta cierto punto, con la estructura del ion precursor, la probabilidad de que un compuesto de interferencia se fragmente de la misma manera que el analito de interés es significativamente menor y se reducen las posibilidades de obtener una respuesta de una interferencia. Aunque las intensidades absolutas de las disociaciones de MS-MS pueden ser menores que algunos de los procesos de fragmentación, la reducción asociada del ruido a menudo conduce a un aumento de la relación señal-ruido, por consiguiente, la reducción en los límites de detección.

- **Full scan (Adquisición del espectro completo).** Aunque el modo de adquisición en full scan es típico de los analizadores de alta resolución, los cuadrupolos también pueden funcionar escaneando todos los iones de la muestra inyectada, aunque con menor sensibilidad. Para este modo de adquisición, uno de los cuadrupolos, Q1 o Q3, escanea los iones m/z que provienen del sistema cromatográfico y que se han generado en la fuente de ionización. Como no se pretende la fragmentación de los iones, en este modo Q2 funciona simplemente como una celda de transmisión y no se aplica gas inerte que induzca a la fragmentación de los iones. El otro cuadrupolo que no se utiliza para el escaneo se utiliza también como celda de transmisión, al igual que Q2. Hay que destacar que en los instrumentos de triple cuadrupolo, el espectro obtenido mediante full scan no proporcionará una masa exacta ya que son analizadores de baja resolución.

En la **Tabla 5** aparecen esquematizados los modos de adquisición en los que puede operar un analizador de triple cuadrupolo. La nomenclatura adoptada es la propuesta por Schwartz, Wade, Enke y Cooks [125], en la cual los círculos negros representan que el Q1 o Q3 operan seleccionando la m/z del analito, y los círculos blancos que representan que actúa en modo de escaneo de todos los iones que llegan a ese cuadrupolo.

Tabla 5. Posibles modos de adquisición en un analizador triple cuadrupolo.

Modo	Q1	Q2	Q3	Nomenclatura [125]
<i>Precursor ion scan</i>	Escaneo	Fragmentación	Selección m/z	
<i>Product ion scan</i>	Selección m/z	Fragmentación	Escaneo	
<i>Neutral loss scan</i>	Escaneo	Fragmentación	Escaneo	
<i>Selected Reaction Monitoring (SRM) ó Multiple Reaction Monitoring (MRM)</i>	Selección m/z	Fragmentación	Selección m/z	
Full Scan Q1	Escaneo	Transmisión	Transmisión	—
Full Scan Q3	Transmisión	Transmisión	Escaneo	—

3. EFECTO MATRIZ

3.1. Definición

El análisis de contaminantes y residuos en matrices alimentarias es un análisis a nivel de trazas, ya que estos compuestos no pueden estar en grandes concentraciones en los alimentos. De hecho, normalmente, están regulados a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$. La sensibilidad y especificidad de las técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas es cada vez es mayor, lo cual están permitiendo la identificación y cuantificación de estas sustancias a niveles cada vez más bajos. Al alcanzarse una mayor sensibilidad, los analitos son más susceptibles a tener efecto matriz ya que una perturbación de la señal analítica es más acusada a esos niveles debido a las elevadas proporciones matriz-analito [126]. Como consecuencia, es necesario extremar las precauciones durante todo el proceso analítico, puesto que cualquier alteración tiene un efecto mucho mayor en el resultado final al trabajar con concentraciones tan bajas.

El efecto matriz es un problema que se da en la fuente de ionización [127] y puede definirse como una perturbación de la señal analítica, supresión o aumento, como consecuencia de la presencia de otros compuestos diferentes al analito. Es tan problemático debido a que afecta considerablemente al resto de parámetros analíticos como la sensibilidad, la exactitud y la precisión [128-132].

3.1.1. Causas

En 1993, Tang y Kebarle publicaron el primer estudio que detectó la reducción de señal en una fuente ESI. Observaron que compuestos básicos, es decir con alta afinidad de protones, pueden reducir la intensidad de la señal del analito, a través de procesos en fase gaseosa [133]. Posteriormente, Buhrman y colaboradores introdujeron el término supresión iónica y concluyeron que existía relación entre la

limpieza de los extractos y la intensidad de la señal. Llegando a la conclusión de que los compuestos de la matriz que permanecen en el extracto final y que coeluyen con el analito eran los causantes de la supresión iónica [134]. La teoría de Buhrman y colaboradores, al contrario que la de Tang y Kebarle, se basaba en procesos que tenían lugar en la fase líquida, previa a la evaporación del disolvente en el proceso de ionización por ESI.

En los años siguientes, otros autores demostraron que existen más procesos que también tienen lugar en la fuente de ionización y que pueden provocar la alteración de los resultados analíticos. Como ya se ha explicado en los dos primeros estudios [133,134], la supresión iónica puede darse dentro de la fuente de ionización en la fase líquida o en la fase gaseosa. King y colaboradores concluyeron que ocurren más procesos que propician el efecto matriz en la fase líquida que en la fase gaseosa [135]. Razón por la cual, el efecto matriz normalmente es más acusado en ESI [127,135-138]. Esto es debido a que la fuente ESI, los compuestos se ionizan en fase líquida (cuando aún se encuentran en las gotas cargadas), y, posteriormente, pasan a fase gaseosa. Por el contrario, en la fuente APCI, primeramente se evapora el disolvente mediante una corriente de gas caliente y los compuestos pasan a fase gaseosa en estado neutro. Una vez que el compuesto está en estado gaseoso, es cuando se produce la ionización química a través del plasma y es importante que los iones de analito formados en APCI sean estables [139]. Con esto en mente, los mecanismos que afectan al proceso de ionización en APCI y, por tanto, producen el efecto matriz, sólo pueden darse en fase gaseosa. Mientras que en ESI pueden darse en las dos fases, líquida y gaseosa. Aunque, esto no quiere decir que las fuentes de APCI estén exentas de efecto matriz [128,135,140-146], éste se produce con menor frecuencia en comparación con la fuente ESI. Además, los procesos que pueden ocurrir en fase líquida, están fundamentalmente provocados por otras especies que coeluyen con el analito. Pueden ser compuestos co-extraídos de la matriz u otras especies que se encuentren en el sistema, por ejemplo, aditivos de la fase móvil.

Existen mecanismos principales que provocan una alteración de la señal analítica en la fase líquida, es decir provocan efecto matriz, en el acoplamiento HPLC-ESI-MS:

- **Competición por las cargas disponibles en la superficie de las gotas.** La presencia de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, analitos o interferentes, que superen los 10^{-5} M en la muestra compiten por los espacios de disponibles en la superficie de las gotas cargadas [147]. Por encima de esa concentración la ionización no será eficiente, ya que representa el máximo de moléculas capaces de ser ionizadas por ESI [148]. Además, una elevada concentración de interferentes, sin estar en el límite máximo, puede aumentar la viscosidad y la tensión superficial de las gotas con lo que impiden que algunas moléculas de analito pasen a la fase gaseosa. Esto conlleva una reducción de la señal de analito [146,139,149]. Aparte de la concentración, existen otras propiedades, como la polaridad o la superficie activa, por las que algunos interferentes ocupan la limitada superficie de las gotas, provocando una reducción de fracción de analito ionizado [150,151].
- **Formación de pares iónicos con el analito.** Las especies coeluidas procedentes de la matriz, el extracto obtenido o los aditivos de las fases móviles, pueden formar pares iónicos con los iones ya formados de analito [135,141,146,148,149], lo que causa una reducción o alteración de la señal.
- **Sustancias no volátiles.** Sustancias no volátiles como los sulfatos o fosfatos son bien conocidas por causar supresión iónica [135]. Con lo que en el caso de la presencia de sustancias no volátiles en la matriz o en el extracto obtenido, éstas actuarán de la misma forma. Las especies no volátiles hacen que los iones de analito formados y que están contenidos en las gotas no sean capaces de pasar a fase gaseosa [135,139,146], por lo que ya las gotas

no pueden hacerse más pequeñas para llegar al tamaño en el que las repulsiones electrostáticas provoquen las explosiones de Coulomb [148].

Como conclusión, cualquier especie o proceso que pueda dar lugar a la aparición de efecto matriz debe ser solventado antes o durante la ionización [146].

En la actualidad, el efecto matriz es uno de los mayores problemas, sino el mayor, que puede encontrarse en los métodos de análisis cuantitativo mediante MS [152]. Afecta a todo el proceso de validación y, si no se tiene en cuenta, los resultados obtenidos no se considerarían fiables [128]. Originalmente, Matuszewski y colaboradores establecieron que el efecto matriz se debía únicamente a los compuestos procedentes de la matriz que coeluyeran con el analito. Sin embargo, el efecto matriz no debe centrarse solamente en las especies relativas a la muestra. Los interferentes pueden provenir de sustancias totalmente ajenas a la muestra, como se ha visto en el caso de los aditivos en la fase móvil. Otra fuente muy importante de interferentes es el tratamiento de muestra. El extracto final puede contener compuestos diferentes al analito que no estuvieran previamente en la matriz y que procedan de las diversas operaciones realizadas. Un ejemplo de este último caso podrían ser los restos de disolventes, sorbentes, sales y/o cualquier otro reactivo utilizado en el tratamiento de muestra e, incluso, sustancias desprendidas de los materiales utilizados, como polímeros, residuos de detergentes, ftalatos y otros plastificantes [130,139,142,152,161].

Con estas consideraciones, una definición más amplia del efecto matriz en el campo del análisis mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas podría ser la siguiente propuesta:

“El cambio de la señal instrumental del analito debido a compuestos co-eluyentes que influyen en el proceso de ionización, procedentes de sustancias contenidas en la muestra o con las que el analito haya estado en contacto hasta su entrada en la

fente de ionización, causado por los diversos reactivos y materiales utilizados en el tratamiento de muestra y en el análisis cromatográfico”.

3.1.2. Cálculo del efecto matriz

Dada la importancia del efecto matriz en el desarrollo y validación de métodos a niveles de trazas, en la actualidad no hay un consenso claro para su cálculo. Sin embargo, para que lo que sí que hay un consenso es que éste debe ser estimado, minimizado y, en la medida de lo posible, eliminado [153]. Desafortunadamente, su estimación varía mucho según las diferentes guías y reglamentos, nacionales e internacionales, para la validación de métodos [153-155]. De acuerdo con la revisión de Raposo y Barceló sobre 37 guías oficiales, solamente en 20 documentos se evaluaba el cálculo del efecto matriz, aunque sin un procedimiento común [154]. Esto supone una carencia muy notable teniendo en cuenta la gran influencia del efecto matriz en el correcto desarrollo en métodos analíticos para la cuantificación de residuos y contaminantes. Los autores consideran que, dentro de este desafortunado escenario, la guía SANTE para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos es la que ofrece una información más amplia respecto al efecto matriz [154]. En la versión más reciente de esta guía ya se propone una ecuación común para el cálculo del efecto matriz [95].

Por otra parte, en el campo de la investigación, sí se ha enfatizado sobre la importancia de la evaluación del efecto matriz en el proceso de validación, y han sido propuestas varias ecuaciones para el cálculo del efecto matriz [154]. Matuszewski, Constanzer, & Chavez-Eng establecieron una ecuación para poder calcularlo [127]. Los autores propusieron la siguiente ecuación para el cálculo del efecto matriz para cada analito:

$$ME(\%) = \frac{\text{Área de pico del extracto fortificado después del tratamiento de muestra}}{\text{Área de pico del estándar en disolvente}} \times 100$$

A día de hoy, esta ecuación sigue siendo ampliamente para la determinación del efecto matriz de residuos y contaminantes en matrices grasas [155-159]. La misma ecuación para el cálculo del efecto matriz puede utilizarse; pero, en lugar del uso de las áreas de pico se utilizan las pendientes de dos rectas de calibrado [160-164]. Se utiliza la pendiente de una recta de calibrado elaborada fortificando los extractos finales una vez terminado el tratamiento de muestra. Este tipo de recta de calibrado se denomina “*matrix-matched calibration curve*”, y es importante que se emplee una muestra en la que se haya verificado que no hay presencia de analitos. La pendiente de la recta *matrix-matched* se compara con la pendiente de una recta de calibrado en disolvente, se debe tener en cuenta que las concentraciones comparadas sean las mismas para las dos rectas. Por tanto, el cálculo del efecto matriz queda de la siguiente manera:

$$ME(\%) = \frac{\text{pendiente recta de calibrado matrix - matched}}{\text{pendiente recta de calibrado en disolvente}} \times 100$$

De acuerdo con la ecuación de Matuszewski y colaboradores, un 100% de efecto matriz correspondería a la señal de un analito que no está alterada respecto a la señal del estándar en disolvente. Si, por ejemplo, el resultado fuera un 80% de efecto matriz significaría que habría un 20% de supresión de señal. Por el contrario, si el efecto matriz fuese 120% correspondería a un incremento de la señal del 20%. Por tanto, según la ecuación de Matuszewski y colaboradores <100% de ME corresponderá a una supresión de señal, y ME > 100% equivale a un incremento en la señal del analito.

En los años siguientes al establecimiento del concepto de efecto matriz, Chambers y colaboradores [165] propusieron una modificación de la ecuación de Matuszewski y colaboradores aplicando un factor de sustracción de 1 al cociente entre la señal de extracto fortificado una vez que se han realizado todos los pasos del tratamiento de muestra dividido entre la señal de un estándar en disolvente a la misma

concentración. Por tanto, la ecuación propuesta por Chambers y colaboradores queda de la siguiente manera:

$$ME(\%) = \left[\frac{\text{Área de pico del extracto fortificado después del tratamiento de muestra}}{\text{Área de pico del estándar en disolvente}} - 1 \right] \times 100$$

Los resultados de esta ecuación, por tanto, pueden tener un valor de efecto matriz positivo (incremento de señal) o negativo (supresión de señal). Con lo que, ventajosamente, esta modificación de la ecuación permite identificar rápidamente si el efecto matriz es debido a una supresión o incremento de señal y cuál es el porcentaje de pérdida o ganancia de señal. Al igual que en el caso anterior, la ecuación de Chambers y colaboradores también se puede emplear utilizando las pendientes de las rectas de calibrado [166]:

$$ME(\%) = \left[\frac{\text{pendiente recta de calibrado matrix - matched}}{\text{pendiente recta de calibrado en disolvente}} - 1 \right] \times 100$$

La ecuación para el efecto matriz propuesta por Chambers y colaboradores ha sido ampliamente analizada en el campo de la seguridad alimentaria [153,154,161,167,168], y será la empleada a lo largo de esta tesis doctoral, ya que permite identificar con un solo valor cuál es el comportamiento de la perturbación de la señal, supresión o incremento. Dependiendo del porcentaje obtenido en esta ecuación, el impacto del efecto matriz en la señal analítica puede considerarse como nulo, suave, medio o fuerte [154,166]. En la **Tabla 6** pueden apreciarse los rangos de consideración del efecto matriz:

Tabla 6. Clasificación efecto matriz [166].

Impacto del efecto matriz en la señal	% efecto matriz
Nulo	[0%] – [±10%]
Suave	[±10%] – [±20%]
Medio	[±20%] – [±50%]
Fuerte	≥ [±50%]

De acuerdo con el criterio de Ferrer y colaboradores, cuando se obtiene un efecto matriz es nulo o suave se considera que la señal del analito no está interferida por otros compuestos [166], ya que la diferencia de señal de $\pm 20\%$ entra dentro de los parámetros de precisión del método [80,95]. Por tanto, no se considera que el efecto matriz sea relevante y podría utilizarse para la cuantificación rectas de calibrado en disolvente (sin presencia de matriz) [166].

Por último, cabe destacar que esta evaluación del efecto matriz ha sido incluida en la última versión de la guía SANTE de plaguicidas, correspondiente a la versión de 2021. Esto supone un paso muy importante, dado que la regulación normalmente no contemplaba la posible alteración de los resultados debido a este efecto [90]. Se ha propuesto la ecuación de Chambers para su cálculo en esta guía [165].

3.2. Problemática de muestras alimentarias con alto contenido graso

Aunque existan otros factores que pueden desencadenarlo, la causa principal por la que se genera el efecto matriz es la presencia en el extracto final de sustancias co-extraídas de la matriz, diferentes al analito/s.

En el campo de la seguridad alimentaria, más concretamente en la determinación de contaminantes y residuos, la aparición del efecto matriz está estrechamente relacionada con la naturaleza y composición del alimento [169]. Los alimentos están compuestos mayoritariamente por agua, lípidos, proteínas, fibra y carbohidratos [170]. También contienen otros muchos componentes minoritarios naturalmente presentes en su composición, como minerales y vitaminas, o cualquier otra sustancia resultante de la producción alimentaria, descritas anteriormente en el apartado 1.1.

Se considera que una matriz es grasa si su porcentaje es mayor al 2% [171]. Dentro de este grupo pueden encontrarse alimentos de origen animal o vegetal. A partir de este 2% de contenido en lípidos, hay un rango muy amplio de alimentos grasos. Por

ejemplo, la leche, el pollo o el maíz tienen un porcentaje de grasa entre el 2 y 5%; la soja, el aguacate, el huevo o el salmón entre el 10 y 20%. Por otro lado, otras matrices son fundamentalmente grasas como cualquier tipo de fruto seco, alrededor del 60% de grasa, o aceites vegetales, aproximadamente un 98-100% de lípidos [171]. Estas matrices se caracterizan por ser significativamente más complejas en comparación con las matrices no grasas (<2%), como frutas y verduras, que son, en la mayoría de los casos, fundamentalmente agua, hidratos de carbono y fibra. Sin embargo, los alimentos grasos tienen una gran cantidad de componentes que pueden ser co-extraídos, sobre todo lípidos y fosfolípidos. Además, muchos de estos alimentos grasos también suelen caracterizarse por tener una alta cantidad de proteínas: carnes, pescados, huevos, productos lácteos, frutos secos, etc. [171].

Por estas razones, se debe tener en cuenta la estructura de estos posibles interferentes característicos de las matrices de alto contenido graso. En primer lugar, los lípidos en los alimentos, tanto de origen animal como vegetal, se encuentran mayormente en forma de triglicéridos [170,172]. Los triglicéridos están formados por una molécula de glicerol (un alcohol con 3 carbonos y 3 grupos hidroxilo) a la que se han unido 3 moléculas de ácidos grasos, saturados y/o insaturados, mediante un enlace tipo éster [170,173]. Por otra parte, los fosfolípidos son el segundo componente lipídico más abundante después de los triglicéridos [174], y normalmente se encuentran en mayores cantidades en carnes, pescados y mariscos, huevos, productos lácteos y aceites no refinados [172]. Tienen la misma estructura que los triglicéridos, excepto porque uno de los ácidos grasos es sustituido por una molécula de ácido fosfórico esterificado con una molécula orgánica (una base nitrogenada). Las moléculas, tanto de los triglicéridos como de los fosfolípidos son anfipáticas, es decir, tienen una zona polar y otra no polar [172,175]. Aunque, en los fosfolípidos la polaridad es mayor debido a que la presencia del ácido fosfórico y la base orgánica nitrogenada forman una “cabeza” totalmente polar y una cola apolar mucho más marcada. Por ello, los lípidos se clasifican en lípidos neutros

(triglicéridos) y lípidos polares (fosfolípidos) [176,177]. Debido a esta propiedad, los fosfolípidos en conjunción con las proteínas, forman la estructura básica de las membranas celulares [172,174]. Por último, las proteínas son macromoléculas orgánicas constituidas por carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y, en menor cantidad, azufre y fósforo [172]. Están formadas por largas cadenas de aminoácidos unidas mediante un enlace peptídico. Los diferentes aminoácidos que conforman las proteínas pueden presentar cargas negativas o positivas. Por tanto, en función del pH del medio en que se encuentren, la carga total de las proteínas podrá ser negativa o positiva. También puede ocurrir que la carga total sea nula, por lo que a un pH adecuado, denominado punto isoeléctrico, las proteínas pueden presentar una forma zwitteriónica [178].

En conclusión, los componentes que conforman estos alimentos (lípidos, fosfolípidos y, en algunos casos, proteínas) pueden estar presentes en el extracto final al ser co-extraídos ya que se encuentran en grandes cantidades en los alimentos en comparación con los analitos. Los triglicéridos y fosfolípidos, al tener largas cadenas alquílicas, muy hidrófobas, suelen interferir en el análisis por GC, pero también eluyen en LC con grandes cantidades de disolvente orgánico, cercanas al 100%, con lo que suelen co-eluir con los analitos con menor polaridad. Además, si estos interferentes no son correctamente eluidos de la columna cromatográfica, puede producirse una elución inesperada en análisis posteriores, que afectaría a la señal de otros analitos [165]. Además, los fosfolípidos y las proteínas al tener grupos polares son fácilmente ionizables [179], con lo que pueden afectar al proceso de ionización de los analitos en ESI-LC. Por otra parte, los triglicéridos co-extraídos pueden formar gotas lipídicas en el portal de inyección de un cromatógrafo de gases, en la precolumna o, incluso en la columna, provocando irreproducibilidad en el análisis [62].

El análisis de residuos y contaminantes en matrices alimentarias es un análisis a nivel de trazas, ya que estos compuestos no pueden estar en grandes cantidades en los

alimentos, es más, están regulados a niveles de $\mu\text{g kg}^{-1}$, o partes por billón (ppb). Se define traza como cualquier componente que se encuentre en la muestra por debajo de 0.01% [180]. La IUPAC (de sus siglas en inglés: *International Union of Pure and Applied Chemistry*) considera traza cualquier concentración que se encuentre por debajo de 100 partes por millón en la muestra (ppm) [181]. El problema reside en que los lípidos y proteínas se encuentran en cantidades mucho mayores en los alimentos, con lo cual pueden ser fácilmente co-extraídos en las etapas previas al análisis cromatográfico. Por ejemplo, en las matrices grasas con menor contenido en lípidos, 2%, éstos equivaldrán a una concentración de 20 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ o ppm, una cantidad muy superior a los niveles de trazas. Igual ocurre con las proteínas que pueden variar desde un 4% en productos lácteos hasta un 25-30% en pescados y carnes [182]. El contenido en fosfolípidos también es relevante, ya que, al ser lípidos polares, dependiendo del tratamiento de muestra, pueden ser más fácilmente co-extraídos que lípidos neutros. Aunque la mayor parte de la fracción lipídica corresponda a triglicéridos, la concentración de fosfolípidos suele encontrarse por encima de niveles de trazas. Por ejemplo, en alimentos con menor contenido graso como la leche hay 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de fosfolípidos [183,184]. Por el contrario, en otros alimentos, como huevos y salmón, los fosfolípidos pueden suponer, respectivamente, desde el 30% hasta el 50% de los lípidos [176]. En el salmón la concentración de fosfolípidos es de 70 000 ppm [176,177] y, en un huevo entero la cantidad de fosfolípidos es de 35 000 ppm, que se concentran mayormente en la yema [176,185]. Las matrices vegetales tienen menor contenido en fosfolípidos, aunque sean algunas de ellas tengan mayor contenido en lípidos en comparación con las matrices de origen animal [185]. Por ejemplo, los frutos secos tienen una cantidad entre 8 000 y 19 000 ppm [186]. Sin embargo, los aceites de semillas contienen una cantidad mucho menor, de hasta 2 000 ppm [187]. Esto es debido a los procesos de refinamiento a los que se someten para la obtención del aceite. El mismo comportamiento tienen otros aceites vegetales, como el aceite de oliva que contiene hasta 157 ppm de fosfolípidos cuando se trata de aceite virgen, mientras

que no se encuentran fosfolípidos en aceites de oliva que han sido sometidos a procesos de refinamiento [188].

En conclusión, los alimentos con alto contenido graso se caracterizan por ser matrices altamente complejas. Lípidos, fosfolípidos y proteínas, al ser moléculas voluminosas y de alto peso molecular y, en algunos casos, fácilmente ionizables, pueden alterar significativamente el proceso de ionización del analito, incrementando o reduciendo su señal, por lo que son una de las mayores causas de efecto matriz en matrices grasas.

En esta línea, muchos estudios han descrito que la eliminación total de los componentes co-extraídos no ha sido posible tanto en LC-MS [64,126,162,189] como en GC-MS [62,190,191]. Esto conlleva, además de la perturbación de la señal analítica, que los lípidos generan un daño a los equipos (columnas, detectores y, en general, todas las superficies del instrumento) que precisa un mayor mantenimiento, así como una reducción de su vida útil [62,64,165,189,192]. Por esto, para el análisis de matrices grasas no se puede prescindir de tratamiento de muestra. Los residuos más apolares han sido objeto de estudio desde hace varias décadas debido a su tendencia a acumularse en tejidos grasos [62,65,189,192-196]. Por otra parte, también es necesario que se incluya el análisis de residuos polares, sobre todo los plaguicidas, dado que su empleo se ha incrementado en los últimos años debido a que su degradación es más sencilla puesto que son solubles en agua [197-199]. Hay una cierta controversia sobre sus efectos en los humanos y su menor persistencia en el medio ambiente, ya que algunos estudios sí evidencian que presentan efectos negativos para la salud [197]. Por lo que a la hora del diseño de un método de extracción es necesario tener en cuenta las características de los analitos.

La primera aproximación para la medida de la naturaleza y solubilidad lipofílica o hidrofílica de un compuesto es su coeficiente de partición octanol/agua ($\text{Log } K_{ow}$).

Aunque en los primeros años de utilización de este parámetro hubo una cierta controversia en cuáles eran los rangos designados para establecer la solubilidad de los compuestos. En 2002 la FAO establecía que, en general, cuando su $\text{Log } K_{ow} > 4$ el compuesto era liposoluble y si el compuesto tenía un $\text{Log } K_{ow} < 3$ no lo era, mientras que los plaguicidas que tuvieran un valor de $\text{Log } K_{ow}$ intermedio deberían evaluarse uno por uno [200]. Sin embargo, años más tarde, en 2005, la FAO especificó que cualquier residuo (y/o sus metabolitos) a partir de un $\text{Log } K_{ow} > 3$ son potencialmente liposolubles [201]. Más recientemente, en 2015, la UE diferenció entre compuestos no solubles en grasas o compuestos liposolubles [202]. La EFSA determinó que para definir si un residuo es liposoluble, además del valor del $\text{Log } K_{ow}$, son necesarios otros datos procedentes de estudios sobre el metabolismo y alimentación de los animales destinados a producción de alimentos [203]. Por esta razón, la UE empezó a dar información sobre la naturaleza hidro- o lipo- fílica de los residuos. En la base de datos de plaguicidas de la UE aparecen con un símbolo "F" las sustancias que han sido evaluadas y definidas como liposolubles ("*Fat soluble*"). Con lo que un compuesto con un valor de $\text{Log } K_{ow} > 3$ también puede considerarse como no soluble en grasa en función de otros factores (como estudios de metabolismo o alimentación del ganado). Por ejemplo, el fenbuconazol tiene un $\text{Log } K_{ow} = 3.8$, sin embargo no se considera liposoluble dado que no se le atribuye una "F" en la base de datos de plaguicidas de la UE. Por otra parte, la Federación de la Industria Aceitera de la UE (FEDIOL) argumenta que no todos los compuestos con $\text{Log } K_{ow} < 3$ no sean liposolubles, sobre todo en el caso de los aceites vegetales. Ya que este valor de "3" proviene del cálculo en el que la distribución del plaguicida entre parte con menos grasa (músculo) y la parte grasa del animal se vinculó con el valor $\text{Log } K_{ow}$ de la sustancia, y en el que se consideraron las fracciones de lipídica e hidrofílica en cada uno de las dos partes del alimento de origen animal [204]. En algunos casos, los datos de lipofílica de las matrices animales no son extrapolables a todos los alimentos grasos. Esto es debido a que algunos alimentos de origen animal no son homogéneos, tienen zonas con más porcentaje graso que otras, fácilmente

separables e identificables, mientras que en las grasas vegetales se considera la matriz como un todo. Un ejemplo más visual sería que en un filete de carne o pescado existen partes con más grasa que otras, o, por otra parte en un huevo, la mayoría de los lípidos se concentran en la yema. Otro ejemplo de que contaminantes con un $\text{Log } K_{ow} < 3$ pueden transferirse a matrices grasas es la presencia de BTEX en aceite de oliva. En principio, si sólo se tuviese en cuenta su valor de $\text{Log } K_{ow}$, muchos compuestos de esta familia no serían liposolubles, ya que su $\text{Log } K_{ow}$ está entre 2 y 3. Sin embargo, se ha demostrado su transferencia desde la aceituna (11% grasa) al aceite de oliva (100%) [49]; además muchos autores han reportado su presencia en aceite de oliva [47,205] y, recientemente, la UE los ha regulado estableciendo un concentración máxima dependiendo del porcentaje de grasa de la matriz [86]. Con lo que sería, si no se tienen datos que demuestren lo contrario o si la base de datos de la UE no recoge si un residuo es liposoluble, la solubilidad sí que se debe estimar a través de su valor de $\text{Log } K_{ow}$ [204,206,207]. Teniendo en cuenta su definición del coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}):

$$K_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{water}}$$

Donde C es la concentración del compuesto en la fase hidrófoba ($C_{octanol}$) y en la fase acuosa (C_{water}).

En la **Tabla 7** aparece una aproximación del porcentaje de la fracción soluble en octanol (liposoluble) según el valor de $\text{Log } K_{ow}$ de las sustancias.

Tabla 7. Naturaleza y solubilidad hidrofílica y lipofílica de las sustancias según su $\text{Log } K_{ow}$

Log K_{ow}	K_{ow}	$C_{octanol}$	C_{water}	% disuelto en octanol
3	1000	1000	1	99.9 %
2	100	100	1	99.0 %
1	10	10	1	90.0 %
0	1	1	1	50.0 %
-1	0.1	0.1	1	10.0 %
-2	0.01	0.01	1	1.0 %

Por tanto, en ausencia de datos por parte de la UE u otros estudios que no recojan que un residuo no es liposoluble, no se puede afirmar que si el $\text{Log } K_{ow} < 3$ no pueda encontrarse en parte disuelto en la fracción lipídica. De acuerdo con la **Tabla 7**, los residuos con un $\text{Log } K_{ow}$ entre 3 y 0 pueden estar contenidas en los compartimentos grasos de los alimentos en una fracción muy considerable (hasta en un 50%). Por otro lado, si sustancia tiene un $\text{Log } K_{ow}$ negativo se puede considerar que esta es no es soluble en grasa.

Con esto en mente, muchos estudios sobre la presencia de residuos en matrices grasas estudian la transferencia de los compuestos a la matriz según el valor de $\text{Log } K_{ow}$ y si las matrices tienen un alto contenido en grasa [62,162,192,207-209] o si no [192,210-213]. Además, también es posible estudiar la eficacia de diferentes tratamientos de muestra en función del valor de $\text{Log } K_{ow}$ de los analitos [62,192,208,214,215].

Por último, hay que destacar que en las matrices grasas pueden encontrarse contaminantes y residuos tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica [62,189,192-194,208,214,215]. Por ello, la dificultad de encontrar un tratamiento de muestra adecuado se ha ido incrementando con la llegada del análisis multiresiduo. Ya que los analitos normalmente son moléculas complejas y de muy distinta naturaleza físico-química. La diferente polaridad y solubilidad de cada una de estas familias en las diferentes partes del alimento puede llegar a ser un gran obstáculo a la hora del diseño de una técnica para su extracción [193,216].

3.3. Estrategias para minimizar el efecto matriz en muestras grasas

3.3.1. Tratamiento de muestra

El tratamiento de muestra es una de las etapas fundamentales en la determinación de residuos y contaminantes en alimentos de alto contenido graso. De ella depende en gran medida la veracidad, robustez y reproducibilidad de los resultados. Los enormes avances en las técnicas de separación y detección, como el desarrollo de nuevas fases estacionarias y espectrómetros de masas más sensibles, han supuesto que la determinación analítica de contaminantes y residuos no sea una etapa tan problemática [189]. Sin embargo, el tratamiento de muestra, extracción de los analitos y posibles posteriores etapas como limpieza del extracto y/o preconcentración, suele implicar más del 70% del tiempo total de análisis [217,218]. Por tanto, sigue siendo un cuello de botella en el análisis de alimentos [219-221,193]. Además, como en cualquier técnica analítica, en el tratamiento de muestra también se busca una mayor rapidez, reducción en el número de etapas y menor consumo de materiales y disolventes, así como facilitar su implementación en laboratorios de análisis rutinario.

3.3.1.1 Etapa de extracción

La primera etapa del tratamiento de muestra es la correcta extracción de los analitos de interés, su separación del resto de componentes de la matriz y la eliminación de interferentes para un posterior análisis cromatográfico. La etapa de extracción no puede omitirse, tanto si se desea realizar un análisis por GC o (U)HPLC, debido que a que las matrices alimentarias son sólidas o líquidas, y debe obtenerse un extracto compatible para su introducción en el sistema cromatográfico. Los alimentos que se encuentran en estado líquido, como la leche o el aceite, generalmente son más fáciles de procesar ya que la distribución de componentes mayoritarios y residuos es más homogénea que en matrices sólidas [216]. Las matrices alimentarias, tanto de origen animal (carne, pescado, huevos...) como vegetal (como los frutos secos),

requieren una correcta homogeneización de la muestra para tener una correcta representatividad y evaluarla en su conjunto, es decir y como se ha visto anteriormente, sus partes con mayor y menor contenido en grasa. Debido a la gran variedad de sustancias que componen los alimentos, especialmente, la alta concentración de proteínas y lípidos, es complicado llegar a obtener un extracto limpio y libre de interferentes para el análisis. Se deben concebir procedimientos para disminuir su contenido o incluso eliminarlos por completo del extracto final.

Con lo cual, la etapa de extracción se enfoca en extraer los analitos evitando a su vez la extracción de otras sustancias, es decir, de interferentes. Sin embargo, esto no es siempre posible ya que lo que prima es conseguir una extracción cuantitativa del analito que no ponga en riesgo la detección de la sustancia. En otras palabras, hay que tener en cuenta que se persigue cuantificar los compuestos, puesto que, para muchos de ellos, está legislado una concentración que no se puede superar en la muestra, lo que supone que los porcentajes de recuperación deben ser aceptables para poder realizar la cuantificación.

Por lo tanto, el objetivo de la etapa de extracción es conseguir una correcta recuperación de los analitos y, en la medida de lo posible y sin afectar a la recuperación, extraer la menor cantidad de interferentes. A continuación se enumeran las técnicas de extracción más empleadas en el análisis de residuos y contaminantes en matrices alimentarias.

3.3.1.1.1 Precipitación de proteínas

Es un método no selectivo que se emplea en muestras con un contenido relativamente alto en proteínas y se caracteriza por sencillez [154,222]. Se suelen utilizar diferentes disolventes orgánicos como acetonitrilo, metanol, acetona. Otra forma más efectiva es utilizar como disolvente ácido tricloroacético (TCA) o añadir algún ácido a los disolventes anteriormente mencionados. Esto es porque la modificación deliberada del pH de la disolución para que se acerque al pH del punto

isoelectrico, hace que la solubilidad de la proteína sea mínima, por lo que precipita. Además, la adición de ácido puede ser un factor que por sí solo haga precipitar las proteínas puesto que disminuye su solubilidad y genera interacciones proteína-proteína que provoca la precipitación de las mismas. Después de la adición del disolvente, la muestra debe agitarse y, posteriormente, centrifugarse para separar de manera efectiva las proteínas (que quedarán al fondo del tubo) de la disolución con el resto de componentes [222]. Esta aproximación sólo puede darse en matrices líquidas ya que no es posible precipitar las proteínas en una matriz sólida simplemente por la adición de uno de estos disolventes orgánicos. En este contexto, proteínas presentes en la leche de vaca, como la caseína o la beta-lactoglobulina, tienen un punto isoelectrico alrededor de 5. Por esto, en muchas extracciones, se añade ácido a la disolución extractante para lograr ese pH. Algunos autores han utilizado la precipitación de proteínas como tratamiento de muestra de productos lácteos utilizando TCA [223], acetonitrilo [224,225], o acetonitrilo con un pequeño porcentaje de ácido fórmico o acético [226]. La precipitación de proteínas en las matrices alimentarias es necesaria puesto que algunos de los residuos o contaminantes pueden estar enlazados a ellas [216]. O, si no son eliminadas en las etapas iniciales del tratamiento de muestra, pueden adsorber a los analitos en etapas posteriores, con lo que afectarían notablemente a su recuperación [227].

3.3.1.1.2 Extracción líquido-líquido (LLE) y extracción sólido-líquido (SLE)

Es el enfoque más sencillo a la hora de elegir el tratamiento de muestra dependiendo de si la matriz es un líquido (LLE, por sus siglas en inglés: *Liquid-Liquid Extraction*) o un sólido (SLE, por sus siglas en inglés: *Solid-Liquid Extraction*). Es uno de los métodos más antiguos, pero de los más consolidados y empleados en la actualidad para el análisis de alimentos [228,229]. La extracción de compuestos orgánicos mediante LLE y SLE es un procedimiento fiable, adaptable a los analitos y compatible con la mayoría de los instrumentos [217,229]. En las LLE y SLE, la separación de los analitos de la matriz se realiza mediante la adición de un

disolvente inmisible, en el cual tienen una mayor afinidad. En el análisis de residuos y contaminantes en alimentos, la extracción de los analitos depende de su afinidad entre la fase acuosa u orgánica y se basa principalmente en sus propiedades físico-químicas [217,222,230]: solubilidad, Log K_{ow} , polaridad, pK_a , etc. Para el análisis de matrices alimentarias, normalmente este procedimiento no se suele hacerse mediante el enfoque clásico utilizando un embudo de decantación. Por el contrario, se utiliza un tubo tipo Falcon en el que se pesan los gramos necesarios de la muestra, normalmente entre 0.5 y 10 g [231,232] y seguidamente se añaden el o los disolventes con los que se va a realizar la extracción. Después, de un tiempo de agitación, se asegura la transferencia eficaz del analito de la matriz a la fase extractante. Finalmente, el tubo se centrifuga con el fin de lograr una mejor separación de las fases y de concentrar todos los sólidos que hayan podido precipitar (como las proteínas) en el fondo del tubo. Después se recoge la fase en la que se encuentren los analitos.

Inicialmente, para muestras con alto contenido graso, como los aceites, se utilizaban como disolventes hexano y acetonitrilo para hacer la LLE. Esto permitía que los residuos se extrajeran en la fase de acetonitrilo debido a que, en general, presentaban cierta polaridad; mientras que los componentes más apolares de la matriz, como triglicéridos, permanecían en la fase de hexano [193,230]. Sin embargo, este tipo de extracción no era capaz de extraer los analitos más polares. Por otra parte, los disolventes acuosos son los ideales para la extracción de los analitos más polares y, además, no extraen otros interferentes como lípidos. Aunque una extracción simplemente con un disolvente acuoso también extraerá compuestos polares de la matriz, y más importante, no extraerá analitos que no sean tan polares, ni analitos que estén enlazados a proteínas [216,217,227]. Por esa razón, tratamientos de muestra que buscan una extracción de analitos de múltiples clases utilizan disolventes orgánicos con mayor polaridad que el hexano: acetonitrilo, metanol, acetona, acetato de etilo [193,216].

Los disolventes orgánicos que por sí solos presentan una mayor eficacia en la extracción de residuos y contaminantes en matrices alimentarias son el metanol y el acetonitrilo [62,216,227,233]. La utilización de acetonitrilo es una buena elección de compromiso, para evitar la co-extracción de compuestos muy polares o muy apolares de la matriz es menor que con otros disolventes [208]. Sin embargo, compuestos con una elevada polaridad no son extraídos con este disolvente [234-236].

En relación de otros disolventes orgánicos junto a una fase acuosa, una extracción basada en agua y acetona, ofrece mejor recuperación de la mayor cantidad de plaguicidas, medicamentos veterinarios, micotoxinas y otros contaminantes; sin embargo, el efecto matriz obtenido es muy fuerte y afecta a la sensibilidad del método [208]. La extracción con agua y metanol ofrece una gran recuperación aceptable, pero las disoluciones quedan turbias, posiblemente debido a la incompleta desnaturalización de las proteínas [234]. Además, se ha visto que la co-extracción de componentes de la matriz es mayor con el empleo de metanol o acetato de etilo [217].

Con lo que finalmente se ha concluido que el acetonitrilo es el disolvente orgánico preferido en la mayoría de las extracciones [192,208,234,237] debido a que recupera una amplia cantidad de analitos, además de producir una desnaturalización de las proteínas más efectiva, con lo que el efecto matriz disminuye [237].

Como se ha dicho, en muchas ocasiones se añade agua a la hora de realizar la extracción. En alimentos de alto contenido graso la adición de agua a la muestra, normalmente sólida, es necesaria debido a que muchas de ellas no presentan un contenido de agua relevante en su composición, al contrario que frutas o verduras. Esto se hace con objetivo de posibilitar la dilución de los componentes de la matriz sólida y facilitar así que los analitos puedan ser extraídos de ella [193]. En este

sentido, por ej. los compuestos que neutros polares permanecerán disociados en la fase acuosa, mientras que los neutros no polares se extraerán fácilmente en el disolvente orgánico [222]. Sin embargo, la adición de agua en la etapa de extracción de matrices grasas hace que la cantidad de lípidos co-extraídos disminuya, aunque siempre queda una pequeña cantidad de éstos en el extracto final [162,208,230]. Por tanto, se puede deducir que el comportamiento de analitos lipofílicos será similar, con lo que con las mezclas de agua:acetonitrilo utilizadas en el análisis multirresiduo también será posible extraer estos analitos.

También cabe mencionar que en la etapa de SLE o LLE en matrices muy grasas se forma una interfase lipídica entre la fase acuosa y la orgánica, mayor cuanto mayor es el porcentaje de grasa del alimento [208,230]. En esa interfase, estos analitos lipofílicos o altamente apolares pueden quedar parcialmente retenidos con lo que su porcentaje de recuperación suele disminuir [238]. Sin embargo, se ha comprobado que el reparto entre la fase orgánica extractante y la interfase lipídica es reproducible, con lo que las recuperaciones son consistentes [208,238]. Según la guía SANTE referente a plaguicidas se puede asumir esta reducción de la recuperación siempre que ésta esté por encima del 30% [95].

Otro aspecto importante a la hora de la extracción es el pH de la disolución extractante, ya que ayuda al proceso de reparto de los analitos entre una fase y otra. La adición de un pequeño porcentaje de ácido a la disolución hace que los analitos ácidos cargados que permanecían sin disociar en la fase acuosa se neutralicen y se transfieran a la fase orgánica más fácilmente [217]. Además de ser un factor muy beneficioso para aumentar la eficacia de la precipitación de proteínas [216,219] y estabilizar los analitos lábiles [239]. Por tanto, un medio ligeramente ácido, suele mejorar la recuperación de muchos plaguicidas [62,167,208,228,240], medicamentos veterinarios [216,217,220,241] y micotoxinas [156,162,242-244]. Dependiendo del grupo de analitos y/o sus características, en algunas ocasiones sería mejor utilizar un pH por debajo de 4 o por encima de 6. Sin embargo, muchos

autores han llegado a la conclusión que una solución de compromiso, que permita recuperar la mayoría de los residuos y contaminantes de matrices alimentarias, es utilizar un pH en torno a 5 [162,217,223]. Este pH permite la extracción de compuestos sensibles a medios ácidos y básicos, además de no promover la ionización de los analitos en disolución lo cual no los haría fácilmente extraíbles en la fase orgánica, una vez hecha la partición agua:acetonitrilo, y también previene de la degradación de algunos analitos [162,227,234].

3.3.1.2 Etapa de purificación y limpieza del extracto

Las etapas de extracción, especialmente LLE y SLE, no son procedimientos selectivos. De forma que numerosos componentes de la matriz son co-extraídos junto con los analitos. Dada la complejidad de los alimentos de alto contenido graso, parte de los lípidos también estarán presentes en el extracto final. Además, aunque el acetonitrilo no tenga la capacidad de disolver los lípidos, cuanto más porcentaje de grasa contenga la muestra, la cantidad de lípidos co-extraídos aumentará proporcionalmente [230]. También puede aumentar la cantidad de compuestos liposolubles como algunas vitaminas, tocoferoles o carotenoides [62]. Los esteroides, como el colesterol, pueden provocar un efecto de *carry over* en GC, mientras que los triglicéridos co-extraídos pueden formar gotas lipídicas en el inyector del cromatógrafo de gases, en la precolumna o, incluso en la columna, provocando irreproducibilidad en el análisis [62]. Por último, los compuestos lipídicos con mayor polaridad como los fosfolípidos o los ácidos grasos pueden coeluir con los analitos en LC. Por otra parte, la compleja composición de este tipo de matrices, que normalmente también contienen un alto porcentaje de proteínas y carbohidratos, hace que también puedan interferir en el análisis de compuestos con mayor polaridad.

Por lo que, es muy difícil la obtención de un extracto libre de interferentes, los cuales pueden interferir en el proceso de ionización, en definitiva, producen efecto matriz. La inclusión de una etapa posterior a la extracción (denominada purificación,

limpieza o *clean-up*) es una de las mejores alternativas para eliminar los componentes co-extraídos y minimizar el efecto matriz [95,128,146,165,189,193,229]. La selección de un procedimiento de *clean-up* adecuado, es uno de los aspectos críticos, ya que debe eliminar los compuestos interferentes sin afectar la recuperación de los analitos.

3.3.1.2.1 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE (del inglés: *Solid-Phase Extraction*) se puede utilizar como técnica de purificación o *clean-up* de los extractos obtenidos una vez realizada la etapa de extracción. Cabe destacar que es una de las técnicas más empleadas en la etapa de limpieza en matrices grasas [193,237], debido a que presenta características muy deseables en la selección de un tratamiento de muestra como son: simplicidad, rapidez, bajo consumo de disolventes y posibilidad de automatización [245].

Consiste en poner en contacto el extracto líquido de la muestra con un sorbente sólido (partículas de pequeño tamaño con propiedades similares a la de la cromatografía de líquidos) que suele estar alojado en un cartucho de extracción. Entre ambas fases se producen múltiples equilibrios de distribución de los solutos y algunos componentes de la muestra, quedando algunos retenidos por su mayor afinidad por la fase sólida que por el disolvente, mientras que otros compuestos pasan inalterados. La SPE convencional consta de varias etapas: acondicionamiento del sorbente, adición de la muestra, lavado con un disolvente que eluya interferentes, secado del cartucho y elución selectiva de los analitos. En la actualidad algunos tipos de sorbentes permiten la reducción del número de etapas [246]. Una de las aproximaciones actuales más empleadas en la utilización de esta metodología como etapa de *clean-up* es la denominada SPE en modo *pass-through*. Ésta consiste en pasar por el cartucho el extracto y, mediante la utilización de un sorbente capaz de retener los interferentes, recoger el extracto con los analitos. Por tanto, se obtiene un extracto mucho más limpio, ya que los analitos pasan

inalterados por el cartucho, sin ser necesarias etapas como la de lavado o elución, entre otras.

Varios factores pueden reducir la eficiencia de la extracción, la recuperación de la muestra y la reproducibilidad del procedimiento SPE, como un acondicionamiento inadecuado del cartucho, un volumen de carga de muestra elevado y un disolvente de lavado demasiado fuertes, un volumen de elución insuficiente o demasiado grande [245]. La característica más importante que se debe tener en cuenta en la elección de un cartucho de SPE es el tipo de sorbente que contiene y cuál es su interacción con los analitos e interferentes. La separación se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos como la adsorción, intercambio iónico o exclusión de tamaño [154].

3.3.1.2.2 Extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) y metodología QuEChERS.

La técnica d-SPE (del inglés: *dispersive Solid-Phase Extraction*) agiliza y simplifica la etapa de limpieza del extracto en comparación con la SPE [247]. Además, la d-SPE necesita menor cantidad de sorbente, de muestra, de disolventes y materiales [237], y no suele ser necesaria una evaporación del disolvente [248]. La d-SPE se basa en mezclar el extracto obtenido con el sorbente mediante agitación, para que haya una mejor interacción, dando lugar a mayores recuperaciones [208,237]. La aproximación más empleada consiste en que el sorbente adsorba componentes co-extraídos de la matriz sin retener los analitos, que permanecen en la fase líquida [217,247]. Normalmente esta etapa va seguida de una centrifugación con el objetivo de evitar que cualquier partícula sólida permanezca en el extracto líquido.

En 2002, Anastassiades y colaboradores desarrollaron la metodología QuEChERS, acrónimo anglosajón de las palabras "*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*" (Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto, Seguro), para la extracción y *clean-up* enfocada a la determinación de medicamentos veterinarios en tejidos animales [249]. En 2003, Anastassiades y colaboradores detallaron por primera vez este

método para la determinación de plaguicidas en frutas y verduras [250]. Posteriormente, fue validado demostrando su compatibilidad tanto para el análisis por GC como LC [251]. Este tratamiento de muestra implica la extracción con un disolvente orgánico (acetonitrilo) y sulfato de magnesio solo o en combinación con otras sales para favorecer la separación de fases (orgánica y acuosa) y el reparto de los analitos en la fase orgánica, seguido de un paso de limpieza mediante d-SPE. La metodología QuEChERS ha tenido un gran auge desde su desarrollo, y ha supuesto una alternativa muy ventajosa a otros procedimientos de extracción y/o *clean-up* ya que es muy simple, rápida, consume poco tiempo y poco disolvente orgánico [250]. También se ha visto sujeta a pequeñas modificaciones con el objetivo de adaptarla, por una parte, a la detección de numerosos contaminantes y residuos de diferentes polaridades y, por otra parte, a su aplicación en diferentes matrices alimentarias, con bajo y alto contenido graso.

Como ya se ha mencionado previamente, la metodología QuEChERS consta de dos etapas principales: extracción y limpieza. En la primera etapa, el objetivo es la separación de los analitos de la matriz y la obtención de un extracto orgánico. Para ello, normalmente se emplea una pequeña cantidad de acetonitrilo como disolvente extractante. La segunda principal es la limpieza del extracto obtenido para eliminar la mayor cantidad de especies co-extraídas con el fin de reducir el efecto matriz. A continuación se detallan los pasos y las principales variaciones del método QuEChERS.

I. Adición de la muestra homogeneizada

La cantidad de muestra inicialmente planteada, y empleada en muchos casos, es de $10 \text{ g} \pm 0.1 \text{ g}$ [250]. Además, es importante tener en cuenta que la muestra debe haberse homogeneizado previamente. Sin embargo, cuando se trata de muestras que contengan menos de un 25 % de agua, es decir, las muestras de alto contenido graso principalmente, es conveniente reducir la cantidad de matriz a 1-5 g [249]. Al disminuir el tamaño de la muestra, la

cantidad de compuestos apolares se reducirá y facilitará la obtención de un extracto final más limpio.

I.I Adición de agua a la muestra

Inicialmente la adición de agua a la muestra no estaba contemplada debido a que el método QuEChERS se desarrolló para frutas y verduras que tienen una composición fundamentalmente acuosa. Sin embargo, para la adaptación de esta metodología al análisis de alimentos con menor contenido en agua (como las matrices grasas) es necesaria la adición de agua a la muestra con el fin de que se humedezca, se homogenice y se favorezca la extracción de los analitos más polares [249]. Se establece que en matrices con un contenido de agua inferior al 80% es necesario la adición de agua previa a la extracción [249]. Si el contenido de agua se encuentra entre el 80 y el 25 % se pueden añadir hasta 10 mL teniendo en cuenta que el contenido de agua total debe ser:

$$\text{contenido total en agua} = (10 \text{ g}) - (g_{H_2O} \text{ en la muestra})$$

Mientras que, si la cantidad de agua en la muestra es inferior al 25 % se suele añadir 10 mL de agua, además de reducir el tamaño de muestra (hasta los 1-5 g) como se ha mencionado previamente [249].

Finalmente, la muestra con el agua añadida debe agitarse para lograr una correcta homogeneización entre ambas.

II. Adición de disolvente orgánico (acetonitrilo)

A la muestra se añaden 10 mL de disolvente orgánico y se agita el tubo para facilitar la mezcla y el reparto de los analitos entre las dos fases. Generalmente, la proporción de acetonitrilo respecto de la muestra homogeneizada es 1:1 (p/v) [248,252]. El acetonitrilo es el disolvente recomendado en la amplia mayoría de las extracciones tipo QuEChERS. A

veces, puede ir acompañado de un pequeño porcentaje de ácido para mejorar la recuperación y/o disminuir la degradación de algunos analitos [253,254]. También es posible utilizando acetona como disolvente extractante; sin embargo, la posterior separación de la fase acuosa no es tan efectiva [249]. El acetato de etilo es parcialmente soluble en agua, lo que podría suponer una ventaja en la separación de fases, sin embargo, no es capaz de extraer correctamente ni los analitos más polares ni los más básicos, con lo que provoca una disminución de la recuperación durante la d-SPE [221,248,249,252]. Además, acetona y acetato de etilo, son capaces de extraer sustancias más apolares (analitos, pero también interferentes como lípidos) en comparación con el acetonitrilo, con lo cual se requerirá una etapa de limpieza más exhaustiva [192,248]. Cabe destacar que, aunque el acetonitrilo no extraiga tan efectivamente los compuestos más lipofílicos, proporciona una adecuada y consistente extracción de estos analitos en matrices grasas [192,249].

Otros disolventes orgánicos, como el metanol o el etanol, son muy miscibles con el agua debido a que se forman enlaces de hidrógeno. Con lo cual es necesaria una gran cantidad de sales inorgánicas para favorecer la separación entre ambas fases y, aun así, puede permanecer un alto porcentaje de agua en la fase orgánica [255,256]. Además, recientes estudios señalan que algunas sales que son comúnmente utilizadas en la extracción QuEChERS también son solubles en estos alcoholes [255,257,258] y no suelen ser adecuados para esta etapa. Además, estudios que han realizado extracciones de residuos y contaminantes con metanol se obtienen peores resultados en términos de recuperación y efecto matriz en comparación con otros disolventes [234,259,260].

III. Adición de sales (*salting out*)

Después se añaden una mezcla de sales, normalmente compuesta por $4 \text{ g} \pm 0.2 \text{ g}$ MgSO_4 anhidro y $1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ NaCl , para facilitar la separación de fases, y el consecuente reparto de los analitos, mediante el efecto denominado “*salting out*” [249].

El proceso de *salting out* se basa en el aumento de la fuerza iónica de la fase acuosa, mediante la adición de sales, con lo cual disminuye la solubilidad de los compuestos orgánicos (residuos y contaminantes) en ella, lo que hace que éstos “salten” a la fase orgánica [261]. Al aumentar la fuerza iónica de la fase acuosa, la constante de equilibrio para el sistema agua:acetónitrilo se modifica, lo que provoca que disminuya la solubilidad del disolvente orgánico en agua [261]. Esto también ocurre con los analitos debido a que, cuando los iones de las sales añadidas se solvatan, parte del agua deja de estar disponible para los compuestos orgánicos (analitos) y se ve favorecida su transferencia a la fase orgánica [262].

Muchas sales fueron inicialmente evaluadas para esta etapa: sulfato de magnesio, sulfato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, acetato de sodio, nitrato de sodio, entre otras [254]. Las sales más utilizadas son MgSO_4 anhidro y NaCl , ya que ambos actúan en el incremento de la fuerza iónica del medio. El MgSO_4 ayuda a mejorar las recuperaciones al promover la partición de los analitos (compuestos orgánicos) en la fase orgánica. Mientras que el NaCl ayuda a controlar la polaridad del disolvente de extracción y a reducir la cantidad de sustancias co-extraídas de la matriz [250,252], e incrementar la recuperación de analitos polares [253]. De entre estas sales el MgSO_4 anhidro es el que proporciona una mejor separación de fases líquido-líquido [252], ya que se dispersa mejor mediante agitación y forma menos agregados en comparación con otras sales como el Na_2SO_4

[263]. Además, el MgSO_4 anhidro actúa como agente secante debido a que es capaz de retener agua de hidratación en su estructura.

III.1 Adición de sales para el control del pH

El control del pH en la etapa de extracción es muy importante para asegurar una correcta transferencia de los analitos problemáticos, teniendo en cuenta que algunos de ellos tienen propiedades ácido-base [264]. También es interesante tener en cuenta el pH con el objetivo de minimizar la degradación de compuestos lábiles y/o para conseguir la mayor efectividad en la precipitación de proteínas. Además, es importante destacar que la adición de sales que tamponen el pH de la disolución extractante no afecta significativamente a la cantidad de sustancias co-extraídas [250].

En principio, los alimentos con un pH bajo pueden ser utilizados sin modificación del pH, es decir con el método QuEChERS original [253]. Aunque se debe tener en cuenta que, si se quieren detectar compuestos sensibles al medio ácido en alimentos muy ácidos ($\text{pH} < 3$), como los cítricos, es recomendable adicionar en este paso NaOH [249]. Sin embargo, matrices con un pH más alto, el método QuEChERS original debe modificarse con el fin de evitar su degradación [253].

Se han desarrollado principalmente dos modificaciones al procedimiento original con el objetivo de ajustar el pH a alrededor de 5, donde se ha demostrado que la mayoría de los analitos lábiles bajo condiciones ácidas o básicas están suficientemente estabilizados independientemente de la matriz [208,221,249,252,264]:

- **Tampón acetato (*buffered acetate QuEChERS*)**

Fue la primera modificación propuesta en el método QuEChERS. Consiste en la acidificación del disolvente de extracción (acetonitrilo) con un 1% de ácido acético y adición de acetato de sodio anhidro, en lugar de NaCl [264]. El tampón acetato formado tiene un pH alrededor de 4.8 [221]. Este procedimiento tiene la ventaja de que no incrementa los pasos del método original, puesto que el NaCl no se tiene que pesar (se sigue manteniendo la adición de $MgSO_4$), y el ácido acético se añade junto al acetonitrilo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que parte del tampón acetato se transfiere a la fase orgánica, con lo que presenta un fuerte amortiguamiento del pH ácido [238], lo que puede suponer una desventaja en algunos casos.

- **Tampón citrato (*buffered citrate QuEChERS*)**

Posteriormente, se desarrolló otra modificación debido a que la fuerte actividad tamponadora del acetato generaba peores resultados en comparación con el método QuEChERS original en la etapa posterior de limpieza utilizando PSA. Con el objetivo de incrementar ligeramente el pH se realizó un estudio de diferentes sales con las que tamponar la disolución extractante [208]. El tampón citrato fue el que mejor resultados proporcionó debido a su menor poder de amortiguación del pH.

Se consigue añadiendo $1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ citrato trisódico dihidratado y $0.5 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$ hidrogenocitrato disódico sesquihidratado a las sales previamente utilizadas (4 g

MgSO₄ anhidro y 1 g NaCl). Este tampón es el más empleado en la mayoría de las aplicaciones ya que mantiene el pH entre 5 y 5.5, un pH de compromiso para compuestos lábiles ácidos y/o básicos [208,249,265].

IV. Separación de fases y recogida del extracto orgánico

Inmediatamente después de agregar las sales escogidas, el tubo se agita vigorosamente para fomentar el reparto de analitos e interferentes entre las dos fases. Es importante realizar este paso rápidamente debido a que las sales anhidras pueden formar agregados, con lo que se perjudicaría la interacción con los demás componentes.

Seguidamente el tubo se centrifuga con el fin de separar completamente las dos fases formadas de las sales y compuestos que hayan podido precipitar, como proteínas. Por último, se recoge el extracto orgánico.

Cabe mencionar que para el análisis de compuestos altamente apolares en matrices muy grasas se forma una interfase lipídica entre la fase acuosa y la orgánica. En esa interfase, estos analitos pueden quedar parcialmente retenidos, con lo que su porcentaje de recuperación suele ser más bajo. Sin embargo, se ha comprobado que el reparto entre la fase orgánica extractante y la interfase lipídica es reproducible, con lo que las recuperaciones son consistentes [238,249,265] con lo que el método puede seguir empleándose para estos analitos [95].

V. Limpieza del extracto (d-SPE)

Una vez recogido el extracto, se procede a la etapa de purificación. Se prepara en otro tubo una cantidad precisa de sorbente, el cual adsorbe en su superficie interferentes de la matriz que han sido co-extraídos. La mezcla se vuelve a agitar para favorecer la interacción entre el sorbente y los componentes extraídos en la fase orgánica. Después, el tubo se vuelve a

centrifugar, y el sobrenadante puede ser analizado directamente, diluido y/o filtrado.

En el método QuEChERS original el sorbente más utilizado es el PSA (por sus siglas en inglés: *Primary Secondary Amine*), y se establece una relación de 25 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄ anhidro por cada mL de extracto [238,249]. El MgSO₄ anhidro se añade para eliminar el agua que haya podido quedar en el extracto orgánico. Mientras que el PSA que es capaz de retener una gran cantidad de interferentes [245] como ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares o pigmentos. La interacción entre el PSA y los compuestos retenidos es esencialmente inmediata después de agitar las muestras durante unos segundos [250]. El uso de PSA puede hacer que el pH del extracto aumente. Por lo que puede provocar la degradación de analitos sensibles al medio básico. Con lo que se debe controlar el pH de la disolución extractante y si no es ácido, se debe añadir una pequeña cantidad previa al uso de PSA [249]. Sin embargo, dependiendo de la matriz analizada, a veces el PSA no da tan buenos resultados en la eliminación de interferentes con lo que se suelen emplear otros sorbentes [238,249]. Una solución es la utilización de C₁₈ como sorbente, ya que al ser menos polar ayuda a la eliminación de compuestos lipofílicos de la matriz. También se propone el uso de carbón grafitizado (GCB, procedente de: *Graphited Carbon Black*) para muestras grasas [230] y en la eliminación de clorofilas y carotenoides [238,249]. El C₁₈ y el GCB pueden utilizarse por sí solos [266-273] o en combinación con PSA [62,208,216,234,240,254,274].

Por último, cabe destacar que la metodología QuEChERS no es la ideal para compuestos altamente polares. Para la determinación de este tipo de analitos existe la variante conocida como QuPPE, de sus siglas en inglés: *Quick Polar Pesticides Method* (método rápido para la determinación de plaguicidas polares) desarrollada por los laboratorios de referencia europeos. Existen dos variables de la metodología

QuPPE una para matrices de origen vegetal [275] y otra para matrices de origen animal [276]. Sin embargo, tienen varias características en común entre ellas y con el método QuEChERS original: el peso de 10 g de muestra, ajuste del porcentaje de agua según el alimento o la utilización de C₁₈ como sorbente. Mientras que se diferencia principalmente en que el disolvente extractante es metanol acidificado con 1% de ácido fórmico ya que los disolvente apróticos, como el acetonitrilo, aumentan las interacciones con los materiales de vidrio. Algunas extracciones de matrices vegetales (frutos secos, legumbres o cereales) y todas las matrices animales incluyen el etilendiaminotetracético (EDTA) para evitar la formación de complejos de algunos analitos, como el glifosato y glufosinato y los metabolitos de ambos, con iones metálicos [275,276]. La adición de este agente complejante en la extracción ya ha sido ampliamente utilizada en el análisis de medicamentos veterinarios [216,277-280], como fluoroquinolonas, macrólidos y, sobre todo, de tetraciclinas. Estas últimas tienden formar complejos con cationes divalentes como Ca²⁺ y Mg²⁺ [277,281,282], lo cual no favorece su extracción. Como el EDTA es un complejo que forma ligandos fuertes con metales, esto evita que sean los analitos los que formen complejos con los metales.

3.3.1.2.3 Sorbentes

Existen numerosos materiales que pueden utilizarse como sorbentes, ya sea en modo SPE o d-SPE. Las más extendidas en la eliminación de interferentes son el PSA, C₁₈, GCB. En los últimos años, se han ido desarrollando otros sorbentes especialmente diseñados para matrices complejas, alimentos con un alto contenido en grasa. Cabe destacar la necesidad de que los sorbentes empleados en la etapa de limpieza no interfieran con los analitos. Por otra parte, es de suma importancia que el *clean-up* seleccionado minimice efectivamente el efecto matriz en comparación con la etapa extracción simple, es decir, sin el uso del sorbente. A continuación se detallarán los sorbentes más empleados para la determinación de contaminantes y residuos en matrices grasas.

3.3.1.2.3.1 Sílice modificada con grupos funcionales polares

Los sorbentes que tienen mecanismos de fase normal generalmente son grupos funcionales como amino (NH_2), ciano (CN) o diol (COHCOH), con lo que generan una adsorción fuerte de los analitos polares [222,246,283]. La extracción empleando fase normal se basa en las interacciones hidrofílicas entre el soluto y los grupos funcionales polares como enlaces de hidrógeno, interacción π - π o dipolo-dipolo [246,283]. Normalmente se requieren las 4 etapas propias de la SPE, y se termina con un disolvente de mayor fuerza de elución, como el agua o metanol, para eluir los analitos [222,246,283]. Cabe mencionar también que el grupo NH_2 puede retener analitos debido a un intercambio iónico a un pH menor que su $\text{pK}_a=9.8$, ya que se encontrará cargado positivamente. Por lo que, aunque no se produce un intercambio iónico muy fuerte, sí que aumenta la capacidad de retención de algunos analitos [246,284,285].

Por otra parte, se debe tener en cuenta que estos grupos polares suelen permanecer en un soporte de sílice en un cartucho de SPE [246]. Este tipo de sorbentes puede presentar algunas desventajas como interacciones con grupos silanol residuales, posible elución no selectiva, poca retención de compuestos muy polares de bajo peso molecular y rango de pH de trabajo reducido [216,286]. Aun así existen ejemplos de su uso en matrices alimentarias para la determinación de contaminantes y residuos. También puede encontrarse la sílice (SiOH) sin estar unida a ninguno de esos grupos funcionales, siendo un sorbente con una retención polar mucho más fuerte que los anteriores [246]. Este sorbente se ha empleado para la determinación de fungicidas en pescado [245] y soja [287], medicamentos veterinarios en carne [288] y pescado [245], o micotoxinas en cereales y frutos secos [245].

3.3.1.2.3.2 Alúmina (Al_2O_3)

Se trata de un sorbente extremadamente polar. La superficie de alúmina tiende a ser ligeramente más estable en condiciones de pH alto que la sílice [286]. Su tamaño de partícula es más pequeño, lo que asegura una alta eficiencia de extracción y, por lo tanto, se utiliza menor cantidad de sorbente [286]. Este sorbente de Al_2O_3 generalmente se prepara a un pH que asegura una superficie eléctricamente neutra (alúmina N, pH alrededor 6.5-7.5) que se encuentra en forma cristalizada [193,286]. Aunque también existen la alúmina ácida (alúmina A, pH alrededor 4.5) así como la alúmina básica (alúmina B con pH alrededor 10.0) [286].

La alúmina neutra es la más empleada. Como es un sorbente fuertemente polar, retiene los lípidos polares, como fosfolípidos, cuando se eluyen con disolventes orgánicos de polaridad relativamente baja [193], lo que la hace muy adecuada para matrices grasas. En una SPE con este sorbente se vierte un extracto con un alto porcentaje de grasa disuelto en un disolvente apolar y después los analitos se eluyen con disolventes de polaridad creciente. Sin embargo, a medida que aumenta la polaridad del disolvente, los lípidos comienzan a coeluir. Por tanto, estos métodos de adsorción son más útiles para analitos de polaridad relativamente baja, por ejemplo, plaguicidas organoclorados, organofosforados, piretroides o PCBs en aceitunas y aceite de oliva [289-291], y otros aceites vegetales [292]. También se ha empleado como etapa de *clean-up* para la determinación de medicamentos veterinarios, como antihelmínticos y sulfamidas, en productos cárnicos [293-296] y pescado [297]. Y diferentes toxinas, como, micotoxinas o cianotoxinas, en marisco [298,299], huevos [300], maíz [301] o avena [302].

3.3.1.2.3.3 Florisil (MgO_3Si)

Está constituido por óxido de magnesio soportado sobre sílice [193] a un pH aparente alrededor de 8.5 [286,303]. El florisil, MgO_3Si , es un material extremadamente polar ideal para la extracción de analitos polares de matrices

grasas, debido a que evita que los lípidos sean co-extraídos [216,245,246]. Además, también puede emplearse para eliminar interferentes polares como pigmentos y polifenoles [304]. Su estructura permite la utilización de grandes volúmenes de extractos de muestra a un flujo rápido y es una alternativa a la sílice para muestras viscosas [246,303]. Por ello se ha venido empleando en las últimas décadas para el análisis de PCBs o plaguicidas no polares como organoclorados, organofosforados, triazinas y piretroides [189,193]. Estos analitos se han determinado en matrices grasas como productos lácteos, carne, pescado, aceites y aceitunas [305-309]. Ferrer y colaboradores evaluaron diferentes sorbentes polares para la etapa de *clean-up* (alúmina, sílice y florisil) en la determinación de plaguicidas en aceitunas y aceite de oliva. El florisil fue seleccionado puesto que proporcionaba extractos limpios y buenas recuperaciones [306]. El florisil también fue evaluado para la determinación multiresiduo de plaguicidas de un amplio rango de polaridades en matrices grasas [208,304,310-313]. Para el análisis de > 200 plaguicidas en soja [311] y fue seleccionado de entre otros sorbentes (PSA, C₁₈ y GCB) para el análisis de 95 plaguicidas en aceite de soja debido a que propiciaba un extracto más limpio y mejores recuperaciones [312]. Para la detección de > 100 plaguicidas en aceite de oliva también se obtuvieron recuperaciones satisfactorias [304]. Sin embargo, para aceitunas, el florisil interfería en la recuperación de los analitos más polares, por lo que no fue seleccionado [313]. Lo cual, está en consonancia con un reciente estudio para la determinación de plaguicidas polares en matrices con diferente contenido de grasa [314], demuestra también que con el florisil estos analitos presentan un efecto matriz moderado en las matrices más grasas, y los analitos más polares no son correctamente recuperados. Esto es consecuente dado que es un sorbente polar que adsorbe analitos polares. Por otra parte, el florisil también ha sido empleado para la determinación de otros compuestos en matrices grasas como medicamentos de uso veterinario en alimentos de origen animal [315,316] y retardantes de llama en pescado, aceite de pescado y aceite de linaza [317]. También se ha evaluado su utilización para la determinación de micotoxinas [318,319], aunque el florisil no era

capaz de reducir el efecto matriz de zearalenona y α -zearalenol en alimentación animal.

3.3.1.2.3.4 Intercambio iónico

Los analitos polares cargados tanto de naturaleza ácida como básica, pueden extraerse de manera selectiva de los disolventes de carácter polar, mediante intercambio iónico con el sorbente adecuado [245,283]. La principal ventaja de este tipo de sorbente es su alta especificidad, debido a que sólo interaccionan los grupos analitos cargados [216]. En este caso, el mecanismo de aislamiento se basa en la interacción electrostática de alta energía entre los grupos funcionales cargados de los analitos y el sorbente. Por lo tanto, la selección del sorbente depende de la carga del analito. Los sorbentes de intercambio catiónico extraen analitos básicos; mientras que, los sorbentes de intercambio aniónico se emplean para aislar los analitos ácidos. Según el grupo iónico, que suele encontrarse adherido sobre una base de sílice hidrofílica, se pueden clasificar en intercambiadores de iones fuertes y débiles [283]. Para poder lograrse este intercambio de iones los analitos y el sorbente deben estar cargados, con lo que normalmente es necesaria una preparación tanto del cartucho como de la muestra.

Los intercambiadores aniónicos emplean como sorbente aminas secundarias, terciarias o cuaternarias. Se emplean para la retención de analitos ácidos. Los intercambiadores aniónicos fuertes, SAX (*Strong Anion Exchangers*), consisten en grupos totalmente ionizados, entre la que destaca la amina cuaternaria, $-N^+(CH_3)_3$ [245,283]. La etapa de limpieza empleando únicamente SAX no ha sido muy desarrollada [320]. Sin embargo, este sorbente si ha sido más utilizado junto a otros sorbentes, como PSA o C_{18} , en el análisis de matrices grasas para la determinación de plaguicidas [321-324] o medicamentos veterinarios [325,326]. Así como para la detección de toxinas de carácter ácido, como las fumonisinas, en matrices no grasas [327-330].

Los intercambiadores catiónicos contienen ácidos carboxílicos, grupos fosfato o ácidos sulfónicos. Se emplean para la retención de analitos con carácter básico. El ion $-\text{SO}_3^-$ es un fuerte intercambiador catiónico, SCX (*Strong Cation Exchanger*) [245,283]. Estos sorbentes han sido más empleados para la determinación de medicamentos veterinarios [220,331,332], aunque se debe tener en cuenta que las recuperaciones de algunos compuestos como los aminoglucósicos son bajas debido a su fuerte retención por estos sorbentes [216].

3.3.1.2.3.5 PSA (amina primaria secundaria)

La N-propilenediamina o PSA es un sorbente polar soportado sobre una base de sílice ($-\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$). Al ser polar, presenta características típicas de los sorbentes en fase normal. También cabe destacar que, al tratarse de grupos amino también presenta un efecto quelante y un suave carácter de intercambio aniónico. Este sorbente está muy indicado para la adsorción de interferentes polares y ácidos propios de los alimentos [333].

De acuerdo con el método QuEChERS original, el PSA reducía la cantidad de compuestos co-extraídos, en comparación con otros sorbentes como alúmina, aminopropil o de intercambio aniónico [250]. También se demostró que la interacción entre el PSA y los compuestos retenidos es esencialmente inmediata, ya que el tiempo de contacto entre el extracto y el PSA no afecta las recuperaciones [250]. Esto fue explicado por la rápida formación de enlaces de hidrógeno, que hace que cualquier especie interferente con estas características se retenga por completo después de agitar la muestra durante unos segundos. También se tuvo en cuenta la capacidad del PSA de atraer grupos ácidos. Con lo que el pH del extracto no debe ser marcadamente ácido debido a que reducen la interacción de los interferentes ácidos con el PSA [238,253,264]. Sin embargo, para el análisis de analitos sensibles al medio básico, el uso de PSA puede hacer que el pH del extracto aumente, con lo que puede provocar su degradación [249]. Por esto, cuando se utilice PSA debe controlarse el pH de la disolución, ya que si el pH no fuese ligeramente ácido, se

debería añadir una pequeña cantidad para que las recuperaciones de estos analitos lábiles sean adecuadas [238].

Como se ha mencionado, en el método QuEChERS el PSA fue el sorbente original planteado para etapa de *clean-up*, ya que era capaz de eliminar una gran cantidad de interferentes como ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares, pigmentos (clorofilas, antocianinas...) [250,245,253,334]. El PSA es un sorbente altamente adecuado para matrices vegetales, las cuales son ricas en estos compuestos, y ha sido empleado para el análisis de plaguicidas en frutas y vegetales [208,250,251,264,265,335,336] y también en alimentos con un mayor contenido graso [208,251,334,337-340]. Además, ha sido adecuado en la detección de medicamentos de uso veterinario [263,341-343] y PAHs [344-346].

Sin embargo, para la etapa de limpieza de matrices grasas, que contienen lípidos o esteroides, el PSA por sí sólo no suele ser sorbente más adecuado debido a que no elimina compuestos apolares. Por ello, en métodos multirresiduo de matrices grasas que utilizan PSA, se obtiene un efecto matriz suave para los analitos más polares (bajo Log K_{ow}); pero para los analitos más apolares (con mayor K_{ow}) el efecto matriz suele ser fuerte. Por ello, el PSA se utiliza acompañado de otros sorbentes [62,208,240,264,347-349]. Aunque, sin duda la mayor desventaja de este sorbente es que debido a su capacidad de retención de grupos ácidos y compuestos muy polares, no suele recomendarse su uso para la determinación de analitos con estas características [245,251,350]. Por ello incluso desde el método QuEChERS lo desaconsejan [249]. También se ha demostrado que no es adecuado para el análisis de micotoxinas, sobre todo las de carácter ácido (OTA, fumonisinas), ya que son retenidas por el PSA y las recuperaciones disminuyen drásticamente [162,242,243,351,352].

3.3.1.2.3.6 Sorbentes en fase reversa: C₁₈

Las columnas de SPE con sorbentes en fase reversa han sido tradicionalmente utilizadas en el análisis de alimentos [353-355]. Entre los grupos enlazados que más han sido empleados, destaca la de sílice con extremos de octadecil enlazados poliméricamente [193], también denominada en bibliografía como ODS o C₁₈. Estos cartuchos de SPE han sido empleados en alimentos de alto contenido graso para el análisis de plaguicidas [65,356-361], medicamentos veterinarios [216,234,362-365]. Sin embargo, no eran capaces de proporcionar una limpieza efectiva de los compuestos con polaridades más altas ni tampoco los más lipofílicos, con lo que su detección se ve comprometida [62,234].

Como el PSA no era efectivo para eliminar los interferentes más apolares característicos de las matrices grasas, se propuso posteriormente el C₁₈ como sorbente en la etapa de d-SPE [208,350]. Debido a sus interacciones hidrofóbicas, el C₁₈ retiene mayormente lípidos, como los triglicéridos pero también tocoferoles, y colesterol tanto libre como en forma esterificada [62,191,238]. Además, este sorbente también es capaz de retener compuestos como azúcares o almidón [334]. Los compuestos quedan retenidos mediante fuerzas de van der Waals [366] y no suele afectar significativamente a las recuperaciones de los analitos, contrariamente al caso del PSA o GCB, empleados comúnmente también en la etapa de *clean-up* en QuEChERS [208,245,252].

Aunque cuando se propone este sorbente en la etapa de d-SPE el grado de interacción con los compuestos aumenta. Por tanto, existen numerosas aplicaciones que incluyen el C₁₈ junto al PSA en la etapa de limpieza de la metodología QuEChERS enfocadas a matrices grasas, para la determinación de plaguicidas en matrices vegetales [367-370] o animales [62,65,208,371-375], medicamentos veterinarios [214,376-379], micotoxinas [380], o métodos multiresiduo con analitos de diferentes polaridades [381-384]. Sin embargo, algunos métodos proponen simplemente el uso del C₁₈ para eliminar los lípidos debido a que el PSA no era

necesario para determinar los analitos de interés o, incluso, en algunos casos podía llegar a reducir las recuperaciones [216,245,253,269,270,313,351,385-388].

3.3.1.2.3.7 Carbón grafitizado (GCB)

El GCB está constituido por carbón grafitizado no poroso, que se caracteriza por su gran superficie de adsorción [389]. La superficie del carbón está compuesta por anillos hexagonales interconectados y que forman diferentes capas [193]. Este sorbente proporciona tres mecanismos de retención: intercambio aniónico debido al grupo oxonio, el cual está cargado positivamente, interacciones hidrofóbicas entre la superficie de grafito y la estructura aromática de los analitos, y los enlaces de hidrógeno formados entre los grupos funcionales protonados de los analitos y el grupo carbonilo del GCB [334].

De acuerdo con los autores del método QuEChERS en sus sucesivos estudios, la etapa de limpieza con PSA no reducía eficazmente el contenido en esteroides y pigmentos, como clorofilas y carotenoides [238,253,264]. En relación a los pigmentos, los extractos de matrices vegetales con alto contenido en clorofila seguían quedando coloreados tras la etapa de d-SPE con PSA, con lo cual estos compuestos podían interferir en el análisis por LC. Y, aunque no interfiriese en el análisis por GC debido a que no es volátil, las clorofilas se podían acumular en el portal de inyección, por lo que se incrementaría el mantenimiento necesario [264]. La utilización de GCB como sorbente suple esas carencias, ya que retira compuestos neutros con menor polaridad y mayor peso molecular, así como grupos ácidos y básicos [245]. Por ello, en la etapa de limpieza en el método QuEChERS para alimentos con alta concentración de clorofilas y carotenoides se incluyó el GCB , junto al PSA, para realizar el procedimiento d-SPE [238,249]. Normalmente se utiliza con matrices con menor contenido graso, ya que las verduras son los alimentos que más contienen este tipo de pigmentos [191,266,268,271,273,274,390]. Además, de acuerdo con Hildmann y colaboradores, el GCB es capaz de eliminar de la matriz gran parte de los lípidos, excepto fosfolípidos y ácidos grasos libres [62]. Sin

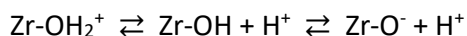
embargo, también existen algunas aplicaciones para la determinación de plaguicidas en matrices grasas como aceite, huevo, o especias, utilizando sólo GCB como sorbente [391-393], aunque normalmente se añade junto al PSA y/o C₁₈ [164,189,230,313,347,394-397].

Sin embargo, la mayor desventaja que presenta este sorbente es la elevada retención de moléculas con anillos planos ya que presentan una fuerte afinidad por el carbón, y como consecuencia, se obtienen recuperaciones muy bajas para estos compuestos [193,208,216,217,238,253,348,398]. Esto es debido a que su superficie de adsorción es muy grande con grupos muy polares los cuales favorecen la formación de enlaces de hidrógeno [398]. Por este motivo, no está recomendado para el análisis de compuestos muy apolares como plaguicidas organoclorados y otros muchos, como el tiabendazol, terbufos, y hexaclorobenceno [193,208,216,230,304,348], ya que prácticamente no se recuperan los analitos. Algunos estudios estiman que se suele sacrificar el porcentaje de recuperación alrededor de un 25% [245,253]. Por otra parte, existen muy pocos estudios que utilicen este sorbente para el análisis de medicamentos de uso veterinario ya que fundamentalmente estos residuos se estudian en matrices de origen animal, las cuales no se caracterizan por contener clorofilas, carotenoides o antocianinas. Además, cabe destacar que algunos de los compuestos que son ampliamente conocidos por su adsorción por el GCB, como el tiabendazol, se emplean también como medicamentos veterinarios con lo que es posible que los compuestos de la familia, benzimidazoles, presenten el mismo comportamiento. Yu y colaboradores estudiaron la presencia de diferentes familias de antibióticos (quinolonas, sulfamidas y tetraciclinas) en verduras de hoja empleando una extracción tipo QuEChERS [399]. Utilizaron como sorbente 50 mg C₁₈ más 10 mg GCB en proporción 6:1, a la vista de los resultados del estudio, no fue posible añadir más GCB en la etapa de limpieza ya que las recuperaciones no eran demasiado elevadas (57-91%). En el caso de las micotoxinas, el GCB ha sido empleado en un número muy reducido

de estudios [352,400,401] e, incluso, en algunos de ellos fue descartado para la etapa de limpieza [402].

3.3.1.2.3.8 Dióxido de zirconio enlazado a sílice: Z-sep

Gracias a la aceptación de la metodología QuEChERS por parte del sector académico, industrial y autoridades dedicadas a la seguridad alimentaria, en los años posteriores a la implantación de la citada metodología, se hizo necesario el desarrollo de nuevos sorbentes que garantizaran una limpieza eficaz de los interferentes propios de las matrices grasas. Los materiales basados en dióxido de zirconio (ZrO_2) enlazados a un soporte de sílice, denominados sorbentes Z-sep, empezaron a emplearse en la etapa de d-SPE. Aunque cabe destacar que este material no es nuevo ya que venía utilizándose desde hace varias décadas como alternativa en columnas de HPLC o de SPE [403]. El dióxido de zirconio se caracteriza por poseer propiedades ácido-base de Lewis y tener una gran estabilidad. Además, es estable en un amplio rango de pH, desde 1 a 13 [403]. Gracias a esto, tiene propiedades de intercambio iónico, tanto catiónico como aniónico. Las propiedades de retención propias del óxido se pueden explicar asumiendo la existencia de diferentes tipos de interacciones. La carga del óxido de titanio, ZrO_2 , en un medio con pH neutro, agua, es cero, teniendo un pK_a de aproximadamente 6.7 [403]. Según el pH de la solución en que se encuentre pueden establecerse diferentes equilibrios:



Los grupos hidroxilo superficiales tienen un pK_a de aproximadamente 8.1, mientras que los grupos superficiales protonados tienen un pK_a alrededor de 4.0 [403]. Por otra parte, cuando el óxido de zirconio se encuentre cargado positivamente, el átomo de zirconio también puede actuar como aceptor de un par de electrones y formar complejos con grupos donadores de electrones como ácidos grasos libres, fosfolípidos y carotenoides [62]. Por otra parte, y además de las interacciones de intercambio iónico, en este sorbente puede producirse interacciones hidrofóbicas y

mediante enlaces de hidrógeno, con lo cual, es capaz de retener interferentes muy apolares como los lípidos.

El sorbente Z-sep es una tecnología patentada desarrollada por Sigma-Aldrich en 2014. Su uso en la etapa de limpieza d-SPE del método QuEChERS está indicado para matrices grasas con el objetivo eliminar de manera efectiva un mayor número de interferentes que los sorbentes tradicionales PSA y C₁₈. Según el fabricante, mientras el C₁₈ retiene compuestos hidrofóbicos, el Z-sep está más indicado en la eliminación de lípidos y pigmentos. Existen 3 productos de este sorbente basado fundamentalmente en ZrO₂ [404]:

- **Z-sep.** Indicado para analitos hidrofóbicos, como PAHs y PCBs. El sorbente Z-sep está formado por sílice funcionalizada con el grupo ZrO₂.
- **Z-sep/C₁₈.** Recomendado para matrices alimentarias con < 15% de grasa. En este caso, se incluye al sorbente anterior una cantidad de otro sorbente, C₁₈. Por lo que se podría decir que es una combinación de dos sorbentes Z-sep más C₁₈. La proporción de esta mezcla de sorbentes es Z-sep:C₁₈, 2:5.
- **Z-sep⁺.** Diseñado para alimentos con > 15% de grasa. La diferencia de este sorbente con el anterior es que en el Z-sep⁺ la sílice está funcionalizada tanto con el grupo ZrO₂ como con C₁₈.

Cabe destacar que la retención de los lípidos que quedan en el extracto se basa en dos mecanismos que actúan en sinergia: (i) la interacción entre los grupos polares de los lípidos y el grupo basado en zirconio del sorbente, (ii) y la interacción entre las cadenas hidrofóbicas y el C₁₈, ya se encuentre como otra sal (en el caso del Z-sep/C₁₈) o adherido sobre la superficie (en el caso del Z-sep⁺) [404].

En posteriores estudios, se testaron Z-sep, Z-sep⁺ y PSA+C₁₈ para el análisis de PCBs, PBDEs, PAHs, plaguicidas y retardantes de llama en pescado [405] y residuos de plaguicidas en aguacate y almendras [406,407] y en huevo [396]. En estos estudios se concluyó que los extractos más limpios se obtenían con Z-sep. En la comparación

de Z-sep⁺ y PSA+C₁₈ para el análisis de carbamatos en cinco aceites vegetales (oliva virgen extra, girasol, maíz, linaza y sésamo) [408] y quesos con alto contenido graso (Gorgonzola, Roquefort, and Camembert) [409], se demostró que el Z-sep⁺ fue capaz de eliminar una mayor cantidad de interferentes que la mezcla PSA+C₁₈, obteniendo además recuperaciones satisfactorias. Sin embargo, otros estudios encontraron que el Z-sep retenía algunos plaguicidas, como triazoles o compuestos que contuvieran grupos acetato o hidroxilo, por lo que estos compuestos no se recuperaban [62,410,411].

También se empleó como etapa de *clean-up* el sorbente Z-sep/C₁₈ para la determinación de 47 medicamentos veterinarios, en pescado [412], mientras que para la detección de sulfonamidas en pollo se empleó Z-sep⁺ [413]. Sin embargo, en el estudio de Geis-Asteggiante y colaboradores se demostró que para el análisis multiresiduo de más de 100 medicamentos veterinarios en carne de vacuno, a pesar de que con Z-sep, Z-sep/C₁₈ y Z-sep⁺ se obtenían unos extractos más limpios, el uso de los sorbentes basados en ZrO₂ producía un gran descenso en las recuperaciones [214]. Además, en este estudio, las familias de las tetraciclinas, quinolonas y macrólidos fueron más retenidas por este sorbente, seguidas de las β-lactamas, por lo que finalmente seleccionaron una etapa de *clean-up* en d-SPE empleando C₁₈+hexano.

Por último, cabe añadir que los estudios sobre micotoxinas utilizando ZrO₂ son muy recientes y se viene empleando Z-sep⁺ para la detección multiresiduo en frutos secos [156,414], C₁₈+Z-sep⁺ para el análisis de alcaloides del cornezuelo en avena y PSA+C₁₈+Z-sep⁺ para el análisis de aflatoxinas en alimentación infantil [415]. Estas mezclas de Z-sep⁺ con otros sorbentes también se están empleando recientemente para la detección de plaguicidas [415,416].

3.3.1.2.3.9 EMR-Lipid

Es otro sorbente que especialmente diseñado para para su aplicación en como sorbente d-SPE para eliminar los interferentes propios de las matrices grasas en la etapa de *clean-up*. Fue desarrollado en 2015 por Agilent Technologies, y su nombre procede de sus siglas en inglés “*Enhanced Matrix Removal*” (Eliminación mejorada de la matriz). Aunque este sorbente también se encuentra bajo patente y no se sabe cuál es su composición, el fabricante menciona que el sorbente EMR-Lipid está especialmente diseñado para extraer lípidos y fosfolípidos característicos de los alimentos de alto contenido graso. Este sorbente no funciona como los sorbentes característicos de (d-)SPE, sino que debe disolverse hasta la saturación [192], por ello se indica que es extremadamente importante que la interacción entre los analitos y el sorbente se realice en un medio acuoso:orgánico. Esta interacción se basa en la combinación de dos mecanismos para lograr la retirada de los interferentes [192,417]:

- **Exclusión por tamaño.** Las cadenas de hidrocarburos no ramificadas características de los lípidos, fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos libres encajan en la estructura del EMR-Lipid. Mientras que los analitos voluminosos no interactúan con éste.
- **Interacciones hidrofóbicas.** Las largas cadenas alifáticas características de los lípidos que entren en contacto con el sorbente son atrapadas en él mediante interacciones hidrofóbicas.

Este protocolo de *clean-up*, al contrario que el resto de procedimientos tipo QuEChERS, consta de dos etapas:

i. “Bond Elut EMR-Lipid d-SPE”

La primera etapa consiste en que un tubo tipo falcon de 15 mL el cual contiene 1 g de sorbente EMR-Lipid debe activarse con 5 mL de agua. Luego, se necesita 1 minuto de agitación manual para mezclar correctamente el

sorbente y el agua. Inmediatamente después de la activación del adsorbente, se deben añadir 5 mL de extracto orgánico a este tubo y agitar manualmente durante otro minuto. A continuación, este tubo se centrifuga para lograr la separación del sorbente con los interferentes que haya retenido.

Cabe señalar que el sobrenadante obtenido consistió en una mezcla acuoso:orgánica (50:50), por lo que este paso implica una dilución del extracto SLE según el factor 1:2. Además, teniendo en cuenta el posterior análisis cromatográfico, no suele interesar un porcentaje tan alto de agua en el extracto tanto si se pretende utilizar una columna de fase normal o HILIC y, mucho menos, si se pretende realizar un análisis por GC. Además el agua en ese extracto, si se considerara el final, puede conllevar que interferentes polares que hayan sido co-extraídos se encuentren en mayor proporción en el vial de análisis que si solo se obtuviera un extracto orgánico. Por último, si se deseara hacer una preconcentración del extracto, la alta proporción de agua aumentaría mucho el tiempo de secado del extracto.

ii. “Bond Elut EMR-Lipid Polish”

Por tanto, para eliminar el agua del extracto libre de interferentes lipídicos y revertir el factor de dilución obtenido en el paso anterior, el segundo paso emplea el tubo EMR-Lipid Polish. El cual contiene 1.6 g de MgSO_4 anhidro y 0.4 g de NaCl. Por lo tanto, la separación de fases se logrará debido al efecto de *salting-out*.

Para ello, se agregan 5 mL de la fase acuosa:orgánica obtenida en el paso anterior al tubo EMR-Lipid Polish y se agita manualmente durante 1 min. Después de 5 min de centrifugación, se pueden observar dos fases. Los analitos permanecerán en la capa superior de acetonitrilo (2.5 mL). Entonces, este paso implicará un factor de preconcentración de 2:1. Por lo

cual, si se considera todo el procedimiento de limpieza, no involucra ningún factor de dilución o preconcentración.

Cabe mencionar que el sorbente se elimina mediante la precipitación en el primer paso o permaneciendo en la fase acuosa en el segundo paso dada su solubilidad en agua. Este sorbente se ha propuesto para multitud de aplicaciones para el análisis de alimentos vegetales de alto contenido graso (aguacate, frutos secos, aceites) y de origen animal (leche, salmón, carne, queso) sin pérdida de analitos: plaguicidas, medicamentos veterinarios, PAHs y micotoxinas [418]. Además, cuenta con la ventaja de que el procedimiento es escalable en proporción directa a diferentes tamaños de muestra y volúmenes de limpieza.

Han y colaboradores hicieron una evaluación de la etapa de *clean-up* empleando EMR-Lipid en distintos tipos de matrices: kale, aguacate, cerdo y salmón [192]. Obtuvieron que las recuperaciones eran satisfactorias. Sin embargo, cuando el $\text{Log } K_{ow} > 6$ los porcentajes de recuperación eran más bajos y variables. Se comprobó que esta disminución se producía en el paso en el que se ponía el extracto en contacto con el sorbente EMR-Lipid, de lo cual se deduce que puede existir una posible interacción del sorbente y los analitos muy apolares [192]. En este estudio también se comprobó, a través de la absorbancia de las especies coloreadas, que el EMR-Lipid también era capaz de retirar pigmentos propios de las matrices estudiadas. El 76 % y el 28 % de la clorofila se eliminó durante la limpieza en kale y aguacate, respectivamente. Respecto a los extractos de salmón y cerdo eran casi incoloros y no hubo un cambio real en la absorbancia antes y después de la limpieza. Por tanto, se pudo comprobar que el sorbente fue capaz de eliminar las clorofilas, pero con la ventaja de que no adsorbía moléculas con anillos planos como en el caso del GCB [192]. Muchos estudios han comprobado que, para la etapa de limpieza d-SPE, el EMR-Lipid para la determinación de plaguicidas mejoraba los resultados (respecto a los sorbentes más comunes hasta la fecha: PSA, PSA+C₁₈, Z-sep y Z-sep⁺) en lo relativo a la limpieza de los extractos y obteniéndose un menor efecto matriz,

además de recuperaciones satisfactorias en la mayoría de los casos. Esto se comprobó en diversas aplicaciones en el caso de la determinación de plaguicidas en aceite de oliva, aceituna y aguacate [215], aceites de soja, oliva, girasol, maíz y/ o canola [419-423], especias [424], semillas de colza [425], cereales [426] y matrices animales como pollo [427], marisco y pescado [428-432]. El EMR-Lipid también ha sido ampliamente estudiado para el análisis de medicamentos de uso veterinario en pescado [432,433], carne [434-437] o huevos [438,439], y micotoxinas en matrices grasas como frutos secos [414,440,441].

En 2017 este sorbente fue comercializado en formato SPE en modo *pass-through*, denominado "Captiva EMR-Lipid". En este caso, este formato se ha centrado más en la aplicación para la determinación de medicamentos veterinarios en carne [442], leche y huevo [443,444], y micotoxinas [445,446].

3.3.1.2.3.10 Sorbentes poliméricos y Oasis PRiME HLB

La SPE basada en polímeros involucra medios poliméricos macroporosos que proporcionan una gran cantidad de ventajas como: (i) no necesitar un acondicionamiento con disolventes ácidos o básicos, (ii) gran capacidad de carga, (iii) mayor flexibilidad en el desarrollo de métodos de limpieza, (iv) no presentar interacción de los analitos con los grupos silanol superficiales residuales, por tanto, menos interacciones secundarias (v) amplia estabilidad y no limitación de pH de trabajo (son estables entre pH 1 y 14).

Los cartuchos de extracción SPE utilizados para la purificación de matrices grasas suelen ser cartuchos en los que el sorbente es polimérico y se basan en las interacciones hidrofílicas-lipofílicas. Los cartuchos comerciales Oasis HLB "*Hydrophilic-Lipophilic Balanced*" (Balance hidrofílico-lipofílico), desarrollados por Waters en 1996, presentan una proporción equilibrada de dos polímeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica) [447]. La N-vinilpirrolidona aumenta la hidrofilia del polímero, y el divinilbenceno proporciona la retención de

fase reversa necesaria para retener los analitos, e incluso el sorbente hidrofóbico posee una retención igual o muy a menudo mayor que la sílice unida a C₁₈ [447]. Además, el sorbente preserva la retención del analito incluso si el sorbente se seca. Al ser hidrófilos, también son capaces de retener compuestos polares, pero para esta aplicación es esencial un bajo contenido orgánico del extracto que se aplica en el cartucho SPE, por lo que el solvente de extracción debe tener un alto contenido de agua o se deben aplicar procedimientos adicionales para cambiar el solvente del extracto antes de la SPE. Las interacciones se basan en interacciones hidrofóbicas como las fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofílicas como dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, enlaces de hidrógeno e interacciones π - π . [366]. Este sorbente es muy adecuado para la eliminación de interferentes propios de matrices grasas como lípidos y fosfolípidos, proteínas, sales, y pigmentos.

Una vez desarrollado el sorbente Oasis HLB, en 2016 se patentó una estrategia basada en una SPE en modo *pass-through*, denominada Oasis HLB PRiME (del inglés "*Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use*"), lo que podría traducirse como mejoras en la robustez del proceso y facilidad del uso respecto al efecto matriz) [447]. Los beneficios se deben a que al reducir el número de etapas de una SPE convencional, ya que no son necesarios el acondicionado y equilibrado del sorbente con disolventes, sino que simplemente se humedece el sorbente en el cartucho con el extracto que se quiera limpiar. Después, se recoge el eluyente una vez que sale del cartucho, en el cual se quedarán las interferencias propias de las matrices grasas. Se produce una reducción en el consumo de solvente y en el tiempo de preparación de la muestra. Este protocolo fue evaluado como etapa de *clean-up* para la detección multirresiduo de plaguicidas, medicamentos de uso veterinario o micotoxinas [448]. Varios estudios han evaluado el protocolo de SPE empleando los cartuchos Oasis HLB PRiME incluyendo la detección de multirresiduo de diferentes familias medicamentos veterinarios en leche [449-451], huevo [277,282,451], pescado [452] y carne de pollo, cerdo o ternera [453-456,]. Y también ha sido

empleado para la determinación de micotoxinas en aceites vegetales y alimentos a base de soja [457] y cereales [458].

3.3.1.2.3.11 Polímeros de impronta molecular: MIPs

Los polímeros de impronta molecular, MIPs, (de su nombre en inglés “*Molecularly Imprinted Polymers*”) son polímeros sintéticos que tienen una selectividad predeterminada para un analito dado, o un grupo de compuestos estructuralmente relacionados, que los convierte en materiales ideales para usar en procesos de separación [459]. Estos polímeros sintéticos tienen sitios de reconocimiento generados artificialmente capaces de volver a unir una molécula objetivo específicamente con preferencia a otros compuestos estrechamente relacionados. Se obtienen mediante la polimerización de monómeros funcionales y moléculas reticulantes (*crosslinkers*) alrededor de una molécula que actúa como un molde (*template*), lo que da lugar a un polímero de red tridimensional altamente reticulada [460].

Los monómeros se eligen considerando su capacidad para interactuar con los grupos funcionales de la molécula molde (*template*). Una vez que ha tenido lugar la polimerización, se extrae esta molécula que actúa como plantilla y se establecen los sitios de unión con forma, tamaño y funcionalidades complementarias al analito. Los MIPs resultantes son estables, robustos y resistentes a una amplia gama de pH, disolventes y temperatura, por lo que su comportamiento emula las interacciones establecidas por los receptores naturales para retener selectivamente una molécula diana (es decir, antígeno-anticuerpo) pero sin la limitación de estabilidad asociada [460].

En este sentido, durante los últimos años, se han publicado una gran cantidad de artículos que tratan sobre el uso de MIPs como sorbentes en la etapa de *clean-up* con SPE [461], la cual consiste en el empaquetamiento de una cantidad de MIP en un cartucho, siendo ésta de 15 a 500 mg normalmente [461]. Después se

acondiciona el cartucho con el disolvente apropiado y se carga la muestra. Seguidamente se lava el cartucho con el fin de retirar los posibles interferentes de la matriz que hayan podido quedar adheridos. Por último, los analitos se eluyen, idealmente sin ninguna sustancia co-extraída. La muestra generalmente se carga en el cartucho de MIP en un disolvente de baja polaridad (por ejemplo, acetonitrilo, diclorometano, tolueno), que en la mayoría de los casos es el mismo solvente que el porógeno para la síntesis de MIP para maximizar las interacciones específicas de los medios [461]. Los analitos se eluyen con un disolvente capaz de interrumpir las interacciones no covalentes típicas entre ellos y el polímero impreso.

En el ámbito de la seguridad alimentaria se han empleado para la reducción del efecto matriz como etapa de *clean-up* MIPs, en la determinación de medicamentos veterinarios como cloranfenicol [462] y quinolonas [463] en leche, fluoroquinolonas en carne [464] y huevos [465]. También se han usado para la determinación de plaguicidas en multitud de matrices vegetales y animales [466,467]. Sin embargo, para el análisis de micotoxinas la problemática se incrementa debido a la falta de grupos funcionales adecuados para establecer las interacciones no covalentes requeridas en el proceso de creación del MIP [466]. Aunque en el desarrollo de los últimos años ha sido posible la creación de MIP para las diferentes familias de micotoxinas, como aflatoxinas [468-470], ocratoxinas [471-473], fumonisinas [474], entre otras [475].

3.3.2. Modificaciones en el método LC-ESI-MS

3.3.2.1 Disminución del volumen de inyección

Una aproximación para reducir el efecto matriz es modificar las condiciones cromatográficas para que los interferentes no afecten a la señal del analito o analitos. La opción más sencilla consiste en disminuir el volumen de inyección, la cantidad de compuestos co-extraídos de la matriz se reducen, y el efecto matriz se

minimiza [476-479]. Normalmente, la principal ventaja es que, al reducir el efecto matriz, se podría llegar a cuantificar concentraciones más pequeñas, por ejemplo, de medicamentos veterinarios en matrices de origen animal [476] o plaguicidas en pan de abeja o productos de origen vegetal [477,478]. Sin embargo, esta aproximación tiene sus limitaciones puesto que la concentración de analito también se ve reducida y puede llegar a haber problemas en la detección.

Un volumen $\leq 2 \mu\text{L}$ reducir el efecto matriz hasta por debajo del 20% en plaguicidas en diferentes [477,478]. Aunque este comportamiento es una característica general de todas las sustancias ni siquiera de todos los plaguicidas, ya que Li y colaboradores indican que cuando el volumen de inyección es mayor a $5 \mu\text{L}$, el efecto matriz puede llegar a ser fuerte ($<60\%$) [478]. Sin embargo, no siempre se da el mismo patrón de comportamiento. Puesto que, en ese estudio, otros plaguicidas presentaban una relación logarítmica o una relación lineal respecto valor de efecto matriz al variar el volumen de inyección e, incluso, algunos analitos tenían el mismo efecto matriz, aunque el volumen de inyección fuese distinto [478]. Por tanto, no se puede asumir que disminuir el volumen de inyección es un criterio universal. Esto es debido a que, como se ha explicado anteriormente, el efecto matriz no depende únicamente de las especies co-extraídas de la muestra a analizar.

3.3.2.2 Modificación de las condiciones cromatográficas

La modificación de los parámetros cromatográficos como composición de la fase móvil o de los aditivos puede variar los tiempos de retención de los analitos. La composición de disolvente de la fase móvil que llega a la fuente de ionización afecta en el propio proceso de ionización [126,480]. En ESI, el agua dificulta más la ionización que los disolventes orgánicos, debido a que tiene una mayor viscosidad lo que dificulta más la separación de los iones y provoca un spray menos estable [481]. Además, el agua tiene un punto de ebullición mayor, con lo que tarda más en evaporarse. Por tanto en LC en fase reversa los compuestos menos polares (mayor $\text{Log } K_{ow}$) eluyen con mayor porcentaje de disolvente orgánico y suelen tener una

mejor sensibilidad ya que se ionizan mejor [481]. Dentro de los disolventes orgánicos que componen la fase móvil Kostianen y Kauppila describen que en el análisis de fármacos y plaguicidas se prefiere el uso de metanol en lugar de acetonitrilo debido a que tiene menor fuerza de elución, lo que causa que los compuestos salgan de la columna con un mayor porcentaje de disolvente orgánico [480,481]. Otro ejemplo podría darse en la detección de analitos polares. La dificultad de la detección de estos compuestos es que eluyen con altos porcentajes de agua en cromatografía de fase reversa, con lo cual, eluyen al principio del análisis, a tiempos de retención muy bajos. Esto puede implicar dos cosas, que no se retengan en la columna y eluyan con el frente de disolvente, y que co-eluyan varios analitos polares o que co-eluyan con otras especies interferentes comúnmente encontradas en alimentos como sales, azúcares o vitaminas [152,480]. Por lo que, intentar favorecer la retención de los analitos más polares, disminuirá los interferentes puesto que no coeluirán con los compuestos nombrados anteriormente [152], además de mejorar su ionización si el porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil es mayor. Otra opción para lograr una mayor sensibilidad de los analitos polares es cambiar el tipo de mecanismo de retención en la fase estacionaria. Con las columnas HILIC, se mejora la retención y favorecen el proceso de ionización en ESI puesto que los analitos son eluidos con un porcentaje de disolvente orgánico mucho mayor que en RP [481]. Por otra parte, los analitos menos polares (mayor $\text{Log } K_{ow}$) están más afectados por los lípidos y fosfolípidos que puedan ser co-extraídos procedentes de las matrices con alto contenido graso [62,155]. Olejnik y colaboradores añadieron el monitoreo de las m/z de fosfolípidos y concluyeron que a mayor señal de estos en el extracto final, menor era la señal obtenida de los analitos hidrófobos, es decir, mayor era la supresión de señal [155].

3.3.2.3 Infusión post-columna

Una de las primeras propuestas para combatir el efecto matriz se basó en evaluar en qué ventana de tiempo el efecto matriz era más acusado, con el objetivo de

modificar los tiempos de retención de los analitos para que no coincidiesen con especies interferentes en el proceso de ionización. Para ello Bonfiglio y colaboradores, [482] y Choi y colaboradores [483], propusieron una aproximación denominada “*post-column infusion*” (infusión post-columna, en español) en muestras de plasma y avena, respectivamente.

El método de infusión post-columna consiste en la colocación de una pieza en forma de T entre la salida de la columna cromatográfica y la entrada al MS. Se inyecta un extracto de matriz blanca y se hace el análisis cromatográfico. Simultáneamente, a través de la T, circula un flujo de una disolución patrón de analito. Con lo cual, el analito y el extracto de matriz se mezclan antes de llegar a la fuente de ionización. La señal de analito, que se está registrando constantemente, genera una línea base. Con lo cual, en el momento en que algún compuesto procedente de la salida del cromatógrafo compita en la ionización con el analito, se observará un cambio en la señal del analito. Finalmente, se obtiene un cromatograma donde se pueden diferenciar las zonas, o tiempos de retención, donde la señal del analito se altera debido al efecto matriz. Sin embargo, ambos autores no coinciden en la explicación de por qué sucede esa perturbación de la señal base. Bonfiglio y colaboradores indican que la naturaleza química del compuesto es lo que más influye en la cantidad de supresión de la señal, más que otros aspectos como especies co-extraídas [482]. Por otra parte, Choi y colaboradores señalan que el comportamiento del método infusión post-columna no depende de la selección de un compuesto que tenga un tiempo de retención idéntico con el analito [483]. En sus experimentos, utilizan para la infusión post-columna un patrón del analito marcado isotópicamente. Y demuestran que éste pudo corregir simultáneamente la supresión existente del analito y uno de sus derivados, aunque el tiempo de retención entre ambos analitos difería en 3 minutos [483].

Ante esta disparidad de teorías, Stahnke y colaboradores realizaron estudios más amplios de infusión post-columna [484,485]. Para la detección de más de 100

plaguicidas en 20 matrices vegetales diferentes, con alto o bajo contenido en agua, ácidas, fermentadas y de alto contenido graso, en total evaluaron 2388 combinaciones analito/matriz [484]. En este estudio concluyen que, en un determinado tiempo de retención, el efecto matriz difiere más entre matrices que entre analitos. Por tanto, el efecto matriz debe estar menos influenciado por las propiedades fisicoquímicas de los analitos que por las propiedades de los componentes de la matriz que eluyen al mismo tiempo. Posteriormente, en otro estudio en 4 matrices (aguacate, té negro, naranja y rúcula) demostraron que la mayoría de los plaguicidas tienen efectos matriz muy similares si coeluyen con el mismo componente de matriz [485]. Con lo que los perfiles de algunos compuestos de referencia, que no estén presentes en las muestras, son suficientes para identificar las regiones de tiempo de los cromatogramas en los que será más o menos acusada la perturbación de la señal. En consecuencia, en qué tiempos de retención habrá mayor o menor efecto matriz.

Por lo tanto, el efecto matriz no depende de la estructura del analito, sino del tiempo de retención al que eluya, ya que éste es el que determina las especies que coeluyen en la separación y que afectarán posteriormente a la ionización. Varios autores han propuesto esta técnica de infusión post-columna como método para evitar zonas problemáticas y, así minimizar, el efecto matriz [214,486-488].

Aunque el método de infusión post columna ha sido utilizado por muchos autores para detectar y solventar el efecto matriz, esta estrategia no sirve para corregirlo. Únicamente sirve para saber cuáles son las zonas de mayor elución de interferentes y, en la medida de lo posible evitar que los analitos eluyan en esa región. Esta es una situación especialmente delicada, porque el tiempo de retención de los analitos está determinado en gran medida por su naturaleza, propiedades físico-químicas, polaridad o $\text{Log } K_{ow}$, entre otros. Con lo cual habrá situaciones en las que los tiempos de retención no puedan modificarse en gran medida. Además, se debe tener en cuenta que, igual que al cambiar parámetros cromatográficos para modificar el

tiempo de retención de los analitos, el tiempo de retención de los interferentes también puede variar. Como ya señalaron Chambers y colaboradores, este método sólo proporciona una evaluación cualitativa del efecto matriz, por lo que es una solución limitada y no proporciona datos cuantitativos sobre el grado en que se ve afectada la señal de los analitos [165]. Además, es un proceso que requiere mucho tiempo para localizar las zonas en las que se haya más efecto matriz y, posteriormente, una optimización para evitarlas. Este inconveniente se ve considerablemente incrementado cuando se trata de una propuesta de análisis multirresiduo, en la que gran cantidad de sustancias con polaridades muy distintas son analizadas. Al final, resultará inevitable que todos los analitos puedan evitar las regiones donde aparecen mayor número de interferentes si no se siguen otras estrategias para reducir el efecto matriz [152]. Esta aproximación está limitada al análisis de un número pequeño de analitos o a compuestos de la misma familia con similares características.

Por otra parte, de acuerdo con Stahnke y Alder, los perfiles de efecto de matriz en LC-MS y los cromatogramas de iones totales (TICs, de sus siglas en inglés: *Total Ion Chromatogram*) se comportan como imágenes especulares. Se observó en todos los casos que una elevada supresión en los experimentos de infusión post-columna generalmente estaba acompañada de un aumento en el TIC [152]. Con lo cual los TICs también pueden usarse como medida de evaluación cualitativa de en qué zonas del cromatograma hay más efecto matriz. Además, esta aproximación puede utilizarse para la comparación y evaluación de la cantidad de interferentes que puede quedar en un extracto de muestra tras diferentes tratamientos de muestra y/o *clean-ups* en LC-MS y GC-MS [152,191].

3.3.3. Uso de fuentes de ionización alternativas

Muchos de los métodos para el análisis cuantitativo de contaminantes y residuos en matrices grasas utilizan instrumentos de (U)HPLC-MS, siendo la ionización por ESI la más utilizada habitualmente [62,64,65,154-161,167,189,192-194,205,]. Como se explicó previamente, el efecto matriz normalmente es más acusado en ESI puesto que intervienen dos fases, líquida y gaseosa, en el proceso de ionización [126,128,135-139]. Además, varios estudios señalan que el diseño de la fuente según el fabricante también afecta a los valores obtenidos de efecto matriz [132,155,479,489]. Es posible optimizar los parámetros de la fuente de ionización ESI para conseguir una reducción del efecto matriz [126]. Aunque normalmente no se puede eliminar completamente el efecto matriz de esta manera y en métodos multiresiduo no es posible seleccionar las condiciones óptimas para todos los analitos [126,155].

Una de las soluciones que se proponen para la reducción del efecto matriz es la utilización de otras fuentes de ionización con el objetivo de reducir los fenómenos que lo provocan al emplear ESI. Normalmente, el cambio de la fuente de ionización no implica otros cambios respecto al tratamiento de muestra ni a las condiciones cromatográficas [154]. Tradicionalmente, la alternativa al ESI era la fuente de ionización APCI [127,138,140]. También en el campo de la seguridad alimentaria para la detección de residuos y contaminantes en matrices vegetales [128,136,142,144,490]. Y en el análisis de matrices grasas para la determinación de la presencia de plaguicidas [491], medicamentos de uso veterinario [492-496] o micotoxinas [497].

Por otra parte, la fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI) también ha sido usada para determinar contaminantes en alimentos [498-500], algunos de ellos pescado con alto contenido graso [501]. En comparación con APCI y ESI, la fuente APPI suele generar señales más reproducibles y su ionización es menos susceptible a la supresión iónica provocada por el efecto matriz [128,499,501]. Esto se debe a

que la ionización por APPI es una técnica más selectiva y está particularmente adaptada a compuestos con menor polaridad, con lo que, las moléculas susceptibles de interferir con el analito de interés probablemente sean diferentes que en ESI o APCI [139,145]. Por tanto, componentes de la muestra a menudo no son ionizables. Sin embargo, los compuestos que logran llegar a fase gaseosa sí que podrían actuar como dopantes, aumentando la eficiencia de ionización de compuestos con alta energía de ionización y causando efecto matriz [128].

El inconveniente del empleo de las fuente APCI y APPI es que son generalmente son menos sensibles [144,495] y tampoco están exentas de efecto matriz [501,502]. Además, cabe señalar que no todos los analitos se comportan de la misma manera debido a los diferentes mecanismos de ionización, incluso a veces no son ionizados [136]. Por lo que el empleo de APCI o APPI a veces no es efectiva en la reducción del efecto matriz. De hecho, algunos autores prefieren el empleo de fuentes ESI aunque exista mayor efecto matriz [144,502], ya que la pérdida de sensibilidad es mucho menor.

En contraposición con las fuentes comerciales actuales la fuente de DBDI ha demostrado su eficacia en el acoplamiento LC/MS y ha sido comparada con ESI, APCI y APPI [118]. En este estudio se comprueba que la fuente DBDI es capaz de ionizar compuestos en un rango de polaridades mayor al ESI y proporciona una menor fragmentación que la fuente APCI. Aplicado al campo de análisis de residuos y contaminantes en alimentos, la fuente DBDI fue comparada con ESI y APCI para la determinación plaguicidas con un amplio rango de propiedades fisicoquímicas en matrices vegetales [197,503]. En estos estudios, con la fuente de DBDI se obtuvo un efecto matriz suave (< -20%) para la mayoría de los compuestos en las matrices estudiadas, manzana, naranja y tomate [197], y naranja y aceite de oliva [503]. Además, la fuente de DBDI mejoraba la sensibilidad obtenida con APCI y de compuestos que en ESI; ya que formaban aductos de sodio en ESI, el DBDI fue capaz de detectar compuestos protonados, mejorando su sensibilidad. Además, la fuente

DBDI fue capaz de ionizar plaguicidas organoclorados que típicamente son analizados mediante GC-MS [197,503]. También el DBDI ha mostrado su eficacia para el análisis de una gran variedad de residuos y contaminantes (plaguicidas, PAHs y medicamentos, entre otros) en aceite de oliva [199]. Para el análisis de esta matriz con un altísimo contenido graso, Gilbert y colaboradores, consiguieron detectar mediante HPLC-DBDI-MS especies polares y no polares (incluyendo compuestos típicos de GC) ionizando en modo positivo y negativo en un solo análisis. Obtuvieron un efecto matriz prácticamente despreciable ($<\pm 15\%$) para la mayoría de compuestos en aceite de oliva. La fuente de DBDI mejoró la sensibilidad frente a ESI y APCI; pero, con la enorme ventaja de conseguir aunar en un solo método compuestos característicos de ambas fuentes. Ya que, en muchos casos, estas fuentes suelen actuar de forma complementaria, es decir, la fuente APCI no ioniza de forma eficiente los compuestos que ionizan bien mediante ESI, y viceversa [199].

Se han propuesto varios enfoques para aumentar la sensibilidad de las fuentes de DBDI. Vogel y colaboradores demostraron el empleo de una atmósfera controlada (CA) producía un aumento significativo en la sensibilidad y, por lo tanto, mejora de los límites de detección [119]. Por otro lado, el F μ TP, desarrollado por Brandt y colaboradores como alternativa a su fuente DBDI [120], la sensibilidad se incrementaba considerablemente con la CA [119]. Y se demostró que, a bajas concentraciones, el F μ TP aún produce una mayor eficiencia de ionización que otros métodos establecidos basados en plasma, como DBDI o LTP [119]. En este contexto la fuente CA-F μ TP es una fuente de ionización suave y que ofrece una sensibilidad adecuada. Vogel y colaboradores, utilizaron CA-F μ TP como fuente de ionización para la determinación de 13 compuestos orgánicos volátiles como biomarcadores potencialmente relevantes para la detección del cáncer en saliva [116]. Este diseño CA-F μ TP permitió una ionización suave con resultados sobresalientes en términos de sensibilidad, efecto matriz nulo y LODs por debajo de 80 ng L⁻¹. Sin embargo, el

potencial de esta fuente de ionización, CA-F μ TP, aún no está explorada en el campo de la seguridad alimentaria.

3.3.4. Dilución directa (*Dilute-and-Shoot*)

La estrategia de *Dilute-and-Shoot* se basa en una simple dilución de la muestra para su posterior análisis mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas. Este protocolo ha sido ampliamente empleado como preparación de muestra para la detección de medicamentos o drogas de abuso en matrices biológicas con un alto contenido en como orina o saliva [504-510] desde los años 2000, mientras que otras muestras biológicas más complicadas como el plasma no podían ser analizadas de simplemente con esta aproximación. Además, teniendo en cuenta la complejidad de las muestras alimentarias, dado que la mayoría no son líquidas, o que incluso siéndolo, p.ej. zumos, leche o aceites, su diversidad de componentes es muy alta, el procedimiento de *Dilute-and-Shoot* no sería conveniente.

En este contexto, cualquier muestra sólida no tendría cabida en este protocolo evidentemente ya que es necesario obtener un extracto que sea compatible para su análisis por LC-MS. Por ello el término *Dilute-and-Shoot* ha sido recientemente redefinido dado el avance de la técnica para incluir también a las matrices sólidas. Para ello se indica que puede adicionarse un disolvente a la matriz que sea capaz de extraer los compuestos de interés a una fase líquida mediante procedimientos físicos (como filtración y centrifugación) [511]. Una vez obtenido un extracto líquido de la muestra este ya puede ser diluido y analizado por LC-MS.

Sin embargo, la tendencia actual en la química analítica en el campo de la seguridad alimentaria es al desarrollo de métodos genéricos que hagan posible el análisis del mayor número de compuestos extraídos [156,259,511-514]. Sin embargo, la mayor desventaja de este tipo de métodos es que al no realizar una etapa de limpieza el efecto matriz puede ser muy alto. Por tanto, una de las soluciones más sencillas para

solventar ese elevado efecto matriz es emplear un alto factor de dilución de la muestra. Ese es el objetivo de este procedimiento, posibilitar que con un protocolo muy simple y rápido de preparación de muestra puedan determinarse los analitos deseados. Además, este tipo de procedimiento es muy ventajoso en términos de reducción del número de materiales y disolventes, con lo cual será más barato y menos contaminante para el medio ambiente [511]. Por tanto, de acuerdo con este reciente estudio en el que reevalúa el concepto de *Dilute-and-Shoot*, se especifica que los factores de dilución actualmente pueden llegar hasta 1:100 con el objetivo de reducir el efecto matriz. Incluso hay autores que dependiendo de la combinación analito/matriz, este factor de dilución es necesario [479]. El mayor inconveniente que puede tener esta técnica es que es necesaria una instrumentación muy potente que logre separar los analitos con una resolución adecuada y detectores suficientemente sensibles, debido a los factores diluciones tan altos que se necesitan para tener un efecto matriz despreciable.

Esta aproximación lleva empleándose ya desde hace al menos una década en la determinación de plaguicidas, medicamentos de uso veterinario y micotoxinas en alimentos grasos, muchas veces como alternativa a los sorbentes empleados en la etapa de limpieza debido a que, en algunas ocasiones, pueden afectar a las recuperaciones [156,166,214,242,278,479,511,515,516].

4. REFERENCIAS

- ¹ European Commission. 2020. Communication from the commission to the European parliament, the council, the European economic and social committee and the committee of the regions. A Farm to Fork Strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system. COM/2020/381 final.
- ² European Commission. 2000. White Paper on food safety. COM/99/0719 final.
- ³ Puntoycoma. 1999. Seguridad alimentaria, ¿food safety o food security? *Boletín de los traductores españoles de las instituciones de la Unión Europea*, 60. Accessed 23/11/2022. <https://ec.europa.eu/translation/bulletins/puntoycoma/60/pyc603.htm>
- ⁴ Hanning, I. B., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., & Ricke, S. C. 2012. Food Safety and Food Security. *Nature Education Knowledge*, 3. Accessed 23/11/2022. <https://www.nature.com/scitable/knowledge/library/food-safety-and-food-security-68168348/>
- ⁵ European Commission. 2021. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. Consolidated text: 02002R0178-20210526.
- ⁶ European Commission. Directorate-General for Agriculture and Rural Development, Directorate-General for Trade. 2018. Ensuring food is safe: the veterinary and phytosanitary system of the European Union explained.
- ⁷ European Commission. 2000. White Paper on food safety. COM/99/0719 final.
- ⁸ European Commission. 2022. Food Safety. Food. Chemical safety. Accessed 10/06/2022. https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety_es
- ⁹ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Chemicals in food. Accessed 22/06/2022. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/chemicals-food>
- ¹⁰ European Commission. 2022. Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. Consolidated text: 02008R1333-20220222.
- ¹¹ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Chemicals in food. Accessed 23/11/2022. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/food-additives>
- ¹² European Commission. 2021. Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. Consolidated text: 02008R1334-20211124.
- ¹³ European Commission. 2021. Regulation (EC) No 2065/2003 of the European Parliament and of the Council of 10 November 2003 on smoke flavourings used or intended for use in or on foods. Consolidated text: 02003R2065-20210327.

- ¹⁴ European Commission. 2022. Commission Implementing Regulation (EU) No 1321/2013 of 10 December 2013 establishing the Union list of authorised smoke flavouring primary products for use as such in or on foods and/or for the production of derived smoke flavourings. Consolidated text: 02013R1321-20220419.
- ¹⁵ European Commission. 2021. Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. Consolidated text: 02004R1935-20210327.
- ¹⁶ European Commission. 2009. Commission Regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food.
- ¹⁷ European Commission. 2005. Council Directive of 15 October 1984 on the approximation of the laws of the Member States relating to ceramic articles intended to come into contact with foodstuffs (84/500/EEC). Consolidated text: 01984L0500-20050520.
- ¹⁸ European Commission. 2007. Commission Directive 2007/42/EC of 29 June 2007 relating to materials and articles made of regenerated cellulose film intended to come into contact with foodstuffs.
- ¹⁹ European Commission. 2020. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Consolidated text: 02011R0010-20200923.
- ²⁰ European Commission. 2015. Commission Regulation (EC) No 282/2008 of 27 March 2008 on recycled plastic materials and articles intended to come into contact with foods and amending Regulation (EC) No 2023/2006. Consolidated text: 02008R0282-20151026.
- ²¹ European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs.
- ²² European Commission. 2022. Food Safety. Food. Chemical safety. Contaminants. Catalogue. Accessed 21/06/2022. https://ec.europa.eu/food/safety/chemical-safety/contaminants/catalogue_en#processing_contaminants
- ²³ EFSA (European Food Safety Authority). 2017. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on a request from the European Commission to perform a scientific risk assessment on nitrate in vegetables. *The EFSA Journal* 2008, 689, 1-79.
- ²⁴ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2016. Scientific Opinion on erucic acid in feed and food. *EFSA Journal* 2016, 14, 11, 4593.
- ²⁵ Sabuncuoğlu, S. 2020. Introductory Chapter: Mycotoxins and Food Safety. In Sabuncuoğlu, S. (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety*. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-875-5.
- ²⁶ EFSA (European Food Safety Authority). 2020. Mycotoxin mixtures in food and feed: holistic, innovative, flexible risk assessment modelling approach: MYCHIF. *EFSA supporting publication 2020*, EN-1757, 1-161.

- ²⁷ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel Panel on Contaminants in the Food Chain). 2014. Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA Journal* 2014, 12, 12, 3916.
- ²⁸ Mannaa, M. & Kim, K.D. 2017. Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage. *Microbiology*, 45, 240-254.
- ²⁹ Xu, R., Kiarie, E.G., Yiannikouris, A., Sun, L., & Karrow, N.A. 2022. Nutritional impact of mycotoxins in food animal production and strategies for mitigation. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 13, 1-19.
- ³⁰ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Mycotoxins. Accessed 20/08/2022. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins#efsa-page-title>
- ³¹ WHO (World Health Organization). 2018. Newsroom. Mycotoxins. Accessed 20/08/2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- ³² Kabak, B. 2009. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 549-554.
- ³³ Idris, Y.M.A., Mariod, A.A., Elnour, I.A., & Mohamed, A.A. 2010. Determination of aflatoxin levels in Sudanese edible oils. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2539-2541.
- ³⁴ Banu, N. & Muthumary, J.P. 2010. Aflatoxin B1 contamination in sunflower oil collected from sunflower oil refinery situated in Karnataka. *Health*, 2, 973-987.
- ³⁵ Eskola, M., Kos, G., Elliott, C.T., Hajšlová, J., Mayar, S., Krska, R. 2020. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60, 2773-2789.
- ³⁶ Cinar, A., & Onbaşı, E. 2019. Mycotoxins: The Hidden Danger in Foods. In Sabuncuoğlu, S. (Ed.), *Mycotoxins and Food Safety*. IntechOpen. ISBN: 978-1-78984-875-5.
- ³⁷ EFSA (European Food Safety Authority). 2017. Scientific report on human and animal dietary exposure to ergot alkaloids. *EFSA Journal* 2017, 15(7):4902.
- ³⁸ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2013. Scientific Opinion on Tropane alkaloids in food and feed. *EFSA Journal* 2013, 11(10):3386.
- ³⁹ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2017. Statement on the risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal* 2017, 15(7):4908.
- ⁴⁰ European Commission. 2020. Commission Regulation (EU) 2020/2040 of 11 December 2020 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of pyrrolizidine alkaloids in certain foodstuffs.
- ⁴¹ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2008. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request

from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *EFSA Journal* 2008, 724, 1-114.

⁴² European Commission. 2011. Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs.

⁴³ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain), 2015. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal* 2015, 13, 6, 4104.

⁴⁴ European Commission. 2018. Commission Regulation (EU) 2017/2158 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide.

⁴⁵ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Dioxins and PCBs. Accessed 24/07/2022. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/dioxins-and-pcbs>

⁴⁶ European Commission. 2017. Commission Recommendation (EU) 2017/84 of 16 January 2017 on the monitoring of mineral oil hydrocarbons in food and in materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Union*, L12/95.

⁴⁷ Carrillo-Carrión, C., Lucena, R., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. 2007. Liquid-liquid extraction/headspace/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene, (o-, m- and p-)xylene and styrene in olive oil using surfactant-coated carbon nanotubes as extractant. *Journal of Chromatography A*, 1171, 1-7.

⁴⁸ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2012. Scientific Opinion on Mineral Oil Hydrocarbons in Food. *EFSA Journal* 2012, 10, 6, 270.

⁴⁹ López-Blanco, R., Moreno-González, D., Nortes-Méndez, R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., & Gilbert-López, B. 2016. Experimental and theoretical determination of pesticide processing factors to model their behavior during virgin olive oil production. *Food Chemistry*, 199, 273-279.

⁵⁰ Morchio, G., Spadone, J.C., & Bracco, U. 1994. Volatile aromatic hydrocarbons (VAHs) in edible vegetable oils with particular reference to virgin olive oil. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 71, 491-501.

⁵¹ Biedermann, M., Grob, K., & Morchio, G. 1996. On the origin of benzene, toluene, ethylbenzene, and the xylenes in virgin olive oil-further results. *European Food Research and Technology / Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 203, 224-229.

⁵² ECHA (European Chemicals Agency). 2022. Perfluoroalkyl chemicals (PFAS). Accessed 29/06/2022. <https://echa.europa.eu/hot-topics/perfluoroalkyl-chemicals-pfas>.

⁵³ EFSA CONTAM Panel (European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain). 2020. Scientific Opinion on the risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA Journal* 2020, 18, 9, 6223.

⁵⁴ European Commission. 2020. Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption (recast).

- ⁵⁵ Tsipi, D., Botitsi, H., & Economou A. .2015. Chapter 1: Pesticide Chemistry and Risk Assessment. In Tsipi, D., Botitsi, H., & Economou, A. (Eds.). *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-111907077-1.
- ⁵⁶ Comisión Del Codex Alimentarius. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. 2016. Codex Alimentarius. Manual de procedimiento (25ª Ed.). ISBN: 978-92-5-309362-5.
- ⁵⁷ Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R.P. 2018. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.
- ⁵⁸ Kim, K.H, Kabir, E., & Jahan, S.A. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*, 575, 525-535.
- ⁵⁹ González-Rodríguez, R. M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Gonzalez-Barreiro, C., & Simal-Gándara, J. 2011. A Review on the Fate of Pesticides during the Processes within the Food-Production Chain. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51:2, 99-114.
- ⁶⁰ Bolognesi, C., & Merlo, F.D. 2011. Pesticides: Human Health Effects. In Nriagu, J.O. (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Health*. The Netherlands: Elsevier. ISBN: 978-0-444-52272-6
- ⁶¹ Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. 2018. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-Cancer and other disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103-114.
- ⁶² Hildmann, F., Gottert, C., Frenzel, T., Kempe, G., & Speer, K. 2015. Pesticide residues in chicken eggs - A sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1403, 1-20.
- ⁶³ Akre, C. 2016. The use of pyrethroids, carbamates, organophosphates, and other pesticides in veterinary medicine. *Chemical Analysis of Non-Antimicrobial Veterinary Drug Residues in Food*, 7, 383-426.
- ⁶⁴ LeDoux, M. 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1021-1036.
- ⁶⁵ Lichtmannegger, K., Fischer, R., Steemann, F.X., Unterluggauer, H., & Masselter, S. 2015. Alternative QuEChERS-based modular approach for pesticide residue analysis in food of animal origin. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 407, 3727-3742.
- ⁶⁶ Zhang, X., Song, Y., Jia, Q., Zhang, L., Zhang, W., Mu, P., Jia, Y., Qian, Y., & Qiu, J. 2019. Simultaneous determination of 58 pesticides and relevant metabolites in eggs with a multi-functional filter by ultra-highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1593, 81-90.
- ⁶⁷ EFSA PPR Panel (European Food Safety Authority Panel on Plant Protection Products and their Residues). 2013. Scientific Opinion on relevance of dissimilar mode of action and its

appropriate application for cumulative risk assessment of pesticides residues in food. *EFSA Journal* 2013, 11, 12, 3472.

⁶⁸ EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Establishment of cumulative assessment groups of pesticides for their effects on the nervous system. *EFSA Journal* 2019, 17, 9, 5800.

⁶⁹ EFSA (European Food Safety Authority). 2020. Cumulative dietary risk characterisation of pesticides that have chronic effects on the thyroid. *EFSA Journal* 2020, 18, 4, 6088.

⁷⁰ European Commission. 1990. Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal L* 224.

⁷¹ Baynes, R.E., Dedonder, K., Kissell, L., Mzyk, D., Marmulak, T., Smith, G., Tell, L., Gehring, R., Davis, J., & Riviere, J.E. 2016. Health concerns and management of select veterinary drug residues. *Food and Chemical Toxicology*, 88, 112-122.

⁷² Boobis, A., Cerniglia, C., Chicoine, A., Fattori, V., Lipp, M., Reuss, R., Verger, P., & Tritscher, A. 2017. Characterizing chronic and acute health risks of residues of veterinary drugs in food: latest methodological developments by the joint FAO/WHO expert committee on food additives. *Critical Reviews in Toxicology*, 47, 885-899.

⁷³ WHO (World Health Organization). 2020. Notas descriptivas. Resistencia a los antimicrobianos. Accessed: 24/11/2022. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

⁷⁴ WHO (World Health Organization). 2021. Newsroom. Antimicrobial resistance. Accessed: 02/09/2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

⁷⁵ WHO (World Health Organization). 2022. Newsroom. World leaders and experts call for action to protect the environment from antimicrobial pollution. Accessed: 02/09/2022 <https://www.who.int/news/item/02-03-2022-world-leaders-and-experts-call-for-action-to-protect-the-environment-from-antimicrobial-pollution>

⁷⁶ WHO (World Health Organization). 2017. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals: policy brief. WHO/NMH/FOS/FZD/17.5

⁷⁷ European Commission. 2022. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Consolidated text: 02006R1881-20220503.

⁷⁸ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. Call for continuous collection of chemical contaminants occurrence data in food and feed. Accessed 20/08/2022. <https://www.efsa.europa.eu/en/call/call-continuous-collection-chemical-contaminants-occurrence-data-food-and-feed-0>

⁷⁹ European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L70*, 12-34.

⁸⁰ European Commission. 2002. 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 L 221*.

⁸¹ EU Reference Laboratories. 2016. Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food.

⁸² European Commission. 2017. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. *SANTE/12089/2016*.

⁸³ European Commission. SCF (Scientific Committee on Food). 1999. Opinion on certain aromatic hydrocarbons present in food.

⁸⁴ Geueke, B. 2017. Dossier - Mineral oil hydrocarbons. DOI: 10.5281/zenodo.820984

⁸⁵ EFSA (European Food Safety Authority). 2019. Rapid risk assessment on the possible risk for public health due to the contamination of infant formula and follow-on formula by mineral oil aromatic hydrocarbons (MOAH). *EFSA Supporting Publication 2019*, EN-1741.

⁸⁶ European Commission. PAFF Committee (Standing Committee on Plants, Animals, Food and Feed). 2022. Draft joint statement of the Member States regarding the presence of Mineral Oil Aromatic Hydrocarbons (MOAH) in food, including food for infants and young children.

⁸⁷ European Commission. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, L330/32.

⁸⁸ European Commission. 2006. Commission directive 2006/141/EC of 22 December 2006 on infant formulae and follow-on formulae and amending Directive 1999/21/EC. *Official Journal of the European Union*, L401.

⁸⁹ European Commission. 2022. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EC. *Official Journal of the European Union*, L70. Consolidated text: 02005R0396-20220516.

⁹⁰ Gómez-Ramos, M.M., Ferrer, C., Malato, O., Agüera, A., & Fernández-Alba, A.R. 2013. Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in fruit and vegetables: Screening and quantitative studies. *Journal of Chromatography A*, 1287, 24-37.

⁹¹ USDA (United States Department of Agriculture). 2022. Agricultural Marketing Service. Pesticide Data Program. PDP Database Search. Accessed 01/09/2022. <https://apps.ams.usda.gov/pdp>

⁹² Bryant Christie Inc. 2022. BCGlobal Subscriptions. Pesticide MRLs. Accessed: 01/09/2022. <https://www.bryantchristie.com/BCGlobal-Subscriptions>

⁹³ European Commission. 2022. EU Pesticides Database. Accessed: 29/08/2022 https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en

- ⁹⁴ EFSA (European Food Safety Authority). 2022. The 2020 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* 2022, 20, 3, 7215.
- ⁹⁵ European Commission. 2022. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. *SANTE 11312/2021*.
- ⁹⁶ European Commission. 2022. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, L 15. Consolidated text: 02010R0037-20220509.
- ⁹⁷ European Commission. 2019. Commission Regulation (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC. *Official Journal of the European Union*, L 289.
- ⁹⁸ European Commission. 2013. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal L 125*. Consolidated text: 01996L0023-20130701.
- ⁹⁹ European Commission. 2009. Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L 152.
- ¹⁰⁰ European Commission. 2021. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. *Official Journal of the European Union*, L 180. Consolidated text: 02021R0808-20210610.
- ¹⁰¹ Naushad, M., Khan M.R., & Allothman, Z.A. 2014. Chapter 1: History and Introduction of UPLC/MS. In Naushad, M., Khan M.R. (Eds.). *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Evaluation and Applications in Food Analysis*. USA, Taylor & Francis Group, LLC. ISBN: 978-1-4665-9155-4.
- ¹⁰² IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 1997. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition, the "Gold Book", Online version 2019, Revised 2012. Compiled by McNaught A.D. & Wilkinson, A. In Chalk, S.J (Ed.). United Kingdom, Blackwell Scientific Publications.). ISBN: 0-9678550-9-8. Accessed 27/09/2022 <https://doi.org/10.1351/goldbook.C01075>
- ¹⁰³ Domingues, P., García, A., & Skrzydlewska, E. 2018. *AAALifeSci Course Companion Manual Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences*. ISBN: 978-83-951534-7-1.

- ¹⁰⁴ Karasekand, F.W., & Clement, R.E. 2003. *Basic Gas Chromatography - Mass Spectrometry. Principles and Techniques*. (Third Impression). The Netherlands, Elsevier. ISBN: 0-444-42760-0.
- ¹⁰⁵ Tipler, A. 2021. Chapter 8: Sample introduction methods. In Poole, C.F. (Ed.). *Gas Chromatography (Second Edition), Handbooks in Separation Science*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780128206751
- ¹⁰⁶ Lucci, P., Busquets, R., & Núñez, O. 2014. Chapter 2: UHPLC-MS(/MS) Analysis of Pesticides in Food. In Naushad, M., Khan M.R. (Eds.). *Ultra Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry, Evaluation and Applications in Food Analysis*. USA, Taylor & Francis Group, LLC. ISBN: 978-1-4665-9155-4.
- ¹⁰⁷ Lacorte, S., Agüera, A., Cortina-Puig, M., & Gómez-Canela, C. 2015. Chapter 6: Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry: mass detectors. In Tsiipi, D., Botitsi, H., & Economou, A. (Eds.). *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-111907077-1.
- ¹⁰⁸ de Hoffmann, E. & Stroobant, V. 2007. *Mass Spectrometry. Principles and Applications*. Third Edition. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-03310-4.
- ¹⁰⁹ Ardrey, R.E. 2003. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. An Introduction*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 0-471-498017.
- ¹¹⁰ Harvey, D.J. 2019. Mass Spectrometry. Overview. In Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., & Miró M. (Eds.). *Encyclopedia of Analytical Science*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780081019849
- ¹¹¹ Portolés, T., Mol, J.G.J., Sancho, J.V., & Hernández, F. 2012. Advantages of Atmospheric Pressure Chemical Ionization in Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Pyrethroid Insecticides as a Case Study. *Analytical Chemistry*, 84, 9802-9810.
- ¹¹² Mirabelli, M.F., Wolf, J.C., & Zenobi, R. 2017. Atmospheric pressure soft ionization for gas chromatography with dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry (GC-DBDI-MS). *Analyst*, 142, 1909-1915.
- ¹¹³ Albert, A., Shelley, J.T., & Engelhard, C. 2014. Plasma-based ambient desorption/ionization mass spectrometry: state-of-the-art in qualitative and quantitative analysis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 406, 6111-6127.
- ¹¹⁴ Smoluch, M., Mielczarek, P., & Silberring, J. 2016. Plasma-based ambient ionization mass spectrometry in bioanalytical sciences. *Mass Spectrometry Reviews*, 35, 22-34.
- ¹¹⁵ Chen, J., Tang, F., Guo, C., Zhang, S., & Zhang, X. 2017. Plasma-based ambient mass spectrometry: a step forward to practical applications. *Analytical Methods*, 9, 4908-4923.
- ¹¹⁶ Vogel, P., Lazarou, C., Gazeli, O., Brandt, S., Franzke, J., & Moreno-González, D. 2020. Study of Controlled Atmosphere Flexible Microtube Plasma Soft Ionization Mass Spectrometry for Detection of Volatile Organic Compounds as Potential Biomarkers in Saliva for Cancer. *Analytical Chemistry*, 92, 9722-9729.

- ¹¹⁷ Brandt, S., Klute, F.D., Schütz, A., & Franzke, J. 2017. Dielectric barrier discharges applied for soft ionization and their mechanism. *Analytica Chimica Acta*, 951, 16-31.
- ¹¹⁸ Hayen, H., Michels, A., & Franzke, J. 2009. Dielectric Barrier Discharge Ionization for Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81, 10239-10245.
- ¹¹⁹ Vogel, P., Marggraf, U., Brandt, S., García-Reyes, J.F., & Franzke, J. 2019. Analyte-Tailored Controlled Atmosphere Improves Dielectric Barrier Discharge Ionization Mass Spectrometry Performance. *Analytical Chemistry*, 91, 3733-3739.
- ¹²⁰ Brandt, S., Klute, F.D., Schütz, A., Marggraf, U., Drees, C., Vogel, P., Vautz, W., & Franzke, J. 2018. Flexible Microtube Plasma (F μ TP) as an Embedded Ionization Source for a Microchip Mass Spectrometer Interface. *Analytical Chemistry*, 90, 10111-10116.
- ¹²¹ Louris, J.N. & Cooks, R.G. 1987. Instrumentation, Applications, and Energy Deposition in Quadrupole Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 59, 1677-1685.
- ¹²² Hocart, C.H. 2010. Mass Spectrometry: An Essential Tool for Trace Identification and Quantification. In Liu, H.-W. (Ben) & Mander, L. (Eds.). *Comprehensive Natural Products II, Chemistry and Biology*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780080453828.
- ¹²³ Spencer, C., Zhang, W., & Ouyang, Z. 2021. Chapter 5: Mass Spectrometry and Applications. In McPherson, R. A. & Pincus, M. (Eds.). *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 24th Edition*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780323755085.
- ¹²⁴ Cooks, R.G. & Hands, O.W. 1987. Tandem mass spectrometry at low kinetic energy. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B29, 427-436.
- ¹²⁵ Schwartz, J.C., Wade, A.P., Enke, C.G., & Cooks, R.G. 1990. Systematic Delineation of Scan Modes in Multidimensional Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 62, 1809-1818.
- ¹²⁶ Krueve, A., Herodes, K., & Leito, I. 2010. Optimization of electrospray interface and quadrupole ion trap mass spectrometer parameters in pesticide liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 24, 919-926.
- ¹²⁷ Matuszewski, B.K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. 2003. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019-3030.
- ¹²⁸ Trufelli, H., Palma, P., Famigliini, G., & Cappiello, A. 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*. 30, 491-509.
- ¹²⁹ Krueve, A. & Leito, I. 2013. Comparison of different methods aiming to account for/overcome matrix effects in LC/ESI/MS on the example of pesticide analyses. *Analytical Methods*, 5, 3035-3044.
- ¹³⁰ Taylor, P.J. 2005. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*, 38, 328-334.

- ¹³¹ Zhou, W., Yang, S., & Wang, P. 2017. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9, 1839-1844.
- ¹³² Ghosh, C., Shinde, C.P., & Chakraborty, B.S. 2012. Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B*, 893, 193-200.
- ¹³³ Tang, L. & Kebarle, P. 1993. Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution. *Analytical Chemistry*, 65, 3654-3668.
- ¹³⁴ Buhrman, D.L., Price, P.I., & Rudewicz, J. 1996. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 7, 1099-1105.
- ¹³⁵ King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., & Olah, T. 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11, 942-950.
- ¹³⁶ Thurman, E.M., Ferrer I., & Barceló, D. 2001. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. *Analytical Chemistry*, 73, 5441-5449.
- ¹³⁷ Liang, H.R., Takagaki, T., Foltz, R.L., & Bennett, P. 2005. Quantitative determination of endogenous sorbitol and fructose in human nerve tissues by atmospheric-pressure chemical ionization liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 19, 2284-2294.
- ¹³⁸ Schuhmacher, J., Zimmer, D., Tesche, F., & Pickard, V. 2003. Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: practical approaches to their elimination. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 17, 1950-1957.
- ¹³⁹ Antignac, J. P., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., & Le Bizec, B. 2005. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*, 529, 129-136.
- ¹⁴⁰ Dams, R., Huestis, M.A., Lambert, W.E., & Murphy, C.M. 2003. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14, 1290-1294.
- ¹⁴¹ Sangster, T., Spence, M., Sinclair, P., Payne, R., & Smith, C. 2004. Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 18, 1362-1364.
- ¹⁴² Souverain, S., Rudaz, S., & Veuthey, J.L. 2004. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, 1058, 61-66.
- ¹⁴³ Matuszewski, B.K. 2006. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, 830, 293-300.

- ¹⁴⁴ De O. Silva, R., De Menezes, M.G.G., De Castro, R.C., De A Nobre, C., Milhome, M.A.L., & Do Nascimento, R.F. 2019. Efficiency of ESI and APCI ionization sources in LC-MS/MS systems for analysis of 22 pesticide residues in food matrix. *Food Chemistry*, 297, 124934.
- ¹⁴⁵ Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., & Gennaro, M.C. 2010. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3929-3937.
- ¹⁴⁶ Niessen, W.M.A, Manini, P., & Andreoli, R. 2006. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25, 881-899.
- ¹⁴⁷ Ikonomu, M.G., Blades, A.T., & Kebarle P. 1990. Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 62, 957-967.
- ¹⁴⁸ Hajšlová, J. & Zrostlíková, J. 2003. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, 1000, 181-197.
- ¹⁴⁹ Mallet, C.R., Lu, Z., & Mazzeo, J.R. 2004. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 18, 49-58.
- ¹⁵⁰ Cech, N.B. & Enke, C.G. 2000. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides. *Analytical Chemistry*, 72, 2717-2723.
- ¹⁵¹ Zhou, S. & Cook, K.D. 2001. A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: Charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12, 206-214.
- ¹⁵² Stahnke, H. & Alder, L. 2015. Chapter 7: Matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. In Tsipi, D., Botitsi, H., & Economou, A. (Eds.). *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-111907077-1.
- ¹⁵³ Raposo, F. & Ibelli-Bianco C. 2020. Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*, 129, 115913.
- ¹⁵⁴ Raposo F., & Barceló, D. 2021. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. *Trends in Analytical Chemistry*, 134, 116068.
- ¹⁵⁵ Olejnik, M., Jedziniak, P., Szprengier-Juskiewicz, T., & Żmudzki, J. 2013. Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 27, 437-442.
- ¹⁵⁶ Sulyok, M., Stadler, D., Steiner, D., & Krska, R. 2020. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: challenges and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 2607-2620.

- ¹⁵⁷ Cunha, S. C., Sá, S. V. M., & Fernandes, J. O. 2018. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 114, 260-269.
- ¹⁵⁸ Liu, Y., Han, S., Lu, M., Wang, P., Han, J., & Wang, J. 2014. Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. *Journal of Chromatography B*, 970, 68-76.
- ¹⁵⁹ Han, Z., Dong, M., Han, W., Shen, Y., Nie, D., Shi, W., & Zhao, Z. 2016. Occurrence and exposure assessment of multiple mycotoxins in dried fruits based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *World Mycotoxin Journal*, 9, 465-474.
- ¹⁶⁰ Villagrasa, M., Guillamón, M., Eljarrat, E. & D. Barceló. 2007. Matrix effect in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material. *Journal of Chromatography B*, 1157, 108-114.
- ¹⁶¹ Hoff, R.B., Rübensam, G., Jank, L., Barreto, F., Peralba, M.C. R., Pizzolato, T. M., Díaz-Cruz, M.S. & Barceló, D. 2015. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. *Talanta*, 132, 443-450.
- ¹⁶² Lacina, O., Zachariasova, M., Urbanova, J., Vaclavikova, M., Cajka, T., & Hajslova, J. 2012. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1262, 8-18.
- ¹⁶³ Vaclavikova, M., MacMahon, S., Zhang, K., & Begley, T.H. 2013. Application of single immunoaffinity clean-up for simultaneous determination of regulated mycotoxins in cereals and nuts. *Talanta*, 117, 345-351.
- ¹⁶⁴ Guo, Q., Zhao, S., Zhang, J., Qi, K., Du, Z., & Shao, B. 2018. Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 1543-1552.
- ¹⁶⁵ Chambers, E., Wagrowski-Diehl, Lu, Z., & Mazzeo, J.R. 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 852, 22-34.
- ¹⁶⁶ Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Jiménez-Girón, A., & Fernández-Alba, A.R. 2011. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7634-7639.
- ¹⁶⁷ Lee, J., Shin, Y., Lee, J., Lee, J., Kim, B.J., & Kim, J.H. 2018. Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. *Chemosphere*, 207, 519-526.
- ¹⁶⁸ Hidalgo-Ruiz, J. L., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., & Garrido-Frenich, A. 2019. Determination of mycotoxins in nuts by ultra high-performance liquid chromatography-

tandem mass spectrometry: Looking for a representative matrix. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103228

¹⁶⁹ Krueve, A., Leito, I., & Herodes, K. 2009. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica Acta*, 651, 75-80.

¹⁷⁰ FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1987. *What is food composed of?* Accessed: 14/09/2022
<https://www.fao.org/3/s4314e/s4314e04.htm#TopOfPage>

¹⁷¹ USFDA (United States Food Drug Administration). 1999. Pesticide Analytical Manual Volume I (PAM) 3rd Edition. Accessed: 14/09/2022
<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm111455.htm>

¹⁷² Melton, L., Shahidi, F., & Varelis, P. 2019. *Encyclopedia of Food Chemistry*. The Netherlands: Elsevier. ISBN: 978-0-12-814045-1.

¹⁷³ Lichtenstein, A.H. 2013. Fats and Oils. In Caballero, B. (Ed.). *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. The Netherlands: Elsevier. ISBN: 9780123848857.

¹⁷⁴ FAO (The Food and Agriculture Organization of the United Nations). 1989. *Nutrientes Esenciales - Lípidos*. Accessed: 14/09/2022 <https://www.fao.org/3/ab492s/AB492S02.htm>

¹⁷⁵ Álvarez Blanco, J.M. 2004. No es lo mismo (I): Amphoteric, amphiphile, amphipathic. *Panace@*, 5, 15, 11.

¹⁷⁶ Lordan, R., Tsoupras, A., & Zabetakis, I. 2017. Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, 22, 1964.

¹⁷⁷ Yeo, J. & Parrish, C.C. 2021. Shotgun Lipidomics for the Determination of Phospholipid and Eicosanoid Profiles in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Muscle Tissue Using Electrospray Ionization (ESI)-MS/MS Spectrometric Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2272.

¹⁷⁸ Gitlin, I., Carbeck, J.D., & Whitesides, G.M. 2006. Why Are Proteins Charged? Networks of Charge-Charge Interactions in Proteins Measured by Charge Ladders and Capillary Electrophoresis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45, 3022-3060.

¹⁷⁹ Ahmad, S., Kalra, H., Gupta, A., Raut, B., Hussain, A., & Rahman, M.A. 2012. HybridSPE: A novel technique to reduce phospholipid-based matrix effect in LC-ESI-MS. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4, 267-275.

¹⁸⁰ Namieśnik, J. 2002. Trace Analysis - Challenges and Problems. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 32, 271-300.

¹⁸¹ IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). 1997. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Edition, the "Gold Book", Online version 2019, Revised 2014. Compiled by McNaught A.D. & Wilkinson, A. In Chalk, S.J (Ed.). United Kingdom, Blackwell Scientific Publications.). ISBN: 0-9678550-9-8. Accessed 27/09/2022
<https://doi.org/10.1351/goldbook.T06421>

¹⁸² USDA (United States Department of Agriculture). Agricultural Research Service. 2020. USDA Food and Nutrient Database for Dietary Studies 2017-2018. Accessed: 18/09/2022.

<https://www.ars.usda.gov/northeast-area/beltsville-md-bhnrc/beltsville-human-nutrition-research-center/food-surveys-research-group/docs/fndds-download-databases/>

¹⁸³ Garcia, C., Lutz, N.W., Confort-Gouny, S., Cozzone, P.J., Armand, M., & Bernard, M. 2012. Phospholipid fingerprints of milk from different mammals determined by ³¹P NMR: Towards specific interest in human health. *Food Chemistry*, 135, 1777-1783.

¹⁸⁴ Pimentel, L., Gomes, A., Pintado, M., & Rogríguez-Alcalá, L.M. 2016. Isolation and Analysis of Phospholipids in Dairy Foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 9827369.

¹⁸⁵ Weihrauch, J.L. & Son, YS. 1983. Phospholipid content of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60, 1971-1978.

¹⁸⁶ Song, S., Cheong, L.-Z., Wang, H., Man, Q.-Q., Pang, S.-J., Li, Y.-Q., Ren, B., Wang, Z., & Zhang, J. 2018. Characterization of phospholipid profiles in six kinds of nut using HILIC-ESIIT-TOF-MS system. *Food Chemistry*, 240, 1171-1178.

¹⁸⁷ Chen, B., McClements, D.J., & Decker, E.A. 2012. Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 901-916.

¹⁸⁸ Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., & Dais, P. 2008. Determination of Phospholipids in Olive Oil by ³¹P NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6232-6240.

¹⁸⁹ García-Reyes, J.F., Ferrer, C., Gómez-Ramos, M.J., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R. 2007. Determination of pesticide residues in olive oil and olives. *Trends in Analytical Chemistry*, 26, 3.

¹⁹⁰ Schenck, F.J. & Lehotay, S.J. 2000. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? *Journal of Chromatography A*, 868, 51-61.

¹⁹¹ Walorczyk, S. 2014. Validation and use of a QuEChERS-based gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for multiresidue pesticide analysis in blackcurrants including studies of matrix effects and estimation of measurement uncertainty. *Talanta*, 120, 106-113.

¹⁹² Han, L., Matarrita, J., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, D.J. 2016. Evaluation of a recent product to remove lipids and other matrix co-extractives in the analysis of pesticide residues and environmental contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1449, 17-29.

¹⁹³ Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., & Molina-Díaz, A. 2009. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*, 79, 109-128.

¹⁹⁴ Theurillat, X., Dubois, M., Huertas-Pérez, J.F. 2021. A multi-residue pesticide determination in fatty food commodities by modified QuEChERS approach and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 353, 129039.

- ¹⁹⁵ Ma, L., He, Q., Qiu, Y., Liu, H., Wu, H., Liu, G., Brennan, C., Brennan, M.A., & Zhu, L. 2021. Food matrixes play a key role in the distribution of contaminants of lipid origin: A case study of malondialdehyde formation in vegetable oils during deep-frying. *Food Chemistry*, 347, 129080.
- ¹⁹⁶ Castillo, M., Carbonell, E., González, C., & Miralles-Marco, A. 2012. Pesticide Residue Analysis in Animal Origin Food: Procedure Proposal and Evaluation for Lipophilic Pesticides. In Soundararajan, R.P. (Ed.), *Pesticides - Recent Trends in Pesticide Residue Assay*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/48665>
- ¹⁹⁷ Kaczynski, P. 2017. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, 230, 524-531.
- ¹⁹⁸ Gilbert-López, B., Geltenpoth, H., Meyer, C., Michels, A., Hayen, H., Molina-Díaz, A., García-Reyes, J.F., & Franzke, J. 2013. Performance of dielectric barrier discharge ionization mass spectrometry for pesticide testing: a comparison with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 27, 419-429.
- ¹⁹⁹ Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Meyer, C., Michels, A., Franzke, J., Molina-Díaz, A., & Hayen, H. 2012. Simultaneous testing of multiclass organic contaminants in food and environment by liquid chromatography/dielectric barrier discharge ionization-mass spectrometry. *Analyst*, 137, 5403-5410.
- ²⁰⁰ FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. FAO manual on the submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed, Rome (Italy), 2002. ISBN: 92-5-104759-6.
- ²⁰¹ WHO (World Health Organization) & FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2005. Pesticide residues in food – 2005. Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Geneva, Switzerland, 20-29 September 2005. ISBN: 92-5-105401-0.
- ²⁰² European Commission. 2015. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/595 of 15 April 2015 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2016, 2017 and 2018 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides. and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin. *The Official Journal of the European Union*, L99, 7-20.
- ²⁰³ EFSA (European Food Safety Authority). 2016. User Guide to the Pesticide Residues Overview File (PROFile).
- ²⁰⁴ FEDIOL (the EU vegetable oil and proteinmeal industry association). 2018. Establishing processing factors for fat soluble pesticides in crude vegetable oils and fats. *Ref. 11SAF181_rev1*.

- ²⁰⁵ Gilbert-López, B., Robles-Molina, J., García-Reyes, J.F., & Molina-Díaz, A. 2010. Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta*, 83, 2, 391-399.
- ²⁰⁶ Bergström, C.A.S. & Larsson, P. 2018. Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting. *International Journal of Pharmaceutics*, 540, 185-193.
- ²⁰⁷ López-Blanco, R., Moreno-González, D., Nortes-Méndez, R., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., & Gilbert-López, B. 2018. Experimental and theoretical determination of pesticide processing factors to model their behavior during virgin olive oil production. *Food Chemistry*, 15, 239, 9-16.
- ²⁰⁸ Lehotay, S.J., Mastovská, K., & Yun, S.J. 2005. Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. *Journal of AOAC International*, 88, 630-638.
- ²⁰⁹ Hakme, E., Herrmann, S.S., & Poulsen, M.E. 2020. Processing factors of pesticide residues in biscuits and their relation to the physicochemical properties of pesticides. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37, 1695-1706.
- ²¹⁰ Li, Y., Jiao, B., Zhao, Q., Wang, C., Gong, Y., Zhang, Y., Chen, W. 2012. Effect of commercial processing on pesticide residues in orange products. *European Food Research and Technology*, 234, 449-456.
- ²¹¹ Bonnechère, A., Hanot, V., Jolie, R., Hendrickx, M., Bragard, C., Bedoret, T., & Loco, J.V. 2012. Effect of household and industrial processing on levels of five pesticide residues and two degradation products in spinach. *Food Control*, 25, 397-406.
- ²¹² Pazzirota, T., Martin, L., Mezcua, M., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A.R. 2013. Dissipation behaviour, processing factors and risk assessment for metalaxyl in greenhouse-grown cucumber. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 30, 1752-1760.
- ²¹³ Schönsee, C.D. & Bucheli, T.D. 2020. Experimental Determination of Octanol-Water Partition Coefficients of Selected Natural Toxins. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65, 1946-1953.
- ²¹⁴ Geis-Asteggiane, L., Lehotay, S.J., Lightfield, A.R., Dutko, T., Ng, C., & Bluhm, L. 2012. Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1258, 43-54.
- ²¹⁵ López-Blanco, R., Nortes-Méndez, R., Robles-Molina, J., Moreno-González, D., Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., & Molina-Díaz, A. 2016. Evaluation of different cleanup sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1456, 89-104.

- ²¹⁶ Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., & Danaher, M. 2009. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7977-8015.
- ²¹⁷ Stolker, A.A.M. & Danaher, M. 2012. Chapter 4: Sample preparation: extraction and clean-up. In Wang, J., MacNeil, J.D., & Kay, J.F. (Eds.). *Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food, First Edition*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-0-470-49042-6.
- ²¹⁸ Rossi, R., Saluti, G., Moretti, S., Diamanti, I., Giusepponi, D., & Galarini, R. 2018. Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 241-257.
- ²¹⁹ Schenck, F.J., Brown, A.N., Podhorniak, L.V., Parker, A., Reliford, M., & Wong, J.W. 2008. A rapid multiresidue method for determination of pesticides in fruits and vegetables by using acetonitrile extraction/partitioning and solid-phase extraction column cleanup. *Journal of AOAC International*, 91, 422-438.
- ²²⁰ Stubbings, G.L. & Bigwood, T. 2009. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637, 68-78.
- ²²¹ Zanella, R., Prestes, O.D., Bernardi, G., & Adaime, M.B. 2017. Chapter 5: Advanced Sample Preparation Techniques for Pesticide Residues Determination by HRMS Analysis. In Romero-González, R. & Garrido Frenich, A. (Eds.). *Applications in High Resolution Mass Spectrometry. Food Safety and Pesticide Residue Analysis*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780128094648.
- ²²² Sargent, M. 2013. Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements. *RSC Analytical Methods Committee*. ISBN 978-0-948926-27-3.
- ²²³ Bohm, D. A., Stachel, C. S. & Gowic, P. 2009. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8217-8223.
- ²²⁴ Li, J., Ren, X., Diao, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jin, W., Zhou, P., Fana, Q., Zhanga, Y. & Liua, H. 2018. Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 257, 259-264.
- ²²⁵ Freitas, A., Barbosa, J., & Ramos, F. 2013. Development and validation of a multi-residue and multiclass ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening of antibiotics in milk. *International Dairy Journal*, 33, 38-43.
- ²²⁶ Ortelli, D., Cognard, E., Jan, P. & Edder, P. 2009. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877, 2363-2374.
- ²²⁷ Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., & Widmer, M. 2008. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate

high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1194, 66-79.

²²⁸ Narendran, S.T., Meyyanathan, S.N., & Babu, B. 2020. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International*, 133, 109141.

²²⁹ Vargas Medina, D. A., Bassolli Borsatto, J. V., Maciel, E. V. S., & Lanças, F. M. 2021. Current role of modern chromatography and mass spectrometry in the analysis of mycotoxins in food. *Trends in Analytical Chemistry*, 135, 116156.

²³⁰ Cunha, S.C., Lehotay, S.J., Mastovska, K., Fernandes, J.O., & Oliveira, M.B.P.P. 2007. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. *Journal of Separation Sciences*, 30, 620-632.

²³¹ Mazaruela, M.D. & Bogialli, S. 2009. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 645, 5-17.

²³² Lehotay, S.J. & Cook, J.M. 2015. Sampling and Sample Processing in Pesticide Residue Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 4395-4404.

²³³ Cappiello, A., Famiglini, G., Palma, P., Pierini, E., Termopoli, V., & Trufelli, H. 2008. Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80, 23, 9343-9348.

²³⁴ Berendsen, B.J.A., Stolker, L.A.A.M., & Nielen, M.W.F. 2013. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 43.

²³⁵ Dasenaki, M. E., Bletsou, A. A., & Thomaidis, N. S. 2015. Chapter 3: Antibacterials. In Nollet, L.M.L. & Toldra, F. (Eds.). *Handbook of Food Analysis – Two Volume Set, 3rd ed.* USA, Taylor & Francis Group, LLC. ISBN: 9780429153747.

²³⁶ Mastovska, K. & Lightfield, A. R. 2008. Streamlining methodology for the multiresidue analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202, 118-123.

²³⁷ Madej, K., Kalenik, T.K., & Piekoszewski, W. 2018. Sample preparation and determination of pesticides in fat-containing foods. *Food Chemistry*, 269, 527-541.

²³⁸ Anastassiades, M., Sherbaum, E., Taselen, B., & Stajnbaher, D. 2007. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In Ohkawa, H.M.H., Lee, P.W. (Eds.). *Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety.* USA, John Wiley & Sons, Inc.

²³⁹ Starowicz, M. 2019. Food and Nutritional Analysis. Sample Preparation. In Worsfold, P., Poole, C., Townshend, A., & Miró, M. (Eds.). *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition).* The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-08-101984-9.

- ²⁴⁰ Chamkasem, N., Ollis, L.W., Harmon, T., Lee, S., & Mercer, G. 2013. Analysis of 136 Pesticides in Avocado Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2315-2329.
- ²⁴¹ Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. 2010. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. *Analytica Chimica Acta*, 672, 93-102.
- ²⁴² Malachová, A., Stránská, M., Václavíková, M., Elliott, C.T., Black, C., Meneely, J., Hajslová, J., Ezekiel, C.N., Schuhmacher, R., & Krska, R. 2018. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 801-825.
- ²⁴³ Eom, T., Cho, H., Kim, J., Park, M., An, J., Kim, M., Kim, S., & Han, S. B. 2017. Multiclass mycotoxin analysis in edible oils using a simple solvent extraction method and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34, 11, 2011-2022.
- ²⁴⁴ Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatpiboon, N. 2014. Evaluation of a modified QuEChERS method for analysis of mycotoxins in rice. *Food Chemistry*, 153, 44-53.
- ²⁴⁵ Balzano, M., Pacetti, D., & Frega, N.G. 2016. Chapter 1: Novel sorbent materials for off-line and on-line solid-phase extraction applied to food analysis. In Núñez, O. & Lucci, P. (Eds.). *New Trends in Sample Preparation Techniques*. USA, Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63485-089-6.
- ²⁴⁶ Moldoveanu, S. & David, V. Chapter 7: Solid-phase extraction. In Moldoveanu, S. & David, V. (Eds.). *Modern Sample Preparation for Chromatography (Second Edition)*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-12-821405-3.
- ²⁴⁷ Marazuela, M.D. & Bogialli, S. 2009. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 645, 5-17.
- ²⁴⁸ Lehotay, S.J. 2011. Chapter 4: QuEChERS Sample Preparation Approach for Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Foods. In Jerry Zweigenbaum (Ed.). *Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 747*. USA, Humana Press, c/o Springer Science+Business Media. ISBN: 978-1-61779-135-2.
- ²⁴⁹ Anastassiades, M. 2022. Home of the QuEChERS Method. Method. Accessed 30/10/2022. <https://www.quechers.eu/method>
- ²⁵⁰ Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F. J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431.
- ²⁵¹ Lehotay, S. J., Kok, A. D., Hiemstra, M., & Bodegraven, P. V. 2005. Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables

using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC international*, 88, 595-614.

²⁵² Núñez, O. & Lucci, P. 2016. Chapter 4: QuEChERS Procedures in Food Sample Preparation. In Núñez, O. & Lucci, P. (Eds.). *New Trends in Sample Preparation Techniques*. USA, Nova Science Publishers, Inc. ISBN: 978-1-63485-072-8.

²⁵³ González-Curbelo, M.Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M.Á. 2015. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185.

²⁵⁴ Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P. Pereira, J.A.M, Silva, C., Medina, S., & Câmara, J.S. 2019. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1-28.

²⁵⁵ Xie, S., Song, W., Yi, C., & Qiu, X. 2017. Salting-out extraction systems of ethanol and water induced by high-solubility inorganic electrolytes. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 56, 145-150.

²⁵⁶ Flinn Scientific, Inc. 2016. Salting Out Effect of Water and Methyl Alcohol. Publication No. 91807061616.

²⁵⁷ Galvão, A.C., Jiménez, Y.P., Justel, F.J., Robazza, W.S., & Donatti, F.S. 2020. Salting-out precipitation of NaCl, KCl and NH₄Cl in mixtures of water and methanol described by the modified Pitzer model. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 150, 106202.

²⁵⁸ Fu, H., Yang, S.T., & Xiu, Z. 2015. Phase separation in a salting-out extraction system of ethanol-ammonium sulfate. *Separation and Purification Technology*, 148, 32-37.

²⁵⁹ Mol, H.G.J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., de Rijk, T.C., Stolker, A.A.M., & Mulder, P.P.J. 2008. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. *Analytical Chemistry*, 80, 9450-9459.

²⁶⁰ Mandal, S., Poi, R., Ansary, I., Hazra, D.K., Bhattacharyya, S., & Karmakar, R. 2020. Validation of a modified QuEChERS method to determine multiclass multipesticide residues in apple, banana and guava using GC-MS and LC-MS/MS and its application in real sample analysis. *SN Applied Sciences*, 2, 188.

²⁶¹ Moldoveanu, S. & David, V. Chapter 6: Solvent extraction. In Moldoveanu, S. & David, V. (Eds.). *Modern Sample Preparation for Chromatography (Second Edition)*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-12-821405-3.

²⁶² Hasseine, A., Meniai, A.H., & Korichi, M. 2009. Salting-out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2-propanol) and (water + xylene + methanol). *Desalination*, 242, 264-276.

²⁶³ Blasco, C., Masia, A., Morillas, F.G., & Picó, Y. 2011. Comparison of the Effectiveness of Recent Extraction Procedures for Antibiotic Residues in Bovine Muscle Tissues. *Journal of AOAC International*, 94,991-1003.

- ²⁶⁴ Lehotay, S.J., Mastovská, K., & Lightfield, A.R. 2005. Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. *Journal of AOAC International*, 88, 615-629.
- ²⁶⁵ Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., & Barba, A. 2007. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389, 1697-1714.
- ²⁶⁶ Li, L., Wei, L., Dongmei, Q, Shurem, J., & Fengmao, L. 2009. Application of graphitized carbon black to the quechers method for pesticide multiresidue analysis in Spinach. *Journal of AOAC International*, 92, 538-547.
- ²⁶⁷ Georgakopoulos, P., Zachari, R., Mataragas, M., Athanasopoulos, P., Drosinos, E.H., & Skandamis, P.N. 2011. Optimisation of octadecyl (C18) sorbent amount in QuEChERS analytical method for the accurate organophosphorus pesticide residues determination in low-fatty baby foods with response surface methodology. *Food Chemistry*, 128, 536-542.
- ²⁶⁸ Pang, N., Wang, T., & Hu, J. 2015. Method validation and dissipation kinetics of four herbicides in maize and soil using QuEChERS sample preparation and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 190, 793-800.
- ²⁶⁹ Zhang, Y., Li, X., Liu, X., Zhang, J., Cao, Y., Shi, Z., & Sun, H. 2015. Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 98, 8433-8444.
- ²⁷⁰ Holmes, B., Dunkin, A., Schoen, R., & Wiseman, C. 2015. Single-laboratory ruggedness testing and validation of a modified QuEChERS approach to quantify 185 pesticide residues in salmon by liquid chromatography- and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5100-5106.
- ²⁷¹ Pang, N., Wang, T., Hu, J., & Bizhang, D. 2017. Field evaluation and determination of four herbicides in a wheat ecosystem by a simple and versatile QuEChERS method with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 99, 376-389.
- ²⁷² Zhang, Z., Dong, M., Hao, X., Han, L., Song, S., & Yao, W. 2019. Evaluation of cleanup procedures in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS in cinnamon bark. *Food Chemistry*, 276, 140-146.
- ²⁷³ Cao, J., Zheng, Y., Kaium, A., Liu, X., Xu, J., Dong, F., Wu, X., & Zheng, Y. 2019. A comparative study of biochar, multiwalled carbon nanotubes and graphitized carbon black as QuEChERS absorbents for the rapid determination of six triazole fungicides by UPLC-MS/MS. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99, 1-15.
- ²⁷⁴ Koesukwiwat, U., Lehotay, S.J., Shui, M., & Leepipatpiboon, N. 2010. High throughput analysis of 150 pesticides in fruits and vegetables using QuEChERS and low-pressure gas

chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6692-6703.

²⁷⁵ Anastassiades, M., Wachtler, A.-K., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Marks, H., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Barth, A., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G. 2021. Quick Method for the Analysis of Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC- or IC-MS/MS Measurement, I. Food of Plant Origin (QuPPE-PO-Method). Version 12. *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM)*.

²⁷⁶ Anastassiades, M., Wachtler, A.-K., Kolberg, D. I., Eichhorn, E., Benkenstein, A., Zechmann, S., Mack, D., Barth, A., Wildgrube, C., Sigalov, I., Görlich, S., Dörk, D., Cerchia, G. 2019. Quick Method for the Analysis of Numerous Highly Polar Pesticides in Food Involving Extraction with Acidified Methanol and LC-MS/MS Measurement, II. Food of Animal Origin (QuPPE-AO-Method). Version 3.2. *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM)*.

²⁷⁷ Wang, K., Lin, K., Huang, X., & Chen, M. 2017. A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 5064-5073.

²⁷⁸ Frenich, A. G., Aguilera-Luiz, M. M., Vidal, J. L. M., & Romero-González, R. 2010. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 661, 150-160.

²⁷⁹ Chen, M., Yi, Q. T., Hong, J. J., Zhang, L. M., Lin, K., & Yuan, D.X. 2015. Simultaneous determination of 32 antibiotics and 12 pesticides in sediment using ultrasonic-assisted extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 7, 1896-1905.

²⁸⁰ Moreno-González, D., & García-Campaña, A. M. 2017. Salting-out assisted liquid–liquid extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods. *Food chemistry*, 221, 1763-1769.

²⁸¹ Aguilera-Luiz, M. M., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., & Frenich, A. G. 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1205, 10-16.

²⁸² Lu, Z., Deng, F., He, R., Tan, L., Luo, X., Pan, X., & Yang, Z. 2019. A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 151, 104213.

²⁸³ Badawy, M.E.I., El-Nouby, M.A.M., Kimani, P.K., Lim, L.W., & Rabea, E.I. 2022. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in

chromatographic analysis. *Analytical Sciences*, <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00190-8>

²⁸⁴ Schenck, F. J., & Donoghue, D. J. 2000. Determination of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in eggs using a solid phase extraction cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6412-6415.

²⁸⁵ Gan, J., Lv, L., Peng, J., Li, J., Xiong, Z., Chen, D., & He, L. 2016. Multi-residue method for the determination of organofluorine pesticides in fish tissue by liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 207, 195-204.

²⁸⁶ Poole, C.F. & Poole, S.K. 2012. Chapter 2.14: Principles and Practice of Solid-Phase Extraction. In Pawliszyn, J. (Ed.). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Volume 2*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-12-381374-9

²⁸⁷ Caiel da Silva, R., Wickert, C., Pizzutti, I. R., & De Kok, A. 2021. Clean-up Strategy for Dithiocarbamate Fungicide Determination in Soybean by GC-ITD-MS and GC-PFPD: Method Development and Validation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 11485-11493.

²⁸⁸ Antignac, J. P., Le Bizec, B., Monteau, F., Poulain, F., & Andre, F. 2001. Multi-residue extraction-purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757, 11-19.

²⁸⁹ Amvrazi, E. G., & Albanis, T. A. 2008. Multiclass pesticide determination in olives and their processing factors in olive oil: comparison of different olive oil extraction systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5700-5709.

²⁹⁰ Lentza-Rizos, C., Avramides, E. J., & Visi, E. 2001. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 921, 297-304.

²⁹¹ Avramides, E. J., & Gkatsos, S. 2007. A multiresidue method for the determination of insecticides and triazine herbicides in fresh and processed olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 561-565.

²⁹² Li, L., Zhou, Z., Pan, C., Qian, C., Jiang, S., & Liu, F. 2007. Determination of organophosphorus pesticides in soybean oil, peanut oil and sesame oil by low-temperature extraction and GC-FPD. *Chromatographia*, 66, 625-629.

²⁹³ Danaher, M., O'Keeffe, M., & Glennon, J. D. 2000. Validation and robustness testing of a HPLC method for the determination of avermectins and moxidectin in animal liver samples using an alumina column clean-up. *Analyst*, 125, 1741-1744.

²⁹⁴ Asea, P. E., MacNeil, J. D., & Boison, J. O. 2006. An Analytical Method to Screen for Six Thyreostatic Drug Residues in the Thyroid Gland and Muscle Tissues of Food Producing Animals by Liquid Chromatography with Ultraviolet Absorption Detection and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 89, 567-575.

- ²⁹⁵ Kishida, K., & Furusawa, N. 2003. Toxic/Harmful Solvents-Free Technique for HPLC Determination of Six Sulfonamides in Meat. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 26, 2931-2939.
- ²⁹⁶ Wang, H., Wang, Z., Liu, S., & Liu, Z. 2009. Rapid Method for Multi-residue Determination of Avermectins in Bovine Liver Using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 39-398.
- ²⁹⁷ Huang, P., Zhao, P., Dai, X., Hou, X., Zhao, L., & Liang, N. 2016. Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid-liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1011, 136-144.
- ²⁹⁸ Watanabe, R., Matsushima, R., Harada, T., Oikawa, H., Murata, M., & Suzuki, T. 2013. Quantitative determination of paralytic shellfish toxins in cultured toxic algae by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 1351-1357.
- ²⁹⁹ Yang, X., Zhou, L., Tan, Y., Shi, X., Zhao, Z., Nie, D., Zhou, C., & Liu, H. 2017. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method coupled with dispersive solid-phase extraction for simultaneous quantification of eight paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish. *Toxins*, 9, 206.
- ³⁰⁰ Maragos, C. M. 2006. Measurement of T-2 and HT-2 toxins in eggs by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food Protection*, 69, 2773-2776.
- ³⁰¹ Eke, Z., Kende, A., & Torkos, K. 2004. Simultaneous detection of A and B trichothecenes by gas chromatography with flame ionization or mass selective detection. *Microchemical Journal*, 78, 211-216.
- ³⁰² Cerqueira, M. B. R., de Borba, V. S., Rodrigues, M. H. P., Silveira, C. O., Badiale-Furlong, E., & Kupski, L. 2022. Reliable and Accessible Method for Trichothecenes Type B Determination in Oat Products. *Food Analytical Methods*, 1-13.
- ³⁰³ Waksmundzka-Hajnos, M. 1998. Properties of florisil and its use in chromatography. *Chemia analityczna*, 43, 301-324.
- ³⁰⁴ Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., & Molina-Díaz, A. 2010. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3736-3747.
- ³⁰⁵ Kodba, Z. C., & Vončina, D. B. 2007. A rapid method for the determination of organochlorine, pyrethroid pesticides and polychlorobiphenyls in fatty foods using GC with electron capture detection. *Chromatographia*, 66, 619-624.
- ³⁰⁶ Ferrer, C., Gómez, M. J., García-Reyes, J. F., Ferrer, I., Thurman, E. M., & Fernández-Alba, A. R. 2005. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase

- dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1069, 183-194.
- ³⁰⁷ Sun, F., Lin, F. Y., Wong, S. S., & Li, G. C. 2003. The screening of organophosphorus, organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides residues in beef fat by tandem solid-phase extraction technique. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11, 258-265.
- ³⁰⁸ Fernandez-Alvarez, M., Llompart, M., Lamas, J. P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., & Dagnac, T. 2008. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. *Analytica Chimica Acta*, 617, 37-50.
- ³⁰⁹ Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., Pastor-Montoro, E., & Romero-González, R. 2008. High-throughput determination of pesticide residues in food commodities by use of ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390, 947-959.
- ³¹⁰ Grande-Martínez, Á., Arrebola, F. J., Moreno, L. D., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. 2015. Development and validation of a multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (rice and wheat flour) using liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 98, 1186-1198.
- ³¹¹ Shin, Y., Lee, J., & Kim, J. H. 2018. A simultaneous multiresidue analysis for 203 pesticides in soybean using florisil solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Applied Biological Chemistry*, 61, 543-548.
- ³¹² Nguyen, T. D., Lee, M. H., & Lee, G. H. 2010. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid–liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal*, 95, 113-119.
- ³¹³ Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Lozano, A., Fernández-Alba, A. R., & Molina-Díaz, A. 2010. Large-scale pesticide testing in olives by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry using two sample preparation methods based on matrix solid-phase dispersion and QuEChERS. *Journal of Chromatography A*, 1217, 6022-6035.
- ³¹⁴ Kaczyński, P. 2017. Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, 230, 524-531.
- ³¹⁵ Noguchi, S., Terada, H., & Tamura, Y. 2008. Simultaneous determination of veterinary drugs in livestock foods and seafoods using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Shokuhin Eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 49, 177-188.
- ³¹⁶ Al-Hawadi, J.S. 2020. Banned Organochlorine Pesticides Still in Our Food: The Presence of Organochlorine Pesticide Residues in Milk, Meat, Liver, and Kidney in Jordan Cattle. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11, 1491-1495.
- ³¹⁷ Náchter-Mestre, J., Serrano, R., Hernández, F., Benedito-Palos, L., & Pérez-Sánchez, J. 2010. Gas chromatography-mass spectrometric determination of polybrominated diphenyl

ethers in complex fatty matrices from aquaculture activities. *Analytica Chimica Acta*, 664, 190-198.

³¹⁸ Martínez-Domínguez, G., Romero-González, R., Arrebola, F. J., & Frenich, A. G. 2016. Multi-class determination of pesticides and mycotoxins in isoflavones supplements obtained from soy by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Food Control*, 59, 218-224.

³¹⁹ De Saeger, S., Sibanda, L., & Van Peteghem, C. 2003. Analysis of zearalenone and α -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 487, 137-143.

³²⁰ Kikuchi, H., Sakai, T., Nemoto, S., & Akiyama, H. (2018). Total determination of residual flutolanil and its metabolites in livestock products and seafood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 2366-2374.

³²¹ Grant, J., Rodgers, C. A., Chickering, C. D., Hill, S. J., & Stry, J. J. 2010. Determination of chlorantraniliprole residues in crops by liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 93, 1293-1301.

³²² Molina-Ruiz, J. M., Cieslik, E., Cieslik, I., & Walkowska, I. 2015. Determination of pesticide residues in fish tissues by modified QuEChERS method and dual-d-SPE clean-up coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 369-378.

³²³ Molina-Ruiz, J. M., Cieslik, E., & Walkowska, I. 2015. Optimization of the QuEChERS method for determination of pesticide residues in chicken liver samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 8, 898-906.

³²⁴ Hirahara, Y., Kimura, M., Inoue, T., Uchikawa, S., Otani, S., Haganuma, A., & Uchida, Y. 2005. Validation of multiresidue screening methods for the determination of 186 pesticides in 11 agricultural products using gas chromatography (GC). *Journal of Health Science*, 51, 617-627.

³²⁵ Ueno, E., Ohno, H., Watanabe, M., Oshima, H., Mikami, E., Nemoto, S., & Matsuda, R. 2011. Analysis of spinosad in animal and fishery products by LC-MS. *Shokuhin Eiseigaku zasshi. Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 52, 330-335.

³²⁶ Wei, Y., Zhang, Y., Xu, J., Guo, C., Li, L., & Fan, W. 2014. Simultaneous quantification of several classes of antibiotics in water, sediments, and fish muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 8, 357-371.

³²⁷ Scott, P. M., Lawrence, G. A., & Lombaert, G. A. 1999. Studies on extraction of fumonisins from rice, corn-based foods and beans. *Mycotoxin Research*, 15, 50-60.

³²⁸ De Girolamo, A., Solfrizzo, M., Visconti, A., & Holst, C. V. 2001. Comparison of different extraction and clean-up procedures for the determination of fumonisins in maize and maizebased food products. *Food Additives & Contaminants*, 18, 59-67.

- ³²⁹ Hübner, F., Harrer, H., Fraske, A., Kneifel, S., & Humpf, H. U. 2012. Large scale purification of B-type fumonisins using centrifugal partition chromatography (CPC). *Mycotoxin Research*, 28, 37-43.
- ³³⁰ Kaltner, F., Rampl, C., Rychlik, M., Zimmermann, T., & Rohe, A. 2017. Development and validation of a cost-effective HPLC-FLD method for routine analysis of fumonisins B1 and B2 in corn and corn products. *Food Analytical Methods*, 10, 1349-1358.
- ³³¹ Sun, H. W., Wang, F. C., & Ai, L. F. 2007. Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat by using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 857, 296-300.
- ³³² Tarbin, J. A., Chan, D., Stubbings, G., & Sharman, M. 2008. Multiresidue determination of triarylmethane and phenothiazine dyes in fish tissues by LC-MS/MS. *Analytica Chimica Acta*, 625, 188-194.
- ³³³ He, Y., & Liu, Y. H. 2007. Assessment of primary and secondary amine adsorbents and elution solvents with or without graphitized carbon for the SPE clean-up of food extracts in pesticide residue analysis. *Chromatographia*, 65,9, 581-590.
- ³³⁴ Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K., & Leepipatpiboon, N. 2008. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 626, 1, 10-20.
- ³³⁵ Leandro, C. C., Hancock, P., Fussell, R. J., & Keely, B. J. 2006. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography for the determination of priority pesticides in baby foods by tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1103, 1, 94-101.
- ³³⁶ Oshita, D., & Jardim, I. C. 2014. Comparison of different sorbents in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in strawberries by LC-MS/MS. *Chromatographia*, 77, 19, 1291-1298.
- ³³⁷ Przybylski, C., & Segard, C. 2009. Method for routine screening of pesticides and metabolites in meat based baby-food using extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 32,11, 1858-1867.
- ³³⁸ Kaczyński, P., & Łozowicka, B. 2017. One-step QuEChERS-based approach to extraction and cleanup in multiresidue analysis of sulfonylurea herbicides in cereals by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 101, 147-160.
- ³³⁹ Song, S., Zhu, K., Han, L., Sapozhnikova, Y., Zhang, Z., & Yao, W. 2018. Residue analysis of 60 pesticides in red swamp crayfish using QuEChERS with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66, 20, 5031-5038.
- ³⁴⁰ Biswas, S., Banerjee, T., Harshang, T., Patanjali, N., Chinnusamy, V., Mukhopadhyay, A., & Singh, A. 2021. Development of a QuEChERS-LCMS/MS method for simultaneous estimation of tebuconazole and chlormequat chloride in wheat crop. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 563, 212-221.

- ³⁴¹ Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. M. 2012. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 89, 201-208.
- ³⁴² Abdallah, H., Arnaudguilhem, C., Jaber, F., & Lobinski, R. 2014. Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry hybrid linear ion trap-Orbitrap. *Journal of Chromatography A*, 13, 61-72.
- ³⁴³ Li, R., Yang, L., Zhang, P., Luo, Y., & Gao, Y. 2017. Determination of 64 veterinary drug residues in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 35, 1266-1275.
- ³⁴⁴ Cai, S. S., Stevens, J., & Syage, J. A. 2012. Ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters. *Journal of Chromatography A*, 1227, 138-144.
- ³⁴⁵ Madureira, T. V., Velhote, S., Santos, C., Cruzeiro, C., Rocha, E., & Rocha, M. J. 2014. A step forward using QuEChERS Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry-levels of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and commercial mussels. *Environmental Science and Pollution Research*, 219, 6089-6098.
- ³⁴⁶ Yoo, M., Lee, S., Kim, S., Kim, S. J., Seo, H. Y., & Shin, D. 2014. A comparative study of the analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *International Journal of Food Science & Technology*, 496, 1480-1489.
- ³⁴⁷ Shimelis, O., Yang, Y., Stenerson, K., Kaneko, T., & Ye, M. 2007. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *Journal of Chromatography A*, 1165, 18-25.
- ³⁴⁸ Polgár, L., Kmellár, B.,m García-Reyes, J.F., & Fodor, P.2012. Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS. *Analytical Methods*, 4,4, 1142-1148.
- ³⁴⁹ Zhou, J., Xu, J. J, Cong, J. M., Cai, Z. X., Zhang, J. S., Wang, J. L., & Ren, Y. P. 2018. Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk. *Journal of Chromatography A*, 15, 20-29.
- ³⁵⁰ Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S., & Szpylka, K. A. 2010. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined

with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5959-5972.

³⁵¹ Liu, Y., Han, S., Lu, M., Wang, P., Han, J., & Wang, J. 2014. Modified QuEChERS method combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 26 mycotoxins in sesame butter. *Journal of Chromatography B*, 970, 68-76.

³⁵² Sharmilli, K., Jinap, S., & Sukor, R. 2016. Development, optimization and validation of QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of multimycotoxin in vegetable oil. *Food Control*, 70, 152-160.

³⁵³ Fillion, J., Sauve, F., & Selwyn, J. 2000. Multiresidue method for the determination of residues of 251 pesticides in fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of AOAC International*, 83, 698-713.

³⁵⁴ Picó, Y., Fernández, M., Ruiz, M. J., & Font, G. 2007. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 117-131.

³⁵⁵ Faraji, M., Yamini, Y., & Gholami, M. 2019. Recent advances and trends in applications of solid-phase extraction techniques in food and environmental analysis. *Chromatographia*, 82, 1207-1249.

³⁵⁶ Rastrelli, L., Totaro, K., & De Simone, F. 2002. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento, Campania, Italy virgin olive oil by capillary gas chromatography. *Food Chemistry*, 79, 303-305.

³⁵⁷ Tsatsakis, A. M., Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Agourakis, Z. B., Tutudaki, M., & Alegakis, A. K. 2003. Three-year study of fenthion and dimethoate pesticides in olive oil from organic and conventional cultivation. *Food Additives & Contaminants*, 20, 553-559.

³⁵⁸ Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A., & de la Guardia, M. 2005. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 553, 50-57.

³⁵⁹ Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., & Sticca, P. 2005. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1071, 67-70.

³⁶⁰ Xinyi, C., Xiwu, G., Xiaogang, C., Wei, Y., Yun, L., Mingli, Y., Xiuqing, Li, Daning, W., Yanyan, F., & Zweigenbaum, J. A. 2007. Application of liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry for the analysis of urea herbicides residues in soybean. *Analytical Letters*, 40, 1117-1130.

³⁶¹ Zhang, M., Bian, K., Zhou, T., Song, X., Liu, Q., Meng, C., & He, L. 2016. Determination of residual fipronil in chicken egg and muscle by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1014, 31-36.

- ³⁶² Dowling, G., Cantwell, H., O'Keeffe, M., & Smyth, M. R. 2005. Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver. *Analytica Chimica Acta*, 529, 285-292.
- ³⁶³ Kantiani, L., Farre, M., Sibum, M., Postigo, C., Lopez de Alda, M., & Barcelo, D. 2009. Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81, 4285-4295.
- ³⁶⁴ Moragues, F., & Igualada, C. 2009. How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of β -agonists in animal liver and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector. *Analytica Chimica Acta*, 637, 193-195.
- ³⁶⁵ Durden, D. A., & Wotske, J. 2009. Quantitation and validation of macrolide endectocides in raw milk by negative ion electrospray MS/MS. *Journal of AOAC International*, 92, 580-596.
- ³⁶⁶ Buszewski, B., Szultka, M., Gadzala-Kopciuch. 2012. Chapter 2.12: Sorbent Chemistry, Evolution. In Pawliszyn, J. (Ed.). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Volume 2*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-12-381374-9.
- ³⁶⁷ Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S., & Szpylka, K. A. 2010. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58,10, 5959-5972.
- ³⁶⁸ He, Z., Wang, L., Peng, Y., Luo, M., Wang, W., & Liu, X. 2015. Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography-tandem mass spectrometry-based method. *Food chemistry*, 169, 372-380.
- ³⁶⁹ Lopes, R. P., Oliveira, F. A., Madureira, F. D., Oliveira, M. L. G., & Silva, G. 2015. Multiresidue analysis of pesticides in peanuts using modified QuEChERS sample preparation and liquid chromatography-mass spectrometry detection. *Analytical Methods*, 7,11, 4734-4739.
- ³⁷⁰ Barci, P. E., Alves, L. D. S., Avellar, Á. A., Cendon, L. R., dos Santos, P. J., Stringhini, F. M., Prestes, O.D., & Zanella, R. 2020. Modified QuEChERS method for multiresidue determination of pesticides in pecan nuts by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 13,3, 793-801.
- ³⁷¹ Guo, Y., Zhang, J., Xu, J., Wu, X., Dong, F., Liu, X., & Zheng, Y. 2021. An Integrated Strategy for Purification by Combining Solid-Phase Extraction with Dispersive-Solid-Phase Extraction for Detecting 22 Pesticides and Metabolite Residues in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69,25, 7199-7208.
- ³⁷² Colazzo, M., Alonso, B., Ernst, F., Cesio, M. V., Perez-Parada, A., Heinzen, H., & Pareja, L. 2019. Determination of multiclass, semi-polar pesticide residues in fatty fish muscle tissue by gas and liquid chromatography mass spectrometry. *MethodsX*, 6, 929-937.
- ³⁷³ Barbieri, M.V., Postigo, C., Guillem-Argiles, N., Monllor-Alcaraz, L.S., Simionato, J.I., Stella, E., Barceló, D., & López de Alda, M. 2019. Analysis of 52 pesticides in freshfish muscle by

QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination. *Science of the Total Environment*, 653, 958-967

³⁷⁴ Shin, D., Kim, J., & Kang, H.S. 2021. Simultaneous determination of multi-pesticide residues in fish and shrimp using dispersive-solid phase extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Control*, 120, 107552.

³⁷⁵ Guo, Y., Zhang, J., Xu, J., Wu, X., Dong, F., Liu, X., & Zheng, Y. 2021. An Integrated Strategy for Purification by Combining Solid-Phase Extraction with Dispersive-Solid-Phase Extraction for Detecting 22 Pesticides and Metabolite Residues in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69, 25, 7199-7208.

³⁷⁶ Chen, X., Lin, T., Liu, X., Mei, W., Yang, D., Li, Y., & Wang, L. 2019. Simultaneous determination of antibiotics and triphenylmethanes veterinary drug residues in fish and shrimp by dispersive solid phase extraction purification-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 37, 9, 946-954.

³⁷⁷ Wang, Y. L., Liu, Z. M., Ren, J., & Guo, B. H. 2015. Development of a method for the analysis of multiclass antibiotic residues in milk using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12,8, 693-703.

³⁷⁸ Qin, Y., Jatamunua, F., Zhang, J., Li, Y., Han, Y., Zou, N., & Pan, C. 2017. Analysis of sulfonamides, tilmicosin and avermectins residues in typical animal matrices with multi-plug filtration cleanup by liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography B*, 1053, 27-33.

³⁷⁹ Shin, D., Kang, H. S., Jeong, J., Kim, J., Choe, W. J., Lee, K. S., & Rhee, G. S. 2018. Multi-residue determination of veterinary drugs in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food analytical methods*, 11, 1815-1831

³⁸⁰ Li, Y., Wen, S., Chen, Z., Xiao, Z., & Ma, M. 2015. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2, zearalenone and its metabolites in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure. *Analytical Methods*, 7,10, 4145-4151.

³⁸¹ Piatkowska, M., Jedziniak, P., & Zmudzki, J. 2014. Comparison of different sample preparation procedures for multiclass determination of selected veterinary drug, coccidiostat and insecticide residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 6, 3034-3044.

³⁸² Hou, X., Xu, X., Xu, X., Han, M., & Qiu, S. 2020. Application of a multiclass screening method for veterinary drugs and pesticides using HPLC-QTOF-MS in egg samples. *Food Chemistry*, 309, 125746.

³⁸³ Patil, R., Chatterjee, N.S., Kamble, N., Nerpagar, A., Langade, N., Kandaswamy, C., Presley, S.I.D., & Banerjee, K. 2022. Multiresidue analysis of pesticides, polyaromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in poultry meat and chicken eggs by GC-MS/MS: method

development and validation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 57, 263-283.

³⁸⁴ Junjun, F. E. N. G., Haiyun, J. I. A. N. G., Jing, W. A. N. G., Zhengyi, J. I. N. G., Fan, Z. H. A. N. G., Tianyu, T. A. N., & Tengfei, L. I. 2022. Simultaneous determination of 40 plant growth regulators, fungicides, insecticides, and antibiotics in bean sprouts by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 220401.

³⁸⁵ Tuzimski, T., & Rejczak, T. 2014. Determination of pesticides in sunflower seeds by high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector. *Journal of AOAC International*, 97, 1012-1020.

³⁸⁶ Castillo, M., González, C., & Miralles, A. 2011. An evaluation method for determination of non-polar pesticide residues in animal fat samples by using dispersive solid-phase extraction clean-up and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400, 1315-1328.

³⁸⁷ Grande-Martínez, A., Moreno-González, D., Arrebola-Liebanas, F. J., Garrido-Frenich, A., & García-Campaña, A. M. 2018. Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 27-32.

³⁸⁸ Hidalgo-Ruiz, J. L., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., & Garrido-Frenich, A. 2019. Determination of mycotoxins in nuts by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Looking for a representative matrix. *Journal of Food Composition and Analysis*, 82, 103228

³⁸⁹ Bruner, F., Crescentini, G., & Mangani, F. 1990. Graphitized carbon black: a unique adsorbent for gas chromatography and related techniques. *Chromatographia*, 30, 565-572.

³⁹⁰ Zheng, H. B., Zhao, Q., Mo, J. Z., Huang, Y. Q., Luo, Y. B., Yu, Q. W., & Feng, Y. Q. 2013. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic graphitized carbon black and primary secondary amine as adsorbent and its application in pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*, 1300, 127-133.

³⁹¹ Ramesh, A. 1998. Rapid preconcentration method for the determination of pyrethroid insecticides in vegetable oils and butter fat and simultaneous determination by gas chromatography-electron capture detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, 123, 1799-1802.

³⁹² Yeoh, C. B., Kuntom, A., Dorasamy, S., Omar, M. R., Nor, M. Y. M., & Noh, M. R. M. 2006. Determination of acephate, methamidophos and monocrotophos in crude palm oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 960-964.

³⁹³ Wang, P. C., Lee, R. J., Chen, C. Y., Chou, C. C., & Lee, M. R. 2012. Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 752, 78-86.

- ³⁹⁴ Choi, S., Kim, S., Shin, J. Y., Kim, M., & Kim, J. H. 2015. Development and verification for analysis of pesticides in eggs and egg products using QuEChERS and LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 173, 1236-1242.
- ³⁹⁵ Muhamad, H., Zainudin, B. H., & Bakar, N. K. A. 2012. Comparative study of different clean-up techniques for the determination of λ -cyhalothrin and cypermethrin in palm oil matrices by gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry*, 134, 4, 2489-2496.
- ³⁹⁶ Song, N. E., Lee, J. Y., Mansur, A. R., Jang, H. W., Lim, M. C., Lee, Y., Yoo, M., & Nam, T. G. 2019. Determination of 60 pesticides in hen eggs using the QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *Food chemistry*, 298, 125050.
- ³⁹⁷ Lee, S. W., Choi, J. H., Cho, S. K., Yu, H. A., Abd El-Aty, A. M., & Shim, J. H. 2011. Development of a new QuEChERS method based on dry ice for the determination of 168 pesticides in paprika using tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4366-4377.
- ³⁹⁸ Cabrera, L. D. C., Caldas, S. S., Prestes, O. D., Primel, E. G., & Zanella, R. 2016. Evaluation of alternative sorbents for dispersive solid-phase extraction clean-up in the QuEChERS method for the determination of pesticide residues in rice by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 39, 1945-1954.
- ³⁹⁹ Yu, X., Liu, H., Pu, C., Chen, J., Sun, Y., & Hu, L. 2018. Determination of multiple antibiotics in leafy vegetables using QuEChERS-UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41, 713-722.
- ⁴⁰⁰ Cavaliere, C., Foglia, P., Pastorini, E., Samperi, R., & Laganà, A. 2005. Development of a multiresidue method for analysis of major Fusarium mycotoxins in corn meal using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *RMC, Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2085-2093.
- ⁴⁰¹ Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., Stampachiaccchiere, S., Ventura, S., & Laganà, A. 2014. Multiclass analysis of mycotoxins in biscuits by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Comparison of different extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, 1343, 69-78.
- ⁴⁰² Laganà, A., Bacaloni, A., Castellano, M., Curini, R., De Leva, I., Faberi, A., & Materazzi, S. 2003. Sample preparation for determination of macrocyclic lactone mycotoxins in fish tissue, based on on-line matrix solid-phase dispersion and solid-phase extraction cleanup followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86, 729-736.
- ⁴⁰³ Blackwell, J. A., & Carr, P. W. 1991. A chromatographic study of the Lewis acid-base chemistry of zirconia surfaces. *Journal of Liquid Chromatography*, 14, 2875-2889.
- ⁴⁰⁴ Sigma-Aldrich Co. 2014. Analysis of Compounds in Fatty Matrices. Accessed: 10/11/2022 https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/document/s/119/950/12023_T414114_Compounds_in_Fatty_Matrices.pdf

- ⁴⁰⁵ Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. 2013. Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 758, 80-92.
- ⁴⁰⁶ Rajski, Ł., Lozano, A., Uclés, A., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A. R. 2013. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304, 109-120.
- ⁴⁰⁷ Lozano, A., Rajski, Ł., Uclés, S., Belmonte-Valles, N., Mezcuca, M., & Fernández-Alba, A. R. 2014. Evaluation of zirconium dioxide-based sorbents to decrease the matrix effect in avocado and almond multiresidue pesticide analysis followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*, 118, 68-83.
- ⁴⁰⁸ Moreno-González, D., Huertas-Pérez, J. F., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. 2014. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta*, 128, 299-304.
- ⁴⁰⁹ Hamed, A. M., Moreno-González, D., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. 2017. Evaluation of a new modified QuEChERS method for the monitoring of carbamate residues in high-fat cheeses by using UHPLC–MS/MS. *Journal of Separation Science*, 40, 488-496.
- ⁴¹⁰ Han, L., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. 2014. Streamlined sample cleanup using combined dispersive solid-phase extraction and in-vial filtration for analysis of pesticides and environmental pollutants in shrimp. *Analytica Chimica Acta*, 827, 40-46.
- ⁴¹¹ Han, L., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. 2016. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography. *Food Control*, 66, 270-282.
- ⁴¹² Peña-Herrera, J. M., Montemurro, N., Barceló, D., & Pérez, S. 2020. Analysis of pharmaceuticals in fish using ultrasound extraction and dispersive spe clean-up on que Z-Sep/C18 followed by LC-QToF-MS detection. *MethodsX*, 7, 101010.
- ⁴¹³ Huertas-Pérez, J. F., Arroyo-Manzanares, N., Havlíková, L., Gámiz-Gracia, L., Solich, P., & García-Campaña, A. M. 2016. Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 124, 261-266.
- ⁴¹⁴ Soares-Mateus, A. R., Barros, S., Pena, A., & Sanches-Silva, A. 2021. Development and Validation of QuEChERS Followed by UHPLC-ToF-MS Method for Determination of Multi-Mycotoxins in Pistachio Nuts. *Molecules*, 26, 5754.
- ⁴¹⁵ Prata, R., López-Ruiz, R., Petrarca, M. H., Godoy, H. T., Frenich, A. G., & Romero-González, R. 2022. Targeted and non-targeted analysis of pesticides and aflatoxins in baby foods by

liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. *Food Control*, 139, 109072.

⁴¹⁶ de Oliveira, L. G., Kurz, M. H. S., Guimarães, M. C. M., Martins, M. L., Prestes, O. D., Zanella, R., Ribeiro, J.N.S., & Gonçalves, F. F. 2019. Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS. *Food chemistry*, 297, 124944.

⁴¹⁷ De Atley, A., Zhao, L., Lucas, D. 2015. Innovative sample prep removes lipids without losing analytes. *American Laboratory*, 47, 9.

⁴¹⁸ Agilent Technologies, Inc. 2018. Complex Matrices: Minimizing Lipids, Maximizing Recovery Food Testing Application Compendium: Volume 3. Accessed 10/11/2022 https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-6950EN_Captiva_EMRLipid_food_appcompendium.pdf

⁴¹⁹ Dias, J. V., Cutillas, V., Lozano, A., Pizzutti, I. R., & Fernández-Alba, A. R. 2016. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *Journal of Chromatography A*, 1462, 8-18.

⁴²⁰ Parrilla-Vázquez, P. P., Hakme, E., Uclés, S., Cutillas, V., Galera, M. M., Mughari, A. R., & Fernández-Alba, A. R. 2016. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1463, 20-31.

⁴²¹ Zhao, L., Szakas, T., Churley, M., & Lucas, D. 2019. Multi-class multi-residue analysis of pesticides in edible oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction and enhanced matrix removal lipid cartridge cleanup. *Journal of Chromatography A*, 1584, 1-12.

⁴²² Hakme, E., Lozano, A., Ferrer, C., Díaz-Galiano, F. J., & Fernández-Alba, A. R. 2018. Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 167-179.

⁴²³ Moreno-González, D., Alcántara-Durán, J., Addona, S. M., & Beneito-Cambra, M. 2018. Multi-residue pesticide analysis in virgin olive oil by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1562, 27-35.

⁴²⁴ Hakme, E., Lozano, A., Uclés, S., Gómez-Ramos, M. M., & Fernández-Alba, A. R. 2018. High-throughput gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues in spices by using the enhanced matrix removal-lipid and the sample dilution approach. *Journal of Chromatography A*, 1573, 28-41.

⁴²⁵ Belarbi, S., Vivier, M., Zaghoulani, W., De Sloovere, A., Agasse, V., & Cardinael, P. 2021. Comparison of different d-spe sorbent performances based on quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QuEChERS methodology for multiresidue pesticide analyses in rapeseeds. *Molecules*, 26, 6727.

- ⁴²⁶ Uczay, F., Bandeira, N. M., Floriano, L., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. 2021. Determination of Avermectins Residues in Soybean, Bean, and Maize Using a QuEChERS-Based Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Separations*, 8, 214.
- ⁴²⁷ Luo, P., Liu, X., Kong, F., Tang, L., Wang, Q., Li, W., & Li, Y. 2020. Multi-residue determination of 325 pesticides in chicken eggs with EMR-Lipid clean-up by UHPLC-MS/MS and GC-MS/MS. *Chromatographia*, 83, 593-599.
- ⁴²⁸ Petrarca, M. H., Fernandes, J. O., Marmelo, I., Marques, A., & Cunha, S. C. 2022. Multi-analyte gas chromatography-mass spectrometry method to monitor bisphenols, musk fragrances, ultraviolet filters, and pesticide residues in seafood. *Journal of Chromatography A*, 1663, 462755.
- ⁴²⁹ Peng, J., Gan, J., Ju, X., Liu, T., Chen, J., & He, L. 2021. Analysis of triazine herbicides in fish and seafood using a modified QuEChERS method followed by UHPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 1171, 122622.
- ⁴³⁰ Drábová, L., Dvořáková, D., Urbancová, K., Gramblička, T., Hajšlová, J., & Pulkrabová, J. 2022. Critical Assessment of Clean-Up Techniques Employed in Simultaneous Analysis of Persistent Organic Pollutants and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fatty Samples. *Toxics*, 10, 12.
- ⁴³¹ Wang, Y., Zhang, X., Hua, H., Huang, B., Li, Y. 2022. Simultaneous Determination and Confirmation of 116 Pesticides Residues and 24 Biotoxins in Aquatic Product and Dried Aquatic Product by Ultra Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole/Exactive Orbitrap Mass Spectrometry. *Modern Food Science and Technology*, 38, 1371-389.
- ⁴³² Vitale, D., Picó, Y., & Álvarez-Ruiz, R. 2021. Determination of organic pollutants in Anguilla anguilla by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *MethodsX*, 8, 101342.
- ⁴³³ Lehotay, S. J., & Lightfield, A. R. 2020. Extract-and-inject analysis of veterinary drug residues in catfish and ready-to-eat meats by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 103, 584-606.
- ⁴³⁴ Anumol, T., Lehotay, S. J., Stevens, J., & Zweigenbaum, J. 2017. Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 2639-2653.
- ⁴³⁵ Rizzetti, T. M., de Souza, M. P., Prestes, O. D., Adaime, M. B., & Zanella, R. 2018. Optimization of sample preparation by central composite design for multi-class determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 246, 404-413.

- ⁴³⁶ Zhao, L., Lucas, D., Long, D., Richter, B., & Stevens, J. 2018. Multi-class multi-residue analysis of veterinary drugs in meat using enhanced matrix removal lipid cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1549, 14-24.
- ⁴³⁷ Jung, Y. S., Kim, D. B., Nam, T. G., Seo, D., & Yoo, M. 2022. Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 382, 132313.
- ⁴³⁸ Luo, P., Liu, X., Kong, F., Chen, L., Wang, Q., Li, W., & Li, Y. 2019. Simultaneous determination of 169 veterinary drugs in chicken eggs with EMR-Lipid clean-up using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 11, 1657-1662.
- ⁴³⁹ Liu, H., Zeng, J.-Y., Liang, X.-Q., Deng, X.-H., Li, Z.-Y. 2018. Determination of Sulfonamides and Quinolones in Eggs by QuEChERS EMR-Lipid and High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Modern Food Science and Technology*, 34, 235-243.
- ⁴⁴⁰ Zhai, A. 2016. Determination of Mycotoxins in Peanuts With Enhanced Matrix Removal-Lipid by LC/MS/MS. *Agilent Technologies Application Note*.
- ⁴⁴¹ Alcántara-Durán, J., Moreno-González, D., García-Reyes, J. F., & Molina-Díaz, A. 2019. Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, 279, 144-149.
- ⁴⁴² Joseph, S., Zou, A., Gan, C.S., Zhao, L., & Batoon, P. 2020. An End-To-End Workflow for Quantitative Screening of Multiclass, Multiresidue Veterinary Drugs in Meat Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole LC/MS. *Agilent Technologies Application Note*.
- ⁴⁴³ Joseph, S., Zou, A., Gan, C.S., Zhao, L., & Batoon, P. 2021. Quantitative Screening of Multiresidue Veterinary Drugs in Milk and Egg Using the Agilent 6495C Triple Quadrupole LC/MS. *Agilent Technologies Application Note*.
- ⁴⁴⁴ Yang, S., Luo, Y., Mu, L., Yang, Y., & Yang, Y. 2021. Risk screening of mycotoxins and their derivatives in dairy products using a stable isotope dilution assay and LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 44, 782-792.
- ⁴⁴⁵ Derick Lucas. 2019. Mycotoxin Analysis in Peanut Butter Using Captiva EMR-Lipid Cleanup and LC/MS/MS. *Agilent Technologies Application Note*.
- ⁴⁴⁶ Albero, B., Fernández-Cruz, M. L., & Pérez, R. A. 2022. Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Aquaculture Feed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Toxins*, 14, 316.
- ⁴⁴⁷ Waters Corporation. 2017. Oasis solid phase extraction products. Simplifying Solid-Phase Extraction. Accessed: 11/11/2022
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001692en.pdf>

- ⁴⁴⁸ Waters Corporation. 2017. Oasis PRiME HLB Food Applications Notebook. Accessed: 11/11/2022 <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005932en.pdf>
- ⁴⁴⁹ Moreno-González, D., Hamed, A. M., Gilbert-López, B., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. 2017. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1510, 100-107.
- ⁴⁵⁰ Wang, J., Fan, X., Liu, Y., Du, Z., Feng, Y., Jia, L., & Zhang, J. 2017. Extraction optimization of sixteen cephalosporins in milk by filtered solid phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9, 1282-1289.
- ⁴⁵¹ He, J., Song, L., Zhou, G., & Zhao, L. 2017. The rapid analysis of antibiotics in animal meat and egg using a novel SEP method and UPLC-MS/MS. *Chromatographia*, 80, 1329-1342.
- ⁴⁵² Fukumitsu, T., Waki, M., Hagio, M., Hayashi, T., & Kuwahara, C. 2021. Development of an Analytical Method for Simultaneous Determination of Quinolones and Tetracyclines in Livestock and Fishery Products. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 62, 168-174.
- ⁴⁵³ Zhao, W., Jiang, R., Guo, W., Guo, C., Li, S., Wang, J., & Li, Y. 2021. Screening and Analysis of Multiclass Veterinary Drug Residues in Animal Source Foods using UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107, 228-238.
- ⁴⁵⁴ Hong, Y. H., Xu, X. L., Li, W. Q., Xu, B. Z., Wu, H. Q., Cheng, Y., & Zhang, F. 2017. A high-accuracy screening method of 44 cephalosporins in meat using liquid chromatography quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometry. *Analytical Methods*, 9, 6534-6548.
- ⁴⁵⁵ Guo, T., Wu, W., Wan, Y., Zheng, M., Pei, B. 2022. Rapid Screening of 45 Kinds of Veterinary Drugs Residues in Animal Liver Using Prime HLB Purification /UHPLC-Q-Orbitrap HRM. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 22, 287-299.
- ⁴⁵⁶ Wang, J., Zhao, W., Guo, W., Li, Y., Jiang, R., Li, H., & Li, Z. 2022. Simultaneous screening and analysis of 155 veterinary drugs in livestock foods using ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole linear-ion-trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 133260.
- ⁴⁵⁷ Luo, D., Guan, J., Dong, H., Chen, J., Liang, M., Zhou, C., & Xu, X. 2022. Simultaneous determination of twelve mycotoxins in edible oil, soy sauce and bean sauce by PRiME HLB solid phase extraction combined with HPLC-Orbitrap HRMS. *Frontiers in Nutrition*, 9.
- ⁴⁵⁸ Scarpino, V., Reyneri, A., & Blandino, M. 2019. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Determination of 17 Aspergillus and Fusarium Mycotoxins in Cereals Using HPLC-ESI-TQ-MS/MS. *Frontiers in Microbiology*, 10, 361.
- ⁴⁵⁹ Tamayo, F. G., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. 2007. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1152, 32-40.
- ⁴⁶⁰ Martín-Esteban, A. 2013. Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 169-181.

- ⁴⁶¹ Turiel, E., & Martín-Esteban, A. 2020. Chapter 8: Molecularly imprinted polymers. In Poole, C.F. (Ed.) *Handbooks in Separation Science. Solid-Phase Extraction*. The Netherlands, Elsevier. ISBN: 9780128169063.
- ⁴⁶² Mohamed, R., Richoz-Payot, J., Gremaud, E., Mottier, P., Yilmaz, E., Tabet, J.C., & Guy Philippe A. 2007. Advantages of molecularly imprinted polymers LC-ESI-MS/MS for the selective extraction and quantification of chloramphenicol in milk-based matrixes. Comparison with a classical sample preparation. *Analytical Chemistry*, 79, 9557-9565.
- ⁴⁶³ Moreno-González, D., Lara, F. J., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. 2014. Molecularly imprinted polymer as in-line concentrator in capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for the determination of quinolones in bovine milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1360, 1-8.
- ⁴⁶⁴ Urraca, J.L., Castellari, M., Barrios, C.A., & Moreno-Bondi, M.C. 2014. Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1343, 1-9.
- ⁴⁶⁵ Xiao, D., Dramou, P., Xiong, N., He, H., Yuan, D., Dai, H., & Li, N. 2013. Preparation of molecularly imprinted polymers on the surface of magnetic carbon nanotubes with a pseudo template for rapid simultaneous extraction of four fluoroquinolones in egg samples. *Analyst*, 138, 3287-3296.
- ⁴⁶⁶ Baggiani, C., Anfossi, L., & Giovannoli, C. 2007. Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica chimica acta*, 591, 29-39.
- ⁴⁶⁷ Wang, P., Sun, X., Su, X., & Wang, T. 2016. Advancements of molecularly imprinted polymers in the food safety field. *Analyst*, 141, 3540-3553.
- ⁴⁶⁸ Díaz-Bao, M., Regal, P., Barreiro, R., Fente, C. A., & Cepeda, A. 2016. A facile method for the fabrication of magnetic molecularly imprinted stir-bars: A practical example with aflatoxins in baby foods. *Journal of Chromatography A*, 1471, 51-59.
- ⁴⁶⁹ Liang, Y., He, J., Huang, Z., Li, H., Zhang, Y., Wang, H., & Zhang, S. 2020. An amino-functionalized zirconium-based metal-organic framework of type UiO-66-NH₂ covered with a molecularly imprinted polymer as a sorbent for the extraction of aflatoxins AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ from grain. *Microchimica Acta*, 187, 1-8.
- ⁴⁷⁰ Bodbodak, S., Hesari, J., Peighambaroust, S. H., & Mahkam, M. 2018. Selective decontamination of aflatoxin M₁ in milk by molecularly imprinted polymer coated on the surface of stainless steel plate. *International journal of dairy technology*, 71, 868-878.
- ⁴⁷¹ Giovannoli, C., Passini, C., Di Nardo, F., Anfossi, L., Baggiani, C. Determination of ochratoxin A in Italian red wines by molecularly imprinted solid phase extraction and HPLC analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62, 5220-5225.

- ⁴⁷² Vidal, J. C., Duato, P., Bonel, L., & Castillo, J. R. 2012. Molecularly imprinted on-line solid-phase extraction coupled with fluorescence detection for the determination of ochratoxin A in wheat samples. *Analytical letters*, 45, 51-62.
- ⁴⁷³ Yu, J. C., & Lai, E. P. 2010. Molecularly imprinted polymers for ochratoxin A extraction and analysis. *Toxins*, 2, 1536-1553.
- ⁴⁷⁴ De Smet, D., Dubruel, P., Van Peteghem, C., Schacht, E., De Saeger, S. 2009. Molecularly imprinted solid-phase extraction of fumonisin B analogues in bell pepper, rice and corn flakes. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 26, 874-884.
- ⁴⁷⁵ Wang, Y., Zhang, C., Wang, J., & Knopp, D. 2022. Recent progress in rapid determination of mycotoxins based on emerging biorecognition molecules: A review. *Toxins*, 14, 73.
- ⁴⁷⁶ Heller, D.N. 2007. Ruggedness testing of quantitative atmospheric pressure ionization mass spectrometry methods: the effect of co-injected matrix on matrix effects. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 21, 644-652.
- ⁴⁷⁷ Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., & Buleté, A. 2013. Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61.
- ⁴⁷⁸ Li, H., Wang, C., Zhu, Q., Du, H., Guan, S., Wang, F., Zhang, W., Fan, W., Chen, Z., Yang, G., & Aboul-Enein, H. Y. 2016. Reduction of matrix effects through a simplified QuEChERS method and small injection volumes in a LC-MS/MS system for the determination of 28 pesticides in fruits and vegetables. *Analytical Methods*, 8, 910-916.
- ⁴⁷⁹ Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., Hemmerling, C., & Alder, L. 2012. The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 875-884.
- ⁴⁸⁰ Asimakopoulos, A.G., Bletsou, A., Kannan, K., & Thomaidis, N.S. 2015. Chapter 5: Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry: advances in liquid chromatographic separations and ionization techniques/interfaces. In Tsipi, D., Botitsi, H., & Economou, A. (Eds.) *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*. USA, John Wiley & Sons, Inc. ISBN: 978-111907077-1.
- ⁴⁸¹ Kostianen, R. & Kauppila, T.J. 2009. Review. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatograph-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 685-699.
- ⁴⁸² Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T.V., & Merkle, K. 2000. The Effects of Sample Preparation Methods on the Variability of the Electrospray Ionization Response for Model Drug Compounds. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 13, 1175-1185.
- ⁴⁸³ Choi, B.K., Gusev, A.I., & Hercules, D.M. 1999. Postcolumn Introduction of an Internal Standard for Quantitative LC-MS Analysis. *Analytical Chemistry*, 71, 4107-4110.
- ⁴⁸⁴ Stahnke, H., Reemtsma, T., & Alder, L. 2009. Compensation of Matrix Effects by Postcolumn Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 81, 2185-2192.

- ⁴⁸⁵ Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., & Alder, L. 2012. Reduction of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Electrospray Ionization–Mass Spectrometry by Dilution of the Sample Extracts: How Much Dilution is Needed? *Analytical Chemistry*, 84, 1474-1482.
- ⁴⁸⁶ Choi, B.K., Hercules, D.M., & Gusev A.I. 2001. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *Journal of Chromatography A*, 907, 337-342.
- ⁴⁸⁷ Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempec, G., & Speerb, K. 2012. Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 8399-8410.
- ⁴⁸⁸ Jank, L., Martins, M.T., Arsand, J.B., Hoff, R.B., Barreto, F., & Pizzolato, T.M. 2015. High-throughput method for the determination of residues of β -lactam antibiotics in bovine milk by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32, 1992-2001.
- ⁴⁸⁹ Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., Ng, K., & Korfmacher, W.A. 2002. Investigation Of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 17, 97-103.
- ⁴⁹⁰ Tóth, S.B., Jolankai, R., Muranyi, Z., & Dallos, A. 2011. Analysis of Deoxynivalenol, Nivalenol, Zearalenone in Food by LC-APCI-MS. *Chromatographia*, 73, 171-174.
- ⁴⁹¹ Blasco, C., Font, G., & Picó, Y. 2004. Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028, 267-276.
- ⁴⁹² Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., & Oka, H. 1999. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 732, 55-64.
- ⁴⁹³ Ali, M.S., Sun, T., McLeroy, G.E., & Phillippo, E.T. 2000. Confirmation of Eprinomectin, Moxidectin, Abamectin, Doramectin, and Ivermectin in Beef Liver by Liquid Chromatography/Positive Ion Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International*, 83, 39-52.
- ⁴⁹⁴ Andersen, W.C., Turnipseed, S.B., & Roybal, J.E. 2006. Quantitative and Confirmatory Analyses of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish and Shrimp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4517-4523.
- ⁴⁹⁵ Martínez-Villalba, A., Moyano, E., & Galceran, M.T. 2013. Ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1313, 119-131.
- ⁴⁹⁶ Turnipseed, S.B., Andersen, W.C., Karbiwny, C.M., Roybal, J.E., & Miller, K.E. 2006. No-discharge atmospheric pressure chemical ionization: evaluation and application to the

analysis of animal drug residues in complex matrices. *Rapid Communication in Mass Spectrometry: RCM*, 20, 1231-1239

⁴⁹⁷ Zöllner, P. & Mayer-Helm, B. 2006. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1136, 123-169.

⁴⁹⁸ Takino, M., Yamaguchi, K., & Nakahara, T. 2004. Determination of Carbamate Pesticide Residues in Vegetables and Fruits by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionization-Mass Spectrometry and Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 727-735.

⁴⁹⁹ Takino, M., Tanaka, T., Yamaguchi, K., & Nakahara. 2004. Atmospheric pressure photoionization liquid chromatography/mass spectrometric determination of aflatoxins in food. *Food Additives and Contaminants*, 21, 76-84.

⁵⁰⁰ Zhang, K., Wong, J.W., Mai, H., & Trucksess, M.W. 2014. Dopant-Assisted Atmospheric Pressure Photoionization of Patulin in Apple Juice and Apple-Based Food with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4112-4118.

⁵⁰¹ Takino, M., Daishima, S. & Nakahara, T. 2003. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1011, 67-75.

⁵⁰² Chen, L., Song, F., Liu, Z., Zheng, Z., Xing, J., & Shuying, L. 2014. Study of the ESI and APCI interfaces for the UPLC-MS/MS analysis of pesticides in traditional Chinese herbal medicine. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 406, 1481-1491.

⁵⁰³ Lara-Ortega, F.J., Robles-Molina, J., Brandt, S., Schütz, A., Gilbert-López, B., Molina-Díaz, A., García-Reyes, J.F., & Franzke, J. 2018. Use of dielectric barrier discharge ionization to minimize matrix effects and expand coverage in pesticide residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1020, 76-85.

⁵⁰⁴ Nassar, A. E., Varshney, N., Getek, T., & Cheng, L. 2001. Quantitative analysis of hydrocortisone in human urine using a high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric-atmospheric-pressure chemical ionization method. *Journal of chromatographic science*, 39, 59-64.

⁵⁰⁵ Choi, C. K., & Dong, M. W. 2005. Chapter 5: Sample preparation for HPLC analysis of drug products. In Ahuja, S., & Dong, M.W. (Eds.) *Separation Science and Technology, Vol. 6*, The Netherlands, Elsevier. ISBN: 978-0-12-088547-3.

⁵⁰⁶ Deventer, K., Pozo, O. J., Verstraete, A. G., & Van Eenoo, P. 2014. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 55, 1-13.

⁵⁰⁷ Görgens, C., Guddat, S., Orlovius, A. K., Sigmund, G., Thomas, A., Thevis, M., & Schänzer, W. 2015. "Dilute-and-inject" multi-target screening assay for highly polar doping agents

using hydrophilic interaction liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry for sports drug testing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407, 5365-5379.

⁵⁰⁸ Enders, J. R., & McIntire, G. L. 2015. A dilute-and-shoot LC-MS method for quantitating opioids in oral fluid. *Journal of Analytical Toxicology*, 39, 662-667.

⁵⁰⁹ Alcántara-Durán, J., Moreno-González, D., Beneito-Cambra, M., & García-Reyes, J. F. 2018. Dilute-and-shoot coupled to nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for the determination of drugs of abuse and sport drugs in human urine. *Talanta*, 182, 218-224.

⁵¹⁰ Pichini, S., Mannocchi, G., Gottardi, M., Pérez-Acevedo, A. P., Poyatos, L., Papaseit, E., & Busardò, F. P. 2020. Fast and sensitive UHPLC-MS/MS analysis of cannabinoids and their acid precursors in pharmaceutical preparations of medical cannabis and their metabolites in conventional and non-conventional biological matrices of treated individual. *Talanta*, 209, 120537.

⁵¹¹ Greer, B., Chevallier, O., Quinn, B., Botana, L. M., & Elliot, C. T. 2021. Redefining dilute-and-shoot: The evolution of the technique and its application in the analysis of foods and biological matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 141, 116284

⁵¹² Romero-González, R., Arrebola-Liebanas, F.J., López-Ruiz, R., & Garrido Frenich, A. 2016. Sample Treatment in Pesticide Residue Determination in Food by High-Resolution Mass Spectrometry: Are Generic Extraction Methods the End of the Road? *Journal of AOAC International*, 99, 1395-1402.

⁵¹³ Wang, J., Chow, W., Chang, J., & Wong, J. W. 2014. Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-Orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: method development and validation. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 62,10375-10391.

⁵¹⁴ Malachová, A., Sulyok, M., Beltrán, E., Berthiller, F., & Krska, R. 2014. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. *Journal of Chromatography A*, 1362, 145-156.

⁵¹⁵ Lehotay, S. J., & Lightfield, A. R. 2021. Comparison of four different multiclass, multiresidue sample preparation methods in the analysis of veterinary drugs in fish and other food matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413, 3223-3241.

⁵¹⁶ Malachová, A., Stránská, M., Václavíková, M., Elliott, C. T., Black, C., Meneely, J., Hajslová, J., Ezekiel, C.N., Schuhmacher, R., & Krska, R. 2018. Advanced LC-MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 801-825.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

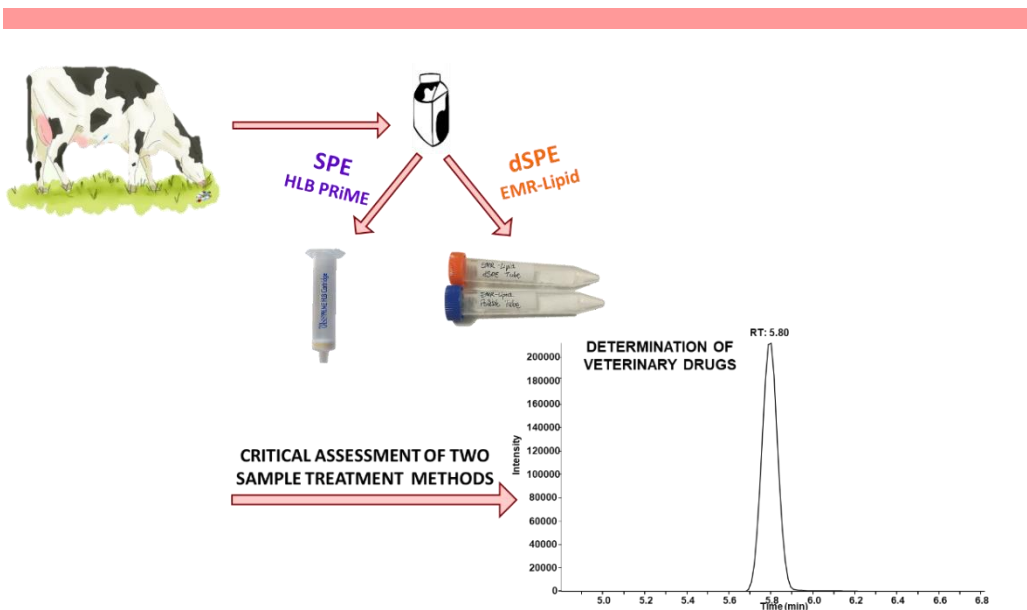


CAPÍTULO 1

Evaluación crítica de dos métodos de tratamiento de muestra para la determinación de multirresiduo de medicamentos veterinarios en leche mediante UHPLC-MS/MS

CHAPTER 1

Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS





Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS

Delia Castilla-Fernández¹ · David Moreno-González¹ · Miriam Beneito-Cambra¹ · Antonio Molina-Díaz^{1,2}

Received: 31 October 2018 / Revised: 19 December 2018 / Accepted: 3 January 2019 / Published online: 26 January 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

In this work, two sample treatment procedures have been evaluated for the determination of veterinary drug residues in milk. In order to cover a wide range of polarities, a total of 66 veterinary drugs with $\log K_{ow}$ ranging from -1 to 5 were selected. Two sample cleanup steps, (i) dispersive solid-phase extraction (dSPE) using enhanced matrix removal lipid as sorbent and (ii) solid-phase extraction (in pass-through mode) using Oasis HLB PRiME cartridges, were critically assessed in terms of sample throughput, recovery, matrix effect, cleanliness of extracts, limit of quantification, and repeatability. The veterinary drugs tested (viz. benzimidazoles, cephalosporins, imidazothiazoles, macrolides, NSAIDs, penicillins, quinolones, steroids, sulfonamides, and β -agonists) were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. According to the results, both methods exhibited similar recovery rates between 70 and 120% for most of compounds tested. Matrix effects were satisfactory for both methodologies, although the tolerance to matrix effects was slightly higher with HLB PRiME with nearly negligible matrix effects in most cases. Limits of quantitation were also well below the current maximum residue levels established by the European Union. Notably, sample throughput was higher in the case of HLB PRiME, since this pass-through SPE cleanup approach involved fewer steps than the EMR-Lipid dSPE approach. The results in terms of analysis time, sensitivity, precision, cleanliness of extracts, and matrix effect showed the suitability of both procedures for the monitoring of veterinary drugs residues in milk samples in a single run.

Keywords Sample treatment · Veterinary drugs · Milk · HLB PRiME · EMR-Lipid · UHPLC-MS/MS

RESUMEN

El uso de medicamentos en la producción animal se está convirtiendo en un problema mundial relacionado con la inocuidad de los alimentos y la salud pública, debido, en gran medida, al desarrollo de resistencia a los antimicrobianos. A través del consumo de productos lácteos, residuos de estos medicamentos pueden entrar en la cadena alimentaria. Como consecuencia, la Unión Europea (UE) establece qué sustancias están autorizadas como medicamentos veterinarios y cuál es el límite máximo de residuo en los alimentos de origen animal. En el caso de la leche, el producto lácteo más consumido en Europa, los límites máximos de residuos (MRLs) están por debajo de los $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. Para ello, se requieren técnicas analíticas altamente sensibles y específicas, como la cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS).

En este trabajo se propone un método multiresiduo para la detección de 66 medicamentos veterinarios mediante UHPLC-ESI-MS/MS con ionización por electrospray. Con el fin de cubrir una amplia gama de polaridades, se seleccionaron diferentes familias: benzimidazoles, cefalosporinas, imidazotiazoles, macrólidos, AINEs, penicilinas, quinolonas, esteroides, sulfonamidas y β -agonistas. Debido a que los valores de $\text{Log } K_{ow}$ de los diferentes analitos estaban entre -1 y 5, fue necesaria una optimización de la separación cromatográfica. Se utilizó columna C_{18} y agua y acetonitrilo (ambos con 1% de ácido fórmico) como fase móvil con gradiente de elución. Para la detección y cuantificación se usó un analizador de triple cuadrupolo, utilizando el modo monitorización múltiple de transiciones MS/MS (MRM). La interfase de tipo ESI operó en modo positivo. Los 66 compuestos fueron caracterizados a través de la masa del ion precursor ($[M+H]^+$), las masas de sus dos fragmentos mayoritarios y su tiempo de retención.

La leche, aunque es una matriz líquida y homogénea, no deja de ser una matriz compleja. Ya que, aparte de agua en su composición, contiene hidratos de carbono,

principalmente lactosa (4-5%), grasas (2-5%), proteínas (4-5%) y otros componentes minoritarios como vitaminas (B12) y minerales (Calcio, Potasio). La determinación de medicamentos veterinarios se ve afectada, en gran medida, por su alta concentración de proteínas y lípidos en la leche. Ya que aumenta la cantidad de sustancias potencialmente interferentes en los extractos finales. Con el fin disminuir la cantidad de estas sustancias co-extraídas, en este trabajo se evaluaron dos tratamientos de muestra: (i) extracción en fase sólida (SPE), en modo pass-through, en cartuchos Oasis HLB PRiME (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”) y (ii) extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), utilizando EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal) como sorbente.

En términos de tiempo de análisis, sensibilidad, precisión, limpieza de extractos y efecto matriz, los resultados obtenidos mostraron la idoneidad de ambos tratamientos de muestra para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en muestras de leche en un solo análisis. Ambos métodos presentaban porcentajes de recuperación similares, entre 70 y 120 %, para la mayoría de los compuestos estudiados. Además, los resultados de efecto matriz obtenidos para los dos métodos fueron satisfactorios. Aunque, comparando los dos tratamientos, HLB PRiME fue ligeramente mejor, ya que presentaba efectos de matriz prácticamente insignificantes en la mayoría de los casos. Los límites de cuantificación estaban muy por debajo de los niveles máximos de residuos establecidos por la Unión Europea. El procedimiento utilizando los cartuchos HLB PRiME implicaba menos pasos en comparación con la metodología EMR-Lipid d-SPE, con lo cual el tiempo empleado en el tratamiento de muestra se reducía significativamente. Por tanto, el uso de cartuchos HLB PRiME, en laboratorios de análisis rutinario, podría resultar más ventajoso para esta aplicación. Por último, esta metodología se empleó para el análisis de 24 muestras de leche, en las cuales fueron detectadas algunas trazas de Danofloxacin por debajo de los límites de la UE.

SUMMARY

The use of veterinary drugs in food-producing animals is becoming a global problem related to food safety and public health, largely due to the development of antimicrobial resistance. Through the consumption of dairy products, residues of these substances can enter the food chain. As a consequence, the European Union (EU) has established the authorized substances to be used as veterinary drugs and the maximum residue limit in animal origin commodities. In the case of milk, the most consumed dairy product around Europe, the Maximum Residue Limits (MRLs) are below $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. It requires highly sensitive and specific analytical techniques, such as ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

In this work, a multiresidue analysis for 66 veterinary drugs by UHPLC-ESI-MS/MS using an electrospray ionization source is proposed. In order to cover a wide range of polarities, different families were selected: benzimidazoles, cephalosporins, imidazothiazoles, macrolides, NSAIDs, penicillins, quinolones, steroids, sulfonamides and β -agonists. An optimization of the chromatographic separation was necessary owing to the different $\text{Log } K_{\text{ow}}$ values of the studied analytes, which ranged from -1 to 5. Finally, a C_{18} column and a mobile phase consisting of water and acetonitrile (both containing 1% formic acid) were used, in gradient elution mode. For detection and quantification, a triple quadrupole analyzer was used, in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) scan mode. The ESI type interface operated in positive mode. The 66 compounds were characterized through the mass of the precursor ion ($[\text{M}+\text{H}]^+$), the mass of two characteristic products and their retention time.

Milk is still a complex matrix, although it is a liquid and homogeneous commodity. This is because milk is composed, apart from water, of carbohydrates, mainly lactose (4-5%), fat (2-5%), proteins (4-5%) and other minor components such as vitamins

(B12) and minerals (Calcium, Potassium). The determination of veterinary drugs is greatly affected by the high concentration of proteins and lipids in milk. It increases to it could increase the complexity of the sample treatment, leading to final extracts rich in potentially interfering substances. Thus, two sample treatments were evaluated in this work: (i) solid phase extraction (SPE), in pass-through mode, using the Oasis HLB PRiME (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”) cartridges and (ii) dispersive solid phase extraction (d-SPE), using EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid) as sorbent.

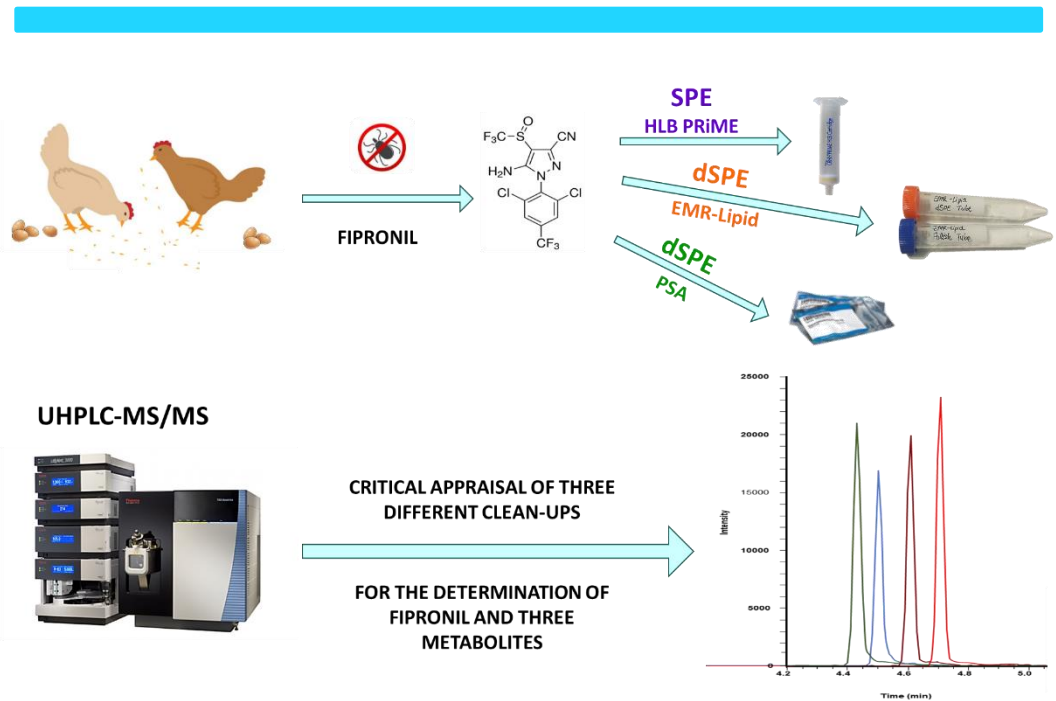
In terms of analysis time, sensitivity, precision, cleanliness of extracts and matrix effect, the results obtained showed the suitability of both sample treatments for monitoring veterinary drug residues in milk samples in a single run. Both methods exhibited similar recovery rates, between 70 and 120%, for most of compounds tested. Matrix effects were satisfactory for both methodologies, although the tolerance to matrix effects was slightly higher with HLB PRiME with nearly negligible matrix effects in most cases. Limits of quantitation were below the current maximum residue levels established by the European Union. Notably, sample throughput was higher in the case of HLB PRiME, since the pass-through SPE clean-up approach involved fewer steps than the EMR-Lipid d-SPE approach. Therefore, the use of HLB PRiME cartridges in routine analysis laboratories, could be more advantageous for this application. Finally, this methodology was used for the analysis of 24 milk samples, in which some traces of Danofloxacin were detected below the EU limits.

CAPÍTULO 2

Evaluación de diferentes sorbentes en la etapa de limpieza para la determinación de fipronil y sus metabolitos en muestras de huevo mediante UHPLC-MS/MS

CHAPTER 2

Appraisal of different clean-up strategies for the determination of fipronil and its metabolites in eggs by UHPLC-MS/MS





Appraisal of different clean-up strategies for the determination of fipronil and its metabolites in eggs by UHPLC-MS/MS

Delia Castilla-Fernández, David Moreno-González^{*}, M^a Carmen Murillo-Cruz, Juan F. García-Reyes, Antonio Molina-Díaz

Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fipronil
Metabolites
Egg
UHPLC-MS/MS
EMR-lipid

ABSTRACT

The large-scale misuse of fipronil insecticide can be a food safety issue. Therefore, the EU has fixed a maximum residue level of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ in egg expressed as the sum of both fipronil and its sulfone metabolite. On the other hand, their determination in egg samples is not an easy task due to the high proportion of lipids and proteins. Therefore, the development of new strategies to isolate fipronil and its metabolites from egg matrix interference remains a significant challenge and is central in food analysis. In this work, three clean-up strategies (EMR-lipid, HLB PRiME, and primary secondary amine (PSA)) based on either dispersive solid-phase extraction (dsPE) or SPE in pass-through mode were evaluated in combination with the QuEChERS extraction to determine fipronil and its metabolites in chicken eggs. All extracts were analyzed with ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Several aspects, including laboratory throughput, matrix effect, limits of quantification, cleanliness of extracts, recovery, and repeatability, were taken into account to provide a comprehensive assessment of these clean-up strategies. LOQs ranged from 0.02 to $0.03 \mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained in all cases, being lower than the maximum residue levels fixed by the current legislation. The samples cleaned up by EMR-Lipid and PSA achieved the highest average recovery, obtaining recovery values between 95.3 and 99.3%, 91.3–96.7%, 85.1–89.3% for EMR-Lipid, PSA, and HLB PRiME, respectively. The matrix effects were only negligible for all studied analytes in the case of EMR-lipid, achieving signal suppression ranged from -8 to -4% . Thus, EMR-lipid provided the best results due to its higher effectiveness in removing co-extracted species from the extract. Finally, different egg chicken samples were tested using the selected clean-up procedure to illustrate the method applicability.

RESUMEN

El fipronil es un insecticida de amplio espectro que ha sido ampliamente utilizado para la agricultura y el control de plagas urbanas. Debido a su mala utilización a gran escala, el fipronil puede ser un problema de seguridad alimentaria. En 2017, a través de las autoridades europeas, saltó la noticia de una contaminación por fipronil en huevos y productos derivados. Como consecuencia, la UE ha fijado un límite máximo de residuos de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ en huevo, expresado como la suma de fipronil y su metabolito fipronil sulfona. Teniendo en cuenta esta situación, existe una gran necesidad de desarrollar métodos analíticos simples y fiables a fin de cumplir con la legislación vigente. Con esto en mente, el fipronil y sus metabolitos generalmente se han determinado mediante cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

En primer lugar, en este trabajo se propone la cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización por electrospray (UHPLC-ESI-MS/MS) para la determinación de fipronil y tres metabolitos (fipronil-sulfona, fipronil-sulfuro y fipronil-desulfonil) en huevo. La separación se realizó mediante una columna C_{18} y una fase móvil compuesta por agua y acetonitrilo, ambas con 2 mmol L^{-1} de acetato de amonio. Para la determinación de los analitos, se empleó un analizador de triple cuadrupolo, en el modo de adquisición de monitorización múltiple de transiciones MS/MS (MRM). El acoplamiento con el cromatógrafo se realizó mediante una fuente de ESI operando en modo negativo. Para la cuantificación, la molécula deprotonada $[\text{M-H}]^-$ se seleccionó como ion precursor, junto con dos iones producto, de cuantificación y confirmación, además del tiempo de retención del compuesto.

Por otro lado, la determinación de fipronil y sus metabolitos en muestras de huevo no es sencilla. Un huevo entero contiene 74% de agua, 12% de lípidos, 12% de proteínas y pequeñas cantidades de carbohidratos y minerales. Además, los analitos tienen un carácter marcadamente apolar debido a que su valor de $\text{Log } K_{ow}$ está

alrededor de 4. Por lo tanto, la alta concentración tanto de lípidos y proteínas supone un inconveniente, ya que la señal analítica puede verse afectada por la presencia de sustancias co-extraídas de la matriz en el extracto final. Realizando una simple etapa de extracción el efecto matriz obtenido fue medio. Por esa razón, es necesario un paso de limpieza para lograr minimizar el efecto matriz. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron tres diferentes estrategias como etapa de limpieza: (i) extracción en fase sólida (SPE), en modo pass-through, utilizando los cartuchos Oasis HLB PRiME (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”), (ii) una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), utilizando el sorbente EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid), y (iii) una d-SPE basada en el extendido sorbente amina secundaria primaria (PSA).

Para proporcionar una evaluación integral de las estrategias de limpieza propuestas, se tuvo en cuenta el efecto matriz, los límites de cuantificación (LOQs), la limpieza de los extractos, recuperación y precisión, entre otros. Después de todos los procedimientos los LOQs obtenidos oscilaron entre 0.02 y 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$, siendo inferiores a los límites máximos de residuos fijados por la legislación vigente. Según los hallazgos de este trabajo, los sorbentes EMR-Lipid y PSA lograron unas recuperaciones más elevadas. Estos valores de recuperación se encontraban entre 95.3-99.3%, 91.3-96.7% y 85.1-89.3% para EMR-Lipid, PSA y HLB PRiME, respectivamente. Mientras que sólo en el caso del EMR-Lipid, el efecto matriz fue insignificante para todos los analitos, obteniéndose una supresión de la señal que oscilaba entre -8% y -4%. Por lo tanto, la etapa de limpieza con EMR-Lipid fue la que proporcionó los mejores resultados debido a su mayor efectividad en la eliminación de especies co-extraídas del extracto, asegurando resultados satisfactorios en términos de recuperación, precisión y sensibilidad, y también brindando el extracto final más limpio. Finalmente, se analizaron cincuenta huevos de gallina para demostrar la aplicabilidad del método propuesto, detectándose residuos de fipronil y fipronil sulfona por debajo de sus LOQs.

SUMMARY

Fipronil is a broad-spectrum insecticide has been widely used for agriculture and urban pest control. Owing to the large-scale misuse of fipronil can be a food safety issue. In 2017 the news broke a fipronil contamination in eggs and related products by the European Union (EU). Therefore, the EU has fixed a maximum residue level of $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ in egg expressed as the sum of both fipronil and its sulfone metabolite. Considering the situation, there is a great necessity for developing simple and reliable analytical methods to fulfill current legislation. With this in mind, fipronil and its metabolites have been usually determined by chromatography coupled to mass spectrometry.

First, in this work an ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using an electrospray ionization source (UHPLC-ESI-MS/MS) is proposed for the determination of fipronil and three metabolites (fipronil-sulfone, fipronil-sulfide, and fipronil-desulfinyl) in egg samples. The separation was performed using a C_{18} column and a mobile phase consisting of water and acetonitrile, both containing 2 mmol L^{-1} ammonium acetate, in gradient elution mode. For detection and quantification, a triple quadrupole analyzer was used, in the Multiple Reaction Monitoring (MRM) scan mode an using ESI source operating in negative mode. For quantification purposes, the deprotonated molecule $[\text{M-H}]^-$ was selected as the precursor ion, then quantification and confirmation ions were employed together with the retention time.

On the other hand, it should be noted the determination of fipronil and its metabolites in egg samples is not simple. Whole eggs contain 74% water, 12% lipids, 12% proteins, and small amounts of carbohydrates and minerals. Furthermore, the analytes have a strongly non polar nature due to their Log K_{ow} value is around 4. Thus, the high concentration of both lipids and proteins is a drawback to be solved because the signal response can be affected by the presence of co-extractives from

the matrix in the final extract. With a simple extraction step a medium matrix effect was obtained. For that reason, a clean-up step is mandatory to achieve minimize matrix effects. Therefore, three different clean-up strategies were evaluated in this work: (i) solid phase extraction (SPE), in pass-through mode, using the Oasis HLB PRiME cartridges (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”), (ii) dispersive solid phase extraction (d-SPE), using EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid) as sorbent, and (iii) conventional d-SPE clean-up based on primary secondary amine (PSA).

Several aspects, including laboratory throughput, matrix effect, limits of quantification, cleanliness of extracts, recovery, and repeatability, were taken into account to provide a comprehensive assessment of the proposed clean-up procedures. Limits of quantification (LOQs) ranged from 0.02 to 0.03 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained in all cases, being lower than the maximum residue levels fixed by the current legislation. Based on the findings of this work, EMR-Lipid and PSA achieved the highest average recovery. The obtained recovery values were between 95.3-99.3%, 91.3-96.7% and 85.1-89.3% for EMR-Lipid, PSA, and HLB PRiME, respectively. The matrix effects were only negligible for all studied analytes in the case of EMR-lipid, achieving signal suppression ranged from -8% to -4%. Thus, EMR-Lipid provided the best results due to its higher effectiveness in removing co-extracted species from the extract, ensuring satisfactory results in terms of recoveries, precision, and sensitivity, and also providing the cleanest final extract. Finally, fifty chicken eggs were analyzed to demonstrate the proposed method applicability, with residues of fipronil and fipronil sulfone detected below their LOQs.

CAPÍTULO 3

Evaluación de un tratamiento de muestra específico de extracción y limpieza de muestras de salmón para la determinación de medicamentos veterinarios y plaguicidas mediante UHPLC-MS/MS

CHAPTER 3

Assessment of a specific sample clean-up for the multiresidue determination of veterinary drugs and pesticides in salmon using UHPLC-MS/MS

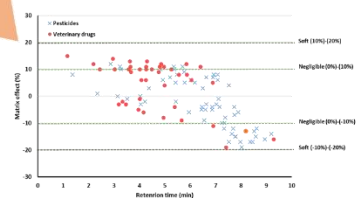


EMR-Lipid dSPE CLEANUP SORBENT IS USED TO EFFECTIVELY REMOVE COEXTRACTED FATTY MATRIX COMPONENTS

UHPLC-MS/MS



SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF PESTICIDES AND VETERINARY DRUGS, ACHIEVING NEGLIGIBLE AND SOFT MATRIX EFFECTS FOR 57 % AND 43% OF THE COMPOUNDS.





Assessment of a specific sample cleanup for the multiresidue determination of veterinary drugs and pesticides in salmon using liquid chromatography/tandem mass spectrometry

Delia Castilla-Fernández^a, David Moreno-González^{a,b}, Marcos Bouza^a, Andrea Saez-Gómez^a, Evaristo Ballesteros^b, Juan F. García-Reyes^a, Antonio Molina-Díaz^{a,c}

^a Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071, Jaén Spain

^b Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, University of Jaén, 23700, Linares, Jaén, Spain

^c Center for Advanced Studies in Olives Grove and Olive Oils (CEAOAO), Science and Technology Park GEOLIT, 23620, Mengibar, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Fatty samples
Cleanup
Veterinary drugs
Pesticides
QuEChERS
EMR-Lipid
UHPLC-MS/MS

ABSTRACT

A novel sample treatment approach based on a modified QuEChERS method was evaluated for the simultaneous determination of veterinary drug and pesticide residues in salmon in this work. To improve the QuEChERS performance, Enhanced Matrix Removal-Lipid dSPE cleanup sorbent was evaluated for the first time for the simultaneous analysis of these organic contaminants in salmon samples. Due to this sorbent can effectively remove coextracted families of lipids. To cover a wide range of polarities, 65 pesticides and 41 veterinary drugs with $\log K_{ow}$ ranging from -1.4 to 5.5 were selected. Extracts after cleanup were analyzed by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for analyte confirmation and quantitation. Outstanding results were obtained for both extraction efficiency and matrix removal. A negligible matrix effect was obtained for 57% of the studied compounds, whereas the rest presented a soft matrix effect. The recovery for spiked samples was in agreement with the current European Union recommendations for most compounds. The rest of the parameters were also satisfactory, reaching quantification limits lower than $3.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ in all cases. The precision was better than 20% in all cases. Finally, the method performance was successfully demonstrated with 20 salmon samples, five of which contained pesticide or veterinary drug residues.

RESUMEN

El pescado es uno de los alimentos más consumidos. Debido su gran demanda, la acuicultura ha hecho posible el continuo crecimiento en la oferta de pescado para el consumo humano. El salmón del Atlántico es uno de los productos acuícolas más demandados, por lo que se escogió como matriz para este estudio. Debido a las técnicas de cría intensivas, que implican el uso de piensos que pueden contener medicamentos veterinarios, y la presencia de plaguicidas que son vertidos continuamente en el medio acuático, la salud de los consumidores debe ser protegida. Por ello, la Unión Europea (UE) ha establecido Límites Máximos de Residuos (MRLs) de medicamentos veterinarios en productos de origen animal, mientras que aún no se han establecido MRLs para residuos de plaguicidas en productos pesqueros. En cambio, EE.UU. sí que ha fijado MRLs para algunos plaguicidas en salmón.

Este estudio tiene como objetivo desarrollar un método de cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización por electrospray (UHPLC-ESI-MS/MS) que permita el análisis simultáneo de una amplia gama de residuos en muestras de pescado con alto contenido graso. Para cubrir una amplia gama de polaridades, se seleccionaron 65 plaguicidas y 41 medicamentos veterinarios con diferentes valores de Log K_{ow} , entre -1.4 y 5.5. Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C_{18} y una fase móvil compuesta por agua y acetonitrilo (ambos con un 0.1% de ácido fórmico). Se realizó una optimización de la separación cromatográfica debido a los diferentes Log K_{ow} de los analitos seleccionados. Finalmente, la separación se realizó con un programa de elución en gradiente de 16 minutos. Se utilizó un analizador de triple cuadrupolo, en modo de adquisición de monitorización múltiple de transiciones MS/MS (MRM) y una interfase tipo ESI operando en modo positivo. Finalmente, para la cuantificación de los analitos se empleó la m/z del ion precursor, $([M+H]^+)$, la m/z de dos iones producto característicos y su tiempo de retención.

En cuanto al tratamiento de muestra, se empleó la metodología QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”); pero con una modificación en la etapa de limpieza, la cual se basa en una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) con un sorbente específico para reducir el número de especies co-extraídas. El análisis de matrices grasas, como el salmón, no es una tarea fácil, ya que está compuesto por 65% agua, 20% proteína, 14% grasa y otras especies. Estos componentes del alimento podrían permanecer en el extracto final, con lo que normalmente se obtiene un efecto matriz fuerte. Así que, con el objetivo de mejorar el protocolo QuEChERS para el análisis de matrices grasas, se evaluó por primera vez el sorbente de limpieza Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) para determinar estos plaguicidas y medicamentos veterinarios en muestras de salmón.

El sorbente EMR-Lipid proporcionó una interacción altamente selectiva y efectiva con los lípidos. La recuperación, precisión y efecto matriz fueron satisfactorios para la mayoría de los analitos. Los resultados obtenidos en términos de sensibilidad y veracidad fueron similares a los obtenidos por otros autores, pero el efecto matriz se reducía significativamente. El efecto matriz fue despreciable para el 57% de los analitos, mientras que el resto presentó un efecto matriz suave. La recuperación se encontraba dentro de los niveles recomendados por la UE para la mayoría de los compuestos. Y los límites de cuantificación (LOQs) fueron inferiores a $3.7 \mu\text{g kg}^{-1}$. En consecuencia, resultó muy beneficiosa la incorporación de un sorbente de limpieza específico, como EMR-Lipid, a la metodología QuEChERS en lugar de los sorbentes clásicos, como amina primaria secundaria (PSA) y C_{18} para analizar muestras de pescado con alto contenido graso. Finalmente, la metodología propuesta fue aplicada a 20 muestras de salmón, en las que se encontraron residuos de plaguicidas o medicamentos veterinarios en 5 de ellas. Se obtuvieron algunos hallazgos notables, como presencia de metronidazol, sustancia no autorizada, lo que revela la necesidad de mejorar los métodos actuales.

SUMMARY

Nowadays, fish products are considered one of the most consumed foodstuffs. Due to the high demand of fish products, aquaculture has been responsible for the continuing growth in the supply of fish for human consumption. Atlantic salmon is one of the most demanded aquaculture products, so it was selected as the model matrix. Owing to the crash cultivation methods, that imply the use of formulated feeds that contain veterinary drugs and the presence of pesticides that are continuously poured into the aquatic environment, the health of the costumers has to be protected. For that reason, the European Union (EU) has set Maximum Residue Limits (MRLs) for veterinary drugs in animal-origin commodities, meanwhile, MRLs for pesticide residues have not been established in fish products yet. However, it should be noted that MRLs for a certain number of pesticides in salmon has been fixed in the USA.

Therefore, this study aimed to develop a single ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using an electrospray ionization source (UHPLC-ESI-MS/MS) method to analyze simultaneously a wide range of residues in fatty fish samples. To cover a wide range of polarities, 65 pesticides and 41 veterinary drugs with Log K_{ow} ranging from -1.4 to 5.5 were selected. Thus, a C_{18} column and a mobile phase consisting of water and acetonitrile (both containing 0.1% formic acid) were employed. An optimization of the chromatographic separation was necessary owing to the different Log K_{ow} values of the selected analytes. Then, the separation was performed with a 16 minutes gradient elution program. A triple quadrupole analyzer employing the Multiple Reaction Monitoring (MRM) scan mode was used, and the ESI source operated in positive mode. Finally, the analytes were characterized through the mass of the precursor ion, $([M+H]^+)$, the mass of two characteristic product ions and their retention time.

QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) methodology was proposed as the sample treatment, with a modification in clean-up step. This clean-up consists of a dispersive solid phase extraction (d-SPE) using a specific sorbent in order to reduce the number of co-extracted species of the matrix. However, the analysis of fatty matrices, like farmed salmon, is not an easy task. Its composition is 65% water, 20% protein, 14% fat, and minority compounds. These components could remain in the final extract, significantly affecting the analytical response, so, the obtained matrix effect is usually strong. To improve the QuEChERS performance for the analysis of fatty matrices, Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) sorbent was evaluated for the first time for the simultaneous determination of pesticides and veterinary drugs in salmon samples.

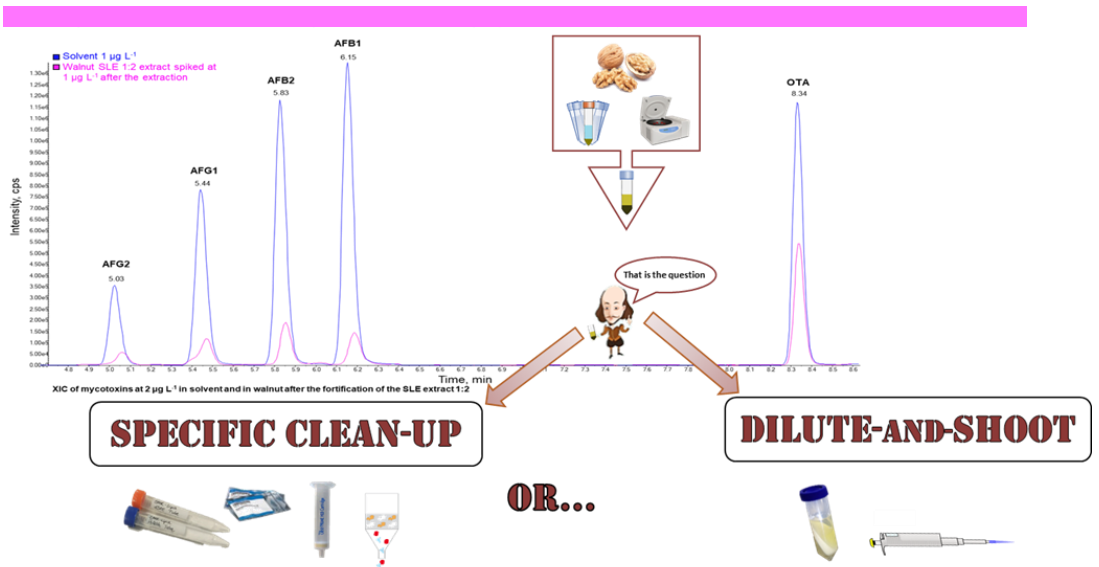
EMR-Lipid provided a highly selective and efficient interaction with lipids, providing excellent extraction efficiency, precision, and matrix effect for most studied compounds. The sensitivity and trueness achieved were similar to those obtained by other reports. Furthermore, the present results in terms of matrix effect have been remarkably improved compared to the other studies. A negligible matrix effect was obtained for 57% of the studied compounds, whereas the rest presented a soft matrix effect. The recovery for spiked samples agreed the EU guidelines for most compounds. Limits of Quantification (LOQs) were lower than $3.7 \mu\text{g kg}^{-1}$ in all cases. Consequently, selecting a specific clean-up sorbent to remove co-extracted compounds, as EMR-Lipid, should be incorporated in the QuEChERS methodology to analyze fatty fish samples instead of the classic d-SPE sorbents such as primary secondary amine (PSA) and C_{18} . Finally, the method performance was successfully demonstrated with 20 salmon samples, and pesticide or veterinary drug residues were found in 5 of the market samples. Some remarkable findings were obtained, such as non-authorized metronidazole, thus revealing the need to improve the current methods.

CAPÍTULO 4

Dilute-and-shoot frente al empleo de una etapa de limpieza específica: Evaluación exhaustiva para la determinación de micotoxinas en frutos secos mediante UHPLC-MS/MS

CHAPTER 4

Dilute-and-shoot versus clean-up approaches: A comprehensive evaluation for the determination of mycotoxins in nuts by UHPLC-MS/MS





Contents lists available at ScienceDirect

LWT

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



Dilute-and-shoot *versus* clean-up approaches: A comprehensive evaluation for the determination of mycotoxins in nuts by UHPLC-MS/MS[☆]

Delia Castilla-Fernández^a, Priscilla Rocío-Bautista^a, David Moreno-González^{a,b,*}, Juan F. García-Reyes^{a,b}, Antonio Molina-Díaz^{a,b}

^a Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, Campus las Lagunillas 1/n, 23071, Jaén, Spain
^b University Research Institute for Olives Grove and Olive Oil, University of Jaén, Campus Las Lagunillas, 23071, Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Mycotoxins
 Matrix effect
 Fatty matrices
 Dilute-and-shoot
 Clean-up

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic metabolites naturally occurring in foodstuffs stored in warm, humid conditions. Ochratoxin A, aflatoxins B1, B2, G1, and G2 are known for their adverse health effects. Thus, EU permitted levels are set as low as $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ for nuts. This study examined solid-liquid extraction (SLE) to isolate mycotoxins from walnuts, followed by UHPLC-MS/MS analysis. However, the strong matrix effect obtained is the main limitation of analyzing mycotoxins in fatty matrices, like nuts. To overcome this problem, 6 clean-ups intended for fatty matrices (PRiME HLB, EMR-Lipid, AFFINIMIP cartridges, Z-sep⁺, C₁₈, and PSA) were tested in terms of matrix effect, cleanliness of the extract, and co-extractives removal. Nevertheless, none of these clean-ups effectively reduced the strong matrix effects encountered by the SLE. So, the addition of more steps would not be profitable in terms of time, cost, and residues generation. As an alternative, the streamlined, cheap, simple, and fast "dilute-and-shoot" approach was tested. This work shows that by applying 1:100 dilution of SLE extract, obtained matrix effect was soft or negligible. Finally, a 1:100 dilute-and-shoot method was proposed and validated according to EU regulations. LOQs fulfilled EU requirements and satisfactory values were obtained for recovery and precision.

RESUMEN

Las micotoxinas son contaminantes producidos por ciertos mohos que crecen de forma natural bajo condiciones cálidas y húmedas. Esta contaminación puede ocurrir a lo largo de toda la cadena alimentaria y normalmente afecta a los productos agrícolas. Las aflatoxinas (AFs) y la ocratoxina A (OTA) son las micotoxinas detectadas con mayor frecuencia en los controles europeos. Además, es bien sabido que las micotoxinas se consideran uno de los contaminantes más peligrosos para la salud. Por esa razón, la Unión Europea (UE) ha establecido límites máximos permitidos tan bajos como $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para AFB1 en frutos secos. Por ello, son necesarios métodos analíticos muy sensibles, con bajos límites de detección, específicos, precisos y exactos para el análisis de estos compuestos. Por lo que las autoridades europeas recomiendan el uso de cromatografía acoplada a espectrometría de masas para la detección y cuantificación de micotoxinas.

Este trabajo se centra en el análisis de AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 y OTA, cuyo $\text{Log } K_{ow}$ oscila entre 0.4 y 4.4. Se usó un equipo de cromatografía líquida de ultra alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización por electrospray (UHPLC-ESI-MS/MS), utilizando un analizador de triple cuadrupolo, pero siendo el tercer cuadrupolo una trampa de iones lineal. La separación se realizó mediante un modo de elución en gradiente, empleando una columna C_{18} y una fase móvil compuesta por agua y metanol, ambos con 0.1% de ácido fórmico. La fuente de ionización por ESI (Ion Drive Turbo V) operaba en modo positivo, detectando como ion precursor la molécula protonada, $[M+H]^+$, para todos los analitos. Para la detección y cuantificación de las micotoxinas el analizador operó en modo de adquisición monitorización múltiple de transiciones MS/MS programada (Scheduled MRM). Además, en los experimentos en los que se deseaba evaluar la limpieza de los extractos, este mismo equipo se utilizó en modo de adquisición Full Scan.

Las nueces, matriz seleccionada para este estudio, solo contiene un 4% de agua. Y tiene una concentración muy alta de lípidos (65%), proteínas (15%) y carbohidratos (14%), con lo cual son el principal obstáculo a la hora de obtener un extracto limpio. Por ello, en otros estudios se suele obtener un efecto matriz fuerte. Con el objetivo de minimizarlo, después de una extracción sólido-líquido (SLE), en este trabajo se evaluaron 6 protocolos de limpieza: (i) extracción en fase sólida (SPE), en modo pass-through, utilizando los cartuchos Oasis HLB PRiME (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”), (ii) una extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), utilizando el sorbente EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid), (iii) una SPE empleando polímeros de impronta molecular (MIPs) AFFINIMIP, y una d-SPE basada los sorbentes (iv) Z-sep⁺ o (v) C₁₈ o (vi) amina secundaria primaria (PSA).

Ninguna de estas sorbentes redujo eficazmente el fuerte efecto matriz de la SLE. Por tanto, la inclusión de más etapas no sería una estrategia rentable en términos de tiempo, costo y generación de residuos. Como alternativa, se probó el enfoque directo, económico, simple y rápido de "Dilute-and-shoot", evaluando 10 factores diferentes de pre-concentración y dilución. Con una dilución 1:100, el efecto matriz era despreciable o suave para todos los analitos. Con lo que éste fue el método propuesto y validado de acuerdo a la normativa de la UE. Se obtuvieron resultados satisfactorios en términos de sensibilidad, recuperación y precisión.

Este trabajo concluye que metodologías sencillas, en determinadas aplicaciones, podrían aprovechar al máximo el potencial de la avanzada instrumentación y contribuir al rápido desarrollo de métodos con un efecto matriz despreciable, reduciendo el precio y consumo de tiempo y materiales. El enfoque de Dilute-and-shoot, con la utilización un factor de dilución alto como 1:100, podría ser suficiente para eliminar el efecto matriz en determinadas aplicaciones. Sin embargo, su principal limitación es que los equipos deben ser lo suficientemente sensibles para detectar los analitos correctamente.

SUMMARY

Mycotoxins are natural contaminants produced by certain moulds that naturally grow under warm and humid conditions. This contamination can occur along the whole food chain and normally affects agricultural commodities. Aflatoxins (AFs) and Ochratoxin A (OTA) are the most frequently detected mycotoxins in the European controls. It is well known that mycotoxins are considered one of the most dangerous contaminants. For that reason, the European Union (EU) has set maximum permitted levels as low as from 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for AFB1 in nuts. Therefore, sensitive analytical methods with low limits of detection, specificity, precision and accuracy are required for the analysis of these compounds, being chromatography coupled to mass spectrometry highly recommended by the authorities.

In this work, the analysis of AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and OTA, whose Log K_{ow} ranges from 0.4 to 4.4., was performed by an ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using an electrospray ionization source (UHPLC-ESI-MS/MS) instrument, employing a Triple Quadrupole-Linear Ion Trap-Mass Spectrometer. The separation was performed in gradient elution mode using a C_{18} column and a mobile phase consisting of water and methanol, both containing 0.1% of formic acid. The ESI ionization source (Ion Drive Turbo V) was used operating in positive mode. The protonated precursor ion was obtained for all the analytes, $[M+H]^+$. Besides, for detection and quantification of the analytes. in the Scheduled Multiple Reaction Monitoring (sMRM) scan mode. In addition, this same instrument was employed for the full scan acquisition experiments in order to see the cleanliness of the obtained extracts.

Walnut, the selected matrix for this study, only contains 4% of water. It has a very high concentration of lipids (65%), proteins (15%), and carbohydrates (14%), which is the main drawback in order to obtain a clean extract. For that reason, a strong matrix effect is frequently obtained in other studies. To overcome this problem,

after a solid-liquid extraction (SLE) step, 6 different clean-ups were tested in terms of matrix effect, cleanliness of the extract, and co-extractives removal efficiency: (i) solid phase extraction (SPE), in pass-through mode, using the Oasis HLB PRiME cartridges (“Hydrophilic Lipophilic Balance” “Process Robustness improvements of Matrix effects Ease of use”), (ii) dispersive solid phase extraction (d-SPE), using EMR-Lipid (Enhanced Matrix Removal-Lipid) as sorbent, (iii) a SPE using AFFINIMIP Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) cartridges, and d-SPE sorbents sorbentes (iv) Z-sep⁺, or (v) C₁₈, or (vi) primary secondary amine (PSA).

Nevertheless, none of these clean-ups effectively reduced the strong matrix effects encountered by the SLE. Consequently, the addition of more steps would not be profitable in terms of time, cost, and residues generation. As an alternative, the streamlined, cheap, simple, and fast “dilute-and-shoot” approach was tested, evaluating 10 different pre-concentration and dilution factors. This work shows that by applying 1:100 dilution of SLE extract, obtained matrix effect was soft or negligible for the selected analytes. Finally, a 1:100 dilute-and-shoot method was proposed and validated according to the EU regulations. Limits of quantification (LOQs) fulfilled EU requirements and satisfactory values were obtained for recovery and precision.

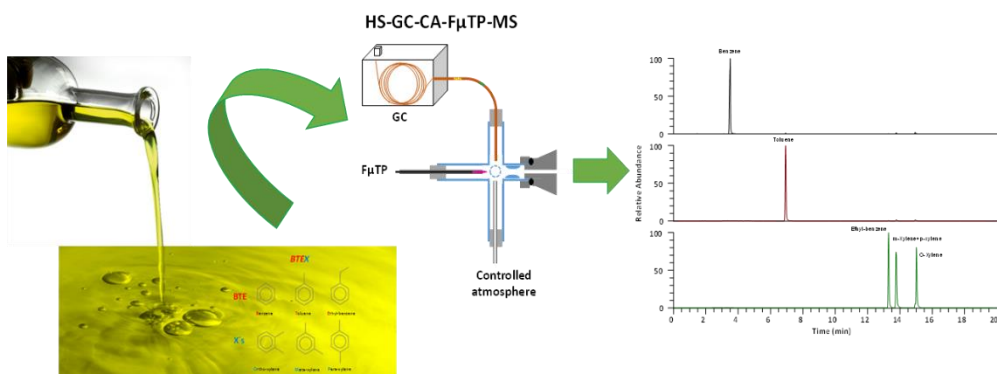
The present experiments concluded that more straightforward methodologies could take full advantage of the potential of the instrumentation and contribute to the development of fast, matrix effect free and reduce the consumption of materials and solvents and, thus, residues generation. However, its main limitation is that LC-MS instruments should be sensitive enough to detect analytes properly. However, if the chromatography separation has an acceptable resolution and the instrumentation is sufficiently sensitive, the dilution-and-shoot approach, using a high dilution factor like 1:100, could be enough to eliminate matrix effects.

CAPÍTULO 5

Evaluación de una nueva fuente de ionización suave en atmosfera controlada basada en plasma de microtubo flexible para la determinación BTEX en aceite de oliva mediante HS-GC-MS

CHAPTER 5

Evaluation of a novel controlled-atmosphere flexible microtube plasma soft ionization source for the determination of BTEX in olive oil by HS-GC-MS





Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Evaluation of a novel controlled-atmosphere flexible microtube plasma soft ionization source for the determination of BTEX in olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry



David Moreno-González^{a, b, *}, Delia Castilla-Fernández^b, Pascal Vogel^a, Guanghui Niu^a, Sebastian Brandt^a, Carolin Drees^a, Juan F. García-Reyes^b, Antonio Molina-Díaz^{b, c}, Joachim Franzke^a

^a IAS-Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften, Dortmund, 44139, Germany

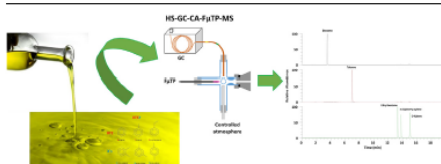
^b Analytical Chemistry Research Group, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Jaén, 23071, Jaén, Spain

^c Center for Advanced Studies in Olives Grove and Olive Oils (CEAOGAO), Science and Technology Park CEOLIT 23620, Mengibar, Spain

HIGHLIGHTS

- Evaluation of the analytical performance of CA-FuTP source for GC-MS.
- The proposed interface provided a no fragmented spectrum.
- Sensitivity matching commercial electronic impact ionization.
- The proposed GC-CA-FuTP-MS method was applied for the analysis of BTEX in olive oil samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2021

Received in revised form

28 June 2021

Accepted 4 July 2021

Available online 7 July 2021

Keywords:

BTEX

Gas chromatography

Mass spectrometry

Plasma

Ambient ionization source

Olive oil

ABSTRACT

Although electron impact ionization (EI) remains the standard ionization source for GC-MS, it presents extensive fragmentation as its main limitation. The potential of a novel plasma-based soft ionization source named controlled-atmosphere flexible microtube plasma (CA-FuTP) has been evaluated in this work for the determination of monoaromatic volatile BTEX group (namely benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-, *m*- and *p*-xylenes) in olive oil, based on headspace technique. The obtained results show an attractive advantage over EI due to no fragmentation was observed. A nitrosated ion $[M + NO]^+$ is obtained as the most abundant species. Thus, the BTEX mass spectrum identification can be carried out without major effort. In general, the sensitivity for CA-FuTP was comparable to those obtained by EI, achieving LODs ranged from 0.6 to 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The potential usefulness of GC-CA-FuTP-MS for the detection of BTEX was demonstrated by analyzing olive oil samples and identifying traces of these compounds in one sample. Therefore, the proposed plasma-based soft ionization is suitable for BTEX analysis in fatty complex matrices as olive oil.

© 2021 Published by Elsevier B.V.

RESUMEN

El grupo de hidrocarburos monocíclicos aromáticos denominados BTEX es considerado como contaminantes prioritarios. Dicho grupo debe su nombre a estar constituido por benceno, tolueno, etilbenceno y o-, m- y p-xilenos. Como consecuencia de su alta volatilidad, están ampliamente extendidos en el medio ambiente, lo cual es la razón principal de su transferencia a los alimentos. En este contexto, la acumulación de BTEX en el aceite de oliva virgen extra puede ser especialmente peligrosa debido al carácter lipofílico de estos compuestos. Los procesos de refinamiento en la obtención de aceites reducen la presencia de BTEX en el producto final. Sin embargo, por las propias características del producto, en los aceites de oliva virgen no se permite el empleo de procesos de refinación para su obtención, con lo que la presencia de BTEX es mayor. Debido a la creciente demanda de alimentos de excelente calidad como el aceite de oliva virgen extra, el desarrollo de métodos analíticos que permitan determinar la presencia de BTEX es esencial para garantizar la seguridad alimentaria.

En este estudio se lleva a cabo la determinación de BTEX en aceite de oliva mediante cromatografía de gases en espacio de cabeza acoplada a espectrometría de masas (HS-GC-MS). La novedad de trabajo reside en la evaluación del potencial de una fuente de ionización suave basada en un diseño de descarga miniaturizado llamado plasma de microtubo flexible en atmósfera controlada (CA-F μ TP). Además, esta fuente de ionización propuesta se compara con la fuente más empleada tradicionalmente en GC, la de impacto electrónico (EI). El empleo de EI como fuente de ionización produce fragmentación más extensa, lo cual se demostró en este trabajo para el análisis de BTEX. Esta abundante fragmentación es la principal limitación de esta técnica, aunque la ionización por EI sigue siendo la más utilizada en el acoplamiento GC-MS. Por el contrario, el empleo de CA-F μ TP es una alternativa interesante debido a que apenas se observa fragmentación. El CA-F μ TP es una fuente de ionización suave y que ofrece una sensibilidad adecuada para estos

compuestos monoaromáticos. En el espectro se observa como especie más abundante el aducto $[M+NO]^+$. El sistema GC-CA-F μ TP-MS para la detección de BTEX se aplicó en el análisis de aceite de oliva. La detección de BTEX a través de su ion nitroso supuso una gran ventaja respecto a la reducción de especies interferentes. Esto es debido a que la mayoría de las sustancias coeluidas ionizan en su forma protonada, $[M+H]^+$, con lo cual no supone una competición en el proceso de ionización de los analitos. Consecuentemente, la utilización de CA-F μ TP en el proceso de ionización supone un gran avance en el análisis de matrices complejas, como puede ser el aceite de oliva. Ya que facilita mucho la identificación y cuantificación de BTEX, además de que los efectos matriz obtenidos en este trabajo son nulos o bajos. Los Límites de Detección (LODs) alcanzados empleando CA-F μ TP se encontraban en el rango 0.6 a 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, lo que indica que su sensibilidad es equivalente a obtenida mediante EI. Los porcentajes de recuperación se encontraban entre 97.2% a 105.3%, lo que indicaba que el método propuesto es adecuado para el análisis de BTEX en aceite de oliva. La precisión también fue estudiada, y se obtuvieron valores de RSD por debajo de 15%. Por último, con el objetivo de estudiar la aplicabilidad del método, se analizaron 10 muestras comerciales de aceite de oliva. Se detectaron trazas de benceno y tolueno en una de las muestras analizadas. Aunque cabe destacar que la concentración encontrada era inferior al límite máximo recomendado. Como conclusión, se demostró que esta metodología empleando una fuente de ionización suave basada en plasma a baja temperatura, CA-F μ TP, es adecuada para el análisis de BTEX en matrices complejas como el aceite de oliva.

SUMMARY

A single-aromatic volatile BTEX group, namely benzene, toluene, ethylbenzene, and o-, m- and p-xylenes, are considered priority pollutants due to their cancerogenic nature and wide distribution in the environment, which is the main reason of their transfer to food samples. On this matter, BTEX accumulation in extra virgin olive oil could be especially harmful owing to the lipophilic character of these compounds. Due to their high volatility BTEX concentration can be reduced by oil refining processes, however no refining processes are allowed to obtain the extra virgin oil. Because the increasing demand of top quality extra virgin olive oil, the development of analytical methods for the determination of BTEX is crucial to ensure the food safety.

This study performed the determination of monoaromatic volatile BTEX group in olive oil by headspace-gas-chromatography/mass-spectrometry (HS-GC-MS). The novelty of this work lies in the evaluation of the potential of a recent plasma-based soft ionization source named controlled-atmosphere flexible microtube plasma (CA-F μ TP) instead of the traditional electron impact (EI) ionization. The typical significant fragmentation was observed using the EI source for the analysis of BTEX. Although, EI remains the standard ionization source for GC-MS, this extensive fragmentation is its main limitation. By contrast, the obtained results using CA-F μ TP showed an attractive advantage over EI due to no fragmentation was observed. The CA-F μ TP offered a soft ionization and an adequate sensitivity for these monoaromatic compounds. The proposed interface provided a no fragmented spectrum, in which the nitrosated ion $[M+NO]^+$ is obtained as the most abundant species. Thus, the BTEX mass spectrum identification can be carried out without major effort. The potential usefulness of GC-CA-F μ TP-MS for the detection of BTEX was demonstrated by analyzing olive oil samples. The formation of nitrosated ions was advantageous for analyzing BTEX in a complex matrix as olive oil, due to most of the interferences were detected as $[M+H]^+$. Thus, the co-eluted interference does not affect the

ionization process, showing the advantages of the developed CA-F μ TP ionization source for analyzing complex matrices. Therefore, their identification and quantification were easier, and matrix effect can be soft or negligible. In general, the sensitivity for CA-F μ TP was comparable to those obtained by EI, achieving Limits of Detection (LODs) ranged from 0.6 to 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The accuracy was estimated by recovery rates which ranged from 97.2% to 105.3%, indicating that the proposed method is suitable to be employed for the quantitative detection of BTEX in olive oil. Precision (intraday and interday) was also studied achieving RSD values lower than 15% in all cases. Finally, the applicability of the method was estimated by analyzing 10 market samples. Traces of benzene and toluene were detected in one sample, being the total concentration detected lower the maximum recommended value. In conclusion, the proposed plasma-based soft ionization is suitable for the analysis of BTEX in fatty complex matrixes as olive oil.

CONCLUSIONES



En esta tesis se han desarrollado una serie de alternativas enfocadas a la reducción del efecto matriz para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos con un alto contenido graso. Normalmente, las metodologías empleadas para la determinación de contaminantes y residuos en estos alimentos presentan un efecto matriz fuerte que requiere su compensación. Además, un elevado efecto matriz afectaba a todo el proceso analítico: sensibilidad, robustez, precisión, selectividad y veracidad. Por tanto, la determinación de residuos y contaminantes se veía comprometida. Con el fin de la reducción del efecto matriz en diferentes matrices grasas se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. El empleo la técnica UHPLC-ESI-MS/MS ha permitido el desarrollo de metodologías analíticas muy sensibles y selectivas adecuadas, de acuerdo con las exigencias de la regulación vigente, para la determinación de compuestos con un amplio rango de polaridad: plaguicidas, medicamentos de uso veterinario y micotoxinas
2. En el estudio de 66 medicamentos de uso veterinario en leche (2-5% de grasa) mediante UHPLC-ESI-MS/MS, se comprobó que la SPE en modo *pass-through* con HLB PRiME era mejor alternativa que el protocolo EMR-Lipid en términos de efecto matriz y rapidez del proceso. No obstante, cabe destacar que los resultados obtenidos mostraron la idoneidad de ambos tratamientos de muestra en términos de efecto matriz, limpieza de extractos, recuperación, precisión y sensibilidad.
3. Para el estudio de la cuantificación mediante UHPLC-ESI-MS/MS del plaguicida fipronil y 3 metabolitos en muestras de huevo (12% de grasa), se concluyó que la metodología QuEChERS seguida de una etapa de *clean-up* con el sorbente EMR-Lipid, en comparación con una limpieza con HLB PRiME o PSA, fue la más conveniente en términos de recuperación, efecto matriz y limpieza de los extractos.

4. Se evaluó por primera vez el uso de la metodología QuEChERS empleando el protocolo de EMR-Lipid en la etapa de limpieza para la determinación multirresiduo de 65 plaguicidas y 41 medicamentos veterinarios mediante UHPLC-ESI-MS/MS en muestras de salmón (14% de grasa). El uso del sorbente EMR-Lipid minimizaba el efecto matriz significativamente, siendo suave o despreciable para todos los analitos; mientras que, en otros estudios similares que proponían los sorbentes convencionales, como el C₁₈ y/o PSA, se obtenían unos efectos matriz fuertes.
5. Se evaluaron 6 sorbentes como etapa de limpieza para la determinación de micotoxinas (ocratoxina A y aflatoxinas B1, B2, G1 y G2) en muestras de nueces (65% de grasa) mediante UHPLC-ESI-MS/MS. Estos sorbentes consistían en: HLB PRiME, EMR-Lipid, MIPs, Z-sep⁺, C₁₈, PSA. Se encontró que ninguno ellos reducía efectivamente el fuerte efecto matriz obtenido en la etapa de extracción y permitía la correcta recuperación de los analitos al mismo tiempo. Como alternativa, se probó el enfoque económico, simple y rápido de *Dilute-and-Shoot*, consistente en una simple extracción de la muestra seguida de una dilución previa a su análisis instrumental. Se evaluaron 10 factores, teniendo en cuenta tanto una preconcentración como dilución del extracto obtenido. Finalmente, se determinó que la dilución 1:100 era la más conveniente, ya que era un factor de compromiso entre el efecto matriz, la limpieza de los extractos y la sensibilidad del método.
6. Para el estudio de BTEX en muestras de aceites de oliva (100% de grasa) se empleó la técnica de extracción de espacio de cabeza previa al análisis por GC-MS. Normalmente, se utiliza la ionización por EI para el acoplamiento de estas dos técnicas. La novedad de este trabajo reside en la evaluación del potencial de la reciente fuente de ionización suave basada en un diseño de descarga miniaturizado llamado "*controlled-atmosphere flexible microtube*

plasma” (CA-F μ TP) en sustitución de la fuente EI. El potencial del sistema GC-CA-F μ TP-MS para la detección de BTEX a través de los aductos [M+NO]⁺, supuso una gran ventaja a la hora de conseguir una ionización más selectiva, por lo que el efecto matriz obtenido fue nulo o bajo. Además, los límites de detección alcanzados empleando CA-F μ TP se encontraban por debajo de 1,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, lo que indica que su sensibilidad es equivalente a obtenida mediante EI.

CONCLUSIONS



this doctoral thesis, a series of alternatives focused on reducing the matrix effect in fatty matrices have been discussed. Methodologies that are usually employed for the determination of contaminants and residues in fatty foods entail a strong matrix effect that required compensation approaches. Additionally, a strong matrix effect affects the entire analytical process: sensitivity, robustness, precision, selectivity, and veracity. Therefore, the determination of residues and contaminants is compromised. In order to reduce the matrix effect in different fatty matrices, the following conclusions have been obtained:

1. The use of the UHPLC-ESI-MS/MS technique has allowed the development of highly sensitive and selective analytical methodologies suitable for the determination of compounds with a wide range of polarity: pesticides, veterinary drugs, mycotoxins and BTEX. Additionally, it fulfils the UE regulation criteria for quantification purposes, providing limits of detection and quantification below the established EU limits.
2. In the study the determination of 66 veterinary drugs in milk (2-5% fat) using UHPLC-ESI-MS/MS was proposed. It was verified that using an SPE in pass-through mode using HLB PRiME as sorbent was a better alternative compared to the EMR-Lipid protocol in terms of matrix effect and speed of the process. However, it should be noted that the results obtained showed the suitability of both sample treatments in terms of matrix effect, extract clean-up, recovery, precision, and sensitivity.
3. UHPLC-ESI-MS/MS was employed for the quantification of fipronil and 3 of its metabolites in egg samples (12% fat). It was concluded that the QuEChERS methodology followed by a clean-up step with the EMR-Lipid sorbent, compared to a clean-up with HLB PRiME or PSA, was the most convenient in terms of recovery, matrix effect, and clean-up of the extracts.

4. The EMR-Lipid clean-up step within the QuEChERS methodology was evaluated for the first time for the multi-residue determination of 65 pesticides and 41 veterinary drugs by UHPLC-ESI-MS/MS in salmon samples (14 % of fat). Similar studies employed traditional QuEChERS sorbents, such as C₁₈ and/or PSA, obtaining strong matrix effects. However, the EMR-Lipid sorbent significantly minimized the matrix effect compared to those studies, because a soft or negligible matrix effect was obtained for all analytes with the EMR-Lipid protocol.
5. Six different sorbents were evaluated as the cleaning step for the determination by UHPLC-ESI-MS/MS of mycotoxins (ochratoxin A and aflatoxins B1, B2, G1, and G2) in walnut samples (65% fat). These sorbents consisted of: HLB PRiME, EMR-Lipid, Z-sep⁺, PSA, C₁₈ and Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). However, none of them effectively reduced the strong matrix effect obtained in the extraction step and obtained a satisfactory recovery at the same time. As an alternative, the straightforward, economical, simple and fast approach of Dilute-and-Shoot was tested. This procedure consisted of a simple extraction of the sample and a dilution of the obtained extract previous to the instrumental analysis. In this study 10 different factors, including pre-concentration and dilution of the obtained extracts, were studied. It was concluded that a 1:100 dilution acted as a compromise factor between the matrix effect, cleanliness of the extracts and the sensitivity of the method.
6. For the BTEX determination in olive oil samples (100% fat) the headspace extraction technique was used prior to an analysis by GC-MS. EI ionization is normally used for the coupling of both techniques. The novelty of this work lies on the evaluation of the potential of the recent soft ionization source based on a miniaturized discharge design called "controlled-atmosphere flexible microtube plasma" (CA-FμTP) instead of the EI source. The potential of the GC-

CA-F μ TP-MS system for the detection of BTEX through their [M+NO]⁺ adducts was a great advantage due to a more selective ionization was achieved. Thus, a negligible or soft matrix effect was obtained. In addition, the detection limits using CA-F μ TP were below 1.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$, which indicates that its sensitivity is equivalent to that obtained by EI.

